

p53, un gen supresor tumoral

p53, a tumor suppressor gene

M. López*, M. Anzola*, N. Cuevas-Salazar*, J.M. Aguirre**, M. Martínez de Pancorbo*

*Dpto. Z. y Dinámica Celular A., Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/EHU. Vitoria-Gasteiz.

**Medicina Bucal, Dpto. de Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/EHU.

RESUMEN

Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular como la regulación de la expresión génica, control del ciclo celular, programación de la muerte celular y estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular, de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula lo cual conduce en ocasiones al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos.

El gen p53 pertenece al grupo de genes implicados en el control del ciclo celular. Este gen tiene múltiples funciones ya que aparece implicado no sólo en el control del ciclo celular sino también en la integridad del ADN y la supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan el ADN. La alteración del gen p53 confiere un riesgo muy elevado de desarrollar cáncer y la mutación del mismo es uno de los cambios genómicos más frecuentes en el cáncer humano.

PALABRAS CLAVE: p53, mutación, apoptosis, gen supresor tumoral.

SUMMARY

Tumor suppressor genes are involved in several processes of cell division such as, transcriptional regulation, cell cycle control, programmed cell death and genome stability. Loss of activity of these genes causes the inability of response to the mechanisms of control that regulate cell division, so that an uncontrolled cell proliferation is caused which sometimes leads to the development of neoplasias.

p53 tumor suppressor gene is a multifactorial factor able to control cell cycle progression, DNA integrity and survival of the cells exposed to DNA damaging agents. p53 gene alteration confers a high risk of developing cancer and its mutation is one of the most frequent genetic changes in human neoplasia.

KEYWORDS: p53, mutation, apoptosis, tumor suppressor gene.

LABURPENEA

Gene supresore tumoralek zatiketa zelularren zenbait prozesutan parte hartzen dute, hala nola gene adierazpenaren erregulazioa, ziklo zelularren kontrola, heriotza zelularren programazioa eta genomaren egonkortasuna. Gene hauek beren jardura gaitzeak zatiketa zelularra erregulatzen duten kontrol mekanismoei erantzuteko gaitasuna ezeztatzen du, eta ondorioz, zelularon ugaltze gutxi-asko kontrolik gabea gertatzen da; beraz, zenbaitetan neoplasiak garatzen dira eta neoplasia horiek agresiboagoak diren prozesu tumoral bihurtzen dira.

p53 genea ziklo zelularren kontrolean parte hartzen duten geneen taldekoa da. Gene honek era askolako funtzioak ditu, ziklo zelularren kontrolean agertzeaz gainera, ADNaren integritatean eta ADNaren kalitatean duten agenteen eraginaren mende dauden zelulen biziraupenean ere zeresanik baitu, p53 genea aldatzeak minbizia garatzeko arrisku oso handia dakar eta haren mutazioa giza minbiziaren aldaketa genomiko sarrienetakoa bat da. **HITZ NAGUSIAK:** p53, mutazioa, apoptosis, gene supresore tumoralak.

Correspondencia:
Marian Martínez de Pancorbo
Dpto. Z. y Dinámica Celular
Facultad de Farmacia
Universidad del País Vasco
Paseo de la Universidad, 7
01006 Vitoria-Gasteiz
Fax: 945 13 07 56
Correo electrónico: gcpmagom@lg.ehu.es

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto FIS/Dpto. de Sanidad del Gobierno Vasco 99/09409

1. Introducción

La prevalencia del cáncer es una característica de la época moderna. Durante las últimas décadas ha habido importantes contribuciones a la comprensión de los mecanismos tumorigénicos habiéndose llegado a la conclusión de que el cáncer es consecuencia de múltiples alteraciones del genoma. En un primer momento los oncogenes han atraído considerable atención. El descubrimiento de los genes supresores de tumores fue posterior a la caracterización de los oncogenes. Incluso su misma existencia fue puesta en duda durante cierto tiempo. Sin embargo, en la actualidad, el número de nuevos genes supresores tumorales identificados, relevantes para el desarrollo de tumores en humanos, crece a ritmo vertiginoso. Se sospecha que en el genoma humano existen al menos 50 genes supresores tumorales que están implicados en diversos procesos tales como el control del ciclo celular, regulación transcripcional, programación de la muerte celular (apoptosis) y estabilidad genética (1). En la presente revisión trataremos del gen supresor del tumor que codifica la proteína p53, gen también conocido como el guardián del genoma.

2. Genes supresores de tumores

El cáncer es el resultado de una serie de alteraciones genéticas que se producen al azar y conducen a la perturbación de los controles normales de la proliferación celular que está regulada por proto-oncogenes que promueven el crecimiento celular y contrabalanceada por genes supresores de tumores (2).

