

Factores de Crecimiento Epitelial: Aspectos Biológicos, Patológicos y Clínicos

Grégory García M. MD`s¹, Dianney Clavijo G. MD`s³, Ananías García DDC, Ciro A. Casadiego T. MD`s⁴, Omar Mejía MD`s⁵, Rafaél Zamora Bch.B⁶.

Los Factores de Crecimiento son mediadores de comunicación celular con un papel vital en el comportamiento normal y patológico celular, tisular y sistémico, de los organismos vivos. Dentro de ellos la familia de los EGF(Factor de Crecimiento Epitelial) son elementos claves en la fisiología celular no sólo celular epitelial, sino también en otros tipos celulares, regulando procesos morfogénicos a varios niveles. Es el objetivo de esta revisión es describir el estado del arte de esta familia de factores de crecimiento tanto en la normalidad como en sus aspectos patológicos. *Salud UIS 2005;37:106-121.*

Palabras Claves: Esquizofrenia, Factor de Crecimiento, EGF(Factor de Crecimiento Epitelial), Neuregulinas, Neurodegeneración, Neoplasia, Cáncer, Carcinoma

The growth factors are communication cell mediators with a vital roll in the normal and pathologic comportament cell, tissue and systemic, in life organism. Into of they, the EGF(Epidermal Growth Factor) family are principal elements in the cell physiology, no only of epithelial cell, so too in others cell types, regulating morphogenic process in diverse nivels. Is the objetive of this revision to summary the corrient knowledge of this family, in the normality as in pathologic aspects. *Salud UIS 2005;37:106-121.*

Key Words: Growth Factor, EGF(Epidermal Growth Factor), Schizophrenia, Neurodegeneration, Neuregulin, Neoplasia, Cancer, Carcinoma

INTRODUCCIÓN

De los Mediadores de Comunicación Celular, el descubrimiento de la Superfamilia de los Factores de Crecimiento se ha considerado clave para el entendimiento de diversos procesos biológicos tanto normales como patológicos¹. Dentro de éstos, está la Familia del Factor de Crecimiento Epitelial (EFG), inicialmente denominado como Epidérmico por el rol inicial descrito sobre dicha capa cutánea, pero con el advenimiento de descubrimientos de otras funciones sobre la mayoría de las células epiteliales, se le ha preferido denominar convenientemente acordemente como Factor de Crecimiento Epitelial².

El descubrimiento del EGF en 1962³,permitio desteterminar que sus miembros comparten un rasgo común, generado en una región aminoacídica de 45-50 residuos que contiene seis cisteínas espaciadas entre sí, que forman tres puentes disulfuros, definiendo una característica estructural que les permite unir a cierto tipo de receptores diana. Este dominio se presenta también en diversas moléculas de la matriz extracelular y en diversos tipos de moléculas de adhesión celular, presentado variación en la estructura prototípica de pauta, ofreciendo así una diversificación de funciones.

1. Instructor Asistente. Área de Morfología. Instituto de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario. Instructor Asociados. Unidad de Bioclínicas. Universidad del Bosque.
2. Profesora Distinguida. Coordinadora Área de Morfología. Instituto de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario del Rosario. Profesora Asistente. Departamento de Morfología. Universidad Nacional de Colombia.
3. Instructor Asociado. Área de Morfología. Instituto de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario.
4. Profesor(R) Universidad Nacional de Colombia. Director Programas de Posgrados Morfología. UNISANITAS.
5. Instructor Asistente. Área de Morfología. Instituto de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario. Instructor Asociado. Unidad Bioclínicas. Universidad del Bosque.
6. Instructor Asociado. Área de Bioquímica. Instituto de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario.

Todos los miembros y subfamilias de EGF se unen al receptor tirosina-kinasa EGF-R/ERBB1/HER1, el cual pertenece a la familia de los Receptores EGF-Familia(EGF-R) denominada como Familia ErbB(Avian Erithroblastic leukemia viral oncogene), que son proto-oncogenes virales, e inicialmente identificados como generatrices de neoplasias hemato-inmunes liquidas en poblaciones aviarias. Posteriormente se encontro que estos receptores son codificados tempranamente por genes asociados a procesos morfogénicos tales como desarrollo, crecimiento, diferenciación y maduración celular. Tanto

los EGF-miembros como los ERBBs han co-evolucionado biológicamente⁴.

En la tabla I se consignan algunas características de la familia EGF, formada por 8 miembros aislados y por 3 subfamilias, e igualmente se mencionan los 4 miembros de la familia ERBB. En la tabla se mencionan la nomenclatura utilizada en esta revisión, las nomenclaturas alternas, los códigos asignados en el Banco Mundial de Genes MIM(Medelian Inheritance McKusick), y la localización genómica cromosómica.

	MIEMBRO EGF FAMILIA	NOMENCLATURA	LOCALIZACIÓN GENÓMICA	MIM CÓDIGO
MIEMBROS AISLADOS	EGF/ Urogastrona	Factor de Crecimiento Epitelial	4q25	131350
	DTR/DTS/ HB-EGF/HEGFL	Receptor para la Toxina Diftérica/Sensitividad para la la Toxina Diftérica/Precursor del factor de crecimiento similar al EGF de unión a la Heparina	55q23	126150
	TGFalfa	Factor Transformante de Crecimiento Alfa	2p13	190170
	BTC	Betacelulina	4q13-21	600345
	AREG/SDGF	Anfirregulina	4q13-21	104640
	EREG	Epirregulina	¿?	602061
	VVGF	Factor de Crecimiento derivado del virus de la Vaccinia	-	-
	EPIGEN(hasta ahora sólo en ratones)	Mitógeno Epitelial	¿?	¿?
EGF-NRG SUBFAMILIA	NRG1/HGL/ HRGA/NDG/ GGF2/ARIA	Neuregulina1/ Heregulina alpha/ Factor Neu de diferenciación /Factor de Crecimiento Glial/ Actividad Inductora del Receptor para Acetilcolina	8p22-11	142445
	NRG2/DON1/ NTAK	Neuregulina2/ Neuregulina 1 Divergente/ Activador para la ERBB-kinasa Neuro- y Timo- derivada	5p23-33	603818
	NRG3	Neuregulina3	10q22	605533
	NRG4	Neuregulina4	¿?	¿?
	NRG5/Decorina/ PGII/ PG40	Neuregulina5	12q13.2	125255
	NRG6/ Neuroglycan C	Neuregulina6	3p21.3	606775

EGF-CFC SUBFAMILIA	Cryptic/HTX2/ CFC1	“Cryo-Fr11-Cryptic” subfamilia miembro 1	Chr2	605194
	CRGF/TDGF1	Factor de Crecimiento Cripto/ Factor de Crecimiento derivado de Teratocarcinomas	3p23-21	187395. Posee dos pseudogenes: uno en el cromosoma 3 que es denominado como CR-1, y el otro está en Xq y se denomina como CR-3/ TDGF2/TDGF3.
EGF-TMEFF-SUBFAMILIA	TMEFF1/ C9ORF2	Proteína transmembranal con dominios similares a EGF y follistatina tipo 1/“Chromosome 9 open reading frame 2”	9q31	603421
	TMEFF2/TR/ HPP1	Proteína transmembranal con dominios similares a EGF y follistatina tipo 2/Tomoregulina/ gen 1 asociado a Poliposis Hiperplásica	2q32-33	605734
MIEMBRO EGF-RECEPTOR FAMILIA	ERBB1/HER1/ EGF-R/S7	Especies antígeno 7	7p12.3-12.1	131550
	ERBB2/HER2/ NGL/NEU/TRK1	Neuroblastoma o glioblastoma-derivado/Tirosina-kinasa-tipo receptor de superficie HER2	17q21.1	164870
	ERBB3/HER3		12q13	190151
	ERBB4/HER4		2q33.3-34	600543

Los EGF-miembros son biosintetizados como grandes precursores transmembranales, luego son clivados y liberados como mediadores solubles maduros. Tal proceso es efectuado por las proteasas ADAM (A Disintegrin and metalloprotease), tales como ADAM9 para HB-EGF, ADAM10 para EGF y BTC, y ADAM17 para EREG, TGFA, AREG, HB-EGF^{5,6,7}.

