

96
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DETECCION DE MUTACIONES DEL GEN p53 EN
TUMORES DE PACIENTES MEXICANOS CON
CANCER DE RECTO



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ABELARDO SOLANO PALACIOS

MEXICO, D. F.,

1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Jurado asignado :

Presidente : Prof. Angelina Quintero Ruiz
Vocal : Prof. Marisol López López
Secretario : Prof. Francisco Hernández Luis
1er. Suplente : Prof. Leda Carolina Torres Maldonado
2do. Suplente : Prof. Ignacio Camacho Arroyo

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biología,
Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



Dra. Angelina QUINTERO RUIZ

SUSTENTANTE



Abelardo SOLANO PALACIOS

Agradezco:

**A Dios,
por haberme hecho conocer este espacio y tiempo; esta Existencia.**

A las Fuerzas que me cuidan y acompañan en el Camino.

**A mi verdadera primera y única Escuela la
Facultad de Química de la UNAM.**

**A todos mis Profesores de la Carrera,
quienes hacen de la Facultad un lugar tan
especial A los Profesores Marisol López y
Francisco Hernández por haber revisado y
corregido este trabajo**

**A mis Compañeros y Amigos del Laboratorio
202, en especial a Julia Segura, quien me hizo
sentir en Casa desde el primer momento**

**A los Doctores Marco Antonio Cerbón e
Ignacio Camacho por todo su apoyo y
colaboración incondicional, ojalá más
Investigadores fueran como ellos**

**A la Maestra Socorro Alpizar, a ella debo
mucho de lo bueno que me ha ocurrido en los
últimos tres años**

**A la Doctora Carmen Giral, ya que no sólo
me dió la oportunidad de enseñar, sino también
el saber que hay que preocuparse por el Bien
de los demás**

**Y con todo respeto, cariño y admiración a mi
Maestra y Amiga, Angelina Quintero, por su
interés y su paciencia (tanto en esperarme para
iniciar la Tesis como para terminarla) Gracias
por su Fortaleza y su Guía**

Dedicatoria:

A mi Familia

A mis (primas) hermanas Claudia, Irma y Larisa, por poner el mal ejemplo, por ser mi Ángel de la Guarda y por compartir conmigo más que buenos momentos, respectivamente.

A C S M., por haberme iniciado en la Ciencia más difícil: el Amor *Ich liebe Dich*.

A Alejandro

Para que encuentre la Luz, la Fuerza Interior. No lo sabes, pero yo sufro cuando tu lo haces ya que eres mi opuesto y complemento

A mi papá, Abelardo

A mi mamá, Maria Eugenia

Porque me han dado Todo a manos llenas.

*I walk the maze of moments
but everywhere I turn to
begins a new beginning
but never finds a finish
I walk to the horizon
and there I find another
it all seems so surprising
and then I find that I know*

...

*To leave the thread of all time
and let it make a dark line
in hopes that I can still find
the way back to the moment
I took the turn and turned to
begin a new beginning
still looking for the answer
I cannot find the finish
it's either this or that way
it's one way or the other
it should be one direction
it could be on reflection
the turn I have just taken
the turn that I was making
I might be just beginning
I might be near the end*

Letra de Roma Ryan
para la canción de Enya *Anywhere is*

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
<i>Capítulo 1, Introducción</i>	2
<i>Capítulo 2, Antecedentes</i>	6
2.1. Generalidades del Cáncer	7
2.2. Bases Moleculares del Cáncer	13
2.3. Supresor Tumoral p53	23
2.4. Cáncer Colorrectal	56
<i>Capítulo 3, Objetivos e Hipótesis</i>	65
<i>Capítulo 4, Metodología Experimental</i>	68
4.1. Obtención de ADN	69
4.2. Amplificación de ADN mediante PCR	75
4.3. Electroforesis en gel de agarosa	80
4.4. Ensayo de SSCP	82
4.5. Fotografía y revelado	86
<i>Capítulo 5, Resultados</i>	87
5.1. Extracción de ADN y determinación de la población a estudiar	88
5.2. Análisis de las muestras por PCR-P ³² /SSCP	95
<i>Capítulo 6, Análisis de Resultados</i>	106
<i>Capítulo 7, Conclusiones</i>	123
<i>Capítulo 8, Bibliografía</i>	125

ABREVIATURAS

A	adenina
a.a.	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
C	citósina
cbp	cuanto baste para
CC	cáncer colorrectal
CpG	dinucleótido citosina-guanina
G	guanina
g	gramo
IHQ	inmunohistoquímica
µg	microgramo
µL	microlitro
mg	miligramo
mL	mililitro
ng	nanogramo
nm	nanómetros
p53	gen supresor de tumores <i>p53</i>
P53	proteína codificada por el gen <i>p53</i>
PAF	poliposis adenomatosa familiar
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rb	gen supresor de tumores retinoblastoma
Rb	proteína codificada por el gen <i>rb</i>
rpm	revoluciones por minuto
RFLP's	análisis de polimorfismos mediante fragmentos de restricción
SSCP	polimorfismos conformacionales de cadena sencilla
T	timina
U	unidades
UV	radiación ultravioleta
W	watts

RESUMEN

El gen *p53* es el más frecuentemente mutado en cánceres humanos. Hasta 50% (en promedio) de los tumores analizados a la fecha lleva consigo una anomalía en este gen, preferentemente en la región más conservada en relación a la escala evolutiva (comprendida entre los exones 5 al 8) y que codifica para la región central de la proteína, cuya función es la de unión al ADN. Esta región modula la actividad de *p53* como regulador del ciclo celular y como parte activa en procesos de apoptosis, señalados a su vez como los principales mecanismos a través de los cuales actúan la quimio y radioterapias aplicadas a pacientes con cáncer para inhibir el crecimiento y proliferación de las células tumorales.

Una muestra de 35 tumores rectales de pacientes mexicanos ha sido analizada para los exones 5, 6, 7 y 8 del gen *p53* mediante la metodología de PCR - SSCP con el fin de determinar la frecuencia y distribución de mutaciones en esta región de vital importancia para las funciones de la proteína. Se encontraron 10 posibles mutaciones para el mismo número de pacientes, además de una posible delección total del gen para una paciente de 18 años con 80% de tumor residual para tras la terapia previa a la resección quirúrgica del tumor. De esta forma, se determinó que aproximadamente la tercera parte de los tumores de recto analizados presentan una anomalía en la región conservada del gen *p53*, lo cual coincide con los estudios de otros grupos de investigación de publicación reciente.

Lo anterior nos llevó a pensar que, dada la muy remota posibilidad de que se presente un índice de mutaciones considerable en otra parte del gen, es posible que se presenten otros mecanismos mediante los cuales las células neoplásicas de los tumores analizados en este y otros estudios, inactiven a la proteína P53 o a los procesos bioquímicos en los que participa, para la detención del ciclo celular, diferenciación y apoptosis. La inactivación puede ser incluso debida a la presencia de oncoproteínas virales semejantes a E6 de papilomavirus humano o HBV-x del virus de la hepatitis B.

RESUMEN

El gen *p53* es el más frecuentemente mutado en cánceres humanos. Hasta 50% (en promedio) de los tumores analizados a la fecha lleva consigo una anomalía en este gen, preferentemente en la región más conservada en relación a la escala evolutiva (comprendida entre los exones 5 al 8) y que codifica para la región central de la proteína, cuya función es la de unión al ADN. Esta región modula la actividad de *p53* como regulador del ciclo celular y como parte activa en procesos de apoptosis, señalados a su vez como los principales mecanismos a través de los cuales actúan la quimio y radioterapias aplicadas a pacientes con cáncer para inhibir el crecimiento y proliferación de las células tumorales.

Una muestra de 35 tumores rectales de pacientes mexicanos ha sido analizada para los exones 5, 6, 7 y 8 del gen *p53* mediante la metodología de PCR - SSCP con el fin de determinar la frecuencia y distribución de mutaciones en esta región de vital importancia para las funciones de la proteína. Se encontraron 10 posibles mutaciones para el mismo número de pacientes, además de una posible delección total del gen para una paciente de 18 años con 80% de tumor residual para tras la terapia previa a la resección quirúrgica del tumor. De esta forma, se determinó que aproximadamente la tercera parte de los tumores de recto analizados presentan una anomalía en la región conservada del gen *p53*, lo cual coincide con los estudios de otros grupos de investigación de publicación reciente.

Lo anterior nos llevó a pensar que, dada la muy remota posibilidad de que se presente un índice de mutaciones considerable en otra parte del gen, es posible que se presenten otros mecanismos mediante los cuales las células neoplásicas de los tumores analizados en este y otros estudios, inactiven a la proteína *P53* o a los procesos bioquímicos en los que participa, para la detención del ciclo celular, diferenciación y apoptosis. La inactivación puede ser incluso debida a la presencia de oncoproteínas virales semejantes a E6 de papilomavirus humano o HBV-x del virus de la hepatitis B.

Capítulo 1
Introducción

CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN

Conocemos por el término "**cáncer**" a una serie de enfermedades humanas que tienen, en común, un crecimiento anormal y descontrolado de las células en el tejido en que se presenta la patología, ya sea estómago, piel, sangre o linfa. La proliferación excesiva de células, resultante de la desregulación del ciclo y la división celular pone en peligro el estado general de salud del paciente y en muchos casos, hasta su propia existencia (1c,2,3).

La historia sobre el conocimiento y estudio del cáncer es tan antigua como la humanidad misma o al menos, de la historia documentada de los primeras grandes civilizaciones como la egipcia y la griega, ya que es una de las enfermedades más comunes del ser humano. Desafortunadamente, parece ser que con el avance de la civilización también aumenta el índice de mortalidad por cáncer, aunque el conocimiento actual sobre las causas, evolución y tratamiento del cáncer es en realidad, notable. Esto es gracias a los enormes avances de la biología molecular en medicina, y no se encuentra demasiado lejos el día en que el cáncer sea completamente prevenible y curable. Ya que el cáncer se presenta también en otras especies animales cercanas en la escala evolutiva al hombre, no podemos más que concluir que este tipo de patología es inherente a los mecanismos como se reproducen nuestras células y se desarrollan nuestros tejidos, y que se encuentra latente, pudiendo surgir si la maquinaria celular llegara a fallar en el control de su propia sobrevivencia (22).

El cáncer es la segunda causa de muerte en México (110). Lo mismo sucede en la mayor parte del mundo, tanto en países industrializados como en países subdesarrollados (109). La existencia de un número creciente de pacientes a los que hay que brindar una atención hospitalaria, y tratamientos costosos, durante meses o años, en un país como el nuestro, hace imperativo el estudio del origen de la enfermedad, así como la búsqueda de técnicas y metodologías que permitan optimizar el manejo de pacientes con cáncer, y así determinar en etapas tempranas de su evolución, el grado de malignidad y la mejor opción terapéutica disponible específica para cada caso.

Uno de los cánceres cuyo número va en rápido aumento en México es el cáncer colorrectal. Se encuentra en cuarto lugar de incidencia después de los tumores de pulmón, cuello del útero y estómago (110). Aunque su frecuencia es alta en personas de edad avanzada, cada vez son más las personas jóvenes que lo padecen.