Los proto-oncogenes pueden volverse hiperactivos por mutaciones que tienen un efecto dominante generando los oncogenes que fuerzan al crecimiento de las células tumorales. Inversamente, las lesiones genéticas de los genes supresores de tumores tienen un efecto inactiva-

dor. Estos genes mutados se manifiestan de forma recesiva (3, 4) de manera que, la pérdida o inactivación de ambos alelos conduce al fenotipo neoplásico (2,5). Se han utilizado varios criterios para definir los genes supresores de tumores.

a) Un alto grado de conservación evolutiva.
b) Habitualmente están implicados en el control del desarrollo de varias clases de tumores ya que su función normal es inhibir o poner freno al crecimiento celular, previniendo el desarrollo de la neoplasia.

c) Tienden a ser recesivos, ambos alelos normales deben mutar para transformar células normales en tumorales.

d) Están frecuentemente asociados con la pérdida de un alelo resultando en la homocigosidad del gen supresor del tumor, así como de los marcadores que le circundan.

e) Las mutaciones en estos genes provocan que la célula ignore uno o más de los componentes de la red de señales inhibitorias, eliminando las barreras del crecimiento celular y resultando en una tasa más elevada de crecimiento canceroso controlado.

f) Los productos de los genes supresores de tumores funcionan en muy diversas localizaciones celulares.

Tradicionalmente la inactivación de un gen supresor de tumor ha sido explicada por los mecanismos más sencillos que contribuyen a la perturbación de la función y de la estructura del gen que son las deleciones, mutaciones puntuales e inserciones. Pero existen otros muchos mecanismos que no afectan a la región codificante del gen pero sí a la expresión de la proteína supresora tumoral como son las alteraciones de otras regiones génicas: promotor, secuencias reguladoras, regiones implicadas en la maduración del ARN. Por otra parte la proteína puede no ser funcional debido al transporte inadecuado de la proteína supresora tumoral a la localización subcelular donde es funcional. Además oncoproteínas de origen vírico pueden inducir la degradación de la proteína supresora o inhibir la transcripción del propio gen. Estos mecanismos se muestran en la Tabla 1.

3. Caracterización de p53

La proteína codificada por el gen supresor de tumor p53, es una fosfoproteína que se localiza en el núcleo celular.

Esta proteína fue descubierta a finales de la década de los 70 e identificada como una fosfoproteína celular de 53 kD capaz de enlazarse al antígeno transformante SV40 T (6, 7), una propiedad que también es compartida por la proteína retinoblas-

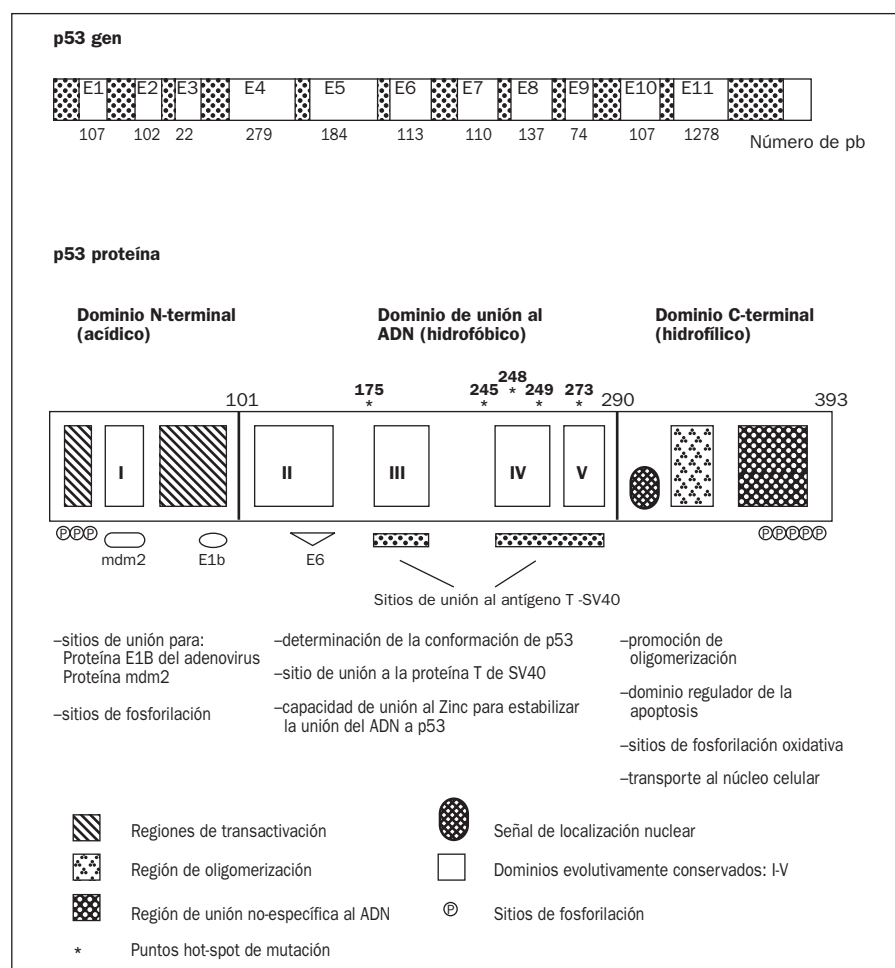


Fig. 1: Estructura del gen p53 y dominios funcionales de la proteína p53

toma, pRb. Inicialmente se sugirió que p53 era un oncogén (10) capaz de inmortalizar las células por sí mismo, o capaz de transformarlas en conjunción con el oncogén ras. Más tarde se demostró que la forma

mutante de p53 era responsable de los efectos descritos, mientras que la forma salvaje suprime la transformación (8). Una importante función de p53 es efectuar el control del ciclo celular en el paso de

TABLA 1

Mecanismos que contribuyen a la perturbación de la función o de la estructura de los genes supresores tumorales.