Los precursores transmembranales son activos y funcionan por mecanismos paracrinos del tipo yuxtacrinos, como si fueran semi-mediadores de comunicación celular^{8,9}. Un rasgo común a estos miembros y sus receptores, al igual que de sus metaloproteinasas clivantes, es su ubicación en dominios membranales plasmalémicos del tipo “Lipid Rafts” o Balsas Esfingolípicas¹⁰.

A continuación se mencionan los aspectos biológicos, patológicos y clínicos de cada EGF-miembro, excepto para algunos de ellos, puesto que la información existente al respecto de ellos es aún vaga.

1-EGF (Factor de Crecimiento Epitelial)

Descrito en 1962 por Cohen³, posteriormente Smith y colaboradores en 1982⁹, encontraron que es homólogo a la beta-urogastrona; este polipéptido hormonal es expresado predominantemente en el duodeno y las glándulas salivares, posee potente capacidad inhibitoria para la secreción de ácido gástrico, y promueve la proliferación celular epitelial⁹.

El EGF es producido como un precursor de 1168 aminoácidos que es madurado hacia una proteína de sólo

53 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 6kDa¹¹. La gamma-urogastrona posee sólo 52 aminoácidos porque pierde la arginina del extremo carboxiterminal, lo cual sugiere la presencia de un clivamiento peptídico para su generación, aunque no se ha encontrado aún tal peptidasa. El precursor contiene homología estructural a EGF entre ellas ocho segmentos adicionales, la región transmembranal, y una corta región intracelular carboxiterminal¹².

La función biológica de EGF tiene que ver en particular con las células epiteliales e inclusive con formas superespecializadas como lo son las de los túbulos seminíferos testiculares, siendo un factor promotor de proliferación celular para estas células a supraconcentraciones, y a niveles constitutivos basales es un inductor de madurez, y anti-apoptótico¹³. Esto último, está relacionado a nivel epitelial con la fosforilación inhibitoria prodegradativa de las proteínas proapoptóticas Bim(BimEL y BimL), las cuales son sensores del citoesqueleto microtubular, que tras daño celular actúa a nivel mitocondrial activando la vía apoptótica dependiente de PTporo(Permeability Transition Pore), permitiendo la apertura de estos conductos, dando como resultado la generación de un flujo masivo de calcio y del citocromo c, este último activa la vía apoptótica de las proteasas apoptóticas caspasas¹⁴.

En ratones la glándula submandibular es la principal fuente de este factor de crecimiento, y la sialoadenectomía en particular de este órgano, disminuye sus niveles circulantes sanguíneos sin afectar los niveles de Testosterona y FSH(Hormona Folículo Estimulante), pero provoca una disminución en el número de espermátides del testículo y de los espermatozoides maduros en el epidídimo, cambios corregibles con la administración EGF. La producción de EGF en la glándula submandibular forma parte de un eje activado por stress celular epitelial, dado que se aumenta su producción para liberación exocrina cuando hay lesión celular epitelial a nivel del tracto mucoso gastrointestinal-digestivo, y para producción endocrina en caso de lesiones de otros órganos epiteliales. La regulación neurovegetativa autónoma de la glándula submandibular está a cargo del Ganglio Cervical Superior, el cual está a su vez es inervado aferentemente desde el cordón medular espinal, por integración efectora neural, proveniente del Circuito Hipotalámico. También se ha encontrado que la glándula submandibular secreta otros 26 EGF en promedio los cuales son mediadores de comunicación celular con actividad tanto exocrina como endocrina, tales como el NGF(Factor de crecimiento neural), TGFA(Factor Transformante de Crecimiento Alfa), IGFI(Factor de

Crecimiento Similar a la Insulina I), TGFs(B1, B2-Factores Transformantes de Crecimiento B1 y B2) y bFGF(Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico o II), e incluso Kalikreínas^{15,16,17}.

Así mismo es producido por la glándula mamaria, con la consecuente liberación en la leche materna, ejerciendo un rol fundamental en el desarrollo del nuevo ser humano, dado que se absorbe por transcitosis enterocítica, y puede ser también liberado a la sangre a través del endotelio fenestrado del lecho microvascular intestinal. Tal rasgo parece ser general a todos los mamíferos. Por otra parte ejerce acciones tróficas en el epitelio mucoso gastrointestinal/digestivo^{18, 19, 20, 21, 22}.

Su producción en la glándula lacrimal se relaciona directamente con la modulación del efecto de los neurotransmisores derivados del Sistema Neurovegetativo Autónomo, sobre la secreción de este órgano²³.

Es un factor de crecimiento de monocitos precursores de macrófagos, como de macrófagos, tanto en la normalidad, como en lesiones ateroscleróticas²⁴.

El EGF y muchos de sus familiares son ampliamente neuromorfogénicos, y en diversos eventos tales RiTRP(Rapid vesicular insertion of Transient Receptor Potencial), que consiste en la rápida inserción en la plasmalema de los canales catiónicos TRP(en particular el tipo TRP5), relacionado con cambios morfológicos a nivel hipocampal. También se encontrado amplia expresión en cerebelo y corteza cerebral, y son reguladores maestros de los ejes neuroendocrinos y no neuroendocrinos extracerebrales GnRH(Hormona Liberadora de Gonadotropina)^{25,26,27,28}. EGF es vital junto a la CKK(Colecistokinina) y la Leptina en el programa de resistencia a injuria y protección a nivel del páncreas²⁹.

En el campo patológico y clínico humano, se han encontrado disminuidos los niveles de EGF en la corteza prefrontal en el striatum, pero elevada la expresión de ERBB1 en el córtex prefrontal en cerebros postmórtem y en suero sanguíneo fresco de pacientes con Esquizofrenia³⁰.

Muchas de sus funciones son dependientes de procesos de migración pro-morfogénicos y pro-regenerativos, donde las células activadas generan ondulaciones membranales(ruffles) y lamelipodios, y tal proceso es dependiente de la co-acción con Esfingosina-1-fosfato. Lo anterior concluido a partir de modelos donde la acción de las enzimas degradantes Esfingosina-1-Fosfato-Fosfatasa, reducen la capacidad inductora de quimiotaxis inducida por EGF³¹.

La función del EGF es ejercida mediante la fosforilación de la Histona H3 por una serina/treonina-kinasa citosólica que corresponde a la RSK2 (Ribosome-Serine/Treonine-Kinase), y la reducción de los niveles séricos de la proteína de unión y transporte de IGFs (Insulin Growth Factors) IGFBP3 (IGFs-Binding Protein 3), relacionándose con niveles más elevados de IGFs libre los cuales funcionan como efectores autocrinos y paracrinos amplificadores.^{32,33,34}

Por otro lado existen a nivel de la población humana variaciones génicas polimórficas del gen codificante de EGF, las cuales se han segregado como tractos alélicos independientes. Los alelos polimórficos A y G a partir de la variación G71A en seres humanos europeos ha sido encontrado con una frecuencia de 56% para A y 44% para G. Las personas con homocigocidad para el alelo A producen significativamente menor cantidad de EGF que los homocigotos para G o los heterocigotos G/A, y se correlaciona esto con el hecho de que los genotipos G/G son más asociados con riesgo de Melanoma, y mayores complicaciones, potencialmente se debe investigar el rol teóricamente de tal hallazgo en otras neoplasias³⁵.