En la actualidad existe un interés especial en tratar de identificar las causas o agentes etiológicos, tanto ambientales como genéticos, que predisponen a una persona hacia el cáncer para prevenir que se presente la enfermedad. El cáncer no surge de un día para otro, puede tomar incluso años la aparición de un tumor maligno, por lo que es necesario aprovechar esta circunstancia para disminuir el número de casos mediante técnicas de detección temprana tanto convencionales como innovadoras (128). Por ejemplo, el cáncer colorrectal se ha disminuido considerablemente en países industrializados en los que las personas mayores de 50 años, se someten periódicamente a revisión del colon y recto mediante proctosigmoidoscopia como medida preventiva en la detección de tumores (129).

También se trata de cambiar hábitos (tabaquismo), conductas (vida sedentaria) y dietas que, aunque empíricamente, se sabe coadyuvan al desarrollo de neoplasias específicas (como las colorrectales). Normas de seguridad más estrictas así como control médico y análisis clínicos oportunos se aconsejan para personal ocupacionalmente expuesto a carcinógenos conocidos (cloruros de vinilo, hidrocarburos policíclicos, benceno, etc.) (100).

En pacientes que ya presentan una neoplasia, se realizan biopsias para determinar el grado de avance del tumor, y es a este nivel, donde los médicos necesitan determinar el tipo de tratamiento que aplicarán y un pronóstico sobre el curso de la enfermedad. Existen varias técnicas citológicas para ello. Sin embargo, la biología molecular ha contribuido significativamente al responder preguntas concretas como: ¿ Servirá o no la terapia adyuvante?, además de explicar el origen del cáncer, que aunque sea una leucemia o un sarcoma, comparten un origen común: la alteración en genes que regulan el crecimiento y división celular: Oncogenes y Genes Supresores Tumorales (8,9,10)

Uno de los genes que controlan la proliferación y el crecimiento de nuestras células es p53. Su descubrimiento y estudio permitió explicar por vez primera los mecanismos moleculares por los cuales una célula tumoral muere a causa de fármacos o radiación utilizados en el tratamiento del cáncer (29). La anulación de la integridad del gen o de la proteína que codifica, generalmente por la presencia de mutaciones puntuales en los exones 5 a 8 del gen, compromete la efectividad de las terapias a las que se ve sometido el paciente con cáncer. Poco se sabe del estado que guarda el gen p53 en la población mexicana con cáncer, aunque ello haya sido ampliamente caracterizado en otras poblaciones. Se han hecho estudios de inmunohistoquímica (IHQ), que incluso se aplica ya a nivel hospitalario, para verificar que p53 sea normal. Ya que la principal causa de inactivación de la proteína es la mutación puntual en la región conservada del gen, la IHQ es muy útil ya que la proteína mutada posee un tiempo de vida media muy superior a la normal, y se acumula en las células tumorales con anomalías en el gen (82,84).

Si bien existe discrepancia entre los resultados obtenidos por IHQ y por técnicas de biología molecular, mostrando porcentajes diferentes de frecuencia de mutaciones en p53 al analizar un mismo conjunto de muestras (98,132,133), esto no se contrapone al proceso neoplásico. Existen mecanismos oncogénicos, ya descritos y otros aún desconocidos, mediante los cuales se inactiva a la proteína sin dañar al gen. Por lo tanto, algunas preguntas que nos podemos plantear, son ¿Ocurre esto en nuestra población? ¿Cuál es la frecuencia de mutaciones de p53 en pacientes mexicanos con cáncer?. Además de contestar a estos planteamientos, hay que recordar que el estudio a nivel genético y molecular del cáncer no sólo ha permitido esclarecer el proceso evolutivo de esta patología, sino comprender en mucho, los procesos normales mediante los cuales las células y tejidos normales crecen y se dividen. El estudio de la proteína celular P53 y del gen que la codifica, ha representado sin duda alguna no tan sólo un gran avance en la comprensión del desarrollo y tratamiento del cáncer a nivel celular y molecular, sino también procesos normales de diferenciación, apoptosis y reparación del daño al ADN.

Capítulo 2 **Antecedentes**

CAPITULO 2 : ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER.

Sabemos que de cualquier célula sana puede surgir un descendiente anormal por el daño a su material genético, con una capacidad inmensa de reproducirse sin control y formar una *neoplasia*, o **tumor primario**, que vive a expensas del resto del tejido sano que le dio origen y consecuentemente, del organismo en su totalidad y de esta forma, poder debilitarlo hasta su muerte (2). Los tumores son, por lo general, conjuntos de células poco diferenciadas que no llevan a cabo una función fisiológica correcta, y viven a expensas del organismo. Afortunadamente, éste posee sistemas de defensa que por lo general, son capaces de detener y destruir el proceso neoplásico naciente, a menos que una parte de las células tumorales crezca lo suficientemente rápido y pueda almacenar suficientes "herramientas" genéticas, bioquímicas o biológicas, para superar la capacidad de ataque del sistema inmune (3). De hecho, se sabe que a lo largo de nuestra vida es muy probable que aparezca en cualquier parte de nuestro cuerpo una célula con capacidad tumoral, pero también que no se pueda desarrollar gracias a un correcto funcionamiento de la capacidad de control y actividad antitumoral de nuestro organismo.

Una de las herramientas bioquímicas y biológicas fundamentales que necesita un tumor para crecer, es su capacidad de **angiogénesis** o formación de nuevos vasos sanguíneos que lo irrigen para aportarle los nutrientes necesarios para su desarrollo (4). Se han caracterizado varios factores angiogénicos secretados por las células tumorales (FGF,TAF,angiogenina,etc) que tienen en común como mecanismo de acción la atracción de células endoteliales de vasos sanguíneos.

Cuando se presenta una homeostasis inadecuada, un mal funcionamiento del sistema inmune o simplemente la aparición de células tumorales con capacidad de invasión a otros tejidos, la persona padecerá de cáncer (tumores malignos) propiamente dicho y necesitará de tratamientos paliativos y/o adyuvantes para contrarrestar la enfermedad (3). La cirugía para remover los tumores sólidos así como la quimioterapia y la terapia por radiación son las metodologías de elección

para el tratamiento del cáncer. Un área nueva y prometedora es el desarrollo de sustancias antiangiogénicas, ya que supone una alternativa terapéutica menos agresiva para el paciente en relación a las mencionadas anteriormente (5).

Se sabe que todas las células constituyentes de los tumores o neoplasias provienen, por lo general, de un antecesor común único, es decir, de una sola célula transformada (Teoría del Origen Monoclonal) Pero durante el crecimiento y el desarrollo de la masa tumoral pueden surgir varias *subpoblaciones* o *subclonas* de células neoplásicas (Heterogeneidad Clonal)(6) Esto de ninguna forma se contrapone a la teoría de la expansión monoclonal, ya que es precisamente en las células neoplásicas, **dada su alta variabilidad e inestabilidad genética**, en donde pueden presentarse con mayor probabilidad cambios y transformaciones y dar lugar así, a tipos más independientes y agresivos de células tumorales. Estas células pueden incluso invadir y colonizar otros tejidos del organismo Este proceso, conocido como **metástasis**, representa la fase más peligrosa y terrible del desarrollo tumoral, ya que existe la posibilidad de que se formen **tumores secundarios** en prácticamente, cualquier parte del cuerpo (4,7). El proceso metastásico es el que en realidad pone en peligro la vida del paciente

Como pruebas de un origen monoclonal tenemos a diferentes marcadores bioquímicos y citogenéticos que se encuentran en toda la población de células neoplásicas, aún cuando progresen a diversos subtipos morfológicos, ejemplo isoenzima "A" de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en cáncer de mama y del cromosoma Filadelfia (translocación 9 22) en leucemia mielocítica crónica Esto da prueba de la existencia de un origen común que con la evolución y expansión clonal gana en heterogeneidad fenotípica (3,6).

El surgimiento de subpoblaciones en un mismo tumor se debe, en gran medida, a la existencia de diversas condiciones y factores ambientales a las que las células tumorales (*al igual que otras células*) se encuentran expuestas, a factores químicos y condiciones estresantes que pueden agravar el proceso del cáncer (progresión tumoral), añadiendo mutaciones y rearrreglos en el material genético, a las anomalías que le dieron origen. Entre más temprano se presenten estas "nuevas adquisiciones", serán de mayor provecho para la sobrevivencia de la

célula. Algunas características y ejemplos de la heterogeneidad clonal, son (2,3,6):

- Existencia de subtipos morfológicos en el mismo tumor; ejemplo: linfomas en formas celulares mixtas pequeñas y largas.
- Poblaciones de células tumorales tanto bien diferenciadas como pobremente diferenciadas en adenocarcinoma de pulmón.
- Aparición de clonas de un tumor original (melanoma B16), con potencial metastásico diferente en pulmón de ratón.
- Expresión diferencial de inmunogenicidad: En un mismo tumor, existen células capaces de provocar una respuesta inmune diferente. Aquellas que evadan más hábilmente al sistema inmune, tendrán una mayor probabilidad de sobrevivencia.
- Diferente respuesta a la quimioterapia (generalmente mayor resistencia a fármacos), por distintas líneas celulares obtenidas a partir del mismo tumor primario.

Esta última característica de la heterogeneidad clonal o diversidad es muy importante, ya que se deben de desarrollar terapias o regímenes terapéuticos que sean efectivos contra todas o la mayoría de subpoblaciones tumorales, ya que de otra forma, se pueden anular algunas y seleccionar otras con mayor capacidad de invasividad y metástasis. Un ejemplo de quimioterapia combinada efectiva para diversas subpoblaciones tumorales se administra en pacientes con linfoma de Hodgkin (6).

2.1.1. Alteraciones en las células tumorales: daño al ADN y ciclo celular.

¿ Cuáles son los cambios que se presentan en una célula normal para convertirla en una célula tumoral? Se sabe de los procesos tumorales desde la antigüedad, pero es desde principios del siglo XX que se les ha dado una caracterización a nivel celular y molecular para explicar su comportamiento anómalo. La respuesta, aunque sencilla teóricamente, implica también un nivel de complejidad importante en términos prácticos desde investigación básica hasta aplicación a la clínica: **la base del cambio la constituye el daño al ADN, el ácido desoxirribonucleico contenido en el núcleo de toda célula eucariótica y que es la molécula que contiene TODA la información genética de cada individuo (1a).** El daño, que

puede presentarse en un número de formas muy vasto, se traduce en la alteración de genes o incluso, de cromosomas enteros, dando lugar a proteínas disfuncionales y procesos bioquímicos defectuosos, desde vías metabólicas irregulares hasta la pérdida en el control del ciclo celular, no faltando incluir una pérdida de adhesión intercelular (lo cual explica, en cierta forma, el proceso metastásico, por ejemplo) (2,3).

Es sin duda alguna, la pérdida del control en el ciclo celular lo que conlleva a la "explosión" demográfica de las células tumorales y lo que ocupa sin duda alguna, el "papel protagónico" en el desarrollo de cualquier tipo de cáncer. Como sabemos, toda célula procede de una célula preexistente y aquella a su vez dará origen a nuevas células. El ciclo de vida de una célula se encuentra determinado casi completamente, por el tipo de tejido del cual forme parte. De esta manera, las células nerviosas no se reproducirán una vez finalizado el desarrollo embrionario, mientras que células como los hepatocitos del hígado o las células epiteliales de la piel se dividirán unas dos veces o decenas de veces al año, respectivamente (2).

El ciclo celular, conformado por las fases **G1**, **S**, **G2** y **M** (o mitosis), se ve acelerado y multiplicado en forma exagerada en las células tumorales (o al menos, en las fases tempranas del cáncer). Es típico de las células tumorales presentar ciclos celulares cortos por lo que se ve incrementado el número de mitosis, y por lo tanto, de células hijas que surgen de una célula neoplásica "madre" (1c).