MECANISMO	
a) Mutación en la región codificante	Delección Inserción Mutación puntual Inserción Alu Expresión de mutantes negativos dominantes
b) Otras dianas de mutación	Mutación en el promotor Procesamiento alternativo Edición del RNA Variegación en el efecto de posición
c) Efectos modificadores	CpG hipermetilación Efectores negativos dominantes: –oncoproteínas virales –oncoproteínas celulares Transcritos antisentido
d) Localización subcelular	

G1 a S. Cuando se han producido lesiones en el ADN, p53 para el ciclo celular en G1-S para dar tiempo a que actúen los sistemas de reparación del ADN y de esta forma asegura: la integridad genómica; la reparación y síntesis del ADN; la diferenciación celular; la represión de la transcripción; la plasticidad genómica y la apoptosis. Mientras la forma salvaje de p53 actúa como un gen supresor de tumor recesivo, la forma mutante tiene las características de un oncogén dominante (9-20).

La mutación en p53 es uno de los cambios genéticos más frecuentemente encontrados en el cáncer humano. El gen p53 no es requerido para el desarrollo normal, pero su falta de función confiere un riesgo enormemente elevado de desarrollar cáncer, por ello, parece actuar verdaderamente como un gen supresor de tumor. La proteína p53 está presente normalmente en cantidades muy pequeñas, pero cuando las células son expuestas a estímulos genotóxicos, los niveles de p53 se incrementan rápidamente e inician un programa de muerte celular mediado por la regulación de la transcripción. Esta respuesta se pierde en muchas células tumorales ya que tienen inactivado su gen p53 por mutación o bloqueada su actividad mediante proteínas que se enlazan a p53 y la neutralizan (21).

4. Localización subcelular y estructura de p53

El gen p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13 (17p13.1), y tiene aproximadamente 20 kb. Consta de 11 exones, siendo el primero no codificante y colocado a 8-10 kb de los exones 2-11, produce un transcrito de ARNm de 2,8 kb cuyo resultado es una proteína de 53 kD que tiene 393 aminoácidos. La estructura del gen p53 y de la proteína se describen en la Fig. 1.

El análisis de los niveles del ARNm de p53 sugiere que el gen se expresa en todos los tejidos corporales durante el desarrollo (21).

La proteína de tipo salvaje normalmente reside en el núcleo celular y tiene una vida media muy corta en los tejidos normales. Esta proteína está siendo producida constantemente pero es muy rápidamente degradada con lo que su *steady-state* permanece muy bajo (21). En tejidos normales está presente en cantidades muy pequeñas que no pueden ser detectadas por inmunohistoquímica. Los agentes que dañan el ADN inducen p53 que se hace muy estable por un mecanismo post-trans-

TABLA 2

Genes cuya transcripción está regulada por la proteína p53

REGULACION POSITIVA		REGULACION NEGATIVA	
GEN	FUNCION	GEN	FUNCION
waf1	progresión del ciclo celular G1/S	PCNA	replicación del ADN
Rb	progresión del ciclo celular G1/S	c-fos	regulación de la transcripción
GADD45	reparación del ADN	c-jun	regulación de la expresión génica
mdm2	vía de autorregulación de p53	mdm2	transducción
bax	apoptosis	IL-2	regula el crecimiento
fas	apoptosis	bcl	inhibición de la apoptosis
thrombospondina	inhibidor de la angiogenesis	genes virales	diferentes funciones
IGF-BP3	progresión del ciclo celular G1/M		

cripcional que induce un elevado aumento de la cantidad de proteína p53 en el núcleo (22-25). La proteína tiene varias regiones evolutivamente conservadas (>90%) en los exones 1, 4, 5, 7 y 8, como se muestra en la Fig. 1, las cuales son esenciales para la función normal de la proteína p53. La proteína incluye varios dominios, tales como la región ácida N-terminal para la transactivación, el dominio core contiene una secuencia enlazante al ADN y el dominio terminal tiene propiedades reguladoras. Las modificaciones post-transcripcionales de la región terminal por acetilación, fosforilación y O-glicosilación generan cambios conformacionales en p53 que regulan la unión específica a secuencias del ADN así como el reconoci-

miento de ADN dañado, aunque estos mecanismos no son del todo conocidos.

5. Funciones de la proteína p53

La proteína salvaje p53 es un factor de transcripción (9) capaz de activar y/o inhibir la transcripción de una amplia variedad de genes. Tabla 2.

Cuando el ADN está dañado p53 se activa para mantener la integridad de la secuencia del ADN bien por medio de la parada de la proliferación celular mientras el daño es reparado, o alternativamente, dirigiendo la célula hacia la apoptosis (5). Ver Figura 2.

