

300627

20



**UNIVERSIDAD LA SALLE**

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

AVANCES EN EL ESTUDIO DEL GEN  
SUPRESOR TUMORAL p53 ASOCIADOS AL  
DESARROLLO DE LA TRANSFORMACION  
NEOPLASICA EN HUMANOS

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
MARGARITA HERNANDEZ SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: QFB LETICIA LINARES ESTUDILLO

México, D. F.

1995

**FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Gracias a su amor y fe en mí*

*A mis padres que con su amor me formaron y con su entusiasmo tuvieron fe en mí para realizarme como profesional.*

*A Felipe, Anselmo y Javier que gracias a su ejemplo de tenacidad y dedicación compartimos la culminación de uno de los anhelos más grandes de mi vida.*

*Con profundo respeto como reconocimiento a mis profesores, Ma. Leticia Linares y José Antonio García , que con su consejo y orientación acompañaron momentos fundamentales para hacer posible la realización de este estudio.*

*De manera especial quiero agradecer a Nuestro Señor Padre por haberme dado la oportunidad de ver terminada una de las primeras metas como profesionista.*

## ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	2
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	4
CAPÍTULO III. GENERALIDADES	6
CAPÍTULO IV. p53 ASOCIADO A CÁNCER	17
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	61
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

## CAPÍTULO I

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.**

El desarrollo de la vida implica mutaciones en todas las células del organismo. Muchas alteraciones del genoma pueden ser subsanadas por la intervención de los sistemas enzimáticos reparadores del DNA (1). Con el transcurso de los años las mutaciones terminan por acumularse para crear un "mosaico" de células mutantes dentro de cada progenie celular.

En un momento determinado puede darse que alguna célula somática que completa los episodios genéticos necesarios se transforme en neoplásica, aumente su capacidad para proliferar y adopte un comportamiento invasor sobre el tejido circundante (2). Todas estas alteraciones se suceden como consecuencia de modificaciones en genes críticos, que codifican para las proteínas relacionadas con la multiplicación o diferenciación celular.

En general la mayor parte de los cánceres se origina por variaciones sobre oncogenes o sobre genes supresores de tumores (1). En el primer caso las mutaciones promueven un incremento en la expresión de un gen que tiene un efecto positivo, para llevar a la célula hacia la malignidad. En el segundo caso, las mutaciones de los genes supresores provocan una pérdida de la expresión de las proteínas reguladoras, que implica la vía libre para comportarse como una célula agresiva.



## CAPÍTULO II

## **CAPÍTULO II. OBJETIVOS.**

**Conocer las características, funciones y alteraciones que genera el gen supresor tumoral p53 en la etiología del cáncer humano.**

**Analizar las propuestas y avances en oncología molecular que diseñan tratamientos tentativos contra la transformación neoplásica.**

## CAPÍTULO III

## **CAPÍTULO III. GENERALIDADES.**

### **1. DEFINICIÓN Y LOCALIZACIÓN.**

El gen p53 es un supresor tumoral potente y suele encontrarse alterado en una gran variedad de neoplasias del ser humano (1). Un gen supresor tumoral se puede definir como aquel gen que inhibe la transformación neoplásica (2). Este gen se encuentra ubicado en el brazo corto o brazo "p" del cromosoma 17 humano.

El gen p53 codifica para una fosfoproteína de 53 kDa compuesta por 393 aminoácidos, que ejercen su acción en el núcleo celular y que recibe el mismo nombre del gen (p53) (3-5).

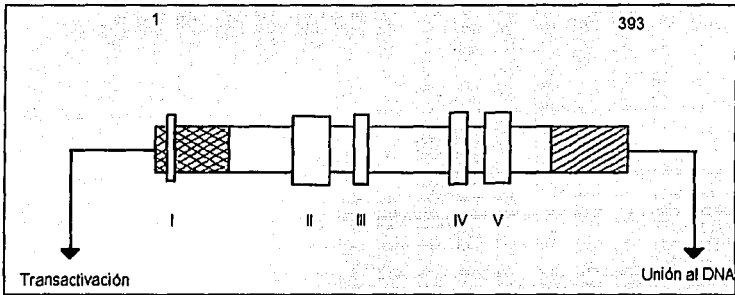
El estudio de las propiedades biológicas tanto de la proteína nativa como mutante es de vital importancia para entender la etiología de algunos cánceres.

Los mecanismos de inactivación de la función de p53, incluyen: 1) mutación; 2) inhibición por productos oncogénicos virales; 3) inhibición por regulación celular y 4) alteración en localización subcelular.

### **2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.**

La proteína p53 humana está compuesta por 393 aminoácidos reensamblados estructuralmente como un factor activador de la transcripción.

La proteína presenta cinco regiones bien definidas, en las que se presentan alteraciones frecuentes asociadas con muchos tumores de los seres humanos como cáncer de mama, colon, pulmón y también algunas leucemias y linfomas (5).



El extremo amino terminal de la p53 es altamente ácido con una carga negativa neta. Este dominio ácido se fusiona en la región de unión del DNA del GAL4, la proteína quimérica resultante puede activar la transcripción de un operón de GAL4. El extremo carboxilo terminal es rico en aminoácidos básicos; tiene una serina en la posición 315, la cual fosforilada puede tener una influencia en la carga de la proteína y como consecuencia alterar la localización subcelular y la actividad biológica de la proteína en el ciclo celular (6-8).

Mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), se lograron separar y

secuenciar fragmentos de DNA y se encontró que cada sitio de unión de p53 contiene 10 copias de 10 bp con el motif 5' - pupupu (A/T) (T/A) GPyPyPy - 3'.

Una copia de 10 bp es insuficiente para la unión, pero ésta es preservada cuando las dos copias son separadas por una secuencia de 13 bp al azar. Los sitios de unión de p53 tienen una simetría obvia, cuatro copias de la mitad del sitio 5'(A/T) GPyPyPy - 3' que están orientadas en sitios opuestos. Esto sugiere que p53 se puede unir a estos sitios como una proteína tetramérica (7). Otros estudios, confirman que p53 se encuentra como un tetrámero en solución (8).

Existen diversos sitios, donde se ha detectado una alta frecuencia mutagénica (*hotspots*), los cuales incluyen, los codones 175, 248, 273 y 281 entre otros (9).

El gen p53 está relacionado con la regulación de la proliferación celular; por lo que las mutaciones inciden en la génesis de la transformación neoplásica, ya que se produce una proteína, con actividad biológica o no, que desorganiza el ciclo celular.

La proteína p53 fue identificada inicialmente en su forma mutada, es decir, asociada con la transformación neoplásica, por ello en distintos estudios se le clasificó como un antígeno tumoral o una verdadera oncoproteína (30,31).

La p53 nativa, no presentaba facultades transformantes y podía comportarse como un

supresor tumoral (6).

Recientemente, se han conseguido cristalizar algunos dominios de la proteína p53, lo que ha permitido definir mejor su estructura. Cho y cols. reportaron la estructura cristalina del "dominio central", el cual abarca los residuos 102 a 292 (10a). Este dominio comprende los sitios de unión específicos al DNA, como son los que se presentan alrededor de los residuos 278 al 286 y del 248. Asimismo, se reportaron sitios de unión al zinc, aunque no se encontró la estructura clásica de dedos de zinc (10a).

Por otra parte, Clore y colaboradores, reportaron la estructura del dominio de oligomerización por el método de resonancia magnética nuclear (NMR) (10b). Este dominio comprende los residuos 319 al 360 y se sugiere que pueda jugar un papel primordial en la transformación celular, dado el requisito de oligomerización de la proteína p53 para ejercer su capacidad supresora.

### 3. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LA PROTEÍNA P53 NATIVA Y DE LA P53 MUTADA.

La p53 nativa actúa como un salvaguarda contra el cáncer y a lo largo de diversos estudios se ha determinado su capacidad de suprimir tumores.

En general, esta proteína tiene una vida media corta (generalmente menos de los 30

minutos) (11), inhibe el crecimiento de células tumorales en cultivo (12-18), e inhibe la transformación de fibroblastos primarios con la ayuda de oncogenes (19-20). La forma nativa de la proteína expone la actividad específica o no específica del DNA, y además es requerida para que se realice la transactivación transcripcional (21-29). Puede formar complejos con el antígeno T (30-31), del virus SV40, lo que provoca la transformación neoplásica. Esta proteína no es reconocida por el anticuerpo monoclonal PAb 240, el cual es específico para las proteínas mutadas (32-33). En cambio el anticuerpo monoclonal que la reconoce es el PAb 1620. Cuando el gen que codifica para la proteína sufre mutaciones puntuales o deleciones, debido a la agresión de distintos agentes, se origina una proteína con acciones biológicas muy diferentes a la forma nativa. Esta forma mutada tiene una vida media prolongada por varias horas, (34-37), fracasa en la supresión de células en crecimiento de tumores (12,13,16), y no inhibe la transformación de fibroblastos primarios por cooperación de oncogenes (19-20). Alelos humanos que contienen *hotspots*, pueden cooperar con el oncogén *ras* activado para variar gradualmente la transformación (37). La proteína no forma complejos oligoméricos con el antígeno T (16). Por lo tanto la p53 mutante desarrolla la proliferación celular, un efecto inverso al de la p53 nativa.

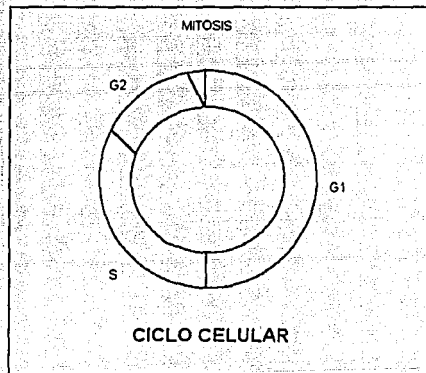
Las mutaciones del gen p53 son recesivas ya que contribuyen a la transformación neoplásica sólo cuando el alelo que cumple la función inhibidora se encuentra inactivado (23).



#### 4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA PROTEÍNA P53 NATIVA.

La p53 puede inducir la detención del crecimiento en la fase G1 del ciclo celular (38-43). Por lo tanto, es capaz de actuar como un regulador negativo en la progresión del ciclo celular. El mecanismo por el cual la p53 pone en juego ésta acción no está totalmente dilucidado, aunque los últimos resultados obtenidos parecen indicar que su estructura helicoidal le permite asociarse con zonas específicas del DNA, encargadas de iniciar la replicación celular (40). Su efecto inhibitorio, bloquea la entrada de la célula en la fase S del ciclo. Cuando se duplica el DNA y la obliga a permanecer en el estado G1 de la interfase. De modo alternativo, la p53 podría estar regulando la transcripción del DNA, que es cuando se codifican las proteínas que se relacionan con el pase de la fase G1 a la duplicación.

Esto hace pensar que la p53 puede estar implicada en la señal de iniciación por estímulo de elementos de restricción de crecimiento como: depleción de factores de crecimiento, exposición de citocinas, inhibidores de crecimiento, etc. Adicionalmente, la proteína p53 nativa aporta dos procesos biológicos.



En líneas celulares de leucemia mieloide murina, la activación de la p53 nativa guía a una muerte celular rápida, con distintas características de apoptosis, es decir, de muerte celular programada (44). En células progenitoras mieloides, la apoptosis sigue del retiro de factores de supervivencia como la IL-3 (45). La p53 puede participar en el cambio de eventos de iniciación de la ausencia de factores de supervivencia que eventualmente guían a la eliminación de células innecesarias. En cada caso, la pérdida de función de p53 puede permitir la supervivencia de estas células. Esto permite que células con alta selectividad, ayuden al avance y faciliten el establecimiento de poblaciones celulares neoplásicas *in vivo*. Por otra parte, se ha reportado que la apoptosis, mediada por la p53 es inhibida por la IL-6 (44), por lo que en presencia de p53 activa, IL-6 puede proveer la función necesaria para el crecimiento celular. La observación de que la p53 puede causar apoptosis, hace posible que otros supresores de tumores puedan estar también involucrados en el control de la muerte y supervivencia celular. Otra manifestación importante de la actividad de p53 es la inducción a la diferenciación.

##### 5. FUNCIONES BIOQUÍMICAS DE p53.

Las bases bioquímicas para una actividad supresora de tumores de la p53 nativa no ha sido bien establecida. La proteína p53 nativa está localizada en el núcleo para ejercer funciones antiproliferativas, por lo que sus actividades están asociadas con los procesos nucleares (41, 42, 46, y 47). Otros estudios muestran que p53 adquiere una función en la replicación del DNA. La p53 puede ser esencial en la organización de la

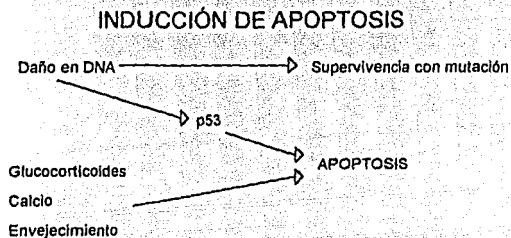
replicación del DNA seguida del daño del mismo (48-52).

La p53 puede ser un regulador transcripcional. Además la p53 nativa puede activar directamente la transcripción del gen promotor de la creatin cinasa del músculo (MCK) (53). Para esto, la proteína requiere de uniones selectivas para definir elementos del DNA. La activación transcripcional del promotor MCK es claramente mediada a través de secuencias específicas de unión de p53 con elementos del DNA localizados arriba del promotor basal. En adición a la regulación específica de promotores, la p53 puede actuar como represor transcripcional. De esta manera, la p53 nativa puede mostrar una regulación baja de proliferación de antígenos celulares nucleares (PCNA) (54) mRNA y con la interferencia de inducción del *c-fos* durante la estimulación de suero (55).

La proteína p53 nativa puede reprimir la transcripción de diversos promotores, incluyendo el gen *c-myc*, en sistemas transcripcionales *in vitro*, por lo que la represión transcripcional por p53 puede representar un efecto inhibitorio de la proteína en la maquinaria transcripcional, esto es una consecuencia secundaria de que p53 pueda intervenir en la detención del crecimiento. La p53 actúa como factor transcripcional, unida específicamente con otros genes y controlando su expresión. Por ejemplo, el *mdm2* aparece en la retroalimentación negativa con p53. Si esto no ocurre el *mdm2* es amplificado y se produce cáncer (múltiples copias de *mdm2* son encontrados en 30% de los sarcomas).

La p53 induce a las células al suicidio. La apoptosis es parte del desarrollo normal y también puede ser disparado por daño del DNA, radiaciones, algunos compuestos químicos, etc. También se ha mostrado que después del daño celular, los niveles de p53 y de su actividad transcripcional se incrementa dramáticamente (56).

Los genes supresores de tumores (p53) juegan un papel esencial en la inducción a la muerte celular programada (57).