Su expresión es disrregulada en varias neoplasias tales como en Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello, como en Mesoteliomas, y en éste último se ha encontrado tal disrregulación junto a otros factores de crecimiento que potencian entre sí la expresión de metaloproteinasas tales como MMP3 y MMP9^{36,37}. Igualmente EGF, con HGF/SF (Factor de Crecimiento Hepático/Factor de Diseminación), SCF (Factor de Crecimiento de las Células Madre) e IGFs inducen MMP2 (Metaloprotease 2) y MMP9 (Metaloprotease 9) en Cáncer Pulmonar Epitelial de células no pequeñas³⁸.

2-HB-EGF (EGF Unidor de Heparina/Heparán Sulfato)

Se identificó en el medio de cultivo de la línea celular de macrófagos U937³⁹. El gen contiene 6 exones y 5 intrones, y se encuentra espaciado a lo largo de 14 kilobases. A partir del precursor transmembrana de 184 aminoácidos, se producen dos proteínas maduras que difieren aminoterminalmente, de 72 a 87 aminoácidos. Es él más altamente glicosilado de la familia y posee ciertos motivos aminoácídicos que le permiten interactuar fuertemente con proteinglicanos ricos en heparán-sulfato^{40,41}. El dominio de unión a heparán-sulfato o heparina, ejerce un efecto inhibitorio sobre la región de interacción con los receptores, y tras la interacción con los glicosa-amino-glicanos, se deshinibe de los dominios, y hace accequible HB-EGF a los ERBBs⁴². Es un antiapoptótico en riñón, músculo e intestino, y es regulado positivamente tras

injuria celular y tisular^{43,44,45}. Es fundamental para la conversión del fenotipo de las células madres citrofoblásticas hacia un fenotipo extravelloso que genera arterias espirales⁴⁶.

La expresión de HB-EGF es regulada positivamente sobre la células endoteliales, y otros tipos epiteliales por TNFA (Factor de Necrosis Tumoral Alfa)^{47,48}. Su expresión en el estómago principalmente en las células parietales, a nivel génico es dependiente de Gastrina, siendo una vía dependiente de la serina/treonina-kinasas PKCs (Proteína Serina/Treonina-Kinasa dependiente de Calcio)⁴⁹.

Se expresa a nivel ovárico, y el clivaje de su precursor membranal, es dependiente de los mediadores de comunicación celular LPAs (Ácidos Lisofosfatídicos)⁵⁰. Así mismo este tipo de transactivación ha sido observado en el músculo estriado cardiaco, en una forma dependiente de Angiotensina II, y de receptores purinérgicos para UTP (Uridina-Trifosfato), a pesar de que los purina-receptor inhiben la expresión del marcador de hipertrofia miocárdica que es ANP (Péptido Natriurético Atrial)^{51,52}. Su clivamiento membranal a nivel biológico es un mecanismo activado por stress, con una cascada intracelular dependiente de p38MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Serine/Treonine-Kinase)⁵³. Al ser clivado se originan dos fragmentos un carboxiterminal y un aminoterminal, siendo el aminoterminal el principal generador de los efectos biológicos⁵⁴.

Los roles patológicos y clínicos humanos de HB-EGF están relacionados con enfermedades infecciosas, gineco-obstétricas, cardíacas y neoplásicas. La toxina diftérica tiene la capacidad catalítica de inhibir el factor de la elongación de la traducción génica eEF2 (eucariotic elongation factor 2), así inhibiendo la biosíntesis proteica en células eucariotas⁵⁵. Tempranamente Creagan y colaboradores mostraron que la sensibilidad a la toxina es propia de nuestra especie (al igual que el conejo, y los cerdos de guinea) pero los ratones y las ratas son resistentes porque poseen un factor codificado por el cromosoma 5⁵⁶. La toxina diftérica es codificada por un gen denominado "tox" que es acarreado por un fago hacia *Corynebacterium diptheriae* que gracias a él se vuelve lisogénico. La toxina es una sola cadena que es fragmentada hacia dos porciones, una llamada efectomérica que es la unidad catalítica, y otra porción que es el haptomérica en cargada de la superficie celular. Posteriormente se encontró que tal receptor es igual a HB-EGF^{57,58,59}.

Niveles disminuidos de HB-EGF en el citotrofoblasto extraveloso invasor se correlaciona con Pre-eclampsia en humanos. Por otra parte los niveles disminuyen en orina de mujeres gestantes con productos de recién nacidos con bajo peso al nacer, no así en quienes desarrollan pre-eclampsia⁶⁰. El hecho de su expresión en ovario, donde participa la proliferación normal y neoplásica del epitelio celómico, y en forma similar actúe en la Hipertrofia Cardíaca, abre el campo de acción para intervención farmacológica especializada^{50,51}. HB-EGF es un factor de crecimiento para las células neoplásicas en el Mieloma Múltiple y en HNSCC, y da una nueva fuente para futuras terapias^{36, 37}. En las células neoplásicas el stress oxidativo y el stress osmótico, desencadenan una cascada intracelular que activa la vía p38MAPK, llevando a la actividad proteasa de ADAM9, ADAM10 y ADAM17, que desencadena el clivaje del precursor de HB-EGF, y la consecuente activación por éste, del receptor ERBB1⁶².

3-TGFA (Factor Transformante de Crecimiento Alfa)

Se produce como una proteína transmembranal de 160 aminoácidos madurada hacia un péptido de 50 aminoácidos, su dominio es un 44% idéntico al de EGF⁶³.⁶⁴. En su región citosólica posee motivos proteicos de unión para proteínas especializadas denominadas TACIPs (pro-TGFA cytoplasmic domain-interacting protein). Se conocen dos proteínas de este tipo que son TACIP-1 (también denominada como Syntrophin-alpha1) y TACIP-18 (también denominada como Syntenin/MDA9), relacionadas con el tráfico vesicular de pro-TGFA^{65, 66, 67, 68}.

Dentro de sus funciones biológicas está la regulación del reloj circadiano en el núcleo supraquiasmático que dirige los ritmos diarios neurovegetativos, por secretar factores que actúan localmente dentro del hipotálamo, y TGFA es un probable inhibidor de la locomoción sintetizado por el núcleo supraquiasmático. Los receptores se encuentran sobre la zona subparaventricular hipotalámica. Existe un circuito neural en el hipotálamo que probablemente media la regulación del comportamiento a partir del núcleo supraquiasmático y la retina, usando TGFA y ERBB1 in el tracto retinohipotalámico⁶⁹.

Su papel en patología y clínica humana se encuentra particularmente ligado a neoplasiaogénesis, dado que se ha relacionado directamente con la translocación cromosómica t(2;8) del Linfoma de no Hodgkin tipo Burkitt, localizando esta cromosomopatía al gen codificante de TGFA cerca al oncogene c-myc. También se encuentra sobre-expresado en algunas otras

neoplasias, como en Mesotelioma y Carcinoma Escamocelular de Cabeza y cuello^{36,37,70}.

Por otra parte se descartó totalmente su rol genopático en el Síndrome de Alstrom (caracterizada por retinopatía, obesidad y diabetes tipo I), cuyo locus cromosómico es próximo⁷¹.

Juega un rol vital en ciertas manifestaciones paraneoplásicas del melanoma (pero también encontrada en otras neoplasias viscerales) tales como el Signo de Leser-Trélat que corresponde a la aparición o incremento en el número y talla de keratosis seborreica, acantosis nigricans y acrocordones eruptivos⁷².

4-BTC

Fue caracterizada a partir de líneas neoplásicas pancreáticas de células beta derivadas de ratones transgénicos expresando el antígeno T del virus SV40⁷³. La proteína madura de 80 aminoácidos es 77% idéntica a la del ratón, y es derivada a partir de un precursor de 178 aminoácidos, con un potencial sitio de N-glicosilación, un dominio-EGF, una región transmembrana, y partes proteicas ricas en lisina y en arginina⁷⁴. Su expresión está dada en hígado, riñón y débilmente en corazón y pulmón. Al parecer existen como mínimo tres tipos distintos de BTC derivados a partir del mismo gen⁷⁵.

