

Importancia de las proteínas G heterotriméricas en la biología molecular del cáncer de próstata

J.C. Prieto Villapun*, R.M. Solano Haro*, M.J. Carmena Sierra*, M. Sánchez-Chapado**.*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. **Departamento de Cirugía, Universidad de Alcalá.

***Servicio de Urología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares.

Actas Urol Esp 2005; 29 (10): 948-954

RESUMEN

IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

Objetivo: Profundizar en el conocimiento de la implicación de las subunidades α_s y α_i de las proteínas G heterotriméricas en el cáncer prostático humano.

Métodos: Tejido prostático de 9 pacientes sometidos a prostatectomía radical por cáncer prostático y 5 controles sometidos a cistoprostatectomía por carcinoma de vejiga. Se analizó la expresión de subunidades α_s y α_i (mRNA por RT-PCR y proteína por Western-blot), funcionalidad (actividad adenilil ciclasa, AC) y posibilidad de mutaciones (análisis de restricción enzimática y secuenciación del cDNA).

Resultados: A nivel de mRNA, se detectó la expresión de subunidades α_s , α_{11} , α_{12} y α_{13} en tejidos sanos y cancerosos. A nivel de proteína, la expresión de subunidades α_s y $\alpha_{11,2}$ disminuyó (25% y 40%, respectivamente) en el cáncer de próstata. También disminuyó la expresión de $\alpha_{13,0}$, mientras que la de β no se modificó. La actividad basal AC en membranas de adenocarcinoma fue 40% inferior al control. La digestión con enzimas de restricción Eag I o AlwN I no permitió localizar mutaciones en α_s . Sin embargo, la digestión a nivel de α_{12} con BstU I sirvió para observar en tejido canceroso un cambio de Gln²⁰⁵ (tripleto CAG) a Pro (CCG).

Conclusiones: La funcionalidad y expresión de las subunidades de las proteínas G heterotriméricas están modificadas selectivamente en el adenocarcinoma prostático humano, concurriendo además alguna mutación puntual. La sustitución observada de Glu²⁰⁵ por Pro puede conllevar que la proteína α_{12} resultante tenga muy baja actividad GTPasa y, por tanto, se encuentre estabilizada en su forma activa.

Palabras clave: Cáncer de próstata. Proteínas G. Expresión. Mutaciones.

ABSTRACT

IMPORTANCE OF HETEROTRIMERIC G PROTEINS IN PROSTATE CANCER MOLECULAR BIOLOGY.

Objective: To deep in the knowledge of the involvement of G-protein α_s and α_i subunits in human prostate cancer.

Methods: Prostate tissue from 9 patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer and 5 controls undergoing cystoprostatectomy for bladder carcinoma. G-protein α_s and α_i subunits were studied for expression (mRNA by RT-PCR and protein by Western-blot), functionality (adenylyl cyclase activity, AC) and possibility of mutations (analysis with restriction enzymes and cDNA sequestration).

Results: At mRNA level, the expression of α_s , α_{11} , α_{12} y α_{13} was detected in healthy and cancerous tissues. At protein level, the expression of α_s y $\alpha_{11,2}$ diminished (25% and 40%, respectively) in prostate cancer. The expression of $\alpha_{13/0}$ also diminished, whereas that of β subunit was not modified. Basal AC activity in adenocarcinoma membranes was 40% inferior to the control. Digestion with restriction enzymes Eag I or AlwN I did not allow to locate mutations in α_s . However, digestion at α_{12} level with BstU I enzyme served to observe a change of Gln²⁰⁵ (CAG triplet) to Pro (CCG).

Conclusions: The functionality and expression of heterotrimeric G proteins are selectively modified in human prostate adenocarcinoma, occurring in addition some punctual mutation. The observed substitution of Gln²⁰⁵ by Pro may result in a low GTPase activity for α_{12} that, therefore, is stabilized in its active form.

Keywords: Prostate cancer. G proteins. Expression. Mutations.