Como cualquier otro proceso celular, el ciclo se encuentra regulado por el ADN, en la forma de genes que codifican para proteínas encargadas de iniciar o atrasar la aparición de una fase determinada; ya sea aumentando su número o llevando a cabo una reacción química determinada; en realidad existen varios mecanismos para su acción. El progreso natural del ciclo se verá afectado si cualquier gen involucrado en la síntesis de proteínas reguladoras del ciclo celular, se ve dañado y la transcripción y traducción del ADN dan por resultado una proteína disfuncional o mutada, o bien, si existiera pérdida total del gen y por ende, de la proteína correspondiente y su función reguladora. Es en este campo de estudio donde se ha llevado a cabo una mayor caracterización del cáncer a nivel molecular, y donde

se han descubierto a los **oncogenes** y a los **genes supresores tumorales**, y sus mecanismos de acción mediante los productos proteicos correspondientes, los cuales nos explican el por qué las células cancerosas han perdido la pauta (o ganado el autocontrol) de sus ciclos celulares (8,9,10). *De ambos tipos de genes, de sus proteínas y los mecanismos de acción correspondiente se hablará detalladamente más adelante*

2.1.2 Alteraciones bioquímicas y biológicas en las células tumorales.

Si bien pueden dividirse más rápido que sus contrapartes normales, las células tumorales también adquieren características físicas y bioquímicas diferentes en relación a otras células, siendo su fenotipo reflejo del genotipo anormal que poseen. Esto resulta de singular importancia en la clínica, ya que permiten a los médicos patólogos y oncólogos establecer los fundamentos que permitan el diagnóstico de cáncer, así como el grado de avance de la enfermedad, y establecer un esquema de terapia a seguir por el médico tratante. Es en este apartado donde resulta muy importante el realizar una biopsia adecuada, si se sospecha de un tumor sólido. Algunas anormalidades de las células tumorales, que han podido ser estudiadas gracias al cultivo *in vitro* (2,3), son

- El núcleo se presenta mucho más grande en relación al citoplasma y de morfología distinta al compararlo con las células normales. También se observa hiper cromático con tinciones específicas, y pueden presentarse varios en una célula al observarse bajo el microscopio.
- Una morfología celular diferente a sus contrapartes normales, dependiendo del tejido del cual provengan.
- Estados de aneuploidía o poliploidía al realizar su cariotipo. Algunas veces los cromosomas no se enrollan completamente durante la mitosis.
- Se sabe de marcadores (proteínas) en la membrana celular que al reaccionar con anticuerpos específicos, nos pueden señalar la presencia de células tumorales, directa o indirectamente. Tal es el caso de la alfa-feto proteína, el antígeno carcinoembrionario y el fragmento beta de la gonadotropina coriónica humana, que se expresan en la superficie de células tumorales y pueden liberarse a la sangre.

- Disminución en la organización del citoesqueleto, lo que da por resultado una mayor flexibilidad de las células y mayor capacidad de movilidad con capacidad de metástasis
- Disminución de fibronectina y cadherinas de membrana, las cuales son moléculas de adhesión intercelular y con lo cual, se pierde capacidad de anclaje al tejido original.
- Aumento en la glicosilación de glucoproteínas de membrana (glucocálix) en la parte extraplasmática, generalmente aumentan los residuos de ácido siálico, los que hacen aumentar la carga negativa de superficie celular, disminuyendo la cohesividad entre células.
- Capacidad elevada para llevar a cabo glucólisis anaerobia (una de las primeras características bioquímicas de células tumorales descritas por O. Warburg hacia 1920) , así como un transporte activo mayor del normal para azúcares y aminoácidos. El metabolismo general de las células tumorales es mucho más rápido que el de células normales
- Una característica bioquímica muy interesante recientemente descrita, y que puede tener una repercusión importante en la clínica, es la actividad anormal en células tumorales de la enzima *Telomerasa* (11), que no es expresada en células normales salvo en tejido embrionario y gonadal. En células somáticas de adulto normales para cada ciclo de división se presenta la pérdida de una parte en la región distal (Telómero), de los cromosomas, de tal forma que al cumplir determinado número de divisiones, las células *no podrán* dividirse de nuevo o sencillamente mueren. En células tumorales, la telomerasa se encarga de reponer (resintetizar) la región de ADN cromosómico perdido durante la división, y en consecuencia, cualquier célula que exprese la proteína constitutivamente, será potencialmente inmortal, ya que su división no tendrá límite.

Como puede observarse de lo antes descrito, es muy claro que las células tumorales pierden gran parte de las capacidades de unión y de especialización en las funciones características de un tejido determinado. El que "reviertan" a un estado embrionario no especializado o ambiguo en su identidad (*anaplasia*), es símbolo de su independencia en relación al organismo, ya que no forman parte estricta del tejido u órgano del cual se originaron, sólo se alimentan de él (7).

2.2. BASES MOLECULARES DEL CÁNCER.

2.2.1. Oncogenes y Genes Supresores de Tumores.

Aunque cualquier región del ADN puede ser dañada por carcinógenos y casi cualquier gen puede ser blanco de inactivación o desregulación, son los genes involucrados en el control y regulación del ciclo celular, los que una vez dañados e inactivados o al contrario, sobreexpresados (amplificados), son capaces de generar un proceso neoplásico al estimular tanto el crecimiento (aumento en masa) como la proliferación (aumento en número) de las células tumorales (12).

Después de muchos años de estudio, se sabe ahora que para que el ciclo celular tenga lugar, se necesitan dos tipos de actividad la primera, estimuladora, está condicionada por genes que codifican para proteínas que activan la progresión de una fase a otra; por ejemplo, de G1 a S o de G2 a M. La mayoría de los genes que intervienen a este nivel, participan en un nivel u otro de las *cascadas de activación* producidas por *factores de crecimiento* a los que una célula eucariótica se encuentra sujeta para su crecimiento y multiplicación, como parte de un tejido altamente organizado y diferenciado (2) La mayoría de los **oncogenes** conocidos, son genes que participan en las vías estimuladoras del crecimiento (2,8,13,Tabla 2 1).

El segundo tipo de actividad reguladora, concierne a la *inhibición* en la progresión del ciclo celular, una actividad muy importante, ya que es precisamente es ésta, la que previene en la mayoría de tejidos y órganos la presencia de anomalías genéticas en las células, lo que los llevaría a un crecimiento desorganizado y masivo. Totalmente desconocidos hasta hace unos pocos años, son los genes **supresores de tumores** los encargados de "vigilar" el comportamiento y la integridad del ADN y permitir, o no, la continuidad del ciclo celular en puntos críticos como el final de la fase G1, antes de la replicación del ADN, y los intrincados procesos eucarióticos de división celular, mitosis y meiosis (8,9,10).

Mucho se ha hablado de una analogía entre los oncogenes y los genes supresores tumorales, como los *aceleradores* y *frenos* del ciclo celular, respectivamente, por lo que si una célula es capaz de "activar" los oncogenes y

"desactivar" los supresores, ya sea por cambios estructurales o químicos (mutaciones) en el ADN que codifica para ellos; es muy probable que esta célula tenga una elevada capacidad para formar un tumor (14). Si bien la activación de 2 o más protooncogenes a oncogenes provoca un cambio en el fenotipo de la célula para hacerla neoplásica (*colaboración* entre los oncogenes para la transformación[2]), es necesario que para conseguir un mayor grado de malignidad (hasta provocar el cáncer propiamente dicho), se produzca la inactivación de un supresor (8,14.).

De esta forma, se requiere que, para inactivar a un gen supresor de tumores, se dañen **ambas copias (alelos)** por mutación y/o se pierdan por delección, y así anularlo funcionalmente, mientras que para activar un protooncogén a oncogén, sólo se necesita la activación de una copia o alelo, para producir una lesión **dominante oncogénica** en el fenotipo, de tipo transformante para hacer de una célula normal, una célula neoplásica o tumoral (9,10, FIGURA 2.1)

2.2.2 Funciones de Protooncogenes.

Los oncogenes y sus productos proteicos fueron las primeras moléculas con actividad biológica en explicar, funcionalmente, la aparición y progresión del cáncer a nivel subcelular. De hecho, no se descubrieron a partir de células, sino de virus que al infectar ciertas células, insertaban en el genoma de éstas, genes que tenían capacidad de transformación dominante (1c,2,13). El punto de partida para la explicación del cáncer en términos moleculares, surgió del descubrimiento en 1970, de los virus con transcriptasa reversa. Se demostró que el virus involucrado en la aparición del sarcoma de Rous, con ARN en su cápside, podía generar, mediante ese tipo de enzima, ADN que se insertaba en el genoma de su hospedero. La inserción de este ADN viral provocaba el surgimiento del tipo neoplásico en la célula al activar la expresión del gen *src*, cuyo producto proteico es una tirosina cinasa de clara actividad oncogénica dominante (1c,2,13)

De esta manera, fueron identificados y caracterizados otros oncogenes, como *myc* y *abl*. Muy pronto se determinó que los oncogenes de origen viral tenían contrapartes celulares, es decir, los oncogenes se presentan naturalmente en las células de los animales superiores y llevan a cabo funciones normales dentro de

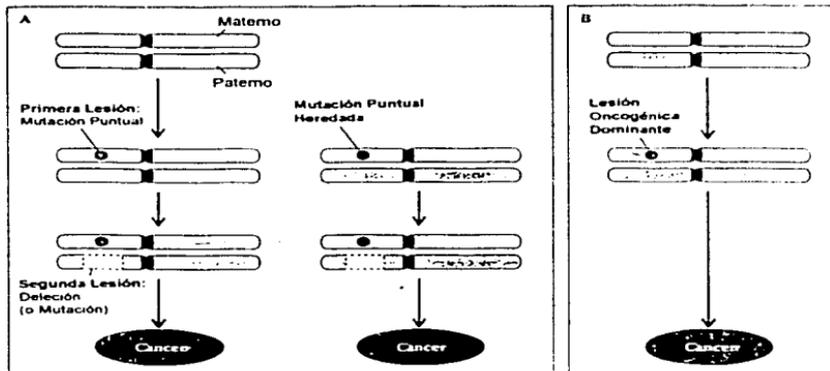


FIGURA 2.1. A) En la inactivación de los genes Supresores de Tumores generalmente se presenta la mutación de un alelo y la defeción del otro. Existen familias en las que la mutación de un alelo se transmite hereditariamente. B) La activación de un protooncogén sólo requiere de la mutación en una sola copia del gen (mutación oncogénica dominante). Tomado y adaptado de D.P. CARBONE (10).

la maquinaria celular, especialmente, en la transmisión de señales activadas por factores de crecimiento, desde la recepción en membrana plasmática, hasta su ejecución por el núcleo en la forma de ARNm. De esta forma, se acuñó el término *protooncogén* para designar a los genes celulares normales, y *oncogén* se utiliza para referirse solamente al protooncogén activado, que siendo diferente del alelo normal, codifica para una proteína disfuncional con una actividad anómala que predispone hacia un fenotipo celular tumoral (2).

También se ha establecido que los oncogenes que contienen los virus (*v-onc*), fueron tomados originalmente, de células hospederas y esto refuerza la teoría de que ciertamente, codifican proteínas reguladoras de gran importancia en el

avance del ciclo de vida de la célula y al ser incorporadas por los virus, éstos las utilizan para promover la replicación del ADN y división celular de su hospedero, asegurando así, la aparición y continuación de su progenie (14).