En mamíferos se ha encontrado un rol vital en ovulación tal como la expansión del cumulus oophorus y la maduración oocitaria⁷⁶. Es un factor de crecimiento y promueve la migración de células musculares lisas durante los procesos de angiogénesis en remodelación vascular tanto normal como patológica⁷⁷. GLP1 (Glucagon-like peptide1) es un factor de crecimiento morfogénico y de mantenimiento para las células beta del páncreas, a través de su señal de transducción intracelular transactiva a ERBB1 por favorecer el clivamiento membranal de la BTC y otros familiares de ésta⁷⁸.

Su rol en patología y clínica humanas está relacionado a la gineo-obstetricia y al cáncer. BTC es fuertemente expresado en células de cáncer mamario, en histiocitoma fibroso maligno y en carcinoma escamocelular de cabeza y cuello^{79,80}. En la terapéutica del conjunto de entidades denominadas bajo el concepto de "Síndrome de Hiperestimulación Ovárica", se abre un nuevo campo farmacológico, dado que se puede bloquear la biosíntesis, la actividad y los efectos post-receptor de AREG, dado que es un mediador paracrino de la LH (Hormona Luteinizante) como ya se mencionó. El uso de estos fármacos iría más allá de los cánceres hormonodependientes tales las neoplasias gonadales,

dado que se ha encontrado este eje paracrino en otras neoplasias⁸¹. La Betacellulina es un factor de crecimiento para las células musculares lisas con fenotipo semi-neoplásico en las placas ateroscleróticas⁷⁷. Su expresión ha sido detectada en Mesotelioma y Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello^{36,37}.

5-AREG

Es un factor que inhibe el crecimiento de ciertas líneas neoplásicas de mama (línea celular MCF-7), y estimula la proliferación de fibroblastos humanos y otras líneas neoplásicas⁸². Se produce como un precursor transmembranal de 252 aminoácidos, que se madura hacia una forma truncada de 78 aminoácidos, y una forma larga que contiene 6 aminoácidos adicionales aminoterminales. Los aminoácidos 46-84 exhiben el rasgo característico de la familia EGF^{83,84,85}. En 1990 se identificó su rol en el desarrollo del sistema nervioso, siendo un factor de crecimiento autocrino para las células de Schwann, y un mitógeno para astrocitos y fibroblastos⁸⁶. También se ha encontrado que es un factor de crecimiento autocrino para los queratinocitos⁸⁷. Juega un rol vital como mediador paracrino de las actividades de la LH (Hormona Luteinizante) en la ovulación de los mamíferos⁷⁶.

Los aspectos farmacológicos son igual de aplicables que para AREG en el “Síndromes de Hiperestimulación Ovárica”^{76,77}. Existe una aberrante expresión de AREG en lesiones cutáneas de la enfermedad autoinmune conocida como Psoriasis, explicando la marcada hiperkeratosis con parakeratosis focal, acantosis, infiltración linfocítica y neutrofílica, y vasos sanguíneos dilatados dentro de la dermis papilar⁸⁷. Existe incrementada expresión en neoplasiaogénesis en algunos casos, como en cáncer colo-rectal y es un gen regulado por estrógenos en cáncer de mama^{88,89}. Así mismo se ha detectado en Mesotelioma y Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello^{36,37}.

6-EREG(Epiregulina)

La proteína se identificó a partir de un sub-clon de la línea celular de ratones NIH3T3. Posee 46 aminoácidos con identidad cercana al 24-50% a otros miembros de la familia, y exhibe baja afinidad por el ERBB1/HER1. Sus niveles de expresión son detectados en casi todos los tejidos, aunque es muy baja pero detectable en macrófagos y placenta⁹⁰. Forma parte de la señal paracrina para la ovulación en mamíferos dependiente de LH⁷⁶. Es un inmunoregulador en la piel, es producido por queratinocitos y por macrófago residentes, y faculta un efecto anti-inflamatorio/inmuno-supresor tipo T2 (respuesta dependiente de perfiles linfocitarios citoquímicos Thelper2, Tcitotóxico2), como se ha mostrado

en un modelo murino “knotkout” para el gen codificante⁹¹. EREG es el factor autocrino y paracrino final maestro de la proliferación del músculo liso vascular, que es inducido por factores vasoconstrictores como Endotelina-1, Angiotensina-II, alfa-Trombina y el Factor Xa de la coagulación^{92,93,94}. Sus aspectos farmacológicos son igual de aplicables que para AREG en el “Síndromes de Hiperestimulación Ovárica”^{76,77}. EREG se comporta como un inhibidor del crecimiento de neoplasias, y es regulado negativamente en neoplasias epiteliales malignas⁹⁵.

7-NRG1(Neuregulin1)

Es una glicoproteína de 44kDa, con variantes por corte y empalme alternativo denominadas como Heregulinas Beta, a partir de un contexto de 15 exones, que producen 14 isoformas, incluyendo la forma clásica⁹⁶. Las isoformas alfa son de 77 aminoácidos y las beta de 62 aminoácidos, y en general las isoformas beta ejercen más potentes efectos biológicos. Estas isoformas se pueden dividir en tipo I que poseen tallo citosólico y tipo II sin este tallo, ambas contienen un dominio Ig-like (Inmunoglobulina-similar) y son referidos como Ig-NRGs. Existen unas isoformas tipo III con o sin tallo citosólico que contienen un CRD (Cystein-rich domain) aminoterminal a la EGF-dominio de la familia, y es por esto que son referidas como CRD-NRGs⁹⁷. Las isoformas con tallo citosólico poseen una región denominada como NRG1-ICD (Intracelular Domain), la cual tras activación por interacción paracrina de tipo yuxtacrino, se cliva por proteasas aún no definidas, y puede este dominio clivado entrar al núcleo para regular la actividad génica nuclear, donde regula negativamente la expresión de genes de apoptosis neuronal⁹⁸.

Es un promotor de proliferación y supervivencia de los oligodendrocitos, y esto está relacionado con la regulación positiva en la expresión de la MBP (Proteína Básica Mayor) en particular la variante por corte y empalme alternativo que contiene el exón 2, y además regula la expresión de ejes citoquímicos inmunológicos regulatorios, ya que regula positivamente la expresión de la IL10 (Interleukina-10), promoviendo tolerancia inmunológica. NRG1 es una señal de supervivencia axón-asociada para el desarrollo de oligodendrocitos⁹⁹. Se ha encontrado que dependiendo la isoforma de NRG1 se puede correlacionar la talla del nervio, es así que las isoformas tipo III inducen hipermielinización¹⁰⁰.

Una versión de NRG1 denominada como ARIA (Acetylcholine receptor-inducing activity) es una proteína de 42kDa, también dirige el cambio de expresión de subunidades gamma a epsilon en el complejo Acetilcolina-Receptor Nicotínico tipo Muscular. Los efectos de NRG1-ARIA son mediados por el ERBB4. NRG1

también es importante para la modulación de la plasticidad sináptica¹⁰¹.

Puede ejercer funciones inhibitorias en la proliferación, y esto parece suceder con una versión denominada como NRG1-HRGA en particular cuando un proceso embriológico o regenerativo ha terminado, esto se explica porque NRG1-HRGA se expresa en la superficie apical en el epitelio aéreo humano, mientras que los ERBB's se expresan en la superficie basolateral. Tras una injuria de tipo mecánico, NRG1-HRGA se pone en contacto con ERBB2 preferencialmente, tras lo cual dispara un programa regenerativo¹⁰².

También ejerce roles en la embriogénesis del sistema cardionector¹⁰³, ejerce un efecto inotrópico negativo dependiente de NO*(Óxido Nítrico)¹⁰⁴ a nivel miocárdico, y es un cardioprotector en quimioterapia¹⁰⁵. Es vital para el desarrollo y trofismo de la córnea¹⁰⁶, de la dentición¹⁰⁷ y del epitelio pulmonar¹⁰⁸.