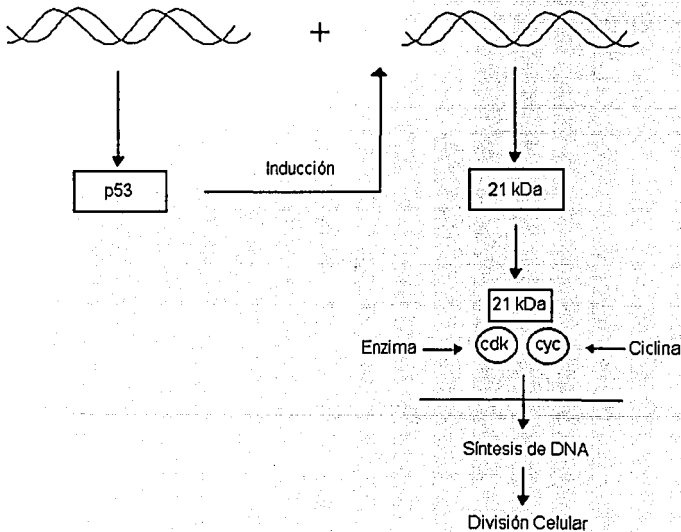


Si p53 une DNA específicamente y contiene un dominio ácido en su amino terminal, uno podría esperar que p53 puede activar la expresión de genes adyacentes al sitio de unión de p53. Esta activación puede ser indirecta, tal vez en respuesta a los numerosos cambios en la expresión genética y en los parámetros de crecimiento inducidos por niveles elevados de p53.

Estudios recientes indican que p53 suprime el crecimiento celular y esto se explica de

la siguiente manera: la proteína codificada por p53 estimula la producción de otras proteínas y estas proteínas secundarias inhiben enzimas clave necesarias para el manejo celular a través del ciclo celular y en la mitosis (57). Estas enzimas se denominan ciclinas dependientes de cinasas. La enzima clave no se une por conducto de la proteína de 21 kDa y, por lo tanto, induce a que se efectúe el ciclo celular, pero si la proteína se encuentra libre no se efectúa el desarrollo de este ciclo. Esto se expresa en el siguiente diagrama.

### SUPRESIÓN A TRAVÉS DEL CICLO CELULAR



## **CAPÍTULO IV**

## **CAPÍTULO IV. p53 ASOCIADO A CÁNCER.**

### **1. ANTECEDENTES**

Actualmente, los registros de salud estadounidenses muestran que la exposición ambiental y ocupacional de determinados agentes tóxicos cobra entre cincuenta mil y setenta mil muertos por año, con una presentación anual de trescientos cincuenta mil casos nuevos (58). Por supuesto, estas cifras no abarcan a los casi diez millones de personas que sufren accidentes de trabajo en ese mismo período y las diez mil muertes ocurridas por igual causa.

Explorando los antecedentes históricos, tal vez el aporte más importante sea el concepto del factor introducido por el médico italiano Bernardino Ramazzini en 1700. En su trabajo, comentó la observación de que el cáncer de mama tenía mayor incidencia en las monjas que en el resto de las mujeres, señalando una diferencia en el estilo de vida y en las experiencias del embarazo y la lactancia de ambos grupos de estudio.

En 1759, se advirtió que la inhalación de tabaco podía provocar cáncer en la cavidad oral y nasal (59). Más tarde, en 1775, se le adjudica a Sir Percival Pott la primera descripción de un cáncer de origen profesional (59). En su hipótesis, relacionaba la intensa exposición al hollín de las chimeneas con el desarrollo de cáncer de escroto, en los deshollinadores de Inglaterra. Pero el doctor Pott fue más allá de la simple descripción y completó su trabajo con las recomendaciones para su diagnóstico,

tratamiento quirúrgico y prevención.

Con el correr del tiempo, surgieron nuevas evidencias sobre la acción carcinogénica de ciertos factores ambientales en situaciones laborales. La lista fue ampliándose con la descripción del cáncer de vejiga en los trabajadores en contacto con anilinas, señalando en 1895, el desarrollo de leucemias y linfomas luego de la exposición al benceno, la esterilidad en las mujeres expuestas a ciertos pesticidas, el desarrollo de cáncer de senos paranasales en los trabajadores en contacto con el barniz y la aparición de neumopatías, cáncer de pulmón, y mesoteliomas por la inhalación de asbestos (58,59). El trabajo de Pott fue retomado en 1918, cuando se logró reproducir experimentalmente la acción carcinogénica del alquitrán. Estas experiencias de oncogénesis experimental fueron estudiadas en profundidad, en Argentina, por el doctor Angel H. Roffo, quien tuvo gran trascendencia en el plano internacional.

En el campo de la epidemiología general, la estimación del riesgo de desarrollar cáncer es una tarea multidisciplinaria diseñada para su aplicación en grupos humanos y poblacionales. Esto significa que sus conclusiones no permiten la extrapolación al individuo. Con el desarrollo de la epidemiología molecular, hoy es posible valorar el riesgo carcinogénico de una persona en particular, a través del estudio de la exposición, la absorción, el metabolismo individual y los mecanismos de reparación del DNA. Estos aspectos son los que producen el daño molecular en la célula sensible, pero en el efecto final intervienen otros factores, como la inestabilidad genómica y las alteraciones en los



protooncogenes, en los genes supresores de tumores y en las variaciones de los índices de mutación(1-2).

El organismo humano, se encuentra constantemente expuesto a múltiples factores carcinogénicos, con efectos aditivos o multiplicativos. Aquí, la variación individual juega un papel decisivo en la biología de la respuesta final, con lo cual no es posible definir un verdadero umbral de seguridad para el estudio de la dosis-respuesta.

Independientemente de la exposición al carcinógeno, las células humanas sufren permanentemente una serie de procesos de mutación espontánea, con un mínimo ritmo biológico que no altera el desarrollo normal de la población celular. Estos fenómenos incluyen los daños oxidativos, la infidelidad de las polimerasas y de las recombinasas, la reducción telomérica y el reordenamiento cromosómico (60).

Los fenómenos de mutación espontánea pueden condicionar una mayor o menor inestabilidad genómica que, según la opinión de los investigadores, podría ser crucial en los procesos iniciales de la carcinogénesis, por las consecuencias de la aneuploidía, las mutaciones y las amplificaciones genéticas.

En síntesis, la carcinogénesis puede iniciarse en forma espontánea o ser provocada por la acción de agentes carcinógenos (químicos, físicos, virales, etc) y ambas vías tienen la capacidad de inducir alteraciones mutagénicas y no mutagénicas o epigenéticas en

las células. En una etapa posterior, la participación de un agente favorecería la proliferación de las células normales, que, de una lesión preneoplásica, pasarían a constituir un tumor clínicamente evidenciable.

Es importante destacar que el promotor no tienen acción mutagénica ni carcinogénica y que, para lograr su efecto biológico, debe persistir en el ambiente. Esto significa que sus efectos se revierten si el promotor se extrae o se anula, aquí se encuentra la principal diferencia con el agente carcinogénico, siendo esto importante para evaluar las distintas estrategias de prevención.

La mutación de los ácidos nucleicos es el fenómeno central de la etapa de iniciación de la carcinogénesis. Los carcinógenos químicos interactúan directamente con el DNA, a través del establecimiento de uniones covalentes y de la formación de productos de adición bioquímica (PABs). Si dicho DNA prosigue a la etapa de síntesis del ciclo celular, se producirían entonces las mutaciones peligrosas. Si el DNA mutado corresponde a un protooncogén, éste podría activarse e incrementar el riesgo y la probabilidad de desarrollar cáncer. Este hecho pudo comprobarse en el grupo de protooncogenes *ras*, cuya mutación guarda relación con la aparición de tumores en colon, páncreas, tiroides, melanomas y leucemias (58-60).

En modelos animales, se vio que las nitrosaminas y los hidrocarburos policíclicos aromáticos eran capaces de sustituir las bases en los codones 12, 13 y 61 de los

protooncogenes (61-65). La activación del protooncogén puede ser un fenómeno inicial provocado por el agente carcinogénico o bien aparecer en etapas posteriores de la oncogénesis, ya como un promotor, aumentando la actividad de los productos proteínicos del oncogén.

El daño oxidativo es otra forma de afectar la estructura del DNA. En los tejidos inflamados, las células producen peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales oxhidrilo que constituyen la principal fuente endógena. La peroxidación lipídica es otra vía de daño oxidativo, a la que se agregan las fuentes exógenas, como benzopirenos, bencenos, catecoles, quinonas y óxido nitrogenado del humo del cigarrillo. La activación de radicales libres puede provenir de las radiaciones ionizantes y de la inhalación de asbestos. En este último caso, se comprobó que las partículas de asbestos actúan como transportadores de las moléculas de benzopirenos absorbidas en su superficie, lo cual potencia la acción tóxica en los trabajadores que fuman.

El daño oxidativo del DNA puede prevenirse o atenuarse por la acción de la vitamina E, el glutatión y las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa. Pero también la célula tiene, en reserva, diversos mecanismos de reparación del DNA dañado. Al respecto se pudo estudiar una "enzima suicida" la O-alquilguanina DNA-alquil transferasa, que específicamente transfiere el grupo alquilo del DNA dañado por los compuestos nitrosamínicos, a su propia estructura molecular, con la cual se inactiva (66).

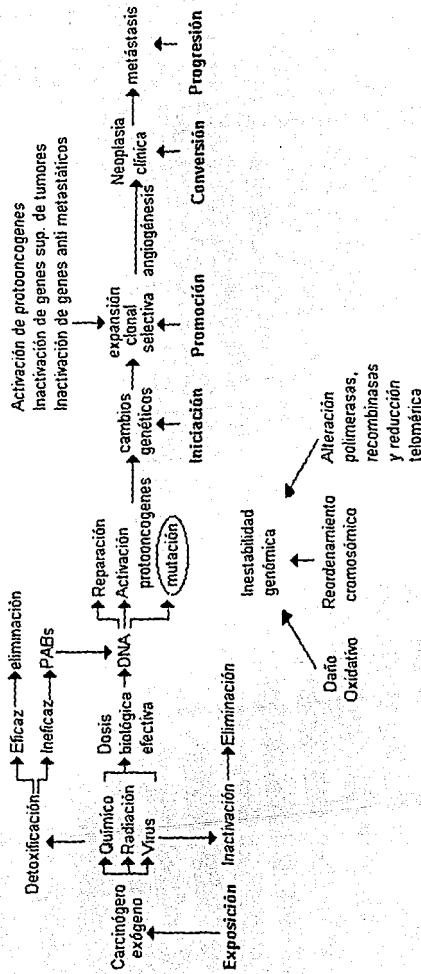
Existen otras enzimas que, sin tener función reparadora, también participan en la protección del DNA. Las enzimas del sistema del citocromo P450 tienen la función principal de la detoxificación. Así, mientras algunos agentes carcinógenos pueden dañar directamente el DNA, otros en cambio lo hacen a través de sus metabolitos de degradación enzimática, que terminan formando uniones covalentes con el ácido nucleico para establecer productos de adición bioquímica. Esto ocurre con los hidrocarburos aromáticos policíclicos que, al interactuar con las enzimas, producen intermediarios epóxidos. Otras enzimas que participan en la metabolización de ciertas aminas aromáticas son la acetiltransferasa y la glutatión transferasa.

Los genes supresores de tumores se heredan en forma recesiva y para su falta de expresión se requiere de la pérdida de ambos alelos genómicos. Estos genes tienen una participación importante en el proceso de carcinogénesis, cuando sufren la inactivación. Cuando esto ocurre, su actividad se transforma en dominante y favorecen así la transformación neoplásica.

En condiciones normales, los genes supresores de tumores mantienen la estabilidad genómica, regulan el crecimiento y la diferenciación celular, modulan los antígenos de histocompatibilidad, regulan la angiogénesis, facilitan las vías de intercomunicación celular e inhiben la actividad de ciertas proteasas. Un gen supresor de tumores muy importante es el p53, el cual, como ya sabemos codifica para la proteína p53 mutada, la cual está asociada con la transformación neoplásica, como el cáncer de mama,

ovárico, pulmón, hepático colorrectal, entre otros; y adicionando a ello ciertos tipos de linfomas y leucemias. Es por ello que se considerarán estudiando datos experimentales y clínicos.

# LAS ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS



## 2. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal, es una enfermedad relacionada con la edad, que conlleva a una mortalidad del 60% cuando se descubre de manera tardía. Se han identificado múltiples factores relacionados con alto riesgo incluyendo predisposición familiar, enfermedad intestinal inflamatoria de larga evolución y dietas bajas en fibra y altas en grasa. Debido a que algunos de los síntomas iniciales del cáncer colorrectal son insidiosos e ignorados por el paciente, la detección temprana de individuos con alto riesgo mediante exámenes de sangre oculta en heces, sigmoidoscopia o colonoscopia es fundamental.

El adenocarcinoma de colon y recto es la neoplasia más frecuentemente encontrada en el hombre y la mujer. A pesar de las técnicas de diagnóstico temprano y de los adelantos logrados en cuanto al conocimiento de los grupos de riesgo, desde hace varias décadas su incidencia no sólo no disminuye, sino que ha experimentado un ligero incremento, sobre todo en los países industrializados (67-69).

El desarrollo de esta neoplasia involucra diversos factores, entre ellos fenómenos ambientales como la dieta del mundo occidental, rica en carnes y pobre en fibras y, especialmente una susceptibilidad individual determinada por factores genéticos y la presencia de enfermedades proliferativas del epitelio intestinal del tipo precanceroso.

De la combinación de estos factores surge la definición del grupo de riesgo, que está compuesto por individuos de ambos sexos, mayores de cuarenta años, con antecedentes personales de pólipos colorrectales, enfermedades inflamatorias crónicas del intestino y antecedentes familiares de síndrome de Gardner o de cáncer de colon y recto.

Existen dos tipos de alteraciones genéticas moleculares que pueden determinar una predisposición a desarrollar un cáncer de colon y que pueden ayudar a comprender el comportamiento biológico y las características patológicas de cada tumor. Un tipo de alteración, detectada por PCR, es la que compromete a los protooncogenes *ras*, los que una vez transformados en oncogenes, están presentes en la mayoría de los pacientes con tumores de colon y recto benignos o malignos (70). La otra alteración es la delección de regiones específicas del brazo corto del cromosoma 17 y del brazo largo del 18, que probablemente incluyan aquéllas integradas por genes supresores de tumores, cuya inactivación facilita el desarrollo neoplásico. Uno de estos genes supresores de tumores es el p53, que desempeña un papel crítico en el control de los ciclos celulares a través de la codificación de una proteína con funciones supresoras (71-73). La mutación de este gen produce una proteína defectuosa que además de perder su poder supresor adquiere capacidad oncogénica. Mediante pruebas inmunohistoquímicas empleando anticuerpos monoclonales anti p53, en particular el PAb 240 y PAb 1801, se midió la frecuencia de p53 mutantes en el cáncer de colon y se comprobó su presencia en más de 70% de los tumores. La mayoría de las células muestran reactividad nuclear y unas pocas presentan



rastros de reactividad en el citoplasma, si bien, no para todos los anticuerpos, la mayoría son positivas para el PAb 240 específico para detectar los genes que han perdido el poder supresor. Es posible que una vez que se produce alteración del p53, éste forme complejos con otras proteínas intracelulares, lo que explicaría la reactividad selectiva con el PAb 240; y luego, cuando se produce la mutación se pierde el alelo 17p, las células reaccionan intensamente con todos los anticuerpos -sobre todo en el núcleo- y presentan una frecuencia elevada de mutaciones del DNA, al contrario de lo que ocurre en los tumores sin pérdida del alelo 17p, en los cuales la reactivada puede ser únicamente citoplasmática y mayor para el anticuerpo PAb 1801 (74). Esto podría ser la explicación a la distinta reactividad de las células en diferentes muestras de un mismo tumor, la presencia de diferentes clones celulares serían responsables de este fenómeno.