La Fig. 2 muestra algunas de las principales funciones de la proteína p53 tales

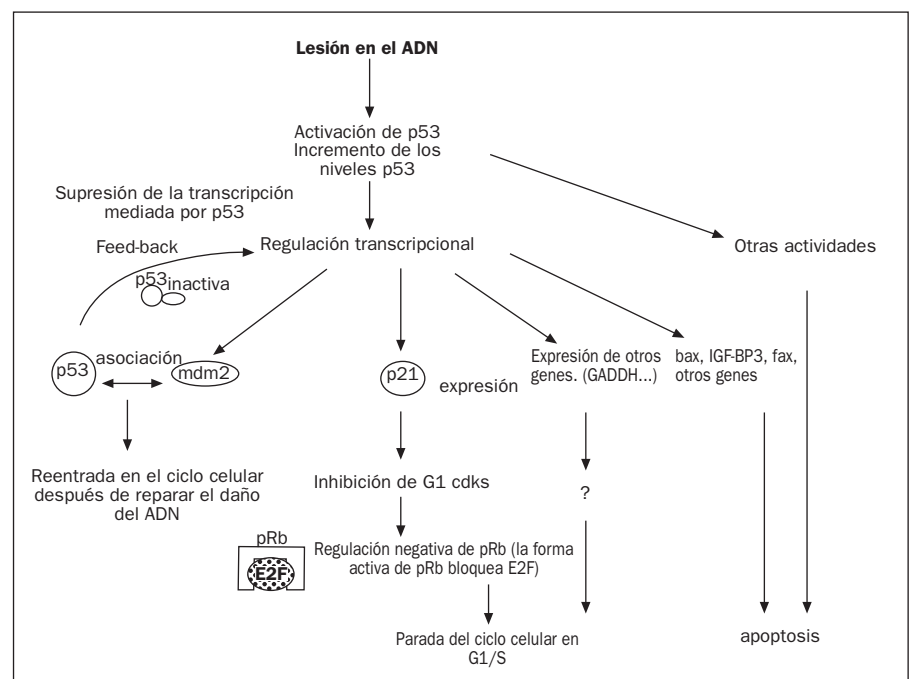


Fig. 2: Control de la progresión del ciclo celular en relación con p53.

como factor de transcripción, control del ciclo celular, inducción de la muerte celular programada y otras funciones relacionadas con la diferenciación neuronal, la supresión de la teratogénesis y el mantenimiento de la integridad genómica.

La proteína mutante pierde su función supresora de tumor, etapa clave que resulta en la cascada neoplásica. Además p53 es capaz de activar la vía apoptótica, por tanto su inactivación podría incrementar el grupo de células proliferantes así como su probabilidad de transformación neoplásica al inhibir la muerte celular programada (26).

Por tanto, p53 es un factor de transcripción multifactorial, implicado en el control de la progresión del ciclo celular, integridad del ADN y supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan al ADN (9-12, 26, 27).

6. Regulación de la actividad de p53

El principal estímulo de respuesta de p53 es el daño celular. La proteína p53 es activada como consecuencia de diversas condiciones de stress celular, incluido el daño del ADN, cambios de potencial redox de la célula, una reducción en el pool de ribonucleótidos y expresión de oncogenes (25). La proteína p53 está regulada principalmente de dos maneras:

a) estabilidad de la proteína.

b) activación mediante el paso desde un estado latente a un estado activo.

La estabilidad de la proteína p53 está regulada principalmente por la proteína celular mdm2 la cual ha demostrado enlazarse en, o próxima al, dominio de activación transcripcional de p53 para bloquear su función como factor transcripcional (28, 29). Se establece así un mecanismo de *feed-back* negativo entre ambas proteínas (Fig. 2).

En cuanto a la activación bioquímica de p53, el paso del estado latente al activo de la proteína, es controlado por la interacción con el ADN dañado mediante modificaciones postranscripcionales de p53 o bien por interacciones proteína-proteína (21). La proteína de tipo salvaje puede existir en una forma latente, incapaz de enlazarse al ADN, la cual puede ser modificada por cambios covalentes en el extremo amino-terminal y en el extremo C-terminal de la molécula (los últimos 30 aminoácidos). Este extremo C-terminal es un dominio regulador negativo, ya que su mera eliminación activa constitutivamente a la proteína (21). Por otra parte ciertas interacciones proteína-proteína afectan a la función de p53 como factor de transcrip-

ción así como a su capacidad de respuesta celular. Estas interacciones se producen entre p53 y reguladores tanto positivos de su actividad (HIF-a, c-abl, p300, PARP, WT-1, p19, pRB) como negativos (hsp70, BRCA 2, bcl-2, c-jun) (30). Aún se desconoce el modo en que algunas de estas proteínas regulan la actividad de p53.

Por último hay que tener en cuenta que además de que la proteína p53 sea estable y activa es necesario que se produzca un transporte adecuado de la misma del citoplasma al núcleo que es donde lleva a cabo sus funciones (31).

Todos estos mecanismos de regulación de p53 permiten que la proteína se torne estable y activa cuando la célula tiene lesiones en el ADN, siendo muy inestable en caso contrario.

7. Mutaciones de p53

Aproximadamente el 50% de los cánceres implican un gen p53 defectuoso, habitualmente inactivado por una mutación puntual o por delecciones génicas. Ambas lesiones impiden la oligomerización y formación de complejos tetraméricos capaces de enlazarse a secuencias específicas del ADN. Esto altera la función fisiológica normal de la proteína (32-36). La prevalencia de mutaciones de p53 varía entre tipos de tumores, de un 0 a un 60% en los principales tipos de cáncer y más del 80% en algunos subtipos histológicos (37).

El espectro de las mutaciones de p53 en los cánceres está proporcionando claves sobre la etiología y patogénesis molecular de las neoplasias (27). Los cánceres con mutaciones en p53 son más agresivos, con mayor capacidad metastática y a menudo fatales. Por tanto, la detección de las anomalías de p53 puede revelar aspectos del origen y evolución del cáncer humano (38, 39).