Una isoforma por corte y empalme alternativo denominada como NRG1-beta3 se ha ubicado intracrinamente, y se ha detectado en el compartimento nuclear en las regiones nucleolares y las regiones "speckles" SC35 positivas, regulando aspectos de la expresión génica¹⁰⁹.

Se ha sugerido un rol en Enfermedades Neurodegenerativas del complejo Alzheimer, y activación anormal de ERBBs por NRG1-HRGA en enfermedades con incremento de permeabilidad epitelial^{102, 110}. Se ha encontrado asociación del gen a Esquizofrenia por diversos haplotipos en poblaciones Escocesas, Islandesas y Chinas, pero aún falta investigación para poder conceptuar^{111, 112, 113}. NRG1 y sus familiares ha mostrado ser un inductor de muerte celular autofágica en células neoplásicas malignas de próstata, de tal forma que podría en un futuro ser un fármaco guiado para esta enfermedad¹¹⁴. Se sugiere la terapia génica, ya desarrollada en ratones, para el manejo de la Esclerosis Múltiple, y también su posible uso en terapia cardioprotectora en quimioterapia^{99, 105}.

8-NRG2(Neuregulin2)

En 1997 fue identificado este factor, con 9 isoformas a partir de 12 exones espaciados a lo largo de 55 kilobases, sobresaliendo las variantes principales DON-1r y DON-1b (inserción adicional proximal de 8 aminoácidos proximal a la región transmembrana), con un dominio aminoteriminal, un bucle inmunoglobulínico tipo C2, un EGF domain, una secuencia transmembrana y un largo tallo citosólico mostrando potenciales sitios de N-glicosilación y O-glicosilación. Su expresión en cerebros

mamíferos queda casi relegado a cerebelo y giro dentado desde la vida fetal, y también se ha detectado en pulmón^{115, 116}. Tiene efectos sobre la angiogénesis, donde las isoformas gamma y delta son inhibitorias de este proceso¹¹⁷.

Se sugiere aún, a pesar de su pronto descartamiento, que sea un gen asociado a una forma autosómica recesiva de la entidad desmielinizante Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth¹¹⁸. Podría ser un gen asociado a la patobiología de la neoplasia derivada de la cresta neural denominada como Neuroblastoma¹¹⁹, y también se ha encontrado expresado en Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello³⁶.

9-NRG3(Neuregulin3)

Este factor de 720 aminoácidos comparte una identidad de secuencia del 93% con la versión del ratón. Posee dos segmentos hidrofóbicos similares a aquellos de NRG1, los cuales funcionan como dominio transmembrana y una secuencia señal interna entre ellos. NRG3 posee característicamente un único segmento amino-terminal rico en alanina y glicina, un dominio-EGF y una región mucina-like rica en serina y treonina, con abundantes sitios para O-glicosilación. Existen al parecer varias isoformas. En el sistema nervioso central alta expresión se detecta en cordón medular espinal, ganglios vestibular, trigeminal y espinal, en el núcleo profundo cerebelar, núcleo vestibular, córtex cerebral, córtex piriforme, núcleo olfatorio anterior, habénula medial, hipocampo, hipotálamo y tálamo, no se expresa en el cuerpo calloso, así como tampoco a nivel del testículo. Es ligando para ERBB4¹²⁰.

10-CFC1

Pertenece a la subfamilia CFC(Cripto, Fr11, Cryptic) siendo una proteína extracelular que juega un rol en comunicación intercelular durante la embriogénesis en vertebrados, específicamente siguiendo los tempranos estados somitarios¹²¹. Los miembros de esta subfamilia se consideran co-receptores para ciertos ligandos de la familia de los TGFβ/Activina como Nodal.

Es necesario para la determinación del eje de simetría derecha-izquierda¹²².

En la especie humana es una proteína de 225 aminoácidos, siendo 22 residuos aminoácídicos más larga que la del ratón. Posee un secuencia señal aminoteriminal para el procesamiento y empaquetamiento a través de la ruta endomembranal retículo endoplásmico rugoso-Aparato Endoplásmico de Golgi, una variante del motivo EGF característico de toda la familia con 6 residuos de

cisteína siendo los dos primeros aledaños, lo cual elimina la presencia de un bucle(A loop), un dominio rico en cisteína característico de la subfamilia denominada como CFC-motivo, y una región hidrofóbica carboxiterminal. Las proteínas CFC determinan la asimetría derecha-izquierda^{123, 124}. Las proteínas CFC funcionan como co-receptor de varios miembros de la familia TGFβ, donde CFC funciona como co-receptor de Nodal y Vg1/GDF1, pero no Activinas, y para ello es importante su dominio CFC que recluta al receptor de tipo I ALK4, para los miembros de la familia TGFβ/Activina, el cual es una serina/treonina-kinasa membranal señalizante intracelularmente. Las proteínas Lefty, que son también miembros de la familia TGFβ, interactúan con los co-receptores CFC, antagonizando por competencia la unión de Nodal y Vg1/GDF1¹²⁵. El mismo dominio CFC de los miembros de la subfamilia CFC les permite interactuar con los miembros de la subfamilia EGF-TMEFF, lo cual hace que por competición el señalamiento de Nodal no se lleve a cabo¹²⁶.

Se ha encontrado también una función morfogénica de la Ruta Nodal-Cripto1 en la Glándula Mamaria¹²⁷.

La ruta Nodal-Cripto1 se encuentra involucrada en Neoplasia Epitelial de la glándula mamaria, colon, pulmón, estómago y páncreas, y se constituye esto en el hecho de que es un nuevo blanco para inmunoterapia^{127,128}.

Genopatías del gen codificante de CFC1 se han identificado en casos esporádicos de Heterotaxia Visceral Autosómica, Ventrículo derecho con doble salida y Transposición de grandes Arterias con dextro-cayado aórtico, es decir transposición de los grandes vasos, aorta incorrectamente elevada a partir del ventrículo derecho y una arteria pulmonar incorrectamente originada a partir del ventrículo derecho^{129, 130}.

11-CRGF/TDGF1

Esta proteína fue detectada en líneas celulares de teratocarcinoma, es de 188 aminoácidos, y muestra una porción central con similitudes estructurales al resto de miembros de la familia, y a la subfamilia CFC, de tal forma que es miembro de esta subfamilia. Característicamente se ha determinado que puede ser expresado en muchos tipos celulares normales y neoplásicos, pero en células indiferenciadas, y su expresión desaparece cuando hay diferenciación inducida por el complejo vitamínico A¹³¹. Su gen posee 6 exones, y al comparar la estructura del gen del ratón y el gen humano, existe conservación de la estructura exónica e intrónica, excepto en los exones 1 y 3, puesto que estos son mucho más cortos en los

ratones, y tal diferencia resulta en diferentes proteínas aminoterminalmente. La proteína del ratón posee una secuencia péptido señal, ausente en la proteína humana^{132,133}.

CRGF es fundamental para el proceso de la formación del eje céfalo-caudal en el contexto del eje derecha-izquierda, así como también es esencial para el desarrollo del prosencéfalo(cerebro anterior). Antes de la etapa embrionaria de la gastrulación, CRGF es expresado inicialmente simétricamente uniforme en el epiblasto, y entonces llega a ser asimétrico en un gradiente proximal-distal. La forma de ejercer tal función es siendo cofactor de la cascada morfogénica dependiente de la proteína Nodal, como ya se mencionó^{121, 122, 123, 124}. Se ha detectado genopatías desfuncionalizantes en Defectos del Cerebro Anterior del tipo Holoprosencefalia^{134, 135, 136}. Su expresión juega un rol en la génesis de los Teratocarcinomas¹³¹.