Las proteínas G heterotriméricas son esenciales para numerosos aspectos fisiológicos y patológicos¹⁻³. Actúan como transportadores de la información de muchas hormonas, neurotransmisores, quimioquinas y factores autocrinos y paracrinos a través de la membrana plasmática; las señales extracelulares son recogidas por receptores de una gran superfamilia (GPCRs) que presentan siete regiones transmembrana y están acoplados a proteínas G, activándolas^{4,5}. En este panorama han aparecido recientemente nuevos e interesantes componentes como son las proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMPs) y las proteínas reguladoras de la señalización por proteínas G (proteínas RGS)⁶. Las proteínas G, localizadas en la cara interna de la membrana, están formadas por tres subunidades, α , β y γ , de las que se han identificado hasta la fecha 27, 5 y 14 isoformas, respectivamente⁷. La subunidad α presenta actividad GTPasa intrínseca. Cuando los GPCRs son activados por un estímulo adecuado, el receptor interacciona con las proteínas G y cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , lo que induce la disociación del complejo heterotrimérico en α -GTP y $\beta\gamma$, iniciándose toda una compleja cascada de eventos intracelulares. Así, α -GTP interacciona con efectores tales como las enzimas adenilil ciclasa (AC), fosfolipasa C β (PLC β) y la fosfodiesterasa de GMP cíclico. Por su parte, $\beta\gamma$ interacciona y regula distintos efectores como algunas AC y fosfolipasa A_2 . Intervienen a nivel intracelular enzimas tan importantes como proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y proteína quinasas activables por mitógenos (MAPKs). Se ponen así en marcha diferentes rutas de señalización integradas por múltiples elementos en un puzzle que, finalmente, desemboca en la regulación de actividades celulares tan importantes como la transcripción de la información genética, proliferación, diferenciación, secreción o motilidad^{8,9}. Por su parte, la actividad GTPasa de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP, induciendo la reasociación del trímero $\alpha\beta\gamma$ y la inactivación de la proteína G. De particular interés es la potencial utilidad de muchos de los componentes de este microsistema de señalización como nuevas dianas terapéuticas en el cáncer y otras patologías¹⁰.

La presencia de mutaciones específicas en genes que codifican proteínas reguladoras de la función celular puede transformarlos en oncogenes cuyos productos sean responsables del desarrollo y crecimiento de células malignas. Estudios realizados en tumores de tipo neuroendocrino han demostrado la presencia de mutaciones específicas en las subunidades α_s (estimuladora de la actividad AC) y α_{12} (inhibidora de la actividad AC)^{11,12}. La codificación de la síntesis de estas proteínas mutadas la llevan a cabo los oncogenes *gsp* y *gip2*, respectivamente¹³⁻¹⁵. Las mutaciones descritas para el oncogen *gsp* se localizan a nivel de los codones que codifican para Arg²⁰¹ (que puede mutar a Cys o His) y para Gln²²⁷ (que muta a Arg o Leu), dando lugar a una subunidad α_s que, debido a su baja o nula actividad GTPasa, está estabilizada en su forma activa. La activación constitutiva de α_s induce una hiperactivación de la vía de transducción de señales dependiente de AC, dando lugar a una proliferación celular anormal¹².

La presencia del oncogen *gip2* ha sido detectada en tumores ováricos y adrenocorticales¹⁶. En este caso, las mutaciones descritas se localizan en los codones que codifican para Arg¹⁷⁹ y Gln²⁰⁵ de la subunidad α_{12} . Ambos aminoácidos ocupan posiciones equivalentes a las ya citadas para α_s y, asimismo, la proteína α_{12} tiene muy baja actividad GTPasa y, por tanto, está activada constitutivamente. Dicha activación constitutiva disminuye los niveles intracelulares de AMPc, induciendo la activación de la proteína raf-1, una Ser/Thr quinasa que forma parte de la vía de las MAPKs que finalizan su señal en el núcleo, donde se activan distintos factores de transcripción¹⁷.