Otra condición genética específica es la poliposis familiar del colon, que se define como la presencia de más de un centenar de pólipos visibles en el intestino grueso, que predisponen al cáncer de colon más que cualquier otro factor (75-77).

Recientemente se aisló al gen responsable de esta patología, el APC presente en el brazo largo del cromosoma 5. El estudio de esta región con marcadores de DNA identificó una delección en el alelo del APC. Los individuos portadores de esta mutación tienen un riesgo elevado de presentar pólipos colónicos, cáncer de colon aislado o alguna de las características fenotípicas asociadas con la poliposis familiar, como osteoma de mandíbula o retinitis pigmentaria.

Las variaciones en la expresión fenotípica del alelo defectuoso APC podrían deberse a diferentes mutaciones, a distintos grados de penetrancia, a influencias ambientales o a la expresión de otros genes. Para medir la cantidad de deleciones totales de los alelos presentes en el genoma se diseñó el FAL, que comprende la fracción de brazos cromosómicos con deleciones; se demostró que en los tumores colorrectales, el FAL asciende al 20%, lo que está fuertemente asociado con los antecedentes familiares de cáncer y que cuanto mayor es éste índice peor es el pronóstico del paciente (79).

A pesar de los adelantos en las técnicas de análisis molecular del genoma, no se pueden emplear los resultados como predictores pronósticos individuales, lo único que se puede asegurar es que los tumores de evolución son los que reúnen mayor cantidad de anomalías genéticas.

La mayoría de las mutaciones del gen p53 asociadas con los carcinomas colorrectales se encuentran en los exones, 5, 6, 7, y 8, del gen. Los codones que se encuentran más frecuentemente mutados son el 175, 238, 245, 248, 273 y 282.

Considerando los cambios de bases, esto ocurre de manera frecuente en un 78%. En la mayoría de ellos (93%) la transición de base es GC por AT.

Otra de las alteraciones genéticas que ocurren en el cáncer colorrectal, incluye la activación del gen *K-ras*, y la pérdida alélica de los cromosomas 5q, 14, 17p, 18q y la

que el empleo del ácido acetil salicílico disminuye el riesgo por cáncer de colon aunque no se conoce el mecanismo exacto de su acción; se propuso que la aspirina favorecería el sangrado de los pólipos lo que facilita, a su vez, el diagnóstico precoz.

### 3. CÁNCER DE PULMÓN.

A principios del siglo los tumores pulmonares eran enfermedades poco frecuentes, tanto es así, que la primera publicación amplia sobre el tema data de 1912.

La rareza del cáncer pulmonar en esa época, no es probable que se debiera a la falta de factores predisponentes como el hábito de fumar, ya que éste estaba instalado desde muchos años antes. Pero si es posible, que muchos casos fueran subdiagnosticados como tuberculosis. Además, se debe recordar que la muerte a edades más tempranas impedía la manifestación de esta enfermedad que es típica de la madurez. Actualmente, el cáncer broncopulmonar ocupa el primer lugar entre las neoplasias del sexo masculino, y representa 90% de los tumores de pulmón (80). Estos tumores, cuyo origen es en realidad bronquial, son uno de los factores determinantes de las tasas de morbimortalidad.

Los estudios epidemiológicos arrojan resultados coincidentes en los que el hábito de fumar cigarrillos es el más importante factor predisponente. De menor importancia son las neumoconiosis y los factores individuales genéticos, locales o endócrinos.

En la tasa de mortalidad no se registraron disminuciones, a pesar de que el estudio de las características biológicas del carcinoma pulmonar progresó, sobre todo en lo que se refiere a factores de crecimiento, anomalías cromosómicas, oncogenes o antioncogenes.

El cáncer pulmonar se ha clasificado en dos tipos, carcinoma de células no pequeñas y carcinoma de células pequeñas. El carcinoma de células no pequeñas incluye células escamosas cancerígenas, adenocarcinomas, carcinomas de células grandes, y carcinomas adenoescamosos.

La mutación de uno de los alelos del gen p53 y la pérdida de heterociguidad se ven involucradas en los cánceres de pulmón.

Ciertos estudios muestran que la sobreexpresión de la proteína p53 junto con la activación del gen *ras* pueden transformar células de ratón (81-83).

Las alteraciones del gen p53 contribuyen aparentemente, al desarrollo neoplásico por interferencia en la actividad del gen.

Revisando los diferentes estudios realizados sobre cáncer pulmonar, se deduce que el cambio nucleotídico predominante, (50% de las mutaciones encontradas) fue la transición de G por T. Los estudios realizados muestran la amplificación y secuencia del

humanos, plantea especulaciones complicadas en materia sanitaria, ya que muchas de estas virosis están muy difundidas en la población. No todos los individuos infectados desarrollan cáncer; sin embargo, cuando se detecta el tumor después de un período prolongado de latencia, una parte significativa de las células de la masa neoplásica contiene partículas virales (99-101).

A pesar de su simplicidad estructural y genética, los virus pueden introducir un gen en las células normales cuyo producto proteínico provoque el surgimiento o mantenimiento de una neoplasia.

La infección por virus de la hepatitis B (HBV) se considera endémica en muchas regiones del planeta. Alrededor de 300 millones de personas son portadores crónicos de esta infección en todo el mundo (102-103). La participación del HBV como factor etiológico principal del carcinoma hepatocelular no deja espacio para la duda.

Pero no sólo esta infección viral es un factor causal determinante. Hace mucho tiempo se reconoció que la dieta puede incluir sustancias con efecto carcinogénico demostrado por distintos modelos experimentales.

Las aflatoxinas -en especial el metabolito B1-, las nitrosaminas y nitrosamidas presentes en el medio, algunos compuestos de las bebidas alcohólicas o el propio etanol, las aminas aromáticas heterocíclicas formadas durante la cocción de los alimentos con

contenido elevado de proteína, deben ser incluidos en la lista de sustancias carcinogénicas potenciales.

En el sur de China y también en zonas de África subtropical, la contaminación de los alimentos con aflatoxinas es habitual y coincidente con una exposición elevada de la población al virus de la hepatitis B. La base de la dieta se compone de maíz, yuca y porotos, que son fértiles para el asentamiento de hongos productores de aflatoxinas. La tercera causa de muerte por cáncer en China es el cáncer de hígado; esto reafirma el papel del HBV y las aflatoxinas en la carcinogénesis hepática.

El metabolito aflatoxina B1 se une al DNA en la posición N7 de la guanina y ejerce una acción mutagénica en células eucariontes y procariontes. Mediante mutaciones por sustitución de bases puede activar oncogenes de la familias *ras* (*c-Ki-ras* y *N-ras*) (104). También se informó la activación de otros oncogenes como el *myc* y el *erb-A* y mutaciones en el gen supresor de tumores p53 (105).

La mutación en el gen supresor tumoral p53, se encuentra ubicada en el codón 249 de este gen. Los estudios reportan que existe una transversión de la base G por T en un 52%.

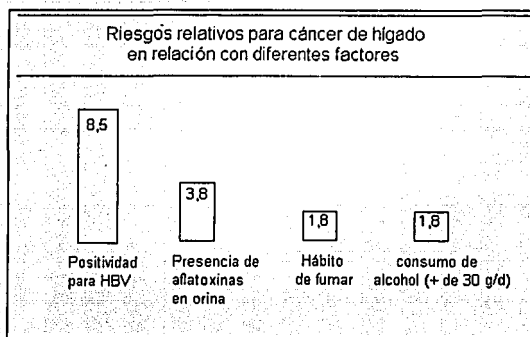
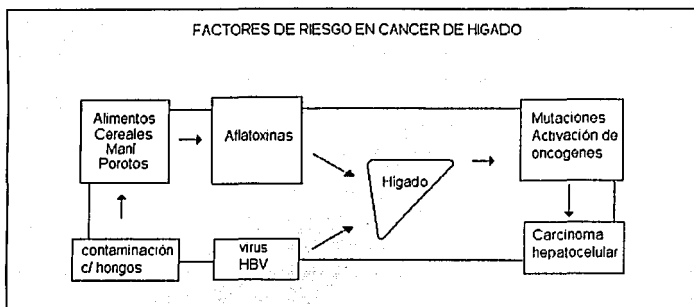
En el tejido tumoral hepático es habitual hallar sobreexpresión de los oncogenes *ras* y *myc*, por esta razón algunos autores deducen que para promover el fenotipo maligno

en el carcinoma hepático humano debiera requerirse la actividad de más de una oncoproteína. Además es posible que la infección por virus de la hepatitis B favorezca la mutagénesis por medio de un sinergismo con las aflatoxinas.

En las marmotas, un virus causante de hepatitis, emparentado con HBV, posee un potencial oncogénico muy elevado. La utilización de este modelo experimental -con ciertas semejanzas con el carcinoma hepatocelular de los seres humanos- permitió demostrar la contribución del virus en la activación de los oncogenes *c-myc* y *N-myc* (104-105).

El desarrollo de métodos rápidos y efectivos para la detección de biomarcadores urinarios de los metabolitos principales y complejos derivados de las aflatoxinas permite la realización de estudios poblacionales en gran escala. En general, en los sujetos con cáncer hepático se detectan concentraciones importantes de compuestos vinculados con las aflatoxinas -en especial el metabolito B1- y suero positivo para el HBV.

El control de la contaminación alimentaria por aflatoxinas, en particular en las áreas más afectadas, podría revertir la tasa de mortalidad con cáncer de hígado, que no logró ser modificada por la vacuna contra el HBV. Los biomarcadores urinarios representan una nueva y valiosa herramienta para el seguimiento de las poblaciones de riesgo.



## 5. CÁNCER MAMARIO.

En la mayoría de los países del mundo, el cáncer de mama sigue siendo el tumor femenino más frecuente y la principal causa de muerte entre los cincuenta y los sesenta



años. Del medio millón de muertes oncológicas, el 9% corresponden a cánceres mamarios. También se debe destacar que la incidencia de la patología tiene una variación geográfica importante: es muy elevada la de los EE UU y menor se registra en Japón (106-107).

Una de cada doce mujeres puede desarrollar un cáncer de mama a lo largo de su vida. Esta realidad epidemiológica demanda muchos esfuerzos de investigación y atención médica, para lograr algún éxito en la lucha contra la enfermedad.

La presencia de un factor genético en la aparición de cáncer de mama se conoce desde fines del siglo pasado, a través de la historia familiar de la enfermedad. Si existen antecedentes familiares, el riesgo de esa mujer es mayor que el de la que no los tiene. Este riesgo se incrementa si el familiar lo es de primer grado y aumenta aún más si el cáncer apareció antes de la menopausia y, más todavía, si fue bilateral (108).

El riesgo de padecer un cáncer de mama, teniendo antecedentes familiares, disminuye cuando la mujer alcanza o pasa los sesenta años; en este momento, su riesgo se iguala al de aquellas sin antecedentes en su familia.

Las mutaciones del gen p53 y la acumulación resultante de la proteína, sugieren una asociación con indicadores conocidos de alta malignidad potencial, alta actividad proliferativa, alto grado histológico y ausencia de receptores de estrógeno y

progesterona.

El porcentaje encontrado de mutaciones de p53 en carcinomas primarios es de un 15.7%, mientras que en tejidos metastásicos se encuentra en un porcentaje de 28.6% (108-109). Runnebaum y cols. estudiaron las mutaciones en el cáncer mamario y encontraron ubicadas estas mutaciones en los exones 5 al 9 en un 17% (10 de 59). Thompson y cols. encuentran mutaciones en un 28% (17 de 60).

La sobreexpresión de la proteína p53 está relacionada con estadios altos de esta enfermedad.

En algunas muestras de mutación de p53, la pérdida de heterocidad encontrada es del 62.3% (110). Esto confirma la idea de que la pérdida funcional de p53 juega un papel importante en la transformación neoplásica.

Muchos de los investigadores encontraron pérdida de heterocidad en el brazo corto del cromosoma 17 en tumores de mama, indicando con ello que es una región importante para la formación tumoral en el pecho. En los estudios realizados las regiones específicas mayormente encontradas fueron el 17p13.1 y el 17p13.3 (111-114).

La amplificación del oncogén *erbB2* es otra de las alteraciones encontradas en el cáncer mamario. La amplificación de este gen encontrada en muestras con mutación de

p53 fue de un 47%, comparado con muestras donde no existe mutación (sólo el 24%). Estudios recientes indican que la amplificación potencial y el detenimiento del ciclo celular, está asociado con la pérdida de la proteína p53 normal (115).

Otra de las asociaciones significativas encontradas entre la mutación de p53 es la detección de niveles bajos de receptores de estrógenos en los tumores.

Las mutaciones somáticas en el cáncer de mama se han encontrado en 44 codones del gen p53, pero las mutaciones más frecuentemente encontradas se sitúan en el codón 175, 194, 273 y 280 (110, 116-121). Las variaciones en las bases nucleotídicas encontradas en primer término son G:C por A:T y en segundo G:C por T:A (116-118).

## 6. CÁNCER DE PIEL.

Entre los diversos agentes que producen cáncer de piel, los rayos ultravioleta son uno de los más frecuentes. Los rayos ultravioleta producen una deformación de la molécula de DNA que desencadena mutaciones (122-126). Las personas de tez morena tienen poca respuesta a la luz solar a diferencia de las personas de tez blanca que no se broncean al contacto con los rayos solares.

La luz puede actuar por sí sola y causar, quemaduras solares, degeneración del tejido

conectivo, arrugas por fotoenvejecimiento, telangectasias, queratosis solares, carcinoma epidermoide o de células basales, melanoma y fotodermatosis (124-126).

Los rayos solares pueden también actuar sobre la piel en combinación con agentes externos, como por ejemplo drogas tomadas por vía general o aplicadas en forma tópica. Estas reacciones son denominadas fototóxicas.

Estudios realizados *in vitro*, deducen que existe un incremento de la expresión de p53 después de una exposición con UVC (122). La región ultravioleta se encuentra dividida en tres diferentes espectros de absorción: a) UVC, 200-290 nm; b) UVB, 290-320 nm; y c) UVA, 320-400 nm. Los tres tipos de radiación ultravioleta induce el daño de DNA.

Comparando las dos variedades de UV los UVB son mucho más potentes que los UVA, pero la penetración de estos últimos en la epidermis humana es casi cien veces más intensa.

Los mecanismos celulares involucrados en la estabilización de la proteína p53 seguida de la exposición a radiación UV, no se entiende con exactitud, inclusive se dice que es conocida pobremente.