Como ya se dijo antes, la mayoría de los genes y proteínas clasificados como "oncogénicos", forman parte de las vías de activación de señales por factores de crecimiento y diferenciación, aunque ya se conocen oncogenes y oncoproteínas cuyo mecanismo de acción involucra el interaccionar directamente con supresores tumorales e inactivarlos o bien, que inhiben el proceso de *apoptosis* (muerte celular programada) inherente a las células normales pero que las células tumorales han podido evitar (14, 22) La clasificación funcional de oncogenes se presenta en la tabla 2.1.

TABLA 2.1. Funciones de Protooncogenes.
Tomado y modificado de J.DARNELL et al (2)

I. Oncogenes Involucrados en Activación de Señales

1. Factores de Crecimiento o Receptores de Factores de Crecimiento	<i>sis (PDGF)</i> <i>erbB</i> <i>neu (erbB2)</i>
2. Transductores de señales 2a. Proteínas con actividad de tirosina,serina o treonina cinasas 2b. Proteínas con actividad de GTPasas	<i>src, abl, met, ros, mos, raf</i> <i>H-ras, N-ras, c-K-ras</i>
3. Factores de Transcripción nuclear	<i>myc, fos, jun, myb ski, rel</i>

II. Oncogenes con otras funciones.

1. Inactivadores de Supresores Tumorales (<i>rb, p53</i>)	<i>mdm2, e6, e7, e1A, e1B, sv40</i>
2. Antiapoptóticos	<i>bcl-2, bcl-xL</i>

2.2.3. Activación de Protooncogenes.

Existen varios mecanismos para la activación de oncogenes (e inactivación de los supresores tumorales), pero fundamentalmente, podemos agruparlos en dos grupos (1b,13,16):

a) alteración de tipo estructural: cambio en la secuencia por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, producidas generalmente por carcinógenos químicos y radiaciones. **b)** activación por alteración de la regulación en la expresión de los genes (translocaciones, amplificaciones).

Los mecanismos que dan origen a una anomalía genética que puede activar protooncogenes (o desactivar genes supresores de tumores) y originar un proceso neoplásico, se describen brevemente a continuación.

a1) Activación por mutaciones puntuales, deleciones e inserciones carcinogénesis química. El cambio en una secuencia de nucleótidos determinada se conoce como "mutación". Las mutaciones se han presentado en la escala evolutiva de forma universal, ya que conllevan con ello al mejoramiento y diversificación de la variabilidad biológica (1b). Sin embargo, en procesos patológicos como el cáncer, el que se presente cierto grado de mutabilidad representa una amenaza mayor para el hospedero, ya que por lo general, al aumentar la carga de mutaciones en una célula tumoral, ésta gana en grado de malignidad y resistencia a los tratamientos terapéuticos.

Se sabe que existen muchos compuestos y especies químicas que son capaces de interactuar y reaccionar con el ADN, muy especialmente, con las bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina y Timina) de los nucleótidos. Estos compuestos provienen de origen tanto natural como sintético, y son por mucho, los sintetizados por el hombre los que poseen un mayor potencial mutagénico. El mecanismo o modo de acción de estas sustancias generalmente implica una reacción redox, ya que muchas de ellas son especies de tipo electrófilo (oxidantes fuertes) y reaccionan con las bases púricas y pirimidicas del ADN (1b,15). Se sabe que la hebra sencilla de ADN es mucho más sensible al ataque electrofílico, por lo que en los procesos de transcripción y replicación del ADN existe un mayor

riesgo de adquirir mutaciones que cuando se encuentra enrollado como cromatina, unido a las histonas.

Las especies químicas carcinógenas pueden actuar directa o indirectamente con el ADN. La forma de acción indirecta, implica la **activación metabólica** del compuesto (2). Son agentes carcinogénicos directos el etilmetano-sulfonato (EMS), el dimetil-sulfóxido (DMS), etc. Agentes indirectos son los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzo(a)pireno y el dibenz (a) antraceno, así como el cloruro de vinilo, las nitrosaminas y la aflatoxina B1.

Podemos, también de otra forma, clasificar a los agentes carcinógenos mediante su mecanismo de acción (1b,2):

- Agentes alquilantes : gas mostaza, etilmetano - sulfonato, etc
- Análogos de Bases (antimetabolitos) 5-bromouracilo, 2-aminopurina
- Acridinas: Proflavinas (Se intercalan entre las bases)
- Agentes desaminantes: ácido nitroso
- Otros: hidroxilamina.

Sea cual fuere su origen o modo de acción, los carcinógenos químicos reaccionan con las bases nitrogenadas o las sustituyen, y provocan un cambio estructural en el ADN. Esto provoca por lo general, que se produzca un **apareamiento incorrecto** entre las bases de la cadena en que se originó la mutación, y las bases en la cadena complementaria. De esta forma, al **replicarse** la hebra con la base defectuosa o el análogo de base incorrecto, se pueden producir **transiciones** (cambio de una base pirimidica por otra pirimidica o en su defecto, de una púrica por otra púrica) o **transversiones** (cambio de una base pirimidica por una púrica o viceversa)(1b). Como ejemplo de transición tenemos el cambio de Citosina por Timina por la presencia de 5-bromouracilo y como ejemplo de transversión, el cambio de Guanina a Timina debido a la aflatoxina.

El que se presenten deleciones o inserciones en la secuencia de nucleótidos también es posible debido a agentes químicos que se intercalan entre las bases y provocan una replicación defectuosa en la hebra complementaria, anomalía que se hereda en replicaciones subsecuentes, a células hijas.

a2) Mutaciones inducidas por radiación: Las bases nitrogenadas son capaces de interaccionar con las radiaciones y sufrir transformación química. Se sabe que son especialmente propensas a reaccionar con la luz UV y con la radiación ionizante proveniente de isótopos radiactivos.

Ya que naturalmente se presenta este tipo de radiaciones, los seres vivos han desarrollado múltiples mecanismos de reparación y defensa que eliminan las bases "defectuosas" y corrigen las mutaciones antes de que se lleve a cabo la replicación de la hebra original. Defectos en tales sistemas de reparación provocan condiciones patológicas severas en los humanos, como la *ataxia telangiectasia* y el *xeroderma pigmentoso*, al no poder contrarrestar los efectos nocivos de los rayos X y la radiación UV, respectivamente (2, 67,68)

b) Alteración en la regulación: Muchos protooncogenes no requieren activarse a oncogenes mediante mutaciones, sino que es la sobreexpresión de la proteína normal, la que exagera cierta función de tal forma, que representa un paso hacia la transformación debido a la aparición de un fenotipo anormal.

La **amplificación** o aumento del número de copias de cierto gen por célula, es un mecanismo por el cual, se eleva en forma exorbitante la cantidad del producto proteico correspondiente, por ejemplo, de c-Myc. Ya que esta proteína actúa como factor de transcripción en el núcleo, se activa la progresión del ciclo celular y las células se multiplican descontroladamente. La amplificación de un oncogén como *myc* o *ras* es de mal pronóstico y se presenta frecuentemente en carcinoma pulmonar, cáncer de mama o cáncer colorrectal. La presencia de un gen amplificado puede ratificarse citogenéticamente al observar los cromosomas en metafase, de una célula tumoral cientos o miles de copias se agrupan en las llamadas "*Regiones de Tinción Homogénea*" en cromosomas anormalmente largos, o bien, como "*dobles puntos*", ADN que no forma parte de los cromosomas pero que se puede observar al encontrarse asociado a histonas (1b,2,16)

La **translocación** de genes de un cromosoma a otro, es muy importante en la aparición de neoplasias malignas. El que cierta región de un cromosoma se escinda de su cromosoma original, y se una a otra región del genoma, es un proceso que no sólo está limitado al cáncer, sino que también se presenta en

otras patologías (1b,2). En el caso del cáncer, una translocación por lo general ocasiona que los protooncogenes pierdan su región reguladora original, y se crean genes "híbridos" en los cuales, debido a la naturaleza de la nueva región reguladora, el protooncogén queda sujeto a una expresión constante sin haber tenido lugar una amplificación. Un ejemplo clásico de traslocación lo constituye el "traspaso" de la región distal del brazo largo del cromosoma 9, que contiene al gen *abl*, al cromosoma 22, formando el *cromosoma Filadelfia*, característico de las células de la mayoría de leucemias mieloides crónicas estudiadas. Así, la proteína Abl, con función de tirosina cinasa se produce continuamente sin restricción. Otro ejemplo importante de translocación se da en el Linfoma de Burkitt, en el que el gen *c-myc*, en la banda q34 del cromosoma 8, pierde su región reguladora original al pasar del cromosoma 8 a una región del cromosoma 14, donde se encuentran los genes que codifican para anticuerpos, por lo que su expresión se vuelve constitutiva. De esta forma, la proteína de *c-myc* se encontrará sujeta a una producción continua en células inmaduras de la línea de linfocitos B (1b,2,13)

2.2.3. Genes Supresores Tumorales.

La historia del descubrimiento de los genes supresores tumorales, se inicia durante el estudio de enfermedades neoplásicas con alto grado de frecuencia en una misma familia, es decir, hereditarias. El caso más importante es el del Retinoblastoma (aparición de tumores en la retina). A. G. Knudson propuso en 1971, mediante estudios citogenéticos, que se requería del daño *heredado* a una de las copias del cromosoma 13 para *predisponer* a una persona a este tipo de tumor, mientras que si se dañaba la *otra copia*, el individuo, invariablemente, se vería afectado por el retinoblastoma (9). La hipótesis de Knudson, conocida como de "Dos Eventos" para la aparición del cáncer, pasó desapercibida por 15 años hasta que en 1986, gracias al avance en las técnicas de biología molecular, se descubrió que la región que sufre el daño en el cromosoma 13, es la correspondiente al gen *rb* (9,17). La proteína RB producida, es una de las piezas centrales en la progresión de la fase G1 a la fase S: En la fase G1 temprana, se encuentra hipofosforilada, y se une muy eficazmente con las proteínas EF2 que son factores de transcripción. Al final de G1, RB es fosforilada por proteínasas dependientes de ciclinas, lo cual hace que cambie de conformación, libere a EF2 y se produzca la transcripción de genes y un aumento en la actividad

metabólica concerniente a la replicación del ADN (12, 17). Parece que RB también regula la actividad de transcripción de las ARN polimerasas I y III, que transcriben ARN ribosomal y de transferencia, respectivamente (12).