En la mayoría de los tumores humanos están inactivadas ambas copias de p53 (9, 20). El mecanismo más común de pérdida de funcionalidad de p53 es la mutación puntual de uno de los alelos y la delección del otro (5). La mutación de solamente uno de los alelos podría afectar a la respuesta de la célula mutante y podría quizá predisponer a la subsecuente inactivación del alelo restante (21). En este sentido cabe destacar que algunas mutaciones de p53 son dominantes (40) lo cual constituye una excepción a la norma que establece que los genes supresores manifiestan su acción cancerígena sólo si se produce una alteración de ambas copias del gen. Esto se debe a que

la proteína expresada en forma de tetramero presenta la máxima afinidad por las secuencias específicas de ADN a las cuales tiene que unirse para transactivar genes (41-43); un solo monómero defectuoso procedente de la mutación de uno de los dos alelos es suficiente para provocar la inactivación total de la proteína. Cuando los monómeros mutados forman complejos con los monómeros normales se alarga sensiblemente la vida de la proteína p53 (44).

8. Tipos y distribución de las mutaciones de p53

Han sido identificadas más de 4.200 mutaciones distribuidas a lo largo del gen p53 sobre más de 350 codones. Aproximadamente el 90% de las mutaciones reportadas se localizan en 190 aminoácidos centrales o dominio enlazante al ADN de la proteína (12). Esta proporción puede estar sobrestimada ya que muchos investigadores han limitado su análisis a los exones 5 a 8. En esta región muchas de las sustituciones de bases alteran la conformación de p53 (quizá por desnaturalización parcial) y su actividad de transactivación.

Los residuos más frecuentemente mutados en cánceres están todos en –o próximos a– la zona de interacción ADN-proteína. Aproximadamente el 20-30% de las mutaciones (45) ocurren en cinco codones *hotspots*: 175, 245, 248, 249 y 273. El porcentaje de mutaciones más elevado ha sido hallado en el codón 273.

El 80% de las mutaciones de p53 son de cambio de sentido por lo que provocan el cambio de un aminoácido por otro. Ello altera la conformación de la proteína y causa acumulación en el núcleo (46, 47). Tres cuartas partes de las sustituciones ocurren en pares de bases G:C (37). Otras mutaciones generan codones *stop* o desfase de lectura. Otros cambios en p53 consisten en delecciones, inserciones y LOH que ocurren también en un amplio abanico de tumores. Además existen otros mecanismos que pueden bloquear la actividad de p53, tales como el enlace a proteínas virales o la asociación a proteínas celulares como mdm2.

No todas las mutaciones son equivalentes. Las proteínas mutantes difieren en la extensión de la pérdida de su función supresora y en su capacidad de inhibir la actividad normal de p53 de forma negativa dominante (48).

Según su impacto sobre la estructura del dominio enlazante de ADN las mutaciones

pueden ser agrupadas en 3 grandes clases:

1. Clase I: las mutaciones afectan a los residuos de la superficie enlazante al ADN tales como Arg248 y Arg272, y perturban las uniones ADN-proteína.

2. Clase II: afecta a residuos cruciales para la orientación correcta sobre la superficie enlazante al ADN, tales como Arg175 y Arg 249, implicados en las conexiones entre el esqueleto y la superficie enlazante. Estas mutaciones pueden perturbar la flexibilidad de regulación de la proteína p53.

3. Las mutaciones de clase III se localizan dentro del esqueleto y perturban la estructura terciaria de todo el dominio enlazante del ADN.

Sin embargo, las propiedades de las mutaciones p53 dependen del tipo celular (49-51).

La clasificación de las mutaciones de p53 en grupos estructurales puede proporcionar una base molecular para explicar propiedades de los mutantes tales como la actividad negativa dominante, potencial oncogénico o sensibilidad a la temperatura. Además, las propiedades funcionales de un mutante particular dependen de la naturaleza de la sustitución aminoácida en un codón particular (52, 53).

9. Consecuencias celulares de las mutaciones de p53

Las mutaciones de p53 afectan directa, o indirectamente, a su interacción con el ADN demostrando que su enlace tiene un papel fundamental en el funcionamiento de p53 como un gen supresor tumoral. La mayoría de las mutaciones interfieren con la capacidad específica de p53 de enlazarse al ADN y por tanto, permiten la proliferación de células que, en condiciones de una función normal de p53 serían eliminadas o detenidas en su crecimiento. La mutación de p53 puede por tanto proporcionar una ventaja selectiva y favorecer la expansión clonal de células pre-neoplásicas y neoplásicas (45).

Algunas mutaciones producen una molécula de p53 capaz de estimular la división celular y provocan cáncer, ya que bloquean la actividad supresora de p53. Esta función puede verse alterada también por cambios en la localización subcelular de p53; como se ha mencionado previamente esta proteína no es funcional en el citoplasma ya que se trata de un factor transcripcional que ejerce su función reguladora negativa de la proliferación celular únicamente cuando está en el núcleo. El secuestro de la proteína p53 en el cito-

plasma impide por tanto su acción como supresor tumoral.

La proteína p53 mutante no tiene la capacidad de controlar el crecimiento celular ya que no puede detener el ciclo celular en G1 y pierde su capacidad de enlazarse al ADN para regular la transcripción (54).