El cáncer de próstata es la neoplasia más diagnosticada en el hombre, constituyendo un grave problema, tanto sanitario como socio-económico, a nivel mundial^{18,19}. A pesar de que numerosos factores epigenéticos y genéticos están implicados en la oncogénesis y progresión del carcinoma prostático, se desconocen actualmente en gran medida los mecanismos moleculares subyacentes a este carcinoma. El funcionamiento normal de la próstata requiere una apropiada diferenciación celular estrechamente controlada durante el desarrollo de la glándula. Este proceso es regulado por toda una serie de facto-

res de transcripción que dan lugar a una estratégica puesta en marcha y regulación de diferentes genes, de tal forma que una alteración de esta vía provoca una diferenciación aberrante, immortalización, proliferación celular incontrolada y, eventualmente, desarrollo de un cáncer prostático²⁰.

Las interrelaciones entre andrógenos, PKA y otras vías de señalización son críticas para el conocimiento de los mecanismos de proliferación, diferenciación y oncogénesis en la próstata. La importancia de las proteínas G en la señalización intracelular y la proliferación en el adenocarcinoma prostático es evidente²¹⁻²³. Así lo apoyan la dependencia de estos procesos respecto de la activación de proteínas G_i a través de la liberación de subunidades βγ o la aceleración de la capacidad tumorigénica y metastatizante en células cancerosas prostáticas tras activación persistente de subunidades α. El presente estudio profundiza en la implicación de las subunidades α_s y α_i de las proteínas G en el cáncer prostático humano analizando su expresión (mRNA y proteína), funcionalidad (actividad AC) y posibilidad de mutaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes. Obtención y procesamiento de tejido prostático. Se obtuvo tejido prostático de 9 pacientes no tratados que se sometieron a prostatectomía radical por adenocarcinoma (edad 51-70 años, T₁-T₂) y 5 controles a los que se practicó cistoprostatectomía por carcinoma de vejiga infiltrante sin invasión prostática. Los pacientes dieron consentimiento por escrito para el estudio, que fue aprobado en el Comité de Ética del Hospital Príncipe de Asturias. Las muestras de tejido fueron clasificadas histológicamente; el material usado para estudio bioquímico se congeló en N₂ líquido y se conservó a -80°C. Se prepararon membranas prostáticas por homeogeneización del tejido y centrifugación²², conservándose a -80°C.

Actividad adenilil ciclasa. De acuerdo a lo publicado anteriormente²², se incubaron membranas prostáticas (0,1 mg proteína/ml) a pH 7,4 y 0,1 ml de volumen final durante 10 min a 30°C. Tras hervir 3 min a 100°C y refrigerar, se añadió

0,2 ml de una suspensión de alúmina, se centrifugó y se separó el sobrenadante para la valoración de AMPc por radioinmunoanálisis.

Aislamiento de RNA y RT-PCR para subunidades de proteínas G. Se extrajo RNA total de tejido prostático con un Kit Ultraspec (Biotecx, Houston, TX, USA) y se valoró por espectrofotometría a 260 y 280 nm. Tal como se describió anteriormente²², se desnaturalizaron 6 μg de RNA total (10 min a 94°C) y se obtuvo el DNA complementario por retrotranscripción (10 min a 23°C y 2 h a 39°C). Se realizó la PCR a continuación con oligonucleótidos apropiados (sentido y antisentido) para subunidades α_s y α_i, con glutaraldehído 3P deshidrogenasa como control. Los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% seguida por tinción con bromuro de etidio para visualizar las bandas de DNA. Se incluyó un marcador de pesos moleculares de DNA (Boehringer, Barcelona, España).