Niños con ambas copias del gen *rb* defectuosas, presentarán tumores en ambas retinas antes de los seis años, mientras que los individuos con un alelo dañado, por lo general requieren de cierta carga o daño ambiental para inactivar al otro alelo. Estas personas presentan el tumor hacia los 30 años y por lo general, sólo en uno de los ojos. Una duda interesante es por qué sólo se presentan tumores en la retina y no en otro tejido del organismo. La descripción y definición para el gen *rb* como un *supresor tumoral*, se aplica para otros genes que como se ha comprobado, predisponen a la transformación celular por el daño a las dos copias, en donde se habla de una *pérdida de la Heterocigosidad* (18). Existen muchos genes candidatos para ello, pero algunos de los supresores identificados hasta ahora, son.

apc.- Tomó las siglas del tipo de cáncer colorrectal en el que se identificó su anulamiento (Adenomatous Polyposis Coli, o Poliposis Adenomatosa Familiar, FAP). Codifica para una proteína citoplasmática presuntamente relacionada con la adherencia intercelular (21, 112)

dcc.- También descubierto en cáncer colorrectal, se le denominó así por "Deleted in Colon Cancer". La proteína que produce es de membrana, de tipo de adhesión celular. Su pérdida significa el poder causar metástasis, por las células tumorales (20)

dpc4.- Recientemente descubierto, se le ha relacionado con la aparición del cáncer de páncreas (18) y presenta cierta homología con *dcc*, ya que la proteína correspondiente también es de adhesión celular

mts1.- Codifica para una proteína de 16 KD (p16), que regula negativamente a cinasas dependientes de ciclinas que fosforilan a pRb, por lo que guarda también relación con *p53* en cuanto a vías inhibitorias de la función de E2F (17).

wf1.- Identificado en el tumor de riñón de tipo Wilkins, en el que es común la pérdida de la región 11p13. La familia de proteínas correspondiente tienen función de factores de transcripción de localización nuclear. *wf1* es un gen de expresión temprana en el desarrollo embrionario (21)

brca (1 y 2).- Han sido identificados en la aparición de cáncer de seno, en familias con alto riesgo de padecer esta neoplasia (8,19).

nf (1 y 2).- Al parecer, las proteínas que producen inhiben a su vez la función de las proteínas de los genes *ras*. Son proteínas de citoesqueleto. Su inactivación está involucrada en cánceres del sistema nervioso: se sabe que la neurofibromatosis tipos 1 y 2 se presenta en 1 de cada 3500 individuos (21).

No existe una generalidad sobre la función de los genes supresores de tumores, pero se sabe que generalmente están involucrados en procesos de adhesión celular, de reparación de ADN o de vigilancia en la progresión del ciclo (19,20,21). Por ello actualmente se propone una clasificación de los genes supresores de tumores en dos tipos principales: los genes que se encargan del cuidado de otros genes (*caretakers*) y los genes que regulan el ciclo celular (*gatekeepers*) (19,34).

2.3. SUPRESOR TUMORAL *p53*.

Las células tumorales, cualquiera que sea su localización en el organismo, poseen una característica común: el dividirse anormalmente, dando lugar a la proliferación de células casi siempre poco diferenciadas, en relación al tejido que les dió origen. Si bien la activación de ciertos oncogenes propicia la aparición de un fenotipo celular transformado, es necesario que las células neoplásicas esquiven las respuestas corporales en su contra, y también las que se encuentran integradas a su genoma como una especie de mecanismo autodestructor que salvaguarde la integridad y funcionalidad del tejido en particular y del organismo en general (14, 22). La inactivación de genes supresores tumorales y sus productos proteicos, permiten a las células transformadas desarrollar un fenotipo más agresivo, y en consecuencia, causar invasión a otros tejidos mediante metástasis (4,5,8) Por otro lado, células anormales formadas durante la embriogénesis y la maduración mueren por un proceso llamado *apoptosis* (muerte celular programada) Este proceso es propiciado por la misma célula en colaboración con ciertos componentes del tejido, por lo que representa una herramienta de último recurso en pro del bienestar del organismo como conjunto (22,23)

La inactivación del gen supresor tumoral *p53* no tan sólo permite a la neoplasia acabar con la regulación del ciclo celular, y multiplicarse más rápido, sino también escapar al proceso apoptótico que debe de seguir como lo que es, una aberración a los patrones celulares normales (14,22,23) No es sorprendente entonces, que *p53* sea el gen más mutado o delecionado en tumores humanos: El 50% (en promedio) de todas las neoplasias analizadas hasta la fecha poseen en sus células, al menos un alelo del gen *p53* mutado (24,25), mucho más de lo que se sabe para mutaciones en protooncogenes (la mutación en *ras*, por ejemplo, se presenta con la mitad de frecuencia en comparación con *p53* para cáncer de pulmón [21,91]) u otros supresores tumorales. Si a esto aunamos los descubrimientos sobre proteínas virales y celulares de carácter oncogénico que se unen a la proteína P53 y la inactivan, y las vías bioquímicas u otros procesos (ver más adelante) en los que directa, o indirectamente se halla involucrado *p53*, entonces es muy probable que la mayoría de los cánceres humanos registren, en cierto nivel de su evolución, la alteración del gen o la proteína P53, o de los

mecanismos celulares en los que participa *p53* es, la "llave maestra" que activa mecanismos clave que detienen el ciclo celular y/o inducen la apoptosis (36)

La presencia de un gen *p53* en mamíferos cercanos al hombre o el respectivo análogo en especies inferiores como insectos, es un hecho que denota por sí mismo la función central (universal) de *p53* y su aparición ancestral como uno de los reguladores clave del ciclo celular, y la correcta progresión de éste (36, 80) A su vez, la inmensa bibliografía sobre investigación y estudio de *p53* adquiere otra dimensión al tomar en cuenta el breve período en que se ha construido el conocimiento sobre este supresor tumoral y recalca la singular importancia de esta proteína, designada como "Molécula del Año 1993" por la Revista Science (26) y de las funciones que lleva a cabo. Este trabajo sólo permite la revisión de los conceptos más importantes y algunas de las áreas más interesantes descritas para *p53*.

2.3.1. Generalidades de *p53*.

p53 se descubrió al final de la década de los 70's (31), gracias a que la proteína se une al antígeno "T-largo" del Virus de Simio 40 (un virus que transforma células en cultivo), y se pensó que la "oncoproteína" de 53 000 daltones de peso que precipitaba junto con SV40-TL, era codificada por un "protooncogén" que al activarse, producía el fenotipo transformado. Por 10 años, se impuso a *p53* la etiqueta de oncogén, hasta que gracias al avance de las técnicas de biología molecular (y al impulso que dió el análisis molecular del gen *rb* a la teoría de Knudson sobre el daño a las dos copias de un determinado gen para producir cáncer), se determinó que un locus de *p53* frecuentemente se deletiona y la otra copia se encuentra casi siempre mutada, en cáncer colorrectal (27,28), lo cual puede extrapolarse a un buen número de neoplasias malignas estudiadas (29,31). Esto consolidó el concepto de supresor tumoral y colocó a *p53* como un gen de importancia vital en la aparición y progresión del cáncer (30,31).

En el hombre, el gen, denominado simplemente *p53* (ó TP53 [21]), se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, en la banda 17p13.1. Posee una extensión de 20 kilobases, en la que se localizan 11 exones y 10 intrones. Los exones 2 al 11 codifican para la proteína, por lo que la región promotora de transcripción se

circunscribe al primer exón e intrón (la gran longitud de éste último hace pensar que juega un papel importante en la regulación) (21,32). Se sabe también de regiones estimuladoras de la transcripción arriba en la secuencia del gen (31).

El ARNm, de unas 2.5 kilobases, posee una vida media mayor a las 12 horas. Se le ha encontrado expresado en casi todos los tejidos estudiados, que generalmente presentan niveles bajos, pero en una mayor proporción, en tejido embrionario y en células con daño a ADN (21). El ARNm humano codifica para una proteína de 393 aminoácidos, la cual posee señal de localización nuclear mediante fosforilación específica en su extremo carboxilo terminal. Su tiempo de vida media se ha calculado en menos de 20 minutos (21). Por otra parte, la proteína mutada se acumula extensamente en núcleo o citoplasma de células transformadas, ya que su vida media es de 4 hasta 20 horas, por lo que sobrepasa, por mucho, el tiempo de vida media de la proteína normal (96,98).

2.3.2. Proteína P53: relación estructura-actividad de los dominios funcionales.

La proteína P53 humana presenta un 76% de homología comparada con la proteína murina. El grado de homología varía con otras especies, pero es muy importante señalar que a éste contribuyen 5 regiones con una secuencia de aminoácidos altamente conservada que se presentan a lo largo de la escala evolutiva (rata, pollo, trucha, *xenopus*, etc.[31,80]). Como es de esperarse, estas secuencias cumplen funciones vitales en la estructura terciaria de la proteína (33,36,80): Los residuos 13-19, 117-142, 171-181, 236-258 y 270-286, constituyen las regiones I,II,III,IV y V, respectivamente, localizadas a lo largo de los 3 dominios funcionales conocidos de P53: el extremo amino terminal (de transactivación de la transcripción), el central (unión a ADN), y el carboxilo terminal (de oligomerización) El esquema correspondiente se muestra en la Figura 2.2.

Los dominios central y carboxilo-terminal de la proteína son resistentes a la mayoría de proteasas celulares (21,31,33), por lo que se cree que la inactivación del extremo amino participa en algún nivel de la regulación de la actividad de P53.

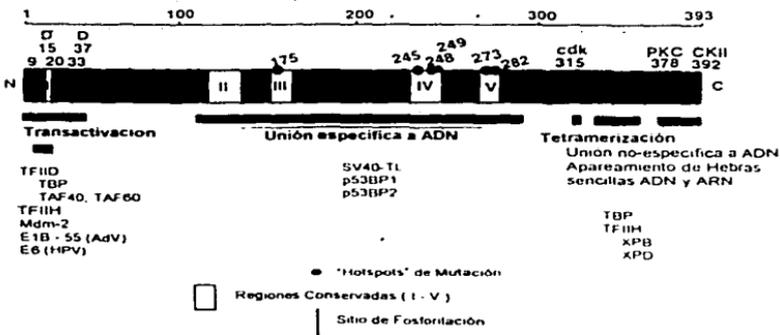


FIGURA 2.2.- Esquematación de la proteína P53. Se ilustran los tres dominios funcionales (bandas gruesas) y las proteínas celulares y virales que se unen a ellos, así como las 5 regiones altamente conservadas en la escala evolutiva y los sitios más frecuentes de mutación. Tomado y adaptado de L. KO y C. PRIVES (36)

Dominio de Transactivación de la Transcripción (amino terminal).- Comprende los aminoácidos 1 a 42, es altamente hidrofóbico y de carácter ácido. Se ha demostrado su capacidad de interaccionar directamente con la maquinaria celular de transcripción basal (con proteínas tales como las de unión a la secuencia TATA [TBP's] y otros factores de activación de la transcripción [TAF's]), a través de los residuos 19, 22 y 23, específicamente (29,33,34). A esta región también se une la proteína MDM2, regulador negativo de P53. La función de activador de la transcripción se encuentra íntimamente ligada con la unión del dominio central a secuencias específicas de ADN (35). Estudios recientes han demostrado la presencia de aminoácidos blancos de cinasas en este dominio que tal vez, se piensa, regulen la transactivación de otros genes efectuada por P53 (29).

Se ha demostrado que los genes *p21(waf/cip1)*, *mdm2*, *gadd45*, *bax*, *ciclina-G* o *igf-bp3* son regulados positivamente por P53 (sus actividades se discutirán más adelante), y se reconoce que existen otros genes candidatos a transcripción mediada por P53(31,36). También se buscan nuevos genes blanco de activación de transcripción por P53, por ejemplo, mediante análisis por computadora de las secuencias de ADN humano en varios bancos genómicos (37). Después de localizar los posibles candidatos, se realizan los protocolos experimentales adecuados para determinar si P53 en realidad controla la expresión de ciertos genes. Entre los candidatos se encuentran diversos oncogenes, proteasas y proteína-cinasas (29,31,37).