Además algunas mutaciones del gen p53 producen una proteína que adquiere nuevas funciones con una implicación directa sobre la disregulación del ciclo celular (55). Este tipo de mutantes de p53 con carácter dominante positivo puede actuar en estado heterocigoto, y es por ello que las mutaciones de p53 llegan a ser tan comunes en los cánceres humanos.

Otra hipótesis es que las mutaciones también pueden ocurrir en un gen “corriente abajo” de p53, por ejemplo, WAF1 que es transactivado por p53 y es un inhibidor de CDKs (56, 57). La interrupción de la ruta de p53 podría interferir con el bucle *feed-back* que regula la expresión de la proteína p53.

Muchas proteínas p53 mutantes se acumulan en grandes cantidades en muchos tipos de células cancerosas y alcanzan concentraciones 10-100 veces más elevadas que en el tipo salvaje (21). Sin embargo, las mutaciones que resultan en delección o truncamiento (sin sentido y desfase de lectura) no causan acumulación de la proteína.

10. Diagnóstico de las mutaciones de p53

La alta incidencia de mutaciones de p53 en los cánceres humanos y las numerosas sugerencias (39, 53, 58) de varios grupos sobre las consecuencias tanto diagnósticas como pronósticas que la presencia o ausencia de mutaciones de p53 puede tener, señala la importancia de la optimización de los métodos para la determinación de p53.

Tradicionalmente, el análisis de p53 estaba basado en la detección de las proteínas p53 mutantes que tienen una vida media mucho más larga que las proteínas de tipo salvaje. Esta determinación es posible mediante técnicas inmunohistoquímicas que detectan la acumulación de p53 en las células. Las técnicas inmunohistoquímicas no pueden detectar los bajos niveles de p53 en las células normales, mientras que en células neoplásicas portadoras de mutaciones con cambio de sentido, la presencia de la proteína p53 es fácilmente observable ya que su elevada vida media aumenta la cantidad de la proteína.

Ocasionalmente, los tumores p53 histoquímicamente positivos no portan mutaciones (53, 59), lo que indica que existen otros mecanismos capaces de estabilizar a p53, tales como el enlace de proteínas celulares (28, 60). Por otro lado, ciertas mutaciones de desfase de lectura o de terminación de cadena resultan en la pérdida de expresión o inestabilidad de la proteína. Por tanto, estos tipos de alteraciones en la secuencia codificante de p53 son inmunohistoquímicamente indetectables. Estos cambios constituyen menos del 20% de las mutaciones de p53 descritas en tumores humanos (12). La concordancia entre mutación en el gen p53 y la acumulación de la proteína p53 no es perfecta, sin embargo, la inmunoreactividad es un indicador aproximado de los tumores con función p53 alterada (58).

Debido a que la inmunohistoquímica no siempre puede detectar las alteraciones de p53 en lesiones precancerosas, el estudio inmunohistoquímico debe ser complementado con el análisis genético para aumentar la sensibilidad de detección de los casos que progresarán hacia un tumor. Las alteraciones genéticas que surgen durante la tumorigénesis pueden ser de utilidad para la detección de células tumorales en muestras clínicas y su análisis tiene la ventaja de que se basa en el material genético. El ADN es un sustrato ideal para el diagnóstico molecular porque es el único material que sobrevive a las condiciones adversas experimentadas por muchos especímenes clínicos, además, la cantidad de material de partida necesario es muy reducida gracias a su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (61).

El procedimiento más habitual para el análisis genético de p53 consiste en la extracción del ADN, amplificación de los exones 4-8, donde se acumulan la mayoría de las mutaciones en este gen, y la detección de las mismas mediante la técnica SSCP (single strand conformational polymorphism). La técnica SSCP se basa en el principio de que las hebras sencillas de ADN, bajo condiciones no desnaturalizantes, asumen conformaciones variables según las consecuencias de sus nucleótidos. El cambio de una sola base puede causar un cambio conformacional en la molécula de ADN (54). Cuando se detecta una posible mutación se realiza el subsecuente análisis de secuenciación para confirmarla y determinar el cambio de bases exacto así como su posición en la secuencia del gen.

Existen evidencias de que no todas las mutaciones de p53 pueden detectarse por SSCP y también hay casos de mutaciones que aparecen fuera de los exones 4-8.

La concordancia de resultados entre secuenciación del ADN y técnicas inmunológicas de detección de p53 es aproximadamente del 90% (54). Por tanto, el uso combinado de ambas técnicas es el método más fiable para el estudio de las mutaciones de p53.

Otro nivel de expresión del gen susceptible de estudio es el ARNm. El aislamiento del ARN de las muestras clínicas, su subsecuente conversión a cADN mediante RT-PCR es la aproximación más viable para evaluar la expresión génica en los pacientes de cáncer. Existen nuevas metodologías basadas en ARN para el descubrimiento de genes que pueden detectar estos cambios en la expresión, incluyendo sistemas de *cDNA chips* (62) y *serial analysis of gene expression* (SAGE) (63), que darán lugar a la detección de un número cada vez mayor de potenciales marcadores tumorales.