En las mutaciones encontradas por absorción directa de la luz UV en el DNA, predomina el cambio de C por T, incluyendo también la mutación de bases dobles CC

por TT. Esta última transición de bases dobles, que hasta el momento se sabe que la induce la luz UV, se considera como un mutágeno.

La longitud de onda más frecuentemente encontrada en mutaciones de p53 es la de la región de la luz UVB. Esto se explica, porque los productos fotopirimídicos son encontrados en mayor cantidad en UVB que en la UVA (122-124).

Los *hotspots* encontrados en este tipo de neoplasia son variados pero corresponden desde el codón 113 al 248 del gen p53. (122-126).

Estudios recientes indican que el tratamiento con luz ultravioleta, causa un incremento dramático en la actividad transcripcional de p53 e incrementa la expresión del gen *mdm2*. La experimentación demuestra que los niveles de proteína p53 se ven incrementados en ratones como en humanos después de que las células son tratadas con UV (127-130).

La p53 muestra su actividad en un punto específico del ciclo celular en respuesta a la radiación gamma (131-132). La radiación gamma induce el bloqueo de fase G1 y G2 del ciclo celular, y la expresión de la proteína normal p53 es necesaria para el bloqueo en G1 pero no en G2. La unión específica de p53 con el DNA se ve incrementada después de la radiación gamma produciendo daño del DNA, por la detención específica de la expresión del gen GADD45 (132).

La caracterización de la función de p53 en respuesta a la radiación gamma generó la hipótesis de que p53 actúa en un punto del ciclo celular, ocasionando un retraso en la fase G1 del ciclo durante el daño para favorecer la reparación (131-132). Además Zhan y colaboradores recientemente mostraron que la actividad transcripcional se ve incrementada en células humanas expuestas a la luz UV. (130). Posibles objetivos de la actividad transcripcional en respuesta a UV es el gen GADD45, y el gen *mdm2* (133). P53 y *mdm2* se expresan para formar un control en la realimentación de la vuelta; mientras p53 induce la transcripción de *mdm2*, niveles elevados de ésta proteína inhiben la actividad transcripcional de p53 (134-136). Los resultados demuestran que el tratamiento de células murinas con luz UV suprime la síntesis de DNA y esto es independiente de la presencia de p53. Esto indica que *mdm2* puede invertir el efecto regulador negativo de p53 en la fase G1 del ciclo celular y/o promueve la entrada de las células a la fase S después de que el daño del DNA ha sido reparado. Por lo tanto, se deduce que después de una radiación UV, se decremente la síntesis del DNA en células que contienen a la p53 nativa y a células carentes de la misma. Los niveles de p53 se incrementan 1-2 horas después de radiación UV y continúa la acumulación cuando las células son tratadas con altas dosis de la misma. La actividad transcripcional de p53 se incrementa de manera dramática seguida del tratamiento con UV y un objetivo de la función de p53 en respuesta a UV es el gen *mdm2*, que contiene respuesta en p53 en el primer intrón.

## 7. CÁNCER OVÁRICO.

El carcinoma de ovario constituye un problema de salud importante ya que muchas pacientes se encuentran en un estadio avanzado de la enfermedad; cuando ésta es diagnosticada.

De las neoplasias ginecológicas, el 18% corresponde a carcinomas de ovario; la incidencia máxima ocurre en mujeres en la década de los cincuenta años (137). Puesto que una neoplasia de ovario suele permanecer oculta hasta que crece o se extiende lo suficiente para producir sintomatología, la detección precoz es difícil y, en el 70% al 80% de los pacientes, la enfermedad se extiende en la pelvis o fuera de ella antes del diagnóstico. Además, el cáncer ovárico es mortal en el tracto genital femenino.

Los reportes indican que existe una pérdida de heterocidad en los cromosomas, 3, 6, 11, 17p y 17q. Eccles y colaboradores reportan una pérdida alélica del gen p53 en un 54.5%, a diferencia de lo reportado por Okamoto y colaboradores que encontraron una alta incidencia (80%) (139-140).

Los estudios indican que las mutaciones de p53 ocurren con mayor frecuencia en los exones 5 al 9.

La mayoría de las mutaciones del gen p53 encontradas en un 52% fueron las

transiciones de GC por AT (137-142).

## 8. CÁNCER DE VEJIGA.

El cáncer de vejiga ocupa el 50% de los cánceres con mayor frecuencia encontrados en los Estados Unidos. Uno de los carcinógenos de mayor riesgo en este tipo de neoplasia son los alquitranes del humo del cigarro (143).

El cáncer de vejiga se divide en dos diferentes tipos: Cáncer superficial, donde no se invade la capa muscular, y el cáncer invasivo donde se involucra a la capa muscular.

Estos tipos de cánceres tienen características clínicas significativamente diferentes. El cáncer superficial se desarrolla en forma papilar. La mayoría de los cánceres de vejiga de tipo superficial tienen un buen pronóstico, pero del 10 al 20 % de los casos, las células cancerígenas muestran un incremento en la malignidad e inclusive puede infiltrarse al músculo. En cambio, en el caso del cáncer invasivo, se presenta una forma nodular con un alto grado de malignidad. Este tipo de cáncer es sumamente agresivo, ya que se desarrolla y progresa rápidamente y ocurre metástasis en estadios tempranos (144).

Diferentes reportes indican que existe una alteración de la familia de los protooncogenes del tipo *ras* y existe un incremento de la expresión del receptor del factor



de crecimiento epidérmico, (EGF) (145-148).

La pérdida de heterocidad en el cáncer de vejiga se encuentra localizada en los cromosomas 9q, 11p y 17p, donde existe una alta incidencia en cuanto a porcentaje encontrado.

Los estudios reportan que existe una transversión de G:C por C:G. Los codones involucrados van desde el 280 al 287 (143-148).

## 9. CÁNCER GÁSTRICO.

En el tracto gastrointestinal se originan más cánceres que en cualquier otro sistema orgánico del cuerpo humano. La carcinogénesis digestiva entraña una compleja interacción de factores genéticos y en especial ambientales, habida cuenta de la importancia patogénica de la dieta y las enfermedades inflamatorias crónicas. A pesar de ello, todavía no ha podido identificarse ningún agente responsable de los cánceres de un órgano específico en todas las poblaciones, ya que la frecuencia de determinadas neoplasias varía de modo sustancial según las regiones o los grupos humanos (149).

En lo que respecta a los procesos malignos del tracto digestivo, su evolución natural se mide en años y, en la mayoría de los casos, están precedidos por alteraciones tempranas en el epitelio que son perfectamente identificables.

Se estima que el carcinoma de estómago ocupa el segundo lugar en el mundo entre los procesos malignos, y si bien su incidencia en los EE.UU. y Europa decreció en los últimos años, no ocurre lo mismo en Asia y América Latina, donde el número de casos se mantiene elevado. La incidencia del cáncer de estómago aumenta con la edad; menos del 25% de los pacientes tienen edades inferiores a los 50 años (150).

La incidencia de mutaciones del gen p53 se encuentra frecuentemente elevada en carcinoma gástrico primario, existe un porcentaje del 52%, lo cual representa una de las alteraciones genéticas más importante en este tipo de neoplasia.

Recientemente, Matozaki y colaboradores encontraron 7 de cada 14 mutaciones en p53 y Martín y colaboradores mostraron una incidencia del 57% en carcinomas gástricos, expresando niveles elevados de la proteína p53, (151-152).

De las mutaciones más frecuentemente encontradas, se reportan 3 *hotspots* en los codones 175, 248 y 273.

Las transiciones encontradas en este tipo de carcinomas encontradas con mayor frecuencia es G:C por A:T (149-155).

Se han encontrado mutaciones en los diferentes estadios de este cáncer de estómago, por ejemplo Renault y colaboradores mostraron que 2 de 3 muestras en el estadio II

presenta mutación; 3 de 9 muestras en el estadio III y 10 de 16 mutaciones en el estadio IV. Esto indica que la mutación del gen p53 se encuentra tanto en estadios tempranos como tardíos de esta carcinogénesis (150). En este tipo de neoplasia se encuentran ampliados los oncogenes, *c-erbB* y/o *K-sam*.

#### 10. CÁNCER DE ESÓFAGO.

El cáncer de esófago se encuentra con una alta incidencia en ciertas regiones del mundo, como lo es China, Irán, sur de África y Francia. En el Oeste de Europa y Norte de América los factores etiológicos clásicos en el cáncer de esófago son el tabaco y el consumo de alcohol (156-157).

Este tipo de neoplasia ocupa uno de los seis cánceres más comúnmente encontrados en todo el mundo.

Existen dos tipos de cáncer esofágico, el cáncer de células escamosas y el adenocarcinoma. Como ya se mencionó anteriormente, los dos carcinógenos, tabaco y alcohol más importantes en este tipo de neoplasia, colaboran en el desarrollo del cáncer escamoso esofágico (158-159).

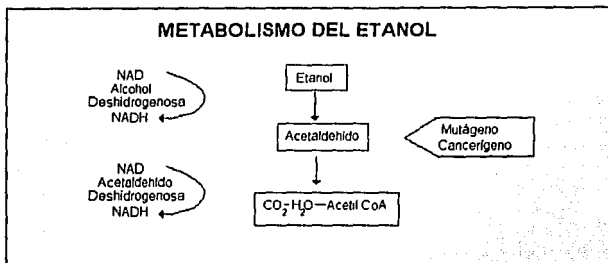
La pérdida de heterocidad en el cáncer de esófago está asociado con el gen Rb

(13q), p53, APC y/o MCC (5q) y con menor frecuencia con el gen DCC (18q). La pérdida alélica del gen p53 detectada, se aproxima a un 50% en los cánceres de esófago (160).

Existe una región altamente mutagénica en este tipo de cáncer, ubicada en el exón 6 que abarca los codones 187 al 224 (156-160).

El alcohol incrementa la susceptibilidad hacia el cáncer de esófago. Se piensa que el efecto carcinógeno no se debe exclusivamente a un simple fenómeno tóxico o irritativo directo sobre las mucosas del tracto digestivo, sino que se podrían estar generando, a lo largo del metabolismo del etanol, sustancias con un potente efecto mutágeno.

Los resultados que arrojan los experimentos *in vitro* sobre distintos tipos celulares aislados muestran que, en ausencia de vías metabólicas exógenas, el etanol no induce daños en el DNA, mutaciones somáticas, daños cromosómicos o transformación celular. Sin embargo, al agregar juntamente con el etanol la enzima alcohol deshidrogenasa, se generaron alteraciones en células del ser humano. Esto se logra apreciar en el siguiente esquema:



La enzima agregada cataliza la formación de acetaldehído, principal producto del metabolito del etanol. Por lo tanto, en el nivel sistémico, en presencia del sistema metabólico oxidativo, el agente mutágeno es el acetaldehído y no el etanol (158-159).

De hecho, en numerosas publicaciones se ha demostrado que el acetaldehído es una sustancia muy efectiva para generar mutaciones (intercambios entre cromátides hermanas y aberraciones cromosómicas, daños en el DNA). También puede inducir la aparición de cáncer en especial de adenocarcinomas y carcinomas escamosas del tracto respiratorio, cuando es administrada por inhalación en ratas y hámsters.

La transversión encontrada en este tipo de neoplasia es G:C por T:A (156-160).

## 11. CÁNCER DE CEREBRO.

Los genes supresores se ven involucrados en la patogenia de tumores del sistema nervioso. La activación de protooncogenes por la amplificación genética ha sido identificada en una gran variedad de tumores neurales. En el caso de neuroblastomas se ha visto involucrado el gen *N-myc*, *c-myb* y el gen receptor de crecimiento en gliomas y *c-myc* en meduloblastomas (161-164).

Una de las anomalías más comúnmente encontrada en tumores de cerebro es el cromosoma 17. Nigro y colaboradores han reportado que 4 de 5 glioblastomas presentan mutación en el cromosoma 17p (165). De manera similar Frankel y colaboradores encontraron 9 de 27 gliomas malignos (33%) y 7 de 11 (64%) de glioblastomas con mutaciones en el gen p53.

Los oligodendrogliomas son tumores gliales, localizados típicamente en los hemisferios cerebrales que se manifiestan generalmente en adultos con una incidencia de entre los 30 y 40 años de edad. Solo un bajo grado de estos oligodendrogliomas crecen lentamente pero la progresión fenotípica se observa ocasionalmente. Estos no reportan ninguna activación oncogénica. Oghaki y colaboradores reportaron una incidencia de mutaciones en p53 del 12% (166).

Los meduloblastomas son tumores cerebrales embrionarios que presentan una mayor

incidencia en los niños entre los 7 y los 12 años de edad. Aparte de encontrarse la mutación del cromosoma 17p se encuentra amplificado el gen *c-myc* (167-168). Los estudios reportados muestran un porcentaje bajo del 11% en el gen supresor p53.

Los sitios de mutación en este tipo de neoplasias se encuentran en los exones 5 (codón 141), 6 (codón 193 y 213) y 7 (codón 246). La mutación encontrada es TGC por TAC, ATG por ATA y CAT por CCT respectivamente. La sustitución aminoacídica encontrada para cada uno es de cisteína por tirosina, metionina por isoleucina e histidina por prolina.

## 12. OTROS.

Es importante considerar que existen otros tipos de cánceres con mutación en el gen p53.

El cáncer nasofaríngeo es un tipo de neoplasia comúnmente encontrada en el sureste de Asia y en el sur de China, donde la alteración más frecuentemente encontrada está en el codón 280, ubicado en el exón 8 del gen y con un cambio de bases nucleotídicas de AGA por ACA y como consecuencia un cambio de base común de guanina por citosina. Esto conlleva, a un cambio de arginina por treonin (169-172).

En el cáncer de cabeza y cuello los factores de riesgo son el tabaco y el consumo de alcohol (173). La transversión más frecuentemente encontrada en este tipo de malignidad es G por T y las encontramos con mayor frecuencia en los codones del 245 al 248 del gen, lo cual comprende al exón 7 (173-176).

El cáncer cervicouterino está asociado con la infección del papilomavirus humano (HPV), aunque por otra parte, algunos estudios indican que en líneas celulares existe una relación estrecha con mutaciones somáticas del gen supresor tumoral p53 (177-178). El HPV 16 y 18 contribuyen a la malignidad. Las oncoproteínas virales generadas E6 y E7 forman complejos con el producto proteínico de genes supresores de tumores; E6 se une a la proteína p53 y E7 al producto del gen del retinoblastoma.

El cambio nucleotídico con mayor frecuencia encontrado en este tipo de neoplasia está localizado en el codón 273 del gen y el cambio generado en cuanto a bases es una cisteína por una arginina.

## **LEUCEMIAS.**

Las leucemias son neoplasias malignas de los tejidos responsables de la formación de la sangre.



Aunque los virus causan varias formas de leucemia animal, la causa de la leucemia humana no se ha definido: únicamente se han identificado dos asociaciones con virus; el virus de Epstein-Barr -un virus, que se asocia al linfoma de Burkitt- y el virus linfotrófico de células T humanas - un retrovirus que se ha ligado a ciertas leucemias y linfomas de células T -. La exposición a la radiación ionizante y ciertos agentes químicos (benceno y algunos fármacos antineoplásicos) se asocia a un riesgo aumentado de leucemia (180). Algunos defectos genéticos y algunas enfermedades familiares predisponen a la leucemia.