Inmunodetección de subunidades de proteínas G. De acuerdo a lo publicado anteriormente²², se solubilizaron membranas prostáticas y se sometieron a electroforesis en gel de poliácridamida/ SDS. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron subunidades de proteínas G por inmunoblot con anticuerpos específicos: RM/1 (α_s), AS/7 (α_{i1/2}) y EC/2 (α_{i3/0}) obtenidos de Dupont (Boston, MA, USA) y T-20 (β) obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Se utilizó un sistema de peroxidasa para el análisis, así como marcadores de peso molecular apropiados (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Análisis de la presencia de mutaciones en subunidades de proteínas G. Se analizaron posibles mutaciones en subunidades α_s y α_i de tejido prostático canceroso¹³. A partir de RNA total, se realizó RT-PCR utilizando cebadores que, además de amplificar las zonas donde se han descrito las mutaciones buscadas, llevan un sitio consenso específico para enzimas de restricción, lo que permite conocer la presencia de dichas mutaciones mediante digestión enzimática del cDNA amplificado. Se utilizaron las siguientes enzimas de restricción: Eag I y AlwN I para α_s y BstU I para α_{i2}. El cDNA amplificado se sometió a secuenciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación de proteínas G por RT-PCR en muestras control y con cáncer de próstata. A partir de las muestras de tejido prostático, se aisló RNA total y se sometió a retrotranscripción al correspondiente cDNA. Posteriormente, se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos elegidos a partir de las secuencias publicadas para las distintas subunidades α de las proteínas G. En la Figura 1 se presentan los resultados obtenidos para las subunidades α_s y α_{i2} , tanto en tejido sano como canceroso. Del mismo modo, se detectó la expresión de subunidades α_{i1} y α_{i3} en ambos tipos de tejido (datos no mostrados). Estos resultados confirman otros previos en hiperplasia benigna de próstata²⁴ y demuestran el mantenimiento de esta información genética durante la transformación neoplásica.

Inmunodetección de subunidades de proteínas G por Western-blot. Una vez demostrada la presencia en próstata humana, tanto en tejido control como canceroso, del mRNA que codifica para las distintas subunidades α de las proteínas G, el siguiente paso fue estudiar la presencia de dichas proteínas. Para ello, se realizaron ensayos de Western-blot utilizando anticuerpos comerciales contra dichas subunidades (Fig. 2). La posterior densitometría de las bandas obtenidas indica una disminución en la expresión de las subunidades α estudiadas (en un 25% para α_s y 40% para $\alpha_{i1,2}$) en el tejido procedente de pacientes con carcinoma prostático con respecto al tejido control. También disminuyó la expresión de subunidades $\alpha_{i3,0}$ (resultados no mostrados). En

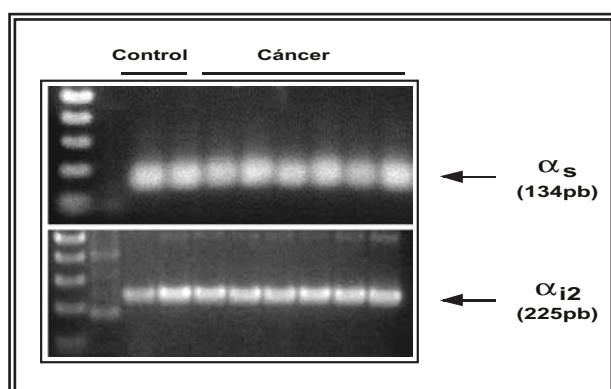


FIGURA 1. Amplificación mediante RT-PCR de las subunidades α_s y α_{i2} de las proteínas G en próstata control y con cáncer.

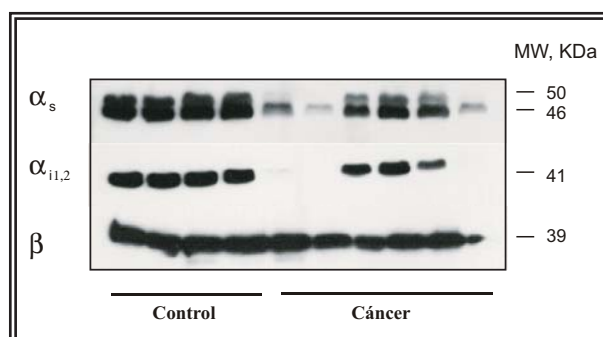


FIGURA 2. Inmunodetección de las subunidades α_s , α_{i2} y β de las proteínas G, en membranas de próstata control y con cáncer.