Dominio de Unión a ADN (región central o "core").- Los residuos 120 a 290 se encuentran implicados en la unión directa de la proteína al ADN y el reconocimiento de secuencias específicas de nucleótidos (en genes cuya transcripción es promovida por la región NH2 terminal): los elementos de respuesta a P53, están dados por la construcción

5'-PuPuPu C (A/T) (T/A) G - PiPiPi-3'

(Pu = purina, Pi = pirimidina) repetida 2 veces con un espacio de entre 0 y 13 bases entre ambas secuencias (21,33,34,37).

La región central en su estructura terciaria presenta dos láminas beta-plegadas que sirven de soporte para los 3 motivos de unión al ADN: una estructura de giro(u horquilla)-lámina-hélice(LSH) que interacciona con el surco mayor de ADN, y dos horquillas mayores, denominadas L2 y L3, que a su vez interaccionan con el surco menor del ADN. La conformación tridimensional de las horquillas L2 y L3, y la región LSH, se encuentra estabilizada por la presencia de un átomo de Zn (2+) tetrahédricamente coordinado (33,38). La conformación tridimensional del core o región central se determinó por cristalografía, en 1994 (38). La unión al ADN implica la formación de puentes de hidrógeno entre residuos específicos de las estructuras LSH, L2 y L3 con la cadena de fosfatos del ADN así como con ciertas bases nitrogenadas en el surco mayor (33,34). La representación de la interacción de la región central de P53 con el ADN se muestra en la figura 2.3.

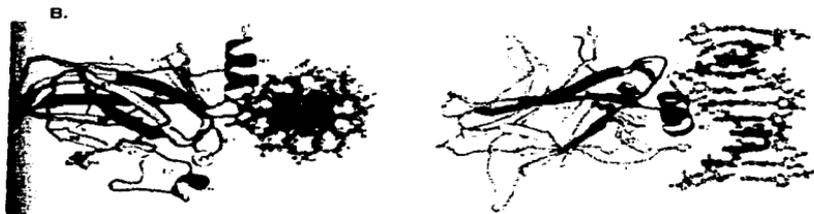


FIGURA 2.3 - Interacción del monomero de P53 (region central) con el ADN. A) Conformación tridimensional en la que se señalan los aminoácidos más frecuentemente mutados. B) Unión P53-ADN. Se indican las estructuras secundarias I,2, I,3 y I,SH1 presentes en P53. Izquierda: Vista desde un plano transversal a la doble hélice. Derecha: Vista lateral paralela al ADN. Tomado de CHO et al (38)

El por qué se presentan para P53 regiones de aminoácidos tan conservadas en la escala evolutiva, se descifra al examinar el dominio central de la proteína: las regiones II y V conforman el motivo LSH, mientras que las regiones III y IV, son, respectivamente, las horquillas L2 y L3. De aquí que la homología entre especies se encuentre comprometida con la región central que al establecer la unión al ADN, permite a P53 desarrollar la mayoría de sus funciones conocidas (34,36). De hecho, la región central puede unirse al ADN, sin presentar el extremo amino, el carboxilo, o incluso, carecer de ambos. No existen proteínas conocidas con secuencias similares a la región central de P53 (33,78).

Los residuos de los codones 175(arginina) en L2, 245(glicina), 248(arginina) y 249(arginina) en L3, 273(arginina) y 282(arginina) en LSH, son muy importantes en la unión al ADN y es de hacer notar que también son los más comúnmente mutados en cánceres humanos (24,30,31). Por lo tanto, al mutar tan sólo uno de ellos, se pierde parte de la capacidad de unión al ADN de p53 y por consecuencia, la funcionalidad de los dominios amino y carboxilo (36,38). También son importantes en la unión al ADN los cuatro aminoácidos que mantienen el enlace coordinado con el átomo de zinc, y que son los residuos 176(cisteína) y 179(histidina) en la horquilla L2, así como los residuos de cisteína en las posiciones 238 y 242 de la horquilla L3 (33,34).

Extremo carboxilo terminal .- Los residuos aminoácidos 300 a 393 engloban no tan sólo un dominio funcional, sino dos al menos por lo que indican estudios recientes sobre la regulación funcional de P53 (36,39), ya que a lo largo de toda esta región existen residuos de serina y treonina que pueden fosforilarse y regular las actividades de la proteína.

Los residuos 300-320 forman una región flexible que une el dominio de unión a ADN con el de oligomerización, establecido entre los aminoácidos 320 a 360. Como es sabido, P53 forma tetrámeros en el núcleo, por lo que su actividad en las células casi siempre está mediada por esta conformación cuaternaria, que se describe a continuación.

La región entre los residuos 325 y 335 forma una hoja beta, y la comprendida entre 337 y 355, una alfa-hélice. Dos monómeros de p53 forman un dímero mediante la interacción de estas hojas beta y hélices alfa, en forma antiparalela. El dímero puede de esta forma asociarse a otro dímero del mismo modo, gracias a la superficie hidrofóbica de cada par de hélices, y de esta manera formar el tetrámero (29,33,34). Se cree que este oligómero reconoce de manera más rápida y aumenta la especificidad de unión a ADN, en relación a los monómeros, si bien éstos también poseen plena capacidad de transactivador de la transcripción, y unión a ADN (40). La esquematización de la interacción del tetrámero de P53 con el ADN mediante la región central, se ilustra en la figura 2.4.

La conformación tridimensional del extremo carboxilo terminal en su región de oligomerización fué definido gracias a la resonancia magnética nuclear y a estudios de cristalografía por rayos X (33)

Otro dominio funcional perfectamente definido, se ha establecido en los últimos treinta aminoácidos de la proteína, es en esta región altamente básica donde se han localizado varios residuos propensos a la fosforilación (como S378 o S392) por diversas proteína-quinasas. Esta fosforilación se ha relacionado con el paso de una forma de P53 "inactiva", hacia una P53 "activa" en cuanto a la capacidad de unión a ADN y transactivación de la transcripción (29,39, sección 2.3.3)

Una función sabida con anterioridad sobre los residuos 360-393, es la de unión a hebras sencillas de ADN o ARN, y promover el apareamiento entre hebras complementarias. La unión a los ácidos nucleicos por esta región, no parece ser secuencia-específica, como en el caso del dominio central (29,33).

2.3.3. Regulación de la actividad de P53.

Regulación positiva.

P53 se encuentra normalmente en muy pequeñas cantidades en las células normales, pero cuando existe daño al ADN, una disminución en la poza de nucleótidos (o alteración en su biosíntesis 34,41), condiciones de estrés (hipoxia, calor) o algún otro tipo de daño o insulto a la célula, se provoca que la proteína se establezca, se alargue su tiempo de vida media y se eleve considerablemente su

A.



B.



FIGURA 2.4 Interacción del tetramero de P53 con el ADN
El tetramero se forma por asociación de dímeros
A) Vista paralela al ADN B) Vista transversal desde la doble
hélice, en la que se aprecia la interacción de la hélice-alfa del
extremo carboxilo, entre los monómeros. Tomado de CHO et al (38).

actividad (29,31,38). Existe evidencia de que también se estimula su traducción y por consiguiente, se aumenta en forma efectiva el número de copias de la proteína (34,39).

Datos interesantes sugieren que P53 puede encontrarse latente en el citoplasma, y que tras alguna señal, se introduce en el núcleo para desarrollar sus funciones (29,39). O bien, la proteína "latente", que se encuentra ya en el núcleo y que carece de actividad intrínseca, debe activarse para poder ejecutar su función (39,42). Se especula que la actividad se presenta en base a un cambio conformacional de la proteína en un tipo de regulación alostérica y que esto se puede producir, de varias formas:

- a) Mediante fosforilación en sus dominios carboxilo y amino terminales (29,39)
- b) Reconociendo daño al ADN en la forma de roturas de hebra sencilla o doble, o deleciones/inserciones de nucleótidos, mediante el extremo carboxilo terminal (29,43). Es muy probable que el daño al ADN, sea verdaderamente detectado por esta región, ya que su interacción con ADN es independiente de la secuencia de nucleótidos
- c) Se ha descrito que la unión de ciertos anticuerpos o péptidos artificiales (44,45), y la unión de hebras cortas, sencillas de ADN (46), en la región de los aminoácidos 360-393, activan a P53
- d) Por regulación tipo redox mediante factores específicos. Se encontró que la proteína Ref-1, cuyo número se eleva, por ejemplo, en condiciones de hipoxia, convierte a P53 que se encuentra en la forma latente a su forma activa (42), al contrarrestar el efecto de especies oxidantes ya que P53 en estado reducido es más hábil para unirse al ADN. También se demostró que Ref-1 activa poderosamente a P53 independientemente del estado redox de la célula, por lo que participaría a la vez como un activador alostérico, en otras condiciones de daño a la célula.
- e) Por interacción con proteínas de sistemas de reparación de ADN, como la proteína ATM (disfuncional en la enfermedad conocida como Ataxia-Telangiectasia). Existe suficiente evidencia para ligar la actividad de ATM, con la activación de P53 (34, 47). Esta señalización proteína-proteína, poco caracterizada para P53, podría explicar algunos mecanismos en los que interviene.

Datos interesantes en cuanto a la regulación de P53, es que se pensaba que existía un proceso de corte o procesado alternativo (o "*splicing*") para el ARNm humano como el que sucede con el ARNm de p53 en ratones y en el que los últimos 26 aminoácidos de la proteína silvestre son cambiados por una secuencia de 17 aminoácidos diferente (21,29,48). Esta proteína alterna mantiene todas sus propiedades y funciones normales, salvo por la actividad de apareamiento (o "*annealing*") de hebras sencillas de ADN o ARN que se ve perdida. Ya que los niveles de la proteína "alterna" y la normal varían durante el ciclo celular de la célula murina, se pensó que lo mismo sucedía en otras especies. Gracias a un estudio detallado por Will y colaboradores (48), se sabe que esto probablemente no ocurre, ya que se examinaron diversos tejidos de rata y de humano, y no se encontró ningún ARNm con "*splicing*" alterno al normal. Así que parece ser que la regulación de P53 depende en gran parte de los procesos antes mencionados como fosforilación y reconocimiento del daño al ADN, en las células humanas.

Un modelo lógico de activación de P53 en daño al ADN, propuesto por Moshe Oren del Instituto Weizmann consiste en lo siguiente (29). El extremo carboxilo se mantiene en contacto con el ADN, mientras p53 se desplaza a lo largo del mismo. Si se llegara a detectar alguna anomalía en el ADN (como dímeros de timina o rompimiento de la doble hebra), P53 recluta a la maquinaria de reparación hasta el sitio, y mediante fosforilación del extremo carboxilo, se cambia la conformación de toda la proteína para promover la transcripción de genes blanco que mediarán el alto en el ciclo, hasta que el daño se haya corregido.

Regulación negativa.

La regulación negativa de P53, involucra su degradación por medio de las proteasas del sistema de ubiquitinación (49). Éste sistema lo emplea activamente el presunto agente etiológico del cáncer cérvico-uterino, el papilomavirus humano (71), para anular parte de la función de P53, mediante la producción de la oncoproteína E6 que se une a P53 y la presenta activamente a tal sistema de degradación (49,131). La confirmación de estas observaciones proviene del hecho de que al inactivar la vía de ubiquitinación y proteólisis, P53 se acumula en las células, así como P21, uno de sus productos de transactivación (50).