Independientemente del agente etiológico, la transformación maligna parece producirse en una única célula, en dos o más etapas, con la consiguiente proliferación y expansión clonal. En algunas leucemias se han identificado ciertas traslocaciones cromosómicas específicas, que se relacionan con una determinada morfología de las células leucémicas y con características clínicas especiales, (traslocaciones de 9 y 22 en la leucemia mieloide crónica y de 15 y 17 en la leucemia promielocítica aguda) (179-182). Generalmente, la transformación se produce a nivel de la célula madre condicionada, con una capacidad de diferenciación más limitada. La clona tiene tendencia a ser genéticamente inestable, con características de heterogeneidad y de evolución fenotípica. En general, las poblaciones de células leucémicas se dividen con ciclos celulares muy largos y menores fracciones de crecimiento que las células normales de médula ósea. La ventaja del crecimiento clonal se produce debido a la acumulación de células leucémicas defectuosas en fases de diferenciación y maduración. Las características

clínicas y de laboratorio de la leucemia son causadas por la supresión de la formación de células sanguíneas normales y la infiltración de órganos. Los factores inhibidores producidos por las células leucémicas, o la sustitución del espacio medular, puede suprimir la hematopoyesis normal, lo cual resulta en anemia, trombocitopenia y granulocitopenia (182). La infiltración de órganos produce un aumento de tamaño del hígado, bazo y ganglios linfáticos, con afectación ocasional de riñones y gónadas. La infiltración meníngea origina un síndrome clínico asociado al aumento de la presión intracraneal (183).

Estudios preliminares muestran que existe una mutación moderada del gen p53, en leucemia linfocítica aguda (LLA) se registra un 39%, en linfoma de Burkitt un 32%, en leucemia de células T adulta una frecuencia del 44%, es estado de crisis blástico de la leucemia mieloide crónica (LMC) un 27% y en leucemia aguda con delección en el cromosoma 17 un 32% (180-183).

## **SARCOMAS**

Los sarcomas son tumores malignos originados en el hueso, cartilago y varios tipos de tejidos conectivos, estos tienen tendencia a proliferar abundantemente y es bastante frecuente en las edades infantil y juvenil.

Anormalidades de la proteína p53 fueron encontradas en un 65% de los osteosarcomas; 30% en leiomiomas y en un porcentaje menor se encuentran los histiocitomas fibrosos malignos (184-185). Las mutaciones encontradas se localizaron en los exones 5, 7 y 8.

HISTOPATOLOGÍA	CODÓN	MUTACIÓN
Osteosarcoma	281	GAC - GAA, Asp - Glu
	286	GAA - AAA, Glu - Lys
Histiocitoma fibroso	163	TAC - TGC, Tyr - Cys
	244	GGC - GAC, Gly - Asp
	143	GTG - ATG, Val - Met
Leiomioma	248	CGG - TGG, Arg - Trp
	132	AAG - ATG, Lys - Met

Existe otro tipo de sarcoma involucrado en las anomalías de p53, el llamado sarcoma de Ewing, el cual es un tumor óseo de células redondas radiosensibles. Las mutaciones se desarrollan en los exones 5, 7 y 8, pero se encuentra una alta incidencia en el codón 176 del gen lo cual sugiere ser un punto crítico en este tipo de sarcoma. (186). La mutación encontrada es TGC - TTC y un cambio aminoacídico de Cys por Phe.

## **OTRAS ENFERMEDADES MALIGNAS**

En el mieloma múltiple también se han identificado mutaciones del gen p53 ubicadas con mayor frecuencia en los codones 270 al 286, con una transición nucleotídica de citosina por timina (187).

Este es un tipo de neoplasia progresiva que se caracteriza por tumores de células plasmáticas en la médula ósea y en la sobreproducción de un anticuerpo monoclonal completo (IgG, IgA, IgD, o IgE) o sólo de cadenas ligeras. La alteración de la producción normal de anticuerpos que se observa en el mieloma múltiple puede deberse a la presencia de monocitos o macrófagos que inhiben la maduración de los linfocitos B normales a células plasmáticas secretoras de anticuerpos (188). Las personas mayores a los 40 años se afectan con mayor frecuencia. Aparte del linfoma de Burkitt, se encuentran linfomas diversos, donde se encuentran mutaciones del gen p53, como es el linfoma de células B, las anomalías cromosómicas encontradas en los linfomas no hodkiniano es de un 84.6% y de este porcentaje se encuentra un 16.3% de anomalía en el cromosoma 17 (189). Los exones involucrados en el linfoma de células B es del exón 5 al 7 del gen. Cabe mencionar que en este tipo de linfoma las mutaciones encontradas se ven alteradas en estadios tardíos de la enfermedad, generalmente en el estadio IV, lo cual hace suponer que la alteración de p53 se localiza en estados clínicos avanzados de esta enfermedad (190).

## SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

Gran proporción de los genes -y de las proteínas codificadas por ellos- es variable dentro de los individuos de una misma especie. En los seres humanos estos genes representan alrededor del 20% y este polimorfismo particular determina la variabilidad de los distintos rasgos corporales. Muchas de estas diferencias en el nivel genético también se vinculan con la capacidad de cada individuo para defenderse de las agresiones del medio. Si se adoptara una postura extremista podría plantearse que toda la entidad nosológica puede ser interpretada como la consecuencia de la interrelación entre el sustento genético de cada individuo y el ambiente. En las enfermedades genéticas el componente alterado adquiere tanta importancia que se manifiesta en forma independiente, sin la participación de factores ambientales de jerarquía (191).

Cuando se investiga un caso de un paciente en el que se sospecha la gravitación de un desorden genético debe ponerse énfasis en los antecedentes familiares. Además de obtenerse datos acerca de la persona clínicamente afectada, que atrae la atención sobre una familia particular, es fundamental un relevamiento completo de todos los familiares en primer grado. Puede hablarse de una "familia enferma" más que un paciente enfermo. En los últimos años el desarrollo de la oncología molecular favoreció la hipótesis que considera al cáncer como una enfermedad genética en el nivel celular y, en algunas circunstancias, en el de la herencia (192).

En el retinoblastoma y en ciertos cánceres colónicos la influencia de la herencia está suficientemente documentada, y se identificaron los genes y las mutaciones responsables.

El síndrome de Li-Fraumeni es un ejemplo de patología cancerosa con una agregación familiar típica, asentado sobre la base de una susceptibilidad genética. Los integrantes de familias con este síndrome desarrollan cáncer mamario, sarcomas, tumores cerebrales, leucemias o carcinomas adrenocorticales, con frecuencia antes de los 45 años (193-196).

El gen p53 suele encontrarse alterado en una gran variedad de neoplasias del ser humano. En algunos casos se detectaron mutaciones germinales heredables del gen p53 en integrantes de familias con el síndrome de Li-Fraumeni.

Por lo general ambos alelos se encuentran alterados, uno por mutación puntual y el otro como consecuencia de deleciones alélicas. Al parecer la pérdida de la actividad biológica de la proteína p53 nativa sería indispensable durante la transformación maligna.

Sin embargo, no todas las familias afectadas por el síndrome demuestran las mutaciones características del p53. Además, algunos grupos familiares definidos dentro del síndrome de Li-Fraumeni "incompleto" pueden presentar o no las alteraciones genéticas mencionadas. (195-197).

La aparición habitual de neoplasias que se originan en estructuras derivadas del mesodermo en los cuadros de cáncer familiar hace suponer la intervención de factores genéticos determinantes. Los pacientes con retinoblastoma tienen un riesgo muy elevado para el desarrollo de osteosarcoma (194-196).

Por otra parte, según un estudio de un grupo noruego, alrededor de 65% de los osteosarcomas, histiocitomas malignos, leiomiomas y 30% de los tumores de partes blandas, evidencian alguna anomalía en el gen p53 (194).

La existencia de familias con cáncer hereditarios, que manifiestan con una frecuencia llamativa tumores que en la población general son esporádicos, refuerza el concepto del "oncogén recesivo", que es aquel que depende de mutaciones en ambos alelos para manifestarse. Además que los genes supresores de tumores se encuadran en este grupo y el ejemplo principal y del que hemos estado hablando es el gen p53 (192-197).

## CAPÍTULO V



## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.**

El cáncer está asociado en su faz de definición y, si los avances siguen a este paso, no está lejano el día en el que médicos y pacientes celebren su victoria.

Hasta no hace muchos años, la detección de los cánceres humanos se superponía en la práctica al acto diagnóstico, esto significa que, en la mayoría de los casos, la enfermedad se descubría en su período de invasión o en el correspondiente a la fase de metástasis. En ese tiempo la suma de esfuerzos se concentraba en la búsqueda de drogas que permitiera controlar la inexorable evolución del cuadro. Las perspectivas no conformaban, muy altos costos para relativamente escasos beneficios. La balanza se inclinaba inevitablemente siempre para el mismo lado. Pocas neoplasias eran controlables, los recursos terapéuticos -quimioterapia y radioterapia rudimentarias todavía- no sólo eran insuficientes, sino que, en muchos casos hasta podían condicionar la aparición de otro tipo de neoplasia maligna. La genética molecular, en combinación con la biología celular, la farmacología, la biotecnología y una serie de ciencias básicas, indicó el camino hacia la comprensión de los posibles mecanismos íntimos de la carcinogénesis.

La primera sorpresa fue comprobar que cánceres totalmente diferentes desde el punto de vista histológico, clínico, sistémico, etc. responden a una fisiopatología común, en otras palabras el cáncer es una enfermedad molecular única con diferentes

manifestaciones sistémicas. Esta afirmación se basa en evidencias experimentales del papel de los protooncogenes y de los factores de crecimiento en la malignización celular

Es así que hoy se sabe que pueden existir hasta trescientas diferencias fenotípicas entre una célula normal y una maligna; la incógnita que resta descubrir es cuáles de ellas son primarias - esto es, generadoras directas de la neoplasia- y cuáles secundarias o accesorias.

La alteración de los protooncogenes parece ser una condición necesaria en el desarrollo del cáncer, debido a que la proliferación celular descontrolada es una característica común a todos los tipos de cáncer, y la función específica de estos protooncogenes es la regulación específica del ciclo celular.

Por su parte, los llamados factores de crecimiento, una serie de polipéptidos de bajo peso molecular, también se relacionan con el cáncer, ya que son capaces de estimular la expresión de determinados genes que pueden estar involucrados en la carcinogénesis, y además las células neoplásicas producen a su vez factores de crecimiento, aunque no se sabe todavía si ello es causa o consecuencia de su existencia

Muchos de estos conceptos nacen a partir del descubrimiento del p53, una proteína considerada como supresora de tumores - capaz de inhibir la proliferación celular anómala in vitro - y su actividad durante la fase final del período G1, de tal manera que

interactuaría directamente con las proteínas responsables de la entrada de la célula en el período S o sobre el DNA impidiendo su duplicación.

Las consecuencias de la experimentación son muchas, brindan la posibilidad de encarar medidas de prevención con fundamentos lógicos, favorecer la creación de métodos de detección cada vez más precisos y tempranos, y fundamentalmente, dieron a la terapéutica un vuelo espectacular al permitir dirigir la acción farmacológica hacia niveles cada vez más específicos.

Una primera consideración sobre la posible creación de vacunas contra los diferentes tipos de cánceres deberá atender a la necesidad de reconocer elementos distintivos dentro de los tumores que tengan cierta capacidad inmunógena, con el objetivo final de lograr un estímulo específico que favorezca la generación de reacciones inmunes contra el tumor.

Sin mediar elementos inductores artificiales, el sistema inmune del hospedero posee mecanismos de resistencia contra las células cancerosas. Estos incluyen componentes de la inmunidad humoral y celular, como las célula T citotóxicas sensibilizadas, que conocen antígenos tumorales asociados con antígenos de histocompatibilidad (clase I), las células NK (*natural killer*), que pueden lisar directamente células tumorales sin una sensibilización previa o a través de mecanismos de citotoxicidad mediada por anticuerpos y, en cierta medida, los macrófagos.

El concepto de Inmuno vigilancia tumoral, en relación con la existencia de un sistema autocontrolado que elimina las células tumorales que se generan en el organismo, puede representar el blanco de las vacunas anticancerosas, estimulándolo específicamente aumentarían las "defensas" contra los tumores.

Sin embargo, muchas observaciones estarían negando su existencia. Los pacientes inmunosuprimidos desarrollan con mucha frecuencia ciertos tipos de linfomas, pero la incidencia de tumores más comunes -pulmón, mama - parece no alterarse. Este hecho pondría en duda el papel desempeñado por la vigilancia inmunitaria, puesto que su abolición no parece afectar seriamente en la génesis del cáncer.

Por otra parte, las células tumorales poseen alternativas variadas para escapar del sistema inmune que dificultan aún más el hipotético uso de vacunas; puede reducir, modular o simplemente no expresar antígenos de superficie y, en muchos casos, provoca fenómenos de Inmunosupresión.

Está aceptado que el cáncer involucra a un polimórfico grupo de enfermedades malignas. Algunas de ellas incluyen en su etiología distintos agentes virales que determinan el origen y el establecimiento de la proliferación neoplásica.

En estos casos, las vacunas que logren Inmunizar al hospedero contra los virus específicos actuarán en forma preventiva y evitarán una gran parte del cáncer

relacionado con esos agentes. Puede decirse, con mucha satisfacción, que ya se encuentra disponible y en uso la primera vacuna contra el virus de la hepatitis B, la cual puede prevenir el establecimiento de la enfermedad hepática crónica, que es el soporte patogénico del carcinoma hepatocelular humano.

Además, por medio de la creación de vacunas que brinden protección contra estas afecciones virales podría evitarse muchos casos de cáncer asociados con el virus de Epstein-Barr (tumores nasofaríngeos, linfomas) y de carcinomas de cuello uterino y cavidad oral, derivados de la infección por papilomavirus.

Cuando se busca la prevención del cáncer utilizando vacunas, el problema se complica con los tumores que no incluyen virus en su etiología. Lamentablemente, éstos representan la gran mayoría de los cánceres en el ser humano. Para actuar en forma preventiva en este tipo de neoplasias debe generarse resistencia contra las propias células tumorales y no contra el agente etiológico, "el virus", como en los casos anteriores. El planteo entonces es muy problemático ¿puede el sistema inmune reconocer y destruir células tumorales aisladas o crecimientos neoplásicos incipientes? ¿es posible estimular mediante vacunas esa función?

De todas formas, está demostrado que el sistema inmune de los portadores de cáncer cuenta con células que reconocen específicamente el tumor y causan su regresión. Se trata de los TIL (*tumor-infiltrating lymphocytes*), que destruyen con selectividad a las

células tumorales y representan otra alternativa en el diseño de vacunas anticancerosas (198).