cambio, no se encontraron variaciones en la expresión de la subunidad β . La baja expresión de las subunidades $\alpha_{i1,2}$ parece ser específica del tejido canceroso, dado que en las mismas condiciones de detección se encuentran altos niveles de expresión de dichas proteínas en la próstata sana. El descenso selectivo de subunidades proteicas α_s y α_i puede deberse a expresión génica reducida o a inestabilidad de las proteínas o de sus mRNAs en el tejido canceroso, aunque su mayor caída en el caso de las subunidades α_i apunta a modificaciones diferenciales de la respuesta celular a agentes que actúen vía GPCRs^{24,25}. Además, el hecho de que los niveles de subunidades β no se modifiquen en tejido canceroso sugiere la existencia en esta condición de complejos $\beta\gamma$ libres, apoyando la sugerida dependencia de la proliferación celular en el cáncer de próstata con respecto a GPCRs acoplados a proteínas G_i ²⁰. Por otro lado, resultados no mostrados indican una correlación inversa entre los niveles de subunidades α_s o α_i y de PSA sérico. La expresión anormal de proteínas G se ha descrito en diversos tejidos y patologías, incluyendo el cáncer^{3,12}, si bien con patrones ciertamente heterogéneos.

Actividad basal de la enzima adenilil ciclasa. El estudio de la actividad enzimática AC puede servir para conocer el estado de activación de subunidades α , tanto estimuladoras (α_s) como inhibitoras (α_i). Los resultados obtenidos a este nivel se presentan en la Fig. 3, observándose que los pacientes con cáncer de próstata presentan niveles de actividad basal de la enzima inferiores en un 40% a los encontrados para los pacientes control. Está descrito que el gen que

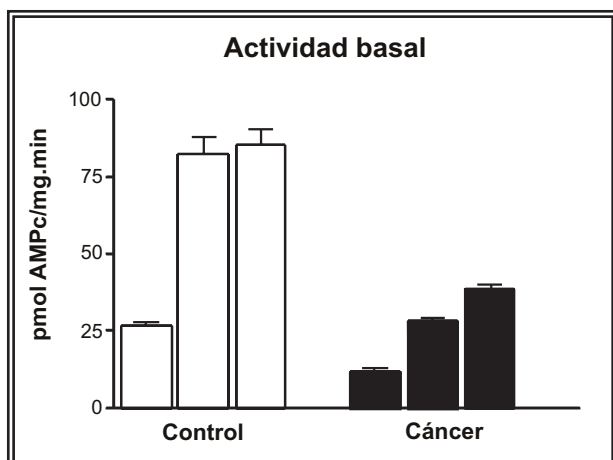


FIGURA 3. Actividad adenilil ciclasa basal en membranas de próstata control y con cáncer.

codifica para la subunidad α_{12} de las proteínas G tiene en su secuencia un sitio de unión para el elemento de respuesta a cAMP (factor CREB)^{1,2}; este hecho sugiere que la baja actividad basal de la enzima adenilil ciclasa encontrada en los pacientes con cáncer de próstata estudiados podría provocar una disminución de la síntesis de dicha subunidad.

Estudio de la presencia de mutaciones en subunidades α_s y α_{12} . La presencia de mutaciones descritas en otros tejidos para las subunidades α_s y α_{12} de las proteínas G se estudió en próstata humana (sana y cancerosa) mediante análisis de restricción enzimática y secuenciación del cDNA amplificado de dichas subunidades³.