12-Sub-familia EGF-TMEFFs

TMEFF1 fue clonado a partir de *Xenopus laevis* como el gen 7365, donde es expresado en tejidos neuroendocrinos. La proteína predicha contiene un péptido señal aminoterminal, una región transmembrana, dos dominios de follistatina-like, y un dominio EGF-like. A nivel citoplasmático posee un sitio asociador y activador de proteínas G triméricas. También posee sitios de n-glicosilación y anclaje a glicosaminoglicanos^{137,138}. TMEFF2 fue descubierta buscando miembros adicionales EGFs por dos grupos de investigación por aparte. TMEFF2 humana es una proteína de 368 aminoácidos que comparte aproximadamente 39% y 99% de identidad, con TMEFF1 humana y la versión de ratón de TMEFF2 respectivamente. Ambos miembros pierden argininas que son reemplazadas por histidinas en posiciones esenciales para la unión a ERBB1. Se detectan tres transcritos primarios distintos para TMEFF2 en cerebro, que difieren en el largo citosólico, producidos al parecer por corte y empalme alternativo. Así mismo existe una forma soluble, producida por la acción de una metaloproteína, cuya expresión es dependiente de la activación del factor de transcripción NF-κB(nuclear factor-kappa binding) por las cascadas señalizadoras dependientes de IL1β(Interleukina-1β) y TNFα(Factor de Necrosis Tumoral-α)¹³⁹. En cerebros de ratón se detectó fuerte expresión cerebral incluyendo bulbos olfatorios, hipocampo, cerebelo y sustancia nigra, y se condiera un factor fundamental de supervivencia para neuronas hipocámpales y mesencefálicas. TMEFFs son ligandos para ERBB4¹⁴⁰. TMEFF2 es expresado diferencialmente en el estroma y el epitelio de las regiones gástrica y colo-rectal del tracto

gastro-intestinal/digestivo. Tal fenómeno se deriva del silenciamiento por metilación del promotor del gen, en lesiones preneoplásicas colo-rectales del tipo los Pólipos Hiperplásicos Adenomatosos. Se ha encontrado también diferencialmente expresado en adenocarcinoma de próstata andrógeno independiente, y en leiomiomas uterinos. Se ha observado un rol en envejecimiento muscular^{141, 142, 143}.

13-VVGF

El "Vaccinia Virus Growth Factor" es 37% idéntico a EGF, posee 77 aminoácidos, siendo secretado cuando células son infectadas con este virus. De está se relaciona con la infectividad y citopaticidad del virus^{144, 145, 146, 147}.

CONCLUSIÓN

Los EGFs son una amplia gama de mediadores biológicos con roles fundamentales en embriogénesis, diferenciación, maduración, mantenimiento, regeneración celular, tisular y orgánica. Su papel en dismorfogénesis y neoplasia es definitiva. Aproximaciones a sus aspectos moleculares y celulares son un gran campo de investigación y terapéutica futura para ciertos trastornos humanos.

REFERENCIAS

1. Perbal B. Communication is the key. *Cell Communication and Signaling* 2003; 1: 3-4.
2. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combination ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 1997; 410: 83-6.
3. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 1962; 237: 1555, 62.
4. Riese D. J. II, Stern D. F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998; 20: 41-8.
5. Hinkle C. L, Sunnanborg S. W, Loiselle D. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 24179-88.
6. Sahin U, Weskamp G, Kelly K. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 2004; 164: 769-79.
7. Fischer O. M, Hart S, Gschwind A. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 2004; 24: 5172-83.
8. Masague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Ann. Rev. Neurosci.* 1993; 62: 515-41.
9. Smith J, Cook E, Fotheringham I. Chemical synthesis and cloning of a gene for human beta-urogastrone. *Nucleic Acid Res.* 1982; 10: 397-401.
10. Yang XL, Xiong WC, Mei L. Lipid rafts in neuregulin signaling at synapses. *Life Sci.* 2004; 75: 2495-504.
11. Gray A, Dull T. J, Ullrich A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* 1983; 303: 722-5.
12. Sudhof T. C, Russell D. W, Goldstein J. L. Cassette of eight exons shared by genes of LDL receptor and EGF precursor. *Science* 1985; 228: 893-5.
13. Carpenter S, Cohen S. Epidermal Growth Factor. *Ann. Rev. Biochem.* 1979; 48: 193-216.
14. Marani M, Hancock D, Lopes R. Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene* 2004; 23: 2331-41.
15. Tsutsumi O, Kurachi H, Oka T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* 1986; 233: 975-7.
16. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 1962; 237: 1555-62.
17. Mathison R, Davison J. S, Befus A. D. Neuroendocrine regulation of inflammation and tissue repair by submandibular gland factors. *Immunology today* 1994; 15: 527-32.
18. Lonnerdal B. Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiol. Rev.* 1997; 77: 643-669.
19. Pácha J. Development of Intestinal Transport Function in Mammals. *Physiol Rev.* 2000; 80: 1633 - 1667.
20. Dvorak B, Fituch C. C, Williams C. S. Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatr. Res.* 2003; 54: 15-9.
21. Takeda T, Sakata M, Minekawa R. Human milk induces fetal small intestinal cell proliferation-involvement of a different tyrosine kinase signaling pathway from epidermal growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 2004; 181: 449-57.
22. Xiao X, Wiong A, Chen X. Epidermal growth factor concentrations in human milk, cow's milk and cow's milk-based infants formulas. *Chin. Med. J(Engl).* 2002; 115: 451-4.
23. Dartt D. A. Interaction of EGF family growth factors and neurotransmitters in regulating lacrimal gland

- secretion. *Exp. Eye Res.* 2004; 78: 337-45.
24. Lamb D, Modjtahedi H, Plant N. J. EGF mediates monocyte chemotaxis and macrophage proliferation and EGF receptor is expressed in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2004; 176:21-6.
 25. Bezzerides V. J, Ramsey I. S, Kotecha S. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 690-2.
 26. Beauvillain J. C, Prevot V. Hypothalamic glial cells and endothelial cells as key regulators of GnRH secretion. *J. Soc. Biol.* 2004; 198: 68-72.
 27. Wong R. W, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 147-56.
 28. Xian C. J, Zhou X. F. EGF family of growth factors: essential roles and functional redundancy in the nerve system. *Front. Bioscie.* 2004; 9: 85-92.
 29. Dabrowski A. Exocrine pancreas; molecular basis for intracellular signalling, damage and protección-polish experience. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 54 Supple 3: 167-81.
 30. Futamura T, Toyooka K, Iritani S. Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Molec. Psychiat.* 2002; 7: 673-82.
 31. Le Stunff H, Mikami A, Giusssani P. Role of sphingosine-1-phosphate-phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 34290-7.
 32. Sassone-Corsi P, Mizzen C. A, Cheung P. Requirement of Rsk2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 1999; 285: 886-91.
 33. Chan S. Y., Wong R. W. C. Expression of epidermal growth factor in transgenic mice causes growth retardation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 38693-8.
 34. Wong R. W. C, Kwan R. W. P, Mak P.H. S. Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 18297-301.
 35. Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 2002; 359: 397-401.
 36. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S. Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 2000; 88: 759-65.
 37. Liu Z, Klominek J. Regulation of matrix metalloprotease activity in malignant mesothelioma cell lines by growth factors. *Thorax* 2003; 58: 198-203.
 38. Bredin C. G, Liu Z, Klominek J. Growth factor-enhanced expression and activity of matrix metalloproteases in human non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res.* 2003; 23: 4877-84.
 39. Higashiyama S, Abraham J. A, Miller J. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 1991; 251: 936-9.
 40. Fen Z, Chadly M. S, Yoshizumi M. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding the human heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor/diphtheria toxin receptor. *Biochemistry* 1993; 32: 7932-8.
 41. Higashiyama S, Lau K, Besner G. E. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor: multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 6205-12.
 42. Takazaki R, Shishido Y, Iwamoto R. Suppression of the biological activities of the EGF-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like growth factor. *J. Biol. Chem.* 2004 Aug 24; 279:47335-43.
 43. Michalsky M. P, Kuhn A, Mehta V. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases apoptosis in intestinal epithelial cells in vitro. *J. Pediatr. Surg.* 2001; 36: 1130-5.
 44. Horikawa M, Higashiyama S., Nomura S. Upregulation of endogenous heparin-binding EGF-like growth factor and its role as a survival factor in skeletal myotubes. *FEBS. Letters* 1999; 459: 100-4.
 45. Nguywn H. T, Bride S. H, Badawy A. B. E. Heparin-binding EGF-like growth factor is up-regulated in the obstructed kidney in a cell- and region-specific manner and acts to inhibit apoptosis. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 889-98.
 46. Leach R. E, Khalifa R, Ramirez N. D. Multiple roles for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor are suggested by its cell specific expression during the human endometrial cycle and early placentation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 3355-63.
 47. Chobotova K, Muchmore M.E, Carver J. The mitogenic potential of heparin-binding epidermal growth factor in the human endometrium is mediated by the epidermal growth factor receptor and is modulated by tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 5769-77.
 48. Pastore S, Mascia F, Mariani V. Epidermal growth factor receptor ligands and tumor necrosis factor-alpha coregulate chemokine expression in human keratinocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 973: 210-3.
 49. Sinclair N. F, Ai W, Raychowdhury R. Gastrin regulates the heparin-binding epidermal-like growth factor promoter via PKC/EGFR-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286: 992-9.
 50. Miyamoto S, Hirata M, Yamazaki A. Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian

- cancer therapy. *Cancer Res.* 2004; 64: 5720-7.
51. Takashima S. Pharmacological role of HB-EGF shedding by angiotensin II in cardiomyocytes. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2004; 124: 69-75.
 52. Morris J. B., Pham T. M., Kenney B. UTP transactivates epidermal growth factor receptors and promotes cardiomyocyte hypertrophy despite inhibiting transcription of the hypertrophic marker gene, atral natriuretic peptide. *J. Biol Chem.* 2004; 279: 8740-6.
 53. Umata T. Mechanism for activation of heparin-binding EGF-like growth factor induced by stimuli. *JUOEH* 2004; 26: 85-97.
 54. Nanba D., Higashiyama S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 13-9.
 55. Chang T. M., Neville D. M. Jr. Demonstration of diphtheria toxin receptors on surface membranes from both toxin-sensitive and toxin-resistant species. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 6866-71.
 56. Creagan R. P., Chen S. H., Ruddle F. H. Genetic analysis of the cell surface: association of human chromosome 5 with sensitivity to diphtheria toxin in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1975; 72: 2237-41.
 57. Pappenheimer A. M. Jr, Gill D. M. Diphtheria. *Science* 1973; 182: 353-8.
 58. Pappenheimer A. M. Jr. Diphtheria toxin. *Ann. Rev. Biochem.* 1977; 46: 69-94.
 59. Naglich J. G., Metherall J. E., Russell D. W. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 1992; 1051-61.
 60. Leach R. E., Romero R., Mee Kim Y. Pre-eclampsia and expression of heparin-binding EGF-like growth factor. *Lancet* 2002; 360: 1215-9.
 61. Mahtouk K., Jourdan M., De Vos J. An inhibitor of the EGF receptor family blocks myeloma cell growth factor activity of HB-EGF and potentiates dexamethasone or anti-IL-6 antibody-induced apoptosis. *Blood* 2004; 103: 1829-37.
 62. Fischer O. M., Hart S., Gschwind A. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin binding-epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 2004; 24: 5172-83.
 63. Tam J. P., Scheikh M. A., Solomon D. S. Efficient synthesis of human type alpha transforming growth factor: its physical and biological characterization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1986; 83: 8082-6.
 64. Adams M. E., Dwyer T. M., Dowler L. L. Mouse alpha-1 and beta-2 syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 25859-65.
 65. Grootjans J. J., Zimmermann P., Reeckmans G. Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1997; 94: 13683-8.
 66. Lin J. J., Jiang H., Fisher P. B. Melanoma differentiation associated gene-9, mda-9, is a human gamma interferon responsive gene. *Gene* 1998; 207: 105-110.
 67. Ahn A. H., Freener C. A., Gussoni E. The Three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 2724-30.
 68. Fernández-Larrea J., Merlos Suárez A., Urena J. M. A role for a PDZ protein in the early secretory pathway for the targeting of pro-TGF-alpha to the cell surface. *Molec. Cell.* 1999; 3: 423-33.
 69. Kramer A., Yang F. C., Snodgrass P. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 2001; 294: 2511-5.
 70. Brissenden J. E., Derynck R., Francke U. Transforming growth factor alpha gene (TGFA) maps to human chromosome 2 close to the breakpoint of the t(2;8) variant translocation in Burkitt lymphoma. *Cytogenet. Cell Genet.* 1985; 40: 589.
 71. Collin G. B., Marshall J. D., Naggert J. K. TGFA: exon-intron structure and evaluation as a candidate gene for Alstrom syndrome. *Clin. Genet.* 1999; 55: 61-2.
 72. Ellis D. L., Kafka S. P., Chow J. C. Melanoma, growth factors, acanthosis nigricans, the sign of Leser-Trelat, and multiple acrochordons: a possible role for alpha-transforming growth factor in cutaneous paraneoplastic syndromes. *New Eng. J. Med.* 1987; 317: 1582-7.
 73. Shing Y., Christofori G., Hanahan D. Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 1993; 259: 1604-7.
 74. Sasada R., Ono Y., Taniyama Y. Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 190: 1173-9.
 75. Watanabe T., Shintani A., Nakata M. Et al. Recombinant human betacellulin: molecular structure, biological activities, and receptor interaction. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 9966-73.
 76. Park J. Y., Su Y. Q., Ariga M. Et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004; 303: 682-4
 77. Mifune M., Ohtsu H., Suzuki H. Signal transduction of betacellulin in growth and migration of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: 807-13.
 78. Buteau J., Foisy S., Joly E., Prentki M. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor

- receptor. *Diabetes* 2003; 52: 124-32.
79. Yamamoto T, Akisue T, Marui T. Expression of betacellulin, heparin-binding epidermal growth factor and epiregulin in human malignant fibrous histiocytoma. *Anticancer Res.* 2004; 24:2007-10.
 80. O-charoenrat P, Wongkajornsilp A, Rhys-Evans P.H. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int. J. Cancer.* 2004;111:174-83.
 81. Freimann S, Ben-Ami I, Hirsch L. Drug development for ovarian hyper-.stimulation and anti-cancer treatment: blocking of gonadotropin signaling for epiregulin and amphiregulin biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 989-96.
 82. Shoyab M, Plowman G. D, McDonald V. L. Structure and function of human amphiregulin: A member of the epidermal growth factor family. *Science* 1989; 243: 1074-6.
 83. Shoyab M, McDonald V. L, Bradley J. G. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulatin glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinome cell line MCF-7. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1988; 85: 6528-32.
 84. Shoyab M, Plowman G. D, McDonald V. L. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 1989; 243: 1074-6.
 85. Pathak B. G, Gilbert D. J, Harrinson C. A. Mouse chromosomal location of three EGF receptor ligand: amphiregulin(Areg), betacellulin(Btc), and heparin-binding EGF(Hegfl). *Genomics* 1995; 28: 116-8.
 86. Kimura H, Fischer W. H, Schubert D. Structure, expression and function of schwannoma-derived growth factor. *Nature* 1990; 348: 257-60.
 87. Cook P. W, Piepkorn M, Clegg C. H. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2286-94.
 88. De Angelis P. M, Fjell B, Kravik K. L. Molecular characterizations of deriavtes of HCT116 colorectal cancer cells that are resistants to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil *Int J. Oncol.* 2004; 24: 1279-88.
 89. Vendrell J. A, Magninon F, Danis E, Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. *J. Mol. Endocrinol.* 2004; 32: 397-414.
 90. Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem. J.* 1997; 326: 69-75.
 91. Shirasawa S, Sugiyama S, Baba I. Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101(38):13921-6.
 92. Taylor D. S, Cheng ., Pawlowski J. E. Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by AngII, ET1 and a-Thrombin. *Proc. Nac. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; 964; 1633-8.
 93. Koo B. H, Kim D. S. Factor Xa induces mitogenesis of vascular smooth muscle cells via autocrine production of Epiregulin. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 52578-86.
 94. Bradford B. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Phys. Rev.* 2001; 81: 999-1030.
 95. Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D. Epiregulin: a novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 7495-500.
 96. Holmes W. E, Sliwkowski M. X, Akita R. W. Identification of heregulin, a specific activator of p185(erbB2). *Science* 1992; 256: 1205-10.
 97. Wolpowitz D, Mason T. B. A, Dietric P. Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 2000; 25: 79-91.
 98. Bao J, Wolpowitz D, Role LW. Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J. Cell. Biol.* 2003 Jun 23;161(6):1133-41. 99-Cannella B, Hoban C. J, Gao Y. L. The neuregulin, glial growth factor-2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1998; 95: 10100-5.
 100. Fernández P. A, Tang D. G, Cheng I. Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron* 2000; 28: 81-90.
 101. Martinou J. C, Falls D, Fischbach G.D. Acetylcholine receptor-inducing activity stimulates expression of the epsilon-subunit gene of the muscle acetylcholine receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1991; 88: 7669-73.
 102. Vermeer P. D, Einwalter L. A, Moninger T. O. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 2003; 422: 322-6.
 103. Rentscheler S, Zander J, Meyers K. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002; 19464-9.
 104. Lemmens K, Fransen P, Sys SU. Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation.* 2004;109:324-6.
 105. Fukazawa R, Miller TA, Kuramochi Y. Neuregulin-1

- protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2003;35:1473-9.
106. Brown DJ, Lin B, Holguin B. Expression of neuregulin 1, a member of the epidermal growth factor family, is expressed as multiple splice variants in the adult human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45:3021-9.
107. Fried K, Risling M, Tidcombe H. Expression of ErbB3, ErbB4, and neuregulin-1 mRNA during tooth development. *Dev. Dyn.* 2002;224:356-60.
108. Liu J, Kern JA. Neuregulin-1 activates the JAK-STAT pathway and regulates lung epithelial cell proliferation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002;27:306-13.
109. Golding M, Ruhrberg C, Sandle J. Mapping nucleolar and spliceosome localization sequences of neuregulin1-beta3. *Exp. Cell Res.* 2004; 299: 110-18.
110. Ni C. Y, Murphy M. P, Golde T. E, Gamma-secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 2001; 294: 2179-81.
111. Stefansson H, Sarginson J, Kong A. Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 83-7.
112. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71: 877-92.
113. Zhao X, Shi Y, Tang J. A case control and family based association study of the neuregulin1 gene and schizophrenia. *J. Med. Genet.* 2004; 41: 31-4.
114. Tal-Or P, Di-Segni A, Lupowitz Z. Neuregulin promotes autophagic cell death of prostate cancer cells. *Prostate.* 2003; 55:147-57.
115. Carraway K. L. III, Weber J. L, Unger M. J. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinase. *Nature* 1997; 387: 512-6.
116. Busfield S. J, Michnick D. A, Chickering T. W. Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus. *Molec. Cell. Biol* 1997; 17: 4007-14.
117. Nakano N, Higashiyama S, Ohmoto H. The N-terminal region of NTAK/Neuregulin-2 isoforms has a inhibitory activity on angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 11465-70.
118. Ring H. Z, Chang H, Guilbot A. The human neuregulin-2(NRG2) gene: cloning, mapping and evaluation as a candidate for the autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease linked to 5q. *Hum. Genet.* 1999; 104: 326-32.
119. Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997; 18: 847-55.
120. Zhang D, Sliwkowski M. X, Mark M. Neuregulin-3(NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 9562-7.
121. Shen M. M, Wang H, Leder P. A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* 1997; 124: 429-442.
122. Schier A. F, Shen M. M. Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 2000; 403: 385-9.
123. Shen M. M, Schier A. F. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. *Trends Genet.* 2000; 16: 303-9.
124. Burdine R. D, Schier A. F. Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev.* 2000; 14: 763-76.
125. Cheng S. K, Olale F, Brivanlou A. H. Lefty blocks a subset of TGFbeta signals by antagonizing EGF-CFC coreceptors. *Plos Biol.* 2004;2:E30.
126. Harms P. W., Chang C. Tomoregulin-1(TMEFF1) inhibits nodal signaling through direct binding to the nodal coreceptor Cripto. *Genes Dev.* 2003; 17: 2624-9.
127. Kenney N. J, Adkins H. B, Sanicola M. Nodal and cripto-1: embryonic pattern formation genes involved in mammary gland development and tumorigenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2004; 9: 133-44.
128. Xing P. X, Hu X. F, Pietersz G. A. Cripto: a novel target for antibody-based cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 2004; 64: 4018-23.
129. Godtmundt E, Bamford R, Karkera J. D. CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70: 776-80.
130. Bamford R. N, Roessler E, Burdine R. D. Loss of function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nature Genet.* 2000; 26: 365-9.
131. Ciccodicola A, Dono R, Obici S. Molecular characterization of a gene of the "EGF family" expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 1989; 8: 1987-91.
132. Liguori G, De Gregorio L, Tucci M. Mapping of the mouse Tdgf1 gene and Tdgf pseudogenes. *Mammalian Genome* 1997; 8: 502-5.
133. Liguori G, Tucci M, Montuori N. Characterization of the mouse Tdgf1 gene and Tdgf pseudogenes. *Mammalian Genome* 1996; 7: 344-8.
134. Dono R, Montuori N, Rocchi N. Isolation and characterization of the CRIPTO autosomal gene and its X-linked related sequence. *Am. J. Human. Genet.* 1991; 49: 555-65.
135. Eib D. W, Martens G. J. A novel transmembrane protein with epidermal growth factor and follistatin domains expressed in the hypothalamo-hypophysial axis of *Xenopus laevis*. *J. Neurochem.* 1996; 67: 1047-55.

136. de la Cruz J. M, Bamford R. N, Burdine R. D. A loss of function mutation in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects. *Hum. Genet.* 2002; 110: 422-8.
137. Eib D. W, Merckx G. F. M, Cremers F. P. M. Assignment of H7365(C9orf2) to human chromosome band 9q31 by somatic cell hybrid analysis and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 1998; 81: 180-1.
138. Lin H, Wada K, Yonezawa M. Tomoregulin ectodomain shedding by proinflammatory cytokines. *Life Sci.* 2003; 73: 1617-27.
139. Horie M, Mitsumoto Y., Kyushiki H. Identification and characterization of TMERF2, a novel survival factor for hippocampal and mesencephalic neurons. *Genomics* 2000; 67: 146-52.
140. Uchida T, Wada K, Akamatsu T. A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB4 in MNK28 gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 266: 593-602.
141. Young J, Biden K. G, Siomms L. A. EHPP1: a transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98: 265-70.
142. Wu X, Blanck A, Norstedt G. Identification of genes with higher expression in human uterine leiomyomas than in the corresponding myometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 2002; 8: 246-54.
143. Welle S, Brooks A. I, Delehanty J. M. Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women. *Exp. Gerontol.* 2004; 3: 369-77.
144. Kim H. S, Lee Y. H, Min D. S. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by vaccinia virus growth factor. *Virology* 1995; 214: 21-8.
145. Jin Q, Yang T, Hou Y. Expression of secreted ligand domain of vaccinia growth factor encoded by vaccinia virus strain tian tan in E. Coli and insect cells. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chaung Bing Du Xue Za Zhi.* 1998; 12: 26-8.
146. Da Fonseca F. G, Silva R. L., Marques J. T. The genome of cowpox virus contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. *Virus Genes.* 1999; 18: 151-60.
147. McCart J. A, Ward J. M, Lee J. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* 2001; 24: 8751-7.