La identificación de antígenos tumorales capaces de provocar reacciones inmunes parece ser el tema primordial de investigación. Por otra parte, la vacuna anticancerosa ideal -apoyándose en esos antígenos- deberá inducir la aparición de anticuerpos neutralizantes y estimular la actividad citotóxica celular. En otras palabras, generar la capacidad de una respuesta inmediata y de memoria con la participación de las células B y T.

Dejando los cánceres de etiología viral reconocida, los tumores no poseen, en general, antígenos específicos reactivos. Sin embargo, investigaciones recientes indicarían que se pueden transformar neoplasias no antigénicas en variantes inmunógenas.

La mutagénesis inducida o la transfección de genes que codifiquen antígenos de superficie fue utilizado con algún éxito en modelos murinos de tumores no inmunógenos. Aparentemente, este tipo de modificaciones en unas pocas células -que son reintroducidas en el organismo- origina una respuesta inmune contra las células no modificadas, en un fenómeno denominado "reconocimiento asociativo".

Otra alternativa para mejorar la inmunogenicidad de las células tumorales se fundamenta en el hecho de que las células T sólo reconocen antígenos de superficie que

son presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, la transfección de genes relacionados, a través de vectores (virus u otros microorganismos), podría revertir la situación y permitiría el reconocimiento por parte de las células T.

Muchas de las limitaciones existentes en la producción de vacunas antitumorales no parten sólo del comportamiento huido de las células cancerosas. También debe recordarse que todavía hay grandes deficiencias en la comprensión de muchos aspectos de los mecanismos de reconocimiento molecular entre las células y de las influencias mutuas entre tumor y sistema Inmune. Además restan, estudios definitivos en cánceres humanos de supuesta etiología viral.

La mejor comprensión de todos estos aspectos, ampliará el horizonte en el desarrollo de vacunas preventivas y terapéuticas que beneficiarían primordialmente a poblaciones con riesgo especial para cáncer de acuerdo a la predisposición genética, los factores ambientales o el diagnóstico previo del cáncer.

Los métodos tradicionales de diagnóstico del cáncer se han ido enriqueciendo con las técnicas de la genética molecular.

No quedan dudas de que el cáncer es una enfermedad genética y que las alteraciones del genoma son adquiridas en el nivel somático.

Esas lesiones genéticas no son las únicas relacionadas con la patogenia del cáncer, pero pueden constituirse en blanco para el diagnóstico. Por otra parte, la proteína p53 mutada posee diferentes comportamientos biológicos y bioquímicos de acuerdo con el lugar en que se produce la alteración. Tal vez el pronóstico varíe en relación con el tipo de mutación que afectó el gen de la p53. Si bien el gen de la p53 se muestra como blanco más frecuente de las alteraciones genéticas del cáncer del ser humano, es de esperar que sus efectos sobre el crecimiento celular se combine en una trama compleja con el de otros genes involucrados.

Es posible que de esta interacción entre genes mutantes se origine la proliferación descontrolada que caracteriza la gran diversidad de tipos de cáncer que se conocen.

En la actualidad se conoce la secuencia completa de nucleótidos de más de tres mil genes, muchos de los cuales producen enfermedades cuando están mutados. La única cura posible para las enfermedades hereditarias es el reemplazo de los genes enfermos por otros sanos, algo posible gracias a la transgenia, que permite la reconstrucción genética de un individuo.

El desarrollo de la mayor parte de los tumores malignos en el ser humano requiere una serie de cambios genéticos o epigenéticos en una estirpe celular determinada. La importancia de la identificación de estas alteraciones excede en gran medida la comprensión del papel que cumplen en el proceso complejo de carcinogénesis. Las



alteraciones constituyen un blanco potencial para el diseño de una estrategia del tratamiento.

Muchas veces la restauración de una función perdida entre las variaciones múltiples que implica la transformación neoplásica, puede mejorar el panorama de manera sensible. La reintroducción de genes supresores de tumores y la eliminación de oncogenes restablecería ciertas funciones celulares críticas, con un beneficio terapéutico importante.

Las modificaciones de los genes *ras* y *p53* representan las anomalías genéticas más frecuentes en las neoplasias malignas humanas; son considerados los blancos terapéuticos más significativos.

Los genes *h-ras*, *n-ras* y *k-ras* participan en la transducción de señales intracelulares que estimulan a la célula a la proliferación o diferenciación. Las variantes oncogénicas del *ras* se activan por mutaciones que generan una señal constante y anómala en el interior celular. Los productos de estos genes son proteína G localizadas en la membrana plasmática, que actúan cuando se unen a GTP y transmiten las señales proliferativas al núcleo celular.

Se sintetizaron varios compuestos con capacidad de interferir en la función del producto proteínico del oncógeno *ras*. La lovastatina y la compactina pueden bloquear la

actividad mitogénica de los factores de crecimiento y detener a las células en G1. Además, la lovastatina suprimiría la génesis de neuroblastomas en ratones (197-198).

Otras sustancias como acetoxicicloheximida, oxanosina, depudicina y azatirosina revierten la morfología de las células transformadas por el oncógeno. La azatirosina, además de inducir una morfología normal y limitar el proceso neoplásico en el gen supresor tumoral p53 (197).

La proteína p53 mutante -carente de su propiedad de detener el ciclo celular en G1- podría derivar de una conformación alterada, sin cambios en la secuencia aminoacídica. Sería factible diseñar drogas que puedan inducir cambios conformacionales que restablezcan la función perdida.

La conformación de la proteína p53 alterada expone un epítipo específico, oculto en la estructura de la p53 nativa. El anticuerpo monoclonal PAb 240 reconoce este sitio de la p53 mutada y abre la posibilidad de dirigir drogas o radionúclidos hacia las células neoplásicas.

Todo este avance en la biología molecular moderna abre un espacio en el tratamiento del cáncer. Aunque en algunos casos restan delinear protocolos; en otros, los blancos terapéuticos asoman en forma tibia y se necesita mucho ingenio y experimentación.

Los genes que codifican para las diferentes proteínas estructurales o enzimáticas se transcriben a mRNA, que luego de un procesamiento complejo están en condiciones de salir del núcleo celular hacia el citoplasma. En los ribosomas cada cadena de mRNA codifica para la síntesis del producto final del gen, una proteína que tendrá acciones específicas dentro o fuera de la célula.

La posibilidad de bloquear a los genes implicados en el desarrollo de cáncer permite la exploración de las bases moleculares del crecimiento celular normal y neoplásico. Podría presentarse también como una oportunidad interesante para el terreno terapéutico, cuando un gen se encuentra activado de manera patológica, como es el caso del p53.

Los oligonucleótidos sintéticos son copias especulares de las secuencias del genoma humano cuya expresión se desea bloquear, por lo que se unen con gran especificidad y bloquean el procesamiento transcripción-traducción, dando como resultado la inhibición de la síntesis de una proteína determinada.

Los oligonucleótidos preparados para interactuar con el DNA de doble cadena se denominan oligonucleótido antígeno, porque inhiben de manera directa la transcripción de DNA a mRNA. El DNA presenta una estructura espacial de alfa hélice. Se supone que los oligonucleótidos antígeno se unen a la hélice y originan una variante en triple hélice que no puede ser transcripta.

También existen oligonucleótidos sintéticos (antisentido) que se asocian con el mRNA, ya transcritos, para fomentar su degradación por RNasa o impedir su procesamiento y traducción a proteína. A este tipo de oligonucleótidos se les llama antisentido.

Recientemente han cobrado gran relevancia los oligonucleótidos modificados químicamente, entre los que se destacan los fosforilados. Estos últimos se obtienen por adición de grupos sulfhidrilos al esqueleto fosfórico de los oligonucleótidos, que les otorga mayor estabilidad y efectividad como moléculas antígeno o antisentido. Además, son solubles en agua, y su manejo y purificación son relativamente simples.

Los primeros estudios *in vivo* con oligonucleótidos talladas -realizados en ratones, ratos y conejos- pusieron de manifiesto su posible aplicación terapéutica. Inoculados por vía parenteral tuvieron una vida media de veinte a cuarenta horas, que es muy superior a la de otros oligonucleótidos no talladas. No mostraron efectos tóxicos relevantes, ni siquiera en los protocolos a largo plazo; por lo que el perfil farmacocinético no constituye un factor limitante para su utilización clínica.

En teoría, la utilización de oligonucleótidos dirigidos contra oncogenes que confieren ventajas, podría resultar más adecuado que el uso de agentes citotóxicos, que dañan en forma indiscriminada a las células neoplásicas y las normales.

El objetivo principal de la utilización de oligonucleótidos sintéticos está enmarcado en

la búsqueda de un medio para interferir con la transcripción o traducción de estas proteínas indispensables para la carcinogénesis y la metastización.

Si bien todavía faltan avances considerables para llegar a la utilización de los oligonucleótidos en la práctica médica, tal vez se esté en los comienzos de una revolución terapéutica que guarda ciertas semejanzas con lo ocurrido cuando se descubrieron los antibióticos, hace ya varias décadas.

Otra de las perspectivas que es importante considerar es el caso de la restenosis, ya que estudios recientes indican que en pacientes con angioplastia coronaria existe una activación del citomegalovirus, y como consecuencia se codifica para una proteína denominada IE84, la cual se une con la proteína p53 y desactiva su actividad, generando con ello la restenosis, que está caracterizada por la proliferación excesiva de células de músculo liso (199). La alternativa propuesta para combatir ésta enfermedad es vehicular drogas con antivirales para inhibir la actividad del citomegalovirus, o bien drogas que reemplacen la supresión de actividad de crecimiento de p53. Esto sugiere que las enfermedades arteriales y el cáncer pueden estar relacionados.

## CAPÍTULO VI

## CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., y Harris, C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
2. J. Bishop, (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 235, 305-311
3. Matlashewsky, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., y Benchimol, S. (1984) Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* 3, 3257-3262.
4. Pennica, D., Goeddel, D., Hayflick, J., Reich, N., Anderson, C., y Levine, A., (1984) The amino acid sequence of murine p53 determined from a cDNA clone. *Virology* 134, 477-483.
5. Soussi, T., Caron de Fromental, C., Mechali, M., May, P., y Dress, M. (1987) Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene* 1, 71-78.
6. Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Zeev, A., y Rotter, V. (1990) Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6565-6577.
7. Milner, J., Cook, A., y Mason, J. (1990) p53 is associated with p34 in transformed cells. *EMBO J.* 9, 2885-2889.
8. Sturzbecher, H., Maimets, T., Chumakov, P., Brain, R., Addison, C., Simains, V., Rudge, K., Philip, R., Grimaldi, M., Court, W., y Jenkins, J. (1990) p53 interacts with p34 in mammalian cells: Implication for cell cycle control and oncogenesis. *Oncogene* 5, 795-801.
9. Shields, P., y Harris, C., (1991) Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. *J. Am. Med. Assoc.* 266, 681-687
- 10a. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P., y Pavletich, N. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355.
- 10b. Core, M., Omichinski, J., Dakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E., y Gronenborn, A., (1994) High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science* 265, 386-391.

11. Gronostajski, R., Goldberg, J., y Pardee, A. (1984) Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. *Mol. Cell. Biol.* 4, 442-448.
12. Baker, S., Marhowitz, S., Fearon, E., Willson, J., y Volgestein B. (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-915.
13. Diller, L., Kassel, J., Nelson, C., Gryka, M., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S., Volgestein, B., y Friend, S. (1990) p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5772-5781.
14. Mercer, W., Shields, M., Amin, M., Suave, G., Appella, E., Ullrich, A., y Romano, J. (1990) Antiproliferative effects of wild-type human p53. *J. Cell. Biochem.* 14C, 285.
15. Mercer, W., Shields, M., Lin, D., Appella, E y Ullrich, S. (1991) Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1958-1962.
16. Chen, P., Chen, Y., Bookstein, R., y Lee, W. (1990) Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250, 1576-1579.
17. Michalovitz, D., Halevy, O., y Oren, M. (1990) Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature sensitive mutant of p53. *Cell* 62, 671-680.
18. Martínez, J., Georgoff, I., Martínez, J., y Levine, A. (1991) Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature sensitive p53 protein. *Genes & Dev.* 5, 151-159.
19. Finlay, C., Hinds, P., y Levine, A. (1989) The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
20. Elyahu, D., Michalovitz, D., Elyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., y Oren, M. (1989) Wild-type can inhibit oncogene-mediated focus formation . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8763-8767.
21. Lane, D., y Gannon, L., (1983) Cellular proteins involved in SV40 transformation. *Cell Biol. Int. Rep.* 7, 513-514.
22. Steinmeyer, K., y Deppert, W. (1988) DNA binding properties of murine p53. *Oncogene* 3, 501-507.
23. Kern, S, Kinzler, K., Baker, S., Nigro, J., Rotter, V., Levine, A., Friedman, P, Prives, C., y Volgestein, B., (1991) Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. *Oncogene* 6, 131-136.



24. Kern, S., Kinzler, K., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., y Volgestein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708-1711.
25. Bargonetti, J., Friedman, P., Kern, S., Volgestein, B., y Prives, C. (1991) Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 65, 1083-1091.
26. Zambetti, G., Bargonetti, J., Walker, K., Prives, C., y Levine A., (1992) Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes & Dev.* 6, 1143-1152.
27. El-Deiry, W., Dern, S., Pietenpol, J., Kinzler, K y Volgestein, B. (1992) Human genomic DNA sequences define a consensus binding site for p53. *Nature Genet.* 1, 44-49.
28. Funk, W., Pak, D., Karas, R., Wright, W., y Shay, J. (1992) A transcriptional active DNA binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell. Biol.* 12, 2866-2871.
29. Bargonetti, J., Reynbisdotlr, I., Friedman, P y Prives, C. (1992) Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes & Dev.* 6, 1886-1898.
30. Lane, D., y Crawford, L. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
31. Linzer, D., y Levine A., (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen in SV40 transformed cells. *Cell* 17, 43-52.
32. Gannon, J., Greaves, R., Iggo, R., y Lane, D. (1990) Activating mutations in p53 produce common conformational effects a monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 9, 1595-1602.
33. Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J., y Lane, D. (1990) Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells. *J. Virol.* 59, 444-452.
34. Reich, N., y Levine, A., (1984) Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308, 199-201.
35. Finlay, C, Hinds, P., Tan, T., Eliyahu, D., Oren, M., y Levine, A., (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.* 8, 531-539.