En el caso de la subunidad α_s , la digestión del fragmento amplificado mediante PCR (134 pb) con las distintas enzimas utilizadas debe dar lugar a los siguientes fragmentos: a) digestión con Eag I (37°C o/n): no mutación en Arg²⁰¹ = 22 pb + 94 pb + 18 pb, mutación en Arg²⁰¹ = 116 pb + 18 pb; b) digestión con AlwN I (37°C o/n): no mutación en Gln²²⁷ = 13 pb + 96 pb + 25 pb, mutación en Gln²²⁷ = 13 pb + 121 pb. Así, en la Figura 4 se presenta el perfil de digestión encontrado para α_s con la enzima Eag I, observándose que todas las muestras analizadas, ya sean controles o de cáncer de próstata, presentan una banda débil con un tamaño aproximado de 94 pb, lo que implica la ausencia de mutación a este nivel. Además, se observan otras dos bandas de mayor intensidad y con tamaño aproximado de 112 pb y 116 pb. La pre-

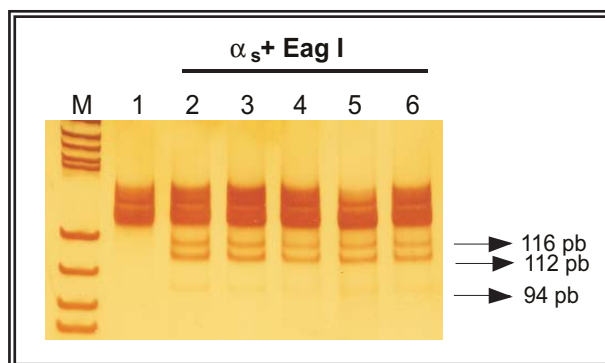


FIGURA 4. Análisis de restricción enzimática con la enzima Eag I (37°C o/n) de la subunidad α_s en próstata humana (control y con cáncer). Carril 1: producto de PCR no digerido; carril 2: producto de PCR de próstata control digerido con Eag I; carriles 3-6: productos de PCR de cáncer de próstata digeridos con Eag I.

sencia de la banda de 116 pb hace pensar en la existencia de una mutación en la Arg²⁰¹, lo que se descartó secuenciando el producto de PCR amplificado de dos de estos pacientes. Para estudiar la presencia de mutaciones en la Glu²²⁷ de la subunidad α_s , se procedió a digerir el producto de PCR amplificado con la enzima de restricción AlwN I. El perfil de digestión encontrado se presenta en la Figura 5, observándose una banda de 126 pb producida por la digestión del producto amplificado en la primera PCR. Igualmente, en todos los pacientes analizados se observó la presencia de una banda de 96 pb, lo que indica la ausencia de mutación en la Glu²²⁷ de la subunidad α_s ^{12,13}.

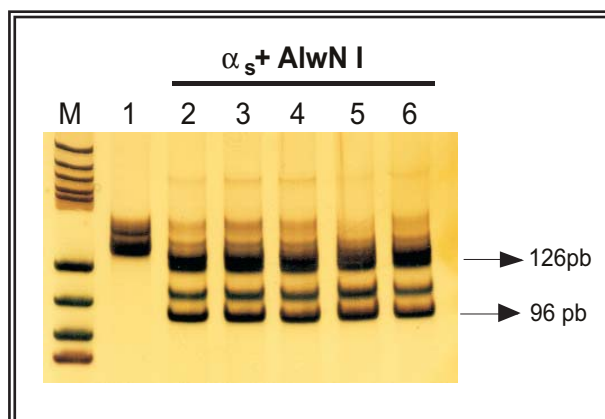


FIGURA 5. Análisis de restricción enzimática con la enzima AlwN I (37°C o/n) de la subunidad α_s en próstata humana (control y con cáncer). Carril 1: producto de PCR no digerido; carril 2: producto de PCR de próstata control digerido con AlwN I; carriles 3-6: productos de PCR de cáncer de próstata digeridos con AlwN I.