Pero la regulación negativa más directa, la provoca el mismo P53 al activar un circuito de autorregulación. P53 promueve la transcripción del gen *mdm2*, cuyo producto proteico se une al dominio amino terminal de transactivación y de esta forma, al expresarse en cantidades similares a P53, impide el bloqueo de G1 que establece el supresor tumoral, y promueve la continuación del ciclo celular hacia la fase S (29,34,36). Se sabe también de *mdmx*, un gen que comparte homología con *mdm2* pero que no se expresa durante el daño al ADN, ni es activado transcripcionalmente por P53, así que debe de controlar a P53 en otras condiciones de bloqueo al ciclo que impone este supresor tumoral (39). *mdm2* se encuentra amplificado y por ende, sobreexpresado, en ciertos tipos de tumores (sarcomas, sobre todo) por lo que se le imputa a este fenómeno la inactivación de la función de P53 y la aparición del fenotipo transformado maligno en células de tales neoplasias (30,51).

2.3.4. Funciones de *p53*.

Una de las razones del impacto de *p53* en el campo de investigación del cáncer, fue que explicó por vez primera, a un nivel molecular, el mecanismo de acción de la quimioterapia y la radioterapia, (52a,b) y el por qué en ciertos pacientes resultan estos tratamientos paliativos y en otros no (53). La resistencia a la terapia adyuvante en cáncer, se ha demostrado estar ligada a la inactivación funcional de *p53* (39,50). A *p53* se le imputan, hasta el momento, dos procesos que son indispensables para controlar una población de células, tanto normales como cancerosas: la detención del ciclo celular en los puntos de restricción G1-S y G2-M, y la apoptosis que se lleva a cabo en células con un daño irreparable de su ADN (31,34,36,39).

2.3.4.1. Daño al ADN = Detención del ciclo en G1

En el desarrollo temprano de la historia de *p53* se supo que eventos como el daño a ADN por radiación, sustancias químicas o especies reactivas de oxígeno, elevaban los niveles de P53 (31) y la mayoría de las células se detenían en la fase G1 al medir los marcadores correspondientes en el ciclo celular. Es lógico pensar que células con daño en su ADN, deban repararlo antes de replicarlo, y esto efectivamente es lo que sucede. ¿Cómo logra P53 detener generalmente el

ciclo en el punto de restricción G1-S? La respuesta es simple: P53 activa, mediante su unión al ADN, la transcripción de genes que son los efectores físicos del alto en el ciclo, siendo P53 una especie de director de varios procesos que se presentan simultáneamente:

A) El principal efector del alto en G1 mediado por P53, es el gen *wal/cip1*, que codifica para una proteína de 21 kd (54,55) P21 se une, e inactiva de esta forma, a cinasas dependientes de ciclinas entre cuyas funciones se encuentra la fosforilación de la proteína RB (56), y proteínas homólogas de RB: P107 y P130 (12,17). Como sabemos, RB hiperfosforilado libera a E2F, factor de transcripción nuclear de varios genes involucrados en la transición de G1 a S.

P21 no tan sólo se une a las ciclinas y complejos ciclina-cinasa como ciclina D-CDK4, ciclina E-CDK2 o ciclina A-CDK2. También se une al antígeno nuclear de la célula en proliferación (PCNA), que es necesario en la replicación del ADN (29,34), lo que tal vez también induzca la detención del ciclo en G1.

Aunque la principal vía de activación de P21 es su transcripción mediada por P53, es necesario señalar que también se ha descrito al menos otra vía alterna de expresión de la proteína P21, independiente de P53 (57). También se ha comprobado que P53 es capaz de inducir el alto en G1/S sin necesidad de activar a P21 en ciertos tipos celulares (56), por lo que otras funciones aparte de su actividad como transactivador estarían involucradas en este proceso.

B) *gadd45* (gen activado en daño al ADN) es otro gen que es activado por P53 para parar el ciclo en G1 (36,39). La proteína GADD45 también se une a PCNA evitando así la replicación de ADN. Se sabe que PCNA interacciona a su vez con la maquinaria de reparación de ADN, específicamente con las proteínas involucradas en la reparación por excisión de nucleótidos (NER). De esta forma es probable que al interactuar GADD45 con PCNA, suceda efectivamente la reparación de ADN durante el alto en el ciclo (29).

2.3.4.2. Falla en la División Celular: detención del ciclo en el punto de restricción G2/M.

Un hallazgo sumamente interesante resultó el descubrir otro punto de bloqueo en G2/M efectuado por p53 en los experimentos realizados por Cross y colaboradores (58). Fibroblastos de ratones a los que se pone en contacto con agentes inhibidores de la formación del huso cromático, como colcemida o nocodazol, permanecen en G2, abortan la mitosis y se trasladan hasta G1/G0 tras el fallido intento de división celular. Por otro lado, los fibroblastos *p53* *-/-* tratados de igual manera, sencillamente ignoran el hecho de falta de huso, entran nuevamente a las fases G1 y S, y de esta forma, se convierten en células aneuploides o poliploides con un elevadísimo grado de inestabilidad genética y mayor grado de malignidad.

La descripción del mismo tipo de comportamiento en fibroblastos humanos (59) fue muy importante, ya que la condición de nulidad para *p53* o *rb* (mediante su inactivación con proteínas E6 y E7 de HPV, respectivamente) predispone a la aparición de células aneuploides espontáneamente tras varias generaciones, lo cual se exacerba al someter a las células a colcemida y nocodazol. En fibroblastos normales la expresión de *p53* se eleva para resguardar el estado diploide. Si bien el mecanismo puede y debe involucrar la transcripción de genes por parte de P53, es cierto que *p21^{waf}* no se encuentra entre ellos (58,59).

De esta forma, se establece sin lugar a dudas un punto de restricción al menos tras la mitosis fallida, promovido por *p53*, pero sólo si se previene la amenaza de apoptosis. Un estudio reciente (60), sostiene que la expresión de *p53* se lleva a cabo en la pseudo-fase G1 a la que entran las células, después de que se detectó la falta de huso, y se activaron sistemas de alarma, aún desconocidos, que inhiben la apoptosis para salvar a estas células, ya que por ejemplo, se requiere la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL.

Otro aspecto interesante de la relación entre *p53* y el citoesqueleto, lo constituye el que en células carentes de *p53*, aparecen espontáneamente varios centrosomas antes de la mitosis y con ello células aneuploides (61). Esto confirma nuevamente el papel de "guardián del genoma" de *p53*, al regular de alguna

forma, el montaje de un huso correcto en el que se distribuyan equitativamente los cromosomas a las células hijas.

2.3.4.3. p53 y Apoptosis.

Entre las funciones descritas para p53 se encuentra la de provocar apoptosis. Esto dependerá del *tipo de células* así como de las *condiciones* en que se lleven a cabo los experimentos del estudio en cuestión (22,39,62). Los mecanismos por los que p53 induce apoptosis en una célula, son objetos de un intenso estudio ya que no son del todo claros; de hecho, ésta actividad de p53 es la más controvertida y discutida entre los investigadores.

Cuando se tratan *in vitro* con fármacos o radiación cultivos de células de tal forma que se infringe un daño masivo al material genético, lo que se trata es de imitar a condiciones ambientales *in vivo* que ponen en peligro la integridad del genoma y de los procesos celulares basales. La mejor opción para proteger al resto del organismo entonces, es llevar a la célula a apoptosis, ya que un daño genético de tal magnitud, puede provocar la aparición de estados patológicos como es el caso del cáncer (8,22,23). Al evitar el proceso de apoptosis las células neoplásicas formadas aseguran su sobrevivencia y como consecuencia, se desarrollará un tumor.

El proceso de la apoptosis se puede observar físicamente, por la formación de una escalera de ADN al hacerse migrar por electroforesis en un gel de agarosa o acrilamida, lo cual indicará su ruptura por nucleasas específicas en una forma definida, contrario al barrido de ADN que puede observarse en células necróticas (22). También se sabe que en la célula apoptótica se registra una marcada actividad proteolítica y que se forman sáculos (cuerpos apoptóticos) que son degradados específicamente por macrófagos del sistema inmune (23). De esta forma, la célula muere en una forma ordenada, en la que se encuentran involucradas señales bioquímicas específicas generadas por determinados genes (8). P53 es uno de ellos, y se sabe que puede provocar apoptosis de varias maneras, utilizando diferentes vías de señales. Tres de ellas se comentan a continuación.

1) **Expresión elevada de la proteína P53.**

Niveles muy altos de la proteína P53 activa, en relación al estado basal de la célula, se han asociado a la muerte por apoptosis (29,39,50). En un estudio determinante, efectuado por Chen y colaboradores (63), se indujo la expresión cuantitativa de P53 en células carentes del gen, mediante regulación negativa por tetraciclina. Se pudo comprobar que la cantidad de P53 es directamente proporcional al número de células en cultivo que mueren, e inversamente proporcional al porcentaje de la población viable

2) **Genes activados por P53.**

La activación de la transcripción por P53 es necesaria para producir apoptosis en algunos tipos celulares, como lo señalan acertadamente algunos estudios (36,55,63). Dos genes que son expresados via P53, y que son involucrados en el contexto de apoptosis, son *bax* e *igf-bp3*

* *igf-bp3*, codifica para una proteína que es inhibidor del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF). IGF, de franco carácter mitogénico, estimula de forma general la progresión del ciclo celular. Al anularse su actividad, se podría anular toda señal de sobrevivencia (29,36)

* *bax*, cuya proteína es apoptótica, y análogo estructural del producto de *bcl-2*, un gen antiapoptótico (64). Existen a su vez varios genes relacionados con los: *bad* y *bak* (apoptóticas) y *bcl-x*, *bcl-w* de carácter protector contra apoptosis (22,65). Esta familia de proteínas parece constituir la vía principal de decisión entre vida o muerte en una célula, y la información sobre el tema es amplísima. Si bien el mecanismo detallado aguarda a ser resuelto, estas proteínas en su estructura tridimensional se parecen proteínas integrantes de canales iónicos. Por lo tanto, tal vez mediarían las señales químicas, mediante flujos iónicos, de la degradación del ADN, destrucción de mitocondrias y otros organelos, y formación de sacos apoptóticos (66).

Se ha establecido que la proteína Bax forma heterodímeros con Bcl-2, pero si se elevan sus niveles, lo cual parece ser que se efectúa por mediación de P53, desplaza a Bcl-2 para formar homodímeros que propician la apoptosis. Por el contrario, una proteína Bcl-2 sobreexpresada forma los homodímeros respectivos que protegen a la célula. De esta forma, se establece un

verdadero equilibrio entre el tipo de dímeros formados, ya sea Bcl-2:Bcl-2, Bax:Bcl-2 o Bax:Bax, el que conducirá a una respuesta definitiva sobre si la célula debe morir o permanecer con vida (22,65).

Datos recientes sobre actividad de transactivación de P53 y apoptosis le han involucrado con los genes *ice* y *apofas*, cuyas proteínas (proteasas) se sabe promueven la muerte celular (22,29,34). También existe información sobre la activación de una familia de genes, denominada "*pig*" que proviene de genes inducidos por P53, cuyas proteínas serían encargadas de producir grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno, lo cual conduciría a un daño masivo *in extenso* a la célula, y provocaría su muerte. Estos estudios aún se encuentran en proceso. Hay que recordar que la caracterización de genes transactivados por P53 aún sigue en progreso (37).

3) Interacción Proteína P53 - Proteínas de reconocimiento al daño y reparación de ADN.