Las mutaciones no son los únicos mecanismos que pueden hacer perder la función normal de la proteína p53. Algunas oncoproteínas de origen viral son capaces de inducir la degradación de la proteína p53 o bien de reprimir su expresión a nivel transcripcional. La oncoproteína E6 sintetizada por ciertos papilomavirus humanos (HPV) (2), la oncoproteína X procedente del virus de la hepatitis B (64) y EBNA-5 codificada por el virus Epstein-Barr (65) son capaces de inducir la degradación de p53. Por otra parte el adenovirus E4orf6 es capaz de bloquear la transcripción del gen supresor tumoral p53 (66).

En pacientes que padecen un tipo de tumor relacionado con posibles infecciones víricas en los que además no se detecta ningún tipo de alteración en el gen p53 sería de gran interés clínico tanto la identificación del virus como el análisis de la expresión de proteínas oncogénicas.

11. Incidencia de las alteraciones de p53 en los tumores humanos

El análisis del gen y la proteína p53 en células tumorales muestra diferencias significativas entre los estadios de la tumorigénesis y los tipos tumorales, así como de sus tejidos de origen. En algunos tumores puede ocurrir la pérdida de uno de ambos alelos p53, reduciéndose así la concentración de p53 de tipo salvaje (67-69). En otros casos una mutación sin sentido resulta en p53 truncada (70). Han sido descubiertos más de 100 genes relacionados con cáncer, varios de los cuales están implicados en la historia natural del cáncer humano puesto que se han hallado mutados en los tumores. El gen supresor de tumor p53 es el ejemplo más notable porque está mutado en aproximadamente la mitad de casi todos los tipos de cánceres originados en un amplio espectro de tejidos (62). Las mutaciones de p53 se encuentran en todos los grandes grupos histopatogénicos (12, 71-73). La Figura 3 muestra la incidencia de mutaciones de p53 en cánceres humanos según los datos de Greenblatt et al., 1994

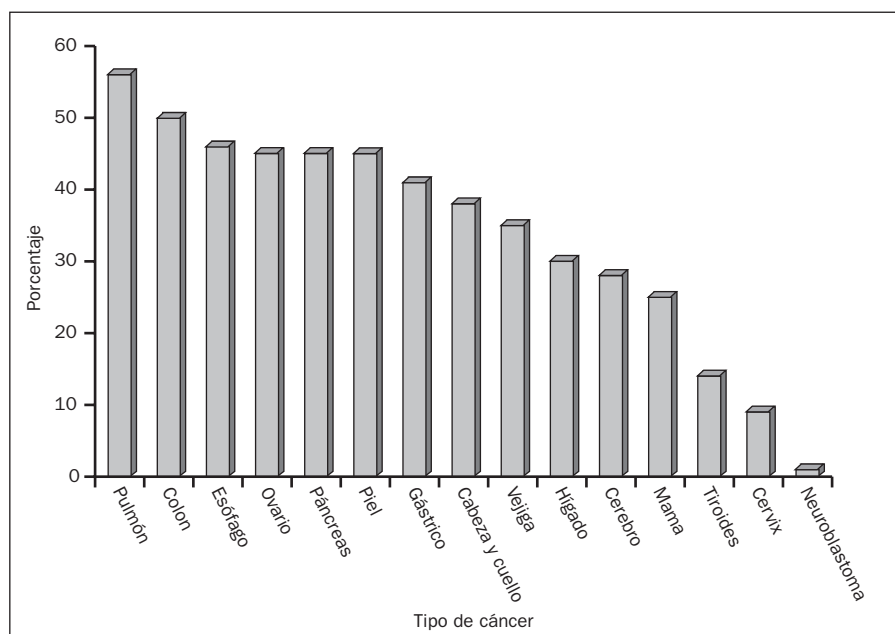


Fig. 3: Incidencia de mutaciones de p53 en cánceres humanos según los datos de Greenblatt et al. (1994) (37). En este estudio se evaluó la mutación de p53 con técnicas basadas en PCR. El screening corresponde a los exones 5-8 del gen p53.

(37). En este estudio se evaluaron las mutaciones de p53 analizando los exones 5-8 del gen con técnicas basadas en PCR. La identificación de los cambios genéticos que conducen a la progresión del cáncer ha proporcionado un conjunto de marcadores moleculares y test, como el diagnóstico de p53, que pueden redefinir los criterios para el diagnóstico del cáncer y abrir nuevas posibilidades para su detección precoz. A la espera de un procedimiento de cura, el diagnóstico molecular preciso puede cambiar la acción clínica y el tratamiento de estos pacientes (61).

Referencias bibliográficas

- Rosell R. Molecular origins of human cancer. En: Rosell R, Abad A, Monzó M, Barnadas A. Manual de oncología clínica y molecular. Badalona, 2000: 1-15.
- Weinberg RA. Tumor suppressor gene. Science 1991; 254: 1138-1146.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. Cell 1991; 64: 235-248.
- Harris H. The genetic analysis of malignancy. J Cell Science 1986; 4: 431-444.
- Brown MA. Tumor suppressor genes and human cancer. Advances in Genetics 1997; 36: 45-135.
- Lane D, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature 1979; 278: 261-263.
- Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells an uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 1979; 17: 43-52.
- Malkin D. Germline p53 mutations and heritable cancer. Annu Rev Genetics 1994; 28: 443-465.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature 1991; 351: 453-456.
- Vogelstein B and Kinzler KW. p53 function and dysfunction. Cell 1992; 70: 523-526.
- Montenarh M. Functional implications of the growth-suppressor/oncoprotein p53. Int J Oncol 1992; 1: 37-45.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253: 49-53.
- Roter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. Adv Cancer Res 1991; 57: 257-272.
- Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? FASEB J 1992; 6: 3169-3176.
- Caron C, Fromental C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. Genes Chromosome Cancer 1992; 4: 1-15.
- Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, Winchester E. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. Nature 1993; 365: 79-82.
- Pietenpol JA, Vogelstein B. No room at the p53 inn. Nature 1993; 365: 17-18.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1995; 88: 323-331.
- Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind VH, Reid BJ. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. Science 1995; 267: 1353-1356.