Para la subunidad α_{i2} , con un fragmento amplificado de 225 pb, la digestión con BstU I (60°C o/n) debe dar lugar a: no mutación en Arg¹⁷⁹: 18 pb + 53 pb + 154 pb, mutación en Arg¹⁷⁹: 18 pb + 207 pb. La Figura 6 muestra como, además de los fragmentos esperados, correspondientes a la ausencia de mutación en la Arg¹⁷⁹ (bandas a 154 pb y 53 pb), se encontraron otros dos fragmentos, de un tamaño aproximado de 133 pb y 71-75 pb, lo que sería indicativo bien de la presencia de nuevos sitios de corte (uno o más) para esta enzima de restricción en la zona amplificada de la subunidad α_{i2} ó de la ausencia de digestión en alguna de las zonas de reconocimiento de la enzima. Para poder comprobar este resultado, se procedió a realizar la secuenciación del producto de PCR de varios de los pacientes analizados. Al analizar la secuencia se observa que, aunque en muy pequeña proporción, la Gln²⁰⁵ (triplete CAG) de alguna de las moléculas del cDNA amplificado podría tener mutada la adenina a citosina, cambiando el triplete CAG por CCG (Pro), mutación que daría lugar a la presencia de un nuevo sitio de corte para la enzima BstU I (zona de reconocimiento: CGCG). Con todos estos datos, la digestión de la zona amplificada de subunidad α_{i2} daría lugar a los siguientes fragmentos: a) no mutación en Arg¹⁷⁹: 18 pb + 53 pb + 154 pb; mutación de Gln²⁰⁵ por Pro: 18 pb + 53 pb + 80 pb + 75 pb. Sin embargo, el hecho de no observar banda alguna a 80 pb podría ser

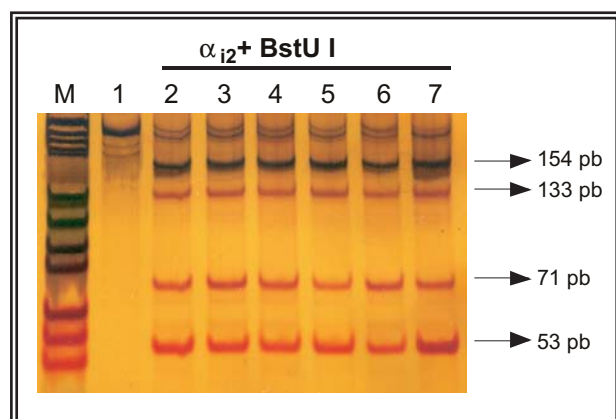


FIGURA 6. Análisis de restricción enzimática con la enzima BstU I (60°C o/n) de la subunidad α_{i2} en próstata humana (control y con cáncer). Carril 1: producto de PCR no digerido; carril 2: producto de PCR de próstata control digerido con BstU I; carriles 3-7: productos de PCR de cáncer de próstata digeridos con BstU I.

debido a que la cantidad de enzima utilizada no sea suficiente para digerir por completo el DNA utilizado y, en algunos casos, la digestión en la Arg¹⁷⁹ no se esté realizando (puesto que en la secuenciación no se observa que haya mutaciones a este nivel), dando lugar a un fragmento de 133 pb^{3,12,14,16}.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo indican que: a) en próstata humana, tanto normal como cancerosa, se expresan y traducen a proteína los genes que codifican para las subunidades α_s y α_i de las proteínas G; b) el tejido procedente de próstatas con cáncer presenta niveles de expresión de las subunidades α_s y α_i menores a los detectados en el tejido sano; c) la actividad basal AC en membranas de cáncer de próstata es un 40% inferior a la encontrada para el tejido control, lo que podría indicar que se diera una hiperactivación de la subunidad α_i inhibidora de la enzima; d) el análisis de restricción enzimática y la secuenciación del fragmento amplificado para la subunidad α_{i2} parece indicar que en una pequeña población del cDNA amplificado se da la sustitución de una adenina por una citosina en el triplete que codifica para la Glu²⁰⁵ (CAG) dando lugar a una Pro (triplete CCG). La presencia de esta mutación en otros tejidos conlleva que la proteína α_{i2} resultante tenga muy baja actividad GTPasa y, por tanto, se encuentra estabilizada en su forma activa. En resumen, la funcionalidad y expresión de las subunidades de las proteínas G heterotriméricas están modificadas selectivamente en el adenocarcinoma prostático humano, concurriendo además alguna mutación puntual cuyas consecuencias deben discernirse.