36. Iggo, R., Gatter, K., Bartek, J., Lane, D y Harris, A. (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer, *Lancet* 335, 675-679.
37. Hinds, P., Finlay, C., Quartin, R., Baker, S., Fearon, E., Volgestein, B., y Levine A. (1990) Mutant p53 cDNAs form human colorectal carcinomas can cooperate with ras in transformation of primary rat cells: a comparison of the 'hot spots: mutant phenotypes. *Cell Growth & Diff.* 1, 571-580.
38. Mercer, W., Shields, M., Amin, M., Sauve, G., Apella, E., Romano, J., y Ullrich, S., (1990) Negative growth regulation in a glioblastoma cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6166-6170.
39. Michalovitz, D., Halevy, O., y Oren M. (1990) Conditional inhibition of transformation and cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62, 671-680.
40. Diller, L., Kassel, J., Nelson C., Gryka, M., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Oizurk, M., Baker, S., Volgestein, B., y Friend, S. (1990) p53 mutations as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5772-5781.
41. Martínez, J., Georgoff, I., Martínez, J., y Levine, A. (1991) Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature sensitive p53 protein. *Genes & Dev.* 5, 151-159.
42. Gannon, J., y Lane D., (1991) Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* 349, 802-806.
43. Baker, S., Markowitz, S., Fearon, E., Willson, J., y Volgestein, B. (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-915.
44. Kimchi, A., y Oren, M., (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352,345-347.
45. Williams, G., Smith, C., Spooncer, E., Dexter, R., y Taylor D. (1990) Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343, 76-79.
46. Ginsberg, D., Michalovitz, D., Ginsberg, D., y Oren, M. (1991) Induction of growth arrest by temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein. *Mol. Cell. Biol.* 11, 582-585.
47. Shaulsky, G., Goldfinger, N., Peled, A y Rotter, V. (1991) Involvement of wild-type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization. *Cell Growth Diff* 2, 661-667.
48. Braithwaite, A., Sturzbecher, H., Addison, C., Palmer, C., Rudge, K., y Jenkins, J. (1987) Mouse p53 inhibits SV40 origin-dependent DNA replication. *Nature* 329, 458-460.

49. Gannon, J., y Lane, D. (1987) p53 and DNA polymerase  $\alpha$  compete for binding to SV40 T antigen. *Nature* 329, 456-458.
50. Sturzbecher, H., Brain, R., Maimets, T., Addison, C., Rudge, K., y Jenkins, J. (1988) Mouse p53 blocks SV40 DNA replication in vitro and downregulates T-antigen DNA helicase activity. *Oncogene* 3, 405-413.
51. Wang, E., Friedman, P., y Prives, C. (1989) The murine p53 protein blocks replication of SV40 DNA in vitro by inhibiting the initiation of SV40 large T antigen. *Cell* 57, 379-392.
52. Wilcock, D., y Lane, D., (1991) Localization of p53, retinoblastoma in host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature* 349, 429-431.
53. Weintraub, H., Haushchka, S., y Tapscott, S. (1991) The MCK enhancer contains a p53 responsive element. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4570-4571.
54. Mercer, W., Shields, M., Lin, D., Apella, E., y Ullrich, S. (1991) Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 1958-1962.
55. Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M., y Oren, M. (1991) Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 9979-9983.
56. Culotta, E., y Koshland, D. (1993) p53 sweeps through cancer research. *Science* 262, 1958-1961.
57. Marx, J. (1993) How p53 suppresses cell growth. *Science* 262, 1644-1645.
58. Samet, J. y Utell, M. (1991) The environment and the lung. Changing perspectives. *JAMA* 266, 670-686
59. Perera, F. (1990) Carcinogens and human health. *Science* 250, 1644
60. Watson, J., (1983) *Biología molecular del gen*, 3a edición, Fondo Educativo Interamericano. 547-590.
61. Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., y Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-649.
62. Jenkins, J., Rudge, K., y Currie, G. (1984) Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312, 651-654.

63. Parada, L., Land, H., Weinberg, R., Wolf, D., y Rotter, V. (1984) Cooperation between gene encoding p54 tumor antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-651.
64. Rovinski, B., y Benchimol, S. (1988) Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 2, 445-452.
65. Hinds, P., Finlay, C., y Levine, A. (1989) Mutation is required to activate p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation.
66. Maehle, L., Metcalf, R., Ryberg, W., Bennett, W., Harris, C., y Haugen, A. (1992) Altered p53 gene structure and wxpression in human epithelial cells after exposure to nickel. *Cancer Res.* 52, 218-221.
67. Okamoto, M., Sasaki, M., Sugio, D., Sato, C., Iwama, T., Idechi, T., Tonomura, A., Sasazuki, T., y Miyaki, M. (1988) Loss of constitutional heterozygosity in colon carcinoma form patients with familial polyposis coli. *Nature* 331., 273-277.
68. Sasaki, M., Okamoto, M., Sato, C., Sugio, K., Soejma, J., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Miyaki, M., y Sasazuki, T., (1989) Loss of constitutional heterozygosity in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli and those with nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 49, 4402-4406.
69. Miyadi, M., Seki, M., Okamoto, M., Yamanaka, A., Maeda, Y., Tanaka, K., Kikuchi, R., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Nakamura, Y., White, R., Miki, Y., Utsonomiya, J., y Koike, M. (1990) Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 50, 7166-7173.
70. Feraron, E., y Volgestein, B., (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
71. Marshall, C. (1991) Tumor suppressor genes. *Cell* 64, 313-326.
72. Sager, R. (1989) Tumor suppressor genes : the puzzlw and the promise. *Science* 24, 1406-1412.
73. Baker, S., Fearon, E., Nigro, J., Hamilton S., Presinger, A., Jessup, J., VanTuinen, P., Ledbetter, D., Barker, D., Nakamura, Y., White, R., y Volgestein, B. (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221.
74. Milner, J., y Medcalf, E. (1991) Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65, 765-774.

75. Bodmer, W., Bailey, C., Bodmer, K.J., Bussey, H., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F., Murday, V., Rider, S., Scambler, P., Sheer, D., Solomon, E., y Spurr, N. (1987) Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 328, 614-616.
76. Leppert, M., Dobbs, M., Scambler, P., O'Connell, P., Nkamura, Y., Stauffer, D., Woodward, S., Burt, R., Hughes, J., Gardner, E., Lathrop, M., Wasmuth, J., Lalouel, J., y White, R. (1987) The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238, 1411-1413.
77. Fearon, E., Cho, D., Nigro, J., Kern, S., Simons, J., Ruppert, J., Hamilton, S., Preisinger, A., Thomas, G., Kinzler, K., y Vogelstein, B. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49-56.
78. Shirasawa, S., Urabe, K., Yanagawa, Y., Toshihara, K., Iwama, T., y Sasazuki, T. (1991) p53 mutations in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli. *Can. Res.* 51, 2874-2878.
79. Yanoshita, R., Konishi, M., Ito, S., Seki, M., Tanaka, K., Maeda, Y., Iino, H., Fukayama, M., Koike, M., Mori, T., Sakaruba, H., Fukunari, H., Iwama, T., y Miyaki, M. (1992) Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* 52, 3965-3971.
80. Bishop, J., (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248.
81. Elliyahu, D., Michalovitz, D., Elliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., y Oren, M. (1989) Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8763-8767.
82. Finlay, C., Hinds, P., y Levine, A. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
83. Michalovitz, D., Haveley, O., y Oren, M. (1990) Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62, 671-680.
84. Lohman, D., Fessler, B., Putz, B., Reich, U., Bohm, J., Prauer, H., Wunsch, P., y Hofler, H. (1993) Infrequent mutations of the p53 gene in pulmonary carcinoid tumors. *Cancer Res.* 53, 5797-5801.

85. Marchetti, A., Buttitta, F., Merlo, G., Diella, F., Pellegrini, S., Pepe, S., Macchirini, P., Chella, A., Angeletti, A., Callahan R., Bisticchi, M., y Squartini, F. (1993) p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res.* 53, 2846-2851.
86. Kishimoto, Y., Murakami, Y., Shiraishi, M., Hayashi, K., y Sekiya, I. (1992) Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res.* 52, 4799-4804.
87. Suzuki, H., Takahashi, T., Kuroishi, T., Suyama, M., Ariyoshi, Y., Takahashi, T., y Ueda, R. (1992) P53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: association between mutations and smoking. *Cancer Res.* 52, 734-736.
88. Lehman, T., Bennett, W., Metcalf, R., Welsh, J., Ecker, J., Modali, R., Ullrich, S., Romano, J., Appella, E., Testa, J., Gerwin, B., y Harris, C. (1991) p53 mutations, ras mutations, and p53-heath shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 51, 4090-4096.
89. Vahakangas, K., Samet, J., Metcal, R., Welsh, J., Bennett, W., Lane, D., y Harris, C. (1992) Mutation of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium miners. *Lancet* 339, 576-580.
90. Cajot, J., Anderson, M., Lehman, T., Shapiro, H., Briggs, A., y Stanbridge, E. (1992). Growth suppression mediated by transfection of p53 in HUT292DM human lung cancer cells expressing endogenous wild-type p53 protein. *Cancer Res.* 52,6956-6960.
91. Horio, Y., Takahashi, T., Hibi, K., Suyama, M., Niimi, T., Shimokata, K., Yamakawa, K., Nakamura, Y., Ueda, R., y Takahashi, T. (1993). Prognostic significance of p53 mutations y 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 53, 1-4.
92. Miller, C., Simon, K., Aslo, A., Kok, K., Yokota, J., Buys, C., Terada, M., y Koeffler, P. (1992) P53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res.* 52, 1695-1698.
93. Takahashi, T., Nau, M., Shiba, I., Birrer, M., Rosenberg, R., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A., y Minna, J. (1989) p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246, 491-494.
94. Takahashi, T., D'Amico, D., Shiba, I., Buchhagen, D., y Minna, J. (1990) Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *J. Clin. Inves.* 86, 363-369.

95. Takahashi, T., Takahashi, T., Suzuki, H., Hida, T., Sekido, Y., Ariyoshi, Y., y Ueda, R. (1991) The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 6, 1775-1778.
96. D'Amico, D., Carbone, D., Mitsudomi, t., Nau, M., Fedorko, J., Russell, E., Johnson, B., Buchhagen, D., Bodner, S., Phelps, R., Gazdar, A., y Mina, J. (1992) High frequently of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene* 7, 339,346.
97. Chiba, I., Takahashi, T., Nau, M., D'Amico, D., Curiel, D., Mitsudomi, T., DL, V., Carbone, D., Piantadosi, S., Koga, H., Reissmann, P., Slamon, D., Holmes, H., y Min, J., (1990) Mutations in the p53 gene are frequent in primary resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 5, 1603-1610.
98. Suzuki, H., Tkahashi, T., Kuroishi, T., Suyama, M. Ariyoshi, Y., Tkahashi, T., y Ueda, R (1992) p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: association between mutation and smoking. *Cancer Res.* 52, 734-736.
99. Simonetti, R., Camma, C., Fiorello, F., Politi, F., D'Amico, G., y Pagliaro, L. (1991) Hepatocellular carcinoma: a worldwide problem and the major risk factors. *Dig. Dis. Sci.* 36, 962-972.
100. Tanaka, K., Hirohata, T., Koga, S., Sugimashi, K., Kanematsu, T., Ohryohji, F., Nawata, H., Ishibashi, H., Maeda, Y., Kiyokawa, H., Tokunaga, K., Irita, Y., Takashita, S., Arase, Y., y Nishino, N. (1991) Hepatitis C and hepatitis B in the etiology of hepatocellular carcinoma in the Japanese population. *Cancer Res.* 51, 2842-2847.
101. Nalpas, B., Driss, F., Pol, S., Hamelin, B., Hausset, C., Breshot, C., y Bertelot P. (1991) Association between HCV and HBV infection in hepatocellular carcinoma and alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 12, 70-74.
102. Wang, J., Sindy, F., Chenivesse, X., Lamas, E., Henglein, B., y Brechot, C. (1992) Modification of cyclin A wxpression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 7, 1653-1656.
103. Kekule, A., Lauer, U., Weiss, L., Lubner, B., y Hofschneider, P. (1993) Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signaling pathway. *Nature* 361, 742-745.
104. Groopman, J., Jiaqi, Z., Donahue, R., Pikul, A., Lisheng, Z., Chen, J. y Wogan, G. (1992) Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guanqxi autonomus regios, peoples Republic of China. *Cancer Res.* 52, 45-52.
105. Hsu, I. Metcalf, R., Sun, T., Welsh, J., Wang, N. y Harris, C. (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350, 427-431.

106. Willet, W. (1987) The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 338, 339-394.
107. Henderson, B., Ross, R., y Pike, M. (1991) Toward the primary prevention of cancer. *Science* 254, 1131-1137.
108. Davidoff, A., Kerns, B., Iglehart, J., y Marks, J. (1991) Maintenance of p53 alternations throughout breast cancer progression. *Cancer Res.* 51, 2605-2610.
109. Coles, C., Thompson, A., Elder, P., Cohen, B., Mackenzie, I., Cranston, G., Chetti, U., Mackay, J., MacDonald, M., Makamura, Y., Hoyheim, B., y Steel, C. (1990). Evidence implicating at least two genes on chromosome 17p in breast carcinogenesis. *Lancet* 336, 761-763.
110. Thorlacius, S., Borresen, A., y Eyfjord, J. (1993) Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in an Icelandic population: a prognostic factor. *Cancer Res.* 53, 1637-1641.
111. Devilee, P., Van Den Broek, M., Kuipers-Dijkshoorn, N., Kolluri, R., Meera Khan, P., Pearson, P., y Cornelisse, C. (1989) At least four different chromosome region are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics* 5, 554-560.
112. Thorlacius, S., Jonasdotir, y Eyfjord, J. (1991) Loss of heterozygosity at selective sites on chromosomes 13 and 17 in human breast carcinoma. *Anticancer Res.* 11, 1501-1508.
113. Andersen, T., Gaustad, A., Oltestad, L., Farrants, G., Nesland, J., Tveit, K., y Borresen, A. (1992) Genetic alteration of the tumour suppressor gene region 3p, 11p, 13q, 17p and 17q in human breast carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 4, 113-121.
114. Thompson, A., Steel, C., Chetty, U., Hawkins, R., Miller, W., Carter, D., Forrest, A., y Evans, H. (1990) p53 gene expression and chromosome 17p allele loss in breast cancer. *Br. J. Cancer* 61, 74-78.
115. Mckay, J., Thompson, A., Coles, C., y Steel, C. (1990) Molecular lesion in breast cancer. *Int J. Cancer* 5, 47-50.
116. Coles, C., Condie, A., Chetty, U., Steel, M., Evans, J., y Prosser, J. (1992) p53 mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 52, 5291-5298.
117. Osborne, R., Merlo, G., Mitsudomi, T., Venesio, T., Liscia, D., Cappa, A., Chiba, I., Takahashi, T., Nau, M., Callahan, R., y Minna, J. (1991) Mutation in the p53 gene in primary human breast cancers. *Cancer Res.* 51, 6194-6198.