20. Lane DP and Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990; 4: 1-8.
21. Lane DP. p53 and human cancers. *British Medical Bulletin* 1994; 50: 582-599.
22. Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiations stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 1984; 4: 1689-1694.
23. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-6311.
24. Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionising radiation: Defects in chromosome instability syndromes. *Cell* 1993; 75: 765-778.
25. Fritsche C, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 1993; 8: 307-318.
26. Harris CC and Holstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-1327.
27. Harris CC. The p53 tumour suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993; 262: 1980-1981.
28. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AL. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69: 1237-45.
29. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53. *Nature* 1993; 362: 857-860.
30. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1998; 18: 6145-6157.
31. Hansen R and Oren M. p53; from inductive signal to cellular effect. *Curr Op Genet & Dev* 1997; 7: 46-51.
32. Mowat MA, Cheng A, Kimura N, Bernstein A, Benchimol S. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemia cells transformed by friend virus. *Nature* 1985; 314: 633-636.
33. Prokocimer M, Shaklai M, Bassat HB, Wolf D, Goldfinger N, Rotter V. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 68: 113-118.
34. Masuda H, Miller C, Koeffler H, Battifora A, Cline MJ. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7716-7726.
35. Ahuja H, Bar-Eli M, Advani SH, Benchimol S, Cline MJ. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1989; 86: 6783-6787.
36. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. P53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-494.
37. Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
38. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2: 32-37.
39. Harris CC. The 1995 Walter Hubert Lecture- molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumor-suppressor gene. *Br J Cancer* 1996; 73: 261-269.
40. Benito de las Heras M. Implicaciones de los oncogenes en el cáncer de colon. *Rev Cáncer* 1992; 6: 156-159.
41. Hupp TR, Lane DP. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* 1994; 4: 865-875.
42. Hainault P, Hall A, Milner J. Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding. *Oncogene* 1994; 9: 299-303.
43. Wang Y, Schwedes JF, Parks D, Mann K, Tegtmeyer P. Interaction of p53 with its consensus DNA binding site. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2157-2165.
44. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 50006-5010.
45. Hainault S, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris CC, Montesano R. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 151-157.
46. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect: a monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9: 1595-1602.
47. Bartek J, Bartkova J, Vogtšek B. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6: 1699-1703.
48. Ko LJ and Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10: 1054-1072.
49. Ory K, Legros Y, Auguin C, Soussi T. Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 1994; 13: 3496-3504.
50. Forrester K, Lupold SE, Ott VL, Chay CH, Band V, Wang XW, Harris CC. Effects of the p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 1994; 13: 3496-3504.
51. Forrester K, Lupold SE, Ott VL, Chay CH, Band V, Wang XW, Harris CC. Effects of the p53 mutants on wild-type p53 mediated transactivation are cell type dependent. *Oncogene* 1995; 10: 2103-2011.
52. Rolley N, Butcher S, Milner J. Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene* 1995; 11: 763-770.
53. Greenblatt MS, Grollman AP, Harris CC. Deletions and insertions in the p53 tumor suppressor gene in human cancers: confirmation of the DNA polymerase slippage/misalignment model. *Cancer Res* 1996; 56: 2130-2136.
54. Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1187-1198.
55. Diamandis EF. Clinical applications of the p53 tumor suppressor gene. *Clinica Chimica Acta* 1995; 237: 79-90.
56. De Mendoza G, Barberá G. P53: factores que modulan su actividad reguladora. *Rev Diagn Biol* 1999; 48: 51-61.
57. El-Dairy WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825.
58. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816.
59. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-26.
60. Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modali RV, Ullrich S, Romano JW, Appella E, Testa JR. p53 mutations ras mutations, and p53 heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 4090-6.
61. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, Geore DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53 associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-83.
62. Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1998; 278: 1054-1058.
63. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet* 1992; 14: 457-460.
64. Zhang L, Zou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruben RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276: 1268-72.
65. Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis B X antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993; 8: 1109-1117.
66. Szekely L, Selinova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG. EBNA-5 an Epstein Barr virus encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5455-5459.
67. Dobner T, Horikoshi N, Rubenwolf S, Shenk T. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 1996; 272: 1470-1473.
68. Khine K, Smith DR, Goh HS. High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* 1994; 73: 28-35.
69. Kohler MF, Marks JR, Wiseman RW, Jacobs JJ, Davidoff AM, Clarke-Pearson DL, Soper JT, Bast RC Jr, Berchuck A. Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1513-1519.
70. Jegu N, Thomas G, Mahemil R. Short direct repeats flanking deletions, and duplicating insertions in p53 gene in human cancers. *Oncogene* 1993; 8: 209-213.
71. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5006-5010.
72. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 174-186.
73. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-661.
74. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 69: 409-416.