Agradecimientos: Proyecto de Investigación dotado con un Premio Pedro Cifuentes Díaz 2001 (Fundación para la Investigación en Urología).

REFERENCIAS

1. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni Mr, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 2003;24:765-781.
2. Offermanns S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progr Biophys Mol Biol* 2003;83:101-130.
3. Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. *Ann Rev Med* 2004;55:27-39.

4. Karnik SS, Gogonea C, Patil S, Saad Y, Takezako T. Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:431-437.
5. Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Therap* 2003;99:25-44.
6. Hepler JR. RGS proteins and G protein interactions: a little help from their friends. *Mol Pharmacol* 2003;64:547-549.
7. Albert PR, Robillard L. G protein specificity: traffic direction required. *Cell Signal* 2002;14:407-418.
8. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002;31:1636-1639.
9. Rashid AJ, O'dowd BF, George SR. Minireview: Diversity and complexity of signalling through peptidergic G protein-coupled receptors. *Endocrinology* 2004;145:2645-2652.
10. Liebmann C. G protein-coupled receptors and their signalling pathways: classical therapeutical targets susceptible to novel therapeutic concepts. *Curr Pharm Des* 2004; 10:1937-1958.
11. Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem Sci* 1989;14:67-71.
12. Vallar L. Oncogenic role of heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv* 1996;27:325-338.
13. Lania A, Mantovani G, Spada A. Genetics of pituitary tumors: focus on G-protein mutations. *Exp Biol Med* 2003; 228:1004-1017.
14. Landis C, Masters S, Spada A, Pace A, Bourne H, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the α chain of G_{α} and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumors. *Nature* 1989;340:692-696.
15. Pace AM, Wong YH, Bourne HR. A mutant alpha subunit of Gi2 induces neoplastic transformation of Rat-1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7031-7035.
16. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne HR, McCormick F. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science* 1990;249:655-659.
17. Gupta SK, Gallego C, Lowndes JM, Pleiman CM, Sable C, Eisfelder BJ, Johnson GL. Analysis of the fibroblast transformation potential of GTPase-deficient gip2 oncogenes. *Mol Cell Biol* 1992;12:190-197.
18. Logothetis CJ. Prostate Cancer I. *Sem Oncol* 1999;26:139-248.
19. Logothetis C.J. Prostate Cancer II. *Sem Oncol* 1999;26: 369-474.
20. Sadar MD. Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via cross-talk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1999;274:7777-7788.
21. Kue PF, Daaka Y. Essential role for G proteins in prostate cancer cell growth and signaling. *J Urol* 2000;164:2162-2167.
22. García-Fernández MO, Solano RM, Sánchez-Chapado M, Ruiz-Villaespesa A, Prieto JC, Carmena MJ. Low expression of G_{α} protein subunits in human prostate cancer. *J Urol* 2001;166:2512-2517.
23. Daaka Y. G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE* 2004;13: 216.
24. Solano RM, Carmena MJ, Carrero I, Cavallaro S, Román F, Hueso C, Travali S, López-Fraile N, Guijarro LG, Prieto JC. Characterization of vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylyl cyclase-activating peptide receptors in human benign hyperplastic prostate. *Endocrinology* 1996;137: 2815-2822.
25. Solano RM, Carmena MJ, Busto R, Sánchez-Chapado M, Guijarro LG, Prieto JC. Identification and functional properties of the pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PAC1) receptor in human benign hyperplastic prostate. *Cell Signal* 1999;11:813-819.

Prof. M. Sánchez-Chapado
Departamento de Cirugía. Universidad de Alcalá,
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
E-mail: msanchez.hupa@salud.madrid.org

(Trabajo recibido el 30 de marzo de 2005)