118. Mazars, R., Spinardi, L., BenCheikh, M., Simony-Lafontaine, J., Jeanteur, P., y Theillet, C. (1992) p53 mutations occur in aggressive breast cancer. *Cancer Res.* 52, 3918-3923.
119. Sidranski, D., Tokino, T., Helzlsouer, K., Zehnbauer, B., Rausch, G., Shelton, B., Prestigiacomo, L., Vogelstein, B., y Davidson, N. (1992) Inherited p53 gene mutation in breast cancer. *Cancer Res* 52, 2984-2986.
120. Davidoff, A., Iglehart, D., y Marks, J., (1992) Immune response to p53 is dependet upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3439-3442.
121. Ozbun, M., Jerry, D., Kittrell, F., Medina, D y Butel, J. (1993) p53 muttions selected in vivo when mouse mammary epithelial cells form hyperplastic outgrowths, asre not necessary for establishment of mammary cell lines in vitro. *Cancer Res* 53, 1646-1652.
122. Evans, M., Taffe, B., Harris, C., y Bohr, V. (1993) DNA strand bias in the repair of the p53 gene in normal human and xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *Cancer Res.* 53, 5377-5381.
123. Ziegler, A., Leffell, D., Kunala, S., Sharma, H., Gallani, M., Simon, J., Halperin, A., Baden, H., Shapiro, P., Bale, A., y Brash, D. (1993) Mutalions hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4216-4220.
124. Campbell, C., Quinn, A., Angus, B., Farr, P., y Rees, J. (1993) Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following wxposure to UV radiallon. *Cancer Res.* 53, 2697-2699.
125. Brash, D., Rudolph, J., Simon, J., Lin, A., Mckenna, G., Baden, H., Halperin, A., y Pontén, J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutation in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10124-10128.
126. Dumaz, N., Drougard, C., Sarasin, A., y Daya-Grosjean, L. (1993) Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10529-10533.
127. Maltzman, W y Czyzyk, L. (1984). UV Irradiation stimulates cells of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Moll. Cell. Biol.* 4, 1689-1694.
128. Fritsche, M., Haessler, C y Brander, G. (1993). Tumorigenesis by a long wavelength uv-A source. *Oncogene* 8, 307-318.

129. Hall, P., Mckee, P., Menage, H., Dover, R., y Lane, D. (1993). High levels of p53 protein in uv-irradiated normal human skin. *Oncogene* 8, 203-207.

130. Zhan, Q., Carrier, F., y Fornace, A. (1993). Nonionasing radition in the skin. *Moll. Cell. Biol.* 13, 4242-4250.

131. Kuerbitz, S., Plunkett, B., Walsh, V., y Kastan, M. (1992). Wild type p53 is a cell cycle check point determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7491-7495.

132. Kastan, M., Zhan, Q., El-Deiry, W., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W., Plunkett, B., Vogelstein, B. y Fornace, A. (1992). High frequency of p53 mutation in ultraviolet radiation induced murine skin tumor: evidence for a strand byse and tumor heterogeneity. *Cell* 71, 587-597.

133. Fornace, A., Alamo, I., y Hollander, M. (1988). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8800-8804.

134. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., y Oren, M. (1993). *mdm-2* expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461-468.

135. Wu, X., Bayle, J., Olson, D., y Levine, A. (1993). The p53 *mdm-2* autorregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126-1132.

136. Momand, J., Zambelli, G., Olson, D., George, D., y Levine, A. (1992). Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cell* 69, 1237-1245.

137. Mok, C., Tsao, S., Knapp, F., Fishbaugh, P., y Lau, C. (1992) Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancers. *Cancer Res.* 52, 5119-5122.

138. Kupryjanczyk, J., y Thor, A. (1993) p53 gene mutation and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4961-4965.

139. Eccles, D., Cranston, G., Steel, C., Nakamura, Y., y Leonard, R. (1990) Allele loss on chromosome 17 in human epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene* 5, 1599-1601.

140. Okamoto, A., Sameshima, Y., Yokoyama, S., Terashima, Y., Sugimura, T. Terada, M., y Yokota, J. (1991) Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 51, 5171-5176.

141. Yaginuma, Y., y Westphal, H. (1992) Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 52, 4196-4199.

142. Marks, J., Davidoff, A., Kerns, B., Humphrey, P., Pence, J., Dodge, R., Clarke-Pearson, D., Iglehart, J., Bast, R., y Berchuck, A. (1991) Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 51, 2979-2984.
143. Spruck, C., Rideout, W., Olumi, A., Ohneseit, P., Yang, A., Tsai, Y., Nichols, P., Horn, T., Hermann, G., Steven, K., Ross, R., Yu, M., y Jones, P. (1993) Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res.* 53, 1162-1166.
144. Fujimoto, K., Yamada, Y., Okajima, E., Kakizoe, T., Sasaki, H., Sugimura, T., y Terada, M. (1992) Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 52, 1393-1398.
145. Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., y Balmain, A. (1986) Carcinogen specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322, 78-80.
146. Olumi, A., Tsai, Y., Nichols, P., Skinner, D., Cain, D., Bender, L., y Jones, P. (1990) Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res.* 50, 7081-7083.
147. Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S., Frost, P., y Vogelstein, B. (1991) Identification of p53 gene mutation in bladder cancers and urine samples. *Science*, 252, 706-709.
148. Tsai, Y., Nichols, P., Hiti, A., Williams, Z., Skinner, D., y Jones, P. (1990) Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.* 50, 44-47.
149. Tamura, G., Kihana, T., Nomura, K., Terada, M., Sugimura, T., y Hirohashi, S., (1991) Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res.* 51. 3056-3058.
150. Renault, B., Van den Broeck, M., Fodde, R., Wijnen, J., Pelegata, N., Amadori, D., Khan, M., y Ranzani, G. (1993) Base transitions are the most frequent genetic changes at p53 in gastric cancer. *Cancer REs.* 53, 2614-2617.
151. Matozaki, T., Sakamoto, C., Suzuki, T., Matsuda, K., Uchida, T., Nakano, O., Wada, K., Nishizaki, H., Konda, Y., Nagao, M., y Nasuga, M. (1992) p53 gene mutations in human gastric cancer: wild-type p53 but not mutant p53 suppresses growth of human gastric cancer cells. *Cancer Res.* 52, 4335-4341.
152. Martin, H., Filipe, M., Morris, R., Lane, D., y Silvestre, F. (1992) p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* 50, 859-862.

153. Yamada, Y., Yoshida, T., Hayashi, K., Sekiya, T., Yokota, J., Hirohashi, S., Nakatani, K., Nakano, H., Sugimura, T., y Terada, M. (1991) p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Res.* 51, 5800-5805.
154. Matozaki, T., Sakamoto, C., Suzuki, T., Matzuda, K., Uchida, T., Nakano, O., Wada, K., Nishisaki, H., Konda, Y., Nagao, M., y Kasuga, M. (1992) p53 gene mutation in human gastric cancer: wild-type p53 but not mutant p53 suppresses growth of human gastric cancer cells. *Cancer Res.* 52, 4335-4341.
155. Mironov, N., Aguelon, A., Potapova, G., Omori, Y., Gorbunov, O., Klimenkov, A., y Yamasaki, H. (1994) Alterations of (CA)<sub>n</sub> DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Res.* 54, 41-44.
156. Boring, C., Squires, T., y Tong, T. (1991) Cancer statistics. *Cancer J. Clin.* 41, 19-36.
157. Robey-Cafferty, S., El-Naggar, A., Sahin, A., Bruner, J., Ro, J., y Cleary, K. (1991) Prognostic factors in esophageal squamous carcinoma: A study of histologic features blood group expression, and DNA ploidy. *Am. J. clin. Pathol.* 95, 844-849.
158. Franceschi, S., Talamini, R., Baron, A., Negri, E., Bidoli, E., Serraino, D., y La Vecchia, C. (1990) Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res.* 50, 6502-6507.
159. Hamilton, S., Smith, R., y Cameron, J., (1988) Prevalence and characteristic of Barrett esophagus in patients with adenocarcinoma of the esophagus or esophageal junction. *Hum. Pathol.* 19, 942-948.
160. Huang, Y., Boynton, R., Blount, P., Silverstein, R., Yin, J., Tong, Y., McDaniel, T., Newkirk, C., Resau, J., Sridhara, R., Reid, B., y Meltzer, S. (1992) Loss of heterozygosity involved multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 52, 6525-6530.
161. Seemayer, T., y Cavenee, W. (1989) Molecular mechanisms of oncogenesis. *Lab. Invest.* 60, 585-599.
162. Bigner, S., y Vogelstein, B. (1990). Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastomas. *Brain. Pathol.* 1, 12-18.
163. Schawab, M., Alituro, K., Klempnauer, K., Varmus, H., Bishop, J., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., y Trent, J. (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell line and a neuroblastoma tumor. *Nature* 305, 245-248.

164. Schwab, M. (1990) Amplification of the MYCN oncogene and deletion of putative tumour suppressor gene in human neuroblastoma. *Brain Pathol.* 1, 41-46.
165. Nigro, J., Baker, S., Preisinger, a., Jessup, J., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., y Glover, T. (1989) Mutation in the p53 gene occur in diverse tumor types. *Nature*, 342, 705-708.
166. Ohgaki, H., Eibl, R., Wiestler, O., Yasargil, G., Newcomb, E., y Kleihues, P. (1991) p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res.* 51, 6202-6205.
167. Bigner, S., Friedman, H., Vogelstein, B., Oakes, W., y Bigner, D. (1990) Amplification of the c-myc gen in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50, 2347-2350.
168. MacGregor, S., y Ziff, E.(1990) Elevated c-myc expression in childhood medulloblastomas. *Pediatr. Res.* 28, 63-68.
169. Sun, Y., Dong, Z., Nakamura, K., y Coulburn, N. (1993). Dosage-dependent dominance over wild-type p53 of a mutant p53 isolated from naso pharyngeal carcinoma. *FASEB J.* 7, 944-950.
170. Spruck, C., Tsai, Y., Huang, D., Yang, A., Rideout, W., Gonzalez-Zulueta, M., Choi, P., Lo, K., Yu, M., y Jones, P. (1992) Absence of p53 gene mutaions in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Res.* 52, 4787-4790.
171. Sun, Y., Hegamyer, G., Cheng, Y., Hildesheim, A., Chen, J., Chen, I., Cao, Y., Yao, K., y Colburn, N. (1992) An infrequent pont mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6516-6520.
172. Sun, Y., Nakamura, K., Wendel, E., y Colburn, N. (1993) Progression toward tumor cell phenotype is enhanced by overexpression of a mutant p53 tumor-suppressor gene isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2827-2831.
173. Somers, K., Merrick, A., Lopez, M., Incognito, L., Schechter, G., y Casey, G. (1992) Frequent p53 mutation in head and neck cancer. *Cancer Res.* 52,5997-6000.
174. Cory, J., Cory, A., Long, S., Carter, G., y Johnson, CH. (1992) Altered steady-state levels of the messenger RNAs for c-myc and p53 in L1210 cell lines resistant to deoxyadenosine. *Cancer Res.* 52, 2000-2003.
175. Brachman, D., Beckett, M., Graves, D., Haraf, D., Vokes, E., y Weichselbaum, R. (1993) p53 mutations does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines. *Cancer Res.* 53, 3667-3669.

176. Chun, K., Mukhopadhyay, T., Kim, J., Casson, A., Ro, J., Geopfert, H., Hong, W., y Roth, J. (1993) Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res.* 53, 1676-1683.
177. Zur Hausen, H. (1987). Papillomaviruses in human cancer. *Appl. PAtHol.* 5, 19-24.
178. Howley, P.(1991). Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res* 51, 5019s-5022s.
179. Fenaux, P., Jonveaux, P., Quiquandon, I., Preudhomme, C., Lai, J., Vanrumbeke, M., Loucheux-Lefebvre, M., Bauters, F., Berger, R., Kerckaert, J.(1992) Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoblastic acute leukemia: A report on 60 cases. *Leukemia* 6, 42
180. Cheng, J., Haas, M.(1990) Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 10 5502.
181. Ferrell, P., Allan, G., Shanahan, F., Vousden K., Crook, T. (1991) p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J.* 10, 2879.
182. Wada, M., Bartram, C., Nakamura, H., Hachiya, M., Chen, D., Borenstein, J., Miller, C., Ludwing, L., Hansen-Hagge, T., Ludwing, W., Reiter, A., Mizoguchi, H., y Koeffler, P. (1993). Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 82, 3163-3169.
183. Ichikawa, A., Hotta, T., Takagi, N., Tsushita, K., Kinoshita, T., Nagai, H., Murakami, Y., Hayashi, K., Saito, H. (1992) Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* 79, 2701.
184. Andreassen, A., Oyjord, T., Hovig, E., Holm, R., Florenes, V., Nesland, J., Myklebost, O., Hoie, J., Bruland, O., Borresen, A., y Fodstand, O. (1993) p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res.*53, 468-471.
185. Iavarone, A., Matthey, K., Steinkirchner, T., e Israel, M. (1992) Germ-line and somatic p53 gene mutations in multifocal osteogenic sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 4207-4209.
186. Komuro, H., HAYashi, Y., Kawamura, M., HAYashi, K., Kaneko, Y., Kamoshita, S., Hanada, R., Yamamoto, T., Honmgo, T., Yamada, M., y Tsuchida, Y. (1993) Mutations of the p53 gene are involved in ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Res.* 53,5284-5288.

187. Neri, A., Baldini, L., Trecca, D., Cro, L., Poli, E., y Maiolo, A. (1993) P53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood*, 81, 128-135.
188. Baldini, L., Cro, L., Della, D., Chiorboli, O., Neri, A., Maiolo, A. (1991) Analysis of tumor-specific immunoglobulin gene rearrangement in peripheral blood B-cells of multiple myeloma patients. *Am J Hematol*, 37, 1-189.
189. Schouten, H., Sanger, W., Weisenburger, D., Anderson, J., Armitage, J. (1990) Chromosomal abnormalities in untreated patients with non-Hodgkin's lymphoma: Associations with histology, clinical characteristics, and treatment outcome. *Blood* 75, 1841.
190. Ichikawa, A., Hotta, T., Takagi, N., Tsushita, K., Kinoshita, T., Nagai, H., Murakami, Y., Hayashi, K., y Saito, H. (1992) Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood*, 79, 2701-2707.
191. Frebourg, T., Kassel, J., Lam, K., Gryka, M., Barbier, N., Andersen, T., Borresen, A., y Friend, S. (1992) Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 641306417.
192. Markin, D., Li, F., Strong, L., Fraumeni, J., Nelson, C., Kim, D., Kassel, J., Gryka, M., Bischoff, F., Tainsky, M., Friend, S. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233-1238.
193. Frebourg, T., Barbier, N., Kassel, J., Ng, Y., Romero, P. y Friend, S. (1992) A functional screen for germ line p53 mutations based on transcriptional activation. *Cancer Res.* 52, 6976-6978.
194. Marx, J. (1990) Genetic defect identified in rare cancer syndrome. *Science* 250, 1209.
195. Srivastava, S., Zou, Z., Pirolo, K., Blattner, W., y Chang, E. (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348, 747-749.
196. Santibañez-Koref, M., Birch, J., Hartley, A., Jones, P., Craft, A., Eden, T., Crowther, D., Kelsey, A., Harris, N. (1991) p53 germline mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Lancet* 338, 1490-1491.
197. Birch, J., Hartley, A., Blair, V. (1990) Cancer in the families of children with soft tissue sarcoma. *Cancer* 66, 2239-2248.

198. Fearon, E., Pardoll, D., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H., Simons, J., Karasuyana, H., Volgestein, B., y Frost, P. (1990) Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 60, 397-403.

199. Speir, E., Modali, R., Huang, E., Leon, M., Shawl, F., Finkel, T., y Epstein, S. (1994) Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265, 391-394.