Un hecho que ha despertado el interés de varios grupos de investigación, lo constituye el que mutantes de P53 sin la región amino-terminal, se encuentran incapacitados para inducir la muerte celular (29,34,36). Sorprendentemente, no es el dominio de transactivación (aminoácidos 1 a 42) el principal en determinar esto, sino una región entre los aminoácidos 61 y 94, de carácter básico y rica en prolínas. La ausencia de tales aminoácidos con el resto de la proteína intacta, señala el descubrimiento de un nuevo dominio funcional en P53. ¿Cuál es la función que supuestamente realiza para inducir apoptosis y muy probablemente también, detención del ciclo celular? Parece ser que la interacción con otras proteínas, tales como

- * **Atm**, que pertenece a un sistema de reparación de ADN en daño producido por radiación ionizante, y que está alterada en la enfermedad genética conocida como Ataxia Telangiectasia (34,47).

- * **ERCC2** y **ERCC3**, productos de los genes *xp-d* y *xp-b*, y que forman parte del complejo del factor de transcripción basal TFHII (67,68). Estas proteínas son helicasas que curiosamente, también están involucradas en sistemas de reparación de ADN. De hecho, los genes fueron denominados con las iniciales de la enfermedad hereditaria en la que se encuentran alterados: el Xeroderma

Pigmentoso, la cual se caracteriza por la aparición de cáncer de piel con un mínimo de exposición a la luz UV (1b y c).

- * **Csb**, otra helicasa también implicada en reparación (defectuosa en el Síndrome de Cockayne) y la cual se une a P53 en la región rica en prolinas (68).

- * **c-Ab1**, que tiene acción de tirosina-cinasa, y cuya expresión normal detiene el ciclo celular, y cuyo análogo viral, el oncogén *v-ab1*, carece de la región correspondiente de unión a P53 en los aminoácidos G1-94 (34)

De esta forma, parece ser que se ha descubierto una verdadera conexión física entre los sistemas de reparación de ADN y la respuesta de detención del ciclo o apoptosis, mediada por p53

2.3.5.- P53 decide: ¿Alto en el Ciclo o Muerte?

Si bien se han identificado algunas vías específicas que determinan la respuesta diferencial a p53, como la expresión de P21 en la detención del ciclo en G1, o la apoptosis por expresión de *bax*, es muy cierto que no es suficientemente claro cuando se evoca a una respuesta u otra, aparte de las situaciones en donde el daño al ADN es tan grave que la célula no tiene otra opción que resolver por apoptosis. Varios autores están de acuerdo en que la decisión **depende** del *tipo de células* en estudio, y de que pueden existir distintos programas de transactivación de transcripción de genes o interacción con otras proteínas, que colaboran a su vez con otros mecanismos bioquímicos y así favorecer a una de las dos opciones (29,34,56)

Para tratar de resolver el dilema sobre que vía es la elegida, la batalla se ha librado en el campo de estudio de los dominios funcionales, y se han llevado a cabo varios estudios en los que se ha probado la actividad de diversas proteínas "quiméricas" o mutantes de P53 (55,56,62). Esto ha dejado en claro, por ejemplo, que se requiere de una **proteína íntegra** para dar el máximo de respuesta apoptótica, o de transcripción de otros genes, lo que establece un hecho clave a considerar: se requiere invariablemente *de la unión a ADN por el dominio central*, o al menos, de la interacción de éste con otros elementos nucleares, para que se

lleve a cabo *cualquier* función de P53. Ya se han descrito proteínas que se unen a la región central en su conformación nativa, más no a una P53 mutada (69).

C. Prives y colaboradores proponen que puede ser una interacción entre los dominios amino y carboxilo (mediada por otros factores o proteínas), en una P53 unida al ADN, lo que determina la vía de apoptosis, en una conformación de la proteína, diferente de la que reconoce el daño al ADN (29) o de la que se presenta en la transactivación (33), y que señalaría el inicio de apoptosis inducida por P53 (62).

Tomando en cuenta los datos más convincentes publicados sobre la interacción de P53 con otros elementos de las vías de respuesta, se puede establecer que :

- a) La expresión de P21 (*waf/cip1*) es completamente ajena a la apoptosis (células *p21-/-* pueden morir efectivamente por apoptosis inducida por P53 [55]) y no siempre se requiere a P21 para establecer el alto en el ciclo en el punto de restricción G1/S (56) Esta y otras observaciones han demostrado que tanto la inducción de apoptosis como la transactivación de genes por P53 son funciones completamente independientes de su habilidad para inhibir el crecimiento (detención del ciclo en G1/S)
- b) Proteínas mutantes con delección del extremo carboxilo (aminoácidos 1 a 314), son incapaces de llevar a cabo apoptosis (55), por lo que seguramente es necesaria la formación del tetrámero para producir este evento
- c) La alteración o bloqueo de la respuesta de los elementos río abajo en la cascada de eventos de la detención del ciclo celular por P53 que es mediada por P21, induce invariablemente apoptosis. Por ello es que si se anula al gen o a la proteína Rb, o si se sobreexpresa el factor de transcripción E2F (lo cual es equivalente a inactivar a Rb) serán alteraciones que serán detectadas por p53 y le indicarán que se ha perdido el control en la detención del ciclo celular, produciéndose así la apoptosis (56,70)
- d) Hansen y colaboradores (56,70) han demostrado que la apoptosis es el mecanismo responsable, y no la detención en G1/S, para suprimir la transformación de células provocada por oncoproteínas tales como E1A y Ras

En relación a lo anterior, durante mucho tiempo se ha sabido que las células (*p53 +/+*) que expresan la proteína E1A de adenovirus, que se une e inactiva la función

de Rb, mueren por apoptosis con el tratamiento adecuado (irradiación, por ejemplo) sin que se manifieste el alto en G1. Lo mismo sucede si está presente la proteína E7 de papilomavirus humano (HPV) (29,36,55,70). Lo anterior puede explicar el por qué, los adenovirus así como papilomavirus, expresan proteínas que inactivan tanto a Rb, como a P53. Al inactivar a Rb solamente, la célula podría sufrir apoptosis porque P53 reconoce una falla en el sistema de bloqueo al ciclo celular en G1/S. Al eliminar la función de P53 con E1B y E6, adenovirus y papilomavirus aseguran su existencia y la propagación de su genoma. En el caso de los papilomavirus esto va más allá, ya que no tan sólo aseguran su sobrevivencia, sino que son capaces de alterar la proliferación y crecimiento de sus células hospederas de tal manera que originan y estimulan el desarrollo de tumores anogénitales (71). Un diagrama con las principales vías en las que participa p53 se presenta en la figura No 2 5

2.3.6. p53 es multifuncional.

Represión transcripcional.

P53 es un factor de transcripción para algunos genes que contienen elementos de respuesta definidos, pero curiosamente, puede reprimir la transcripción de otros que no los poseen (31,36). Esta situación, aunque poco difundida y estudiada hasta hoy, podría explicar algunas contradicciones encontradas en las funciones normales de p53, y definir definitivamente su papel en apoptosis (29). Es posible que para inducir apoptosis, se verifique conjuntamente la activación de ciertos genes y la represión de otros (56). La represión por parte de P53 es factible en genes como *c-fos*, *c-jun*, *hsp70* y *bcl-2*, por lo que representa una buena señal de supresión de señales o estímulos mitogénicos, lo cual concuerda perfectamente con el papel de p53 como supresor tumoral. También se sabe que aparte de carecer del elemento de respuesta a P53, los genes reprimidos contienen en su promotor el elemento TATA (29,72), por lo que p53 bien podría efectuar la represión al impedir a las TBP's y TAF's (proteínas de unión a TATA) unirse al promotor y activar la transcripción del gen.

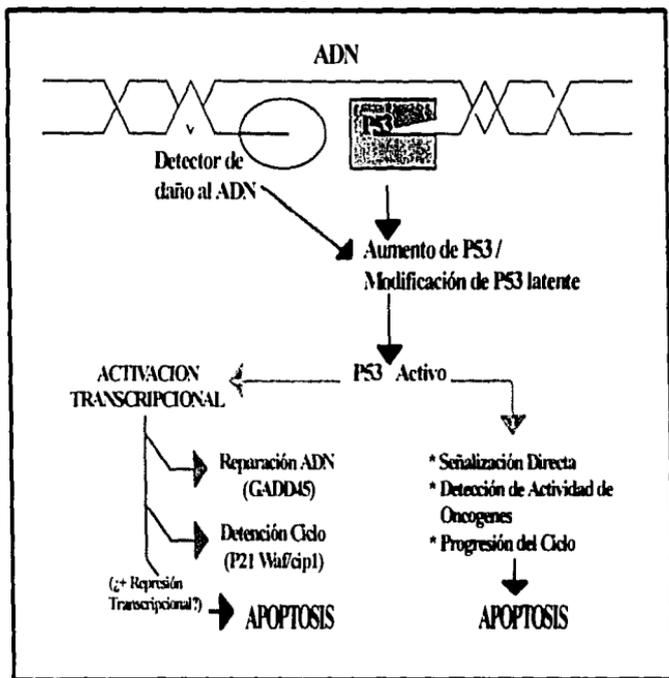


FIGURA 2.5. Mecanismos celulares en los que se encuentra involucrado el Supresor Tumoral P53. Tomado y modificado de ALEVINE (34)

p53 en Desarrollo, Diferenciación y Recombinación.

p53 puede eliminarse de las células germinales y aún así, éstas formar el cigoto y llevar a cabo un desarrollo embrionario normal e incluso, hacer que nazca un producto normal (al menos en ratones [31,73]). Este experimento determinó que p53 **no era indispensable** para procesos de crecimiento o diferenciación *en sus fases tempranas*, más el 100% de ratones nulizigotos para p53, son propensos a desarrollar tumores a las pocas semanas o meses de edad (29,73) y morir a consecuencia de cáncer, principalmente linfomas. Esto comprueba que p53 es **necesario** para un correcto desenvolvimiento de las células en el organismo como conjunto. Es importante señalar que la presencia de P53 disminuye con la edad de las células y con el grado de diferenciación alcanzado (77), y de hecho, no existe inducción de P53 en tejido cerebral, músculo esquelético o tejido hepático por daño a ADN (39).

Aún así, se han realizado experimentos con células de origen hematopoyético, especialmente líneas linfoides pre-B, obtenidas a partir de leucemias y linfomas, que no contienen p53. Cuando se les transfecta el gen, las células comienzan a sintetizar marcadores de células B (cadenas de inmunoglobulinas mu y kappa[36]) o hemoglobina, si las células son de origen eritroide (74). Esto pudiera estar relacionado con la necesidad de recombinación de hebras de ADN en células de la sangre durante su maduración y diferenciación. En relación a lo anterior, se ha descrito que p53 es necesario durante la espermatogénesis, ya que en los testículos de ratones *p53^{-/-}* se forman células gigantes poliploides que bien pueden resultar de una recombinación sin los controles adecuados, mediados por p53 (29,34).

p53 en Angiogénesis y Metástasis.

Uno de los genes candidatos a ser regulado transcripcionalmente por P53, es el de la trombospondina, uno de los inhibidores angiogénicos más potentes conocidos, por lo que p53 bien puede ser un regulador de la angiogénesis en el desarrollo de los tejidos (75,34). Se sabe que las células en cultivo, aunque sean tumorales, requieren de una superficie de contacto o adherencia para poder desarrollarse. Pero Nikiforov y colaboradores (76) han demostrado que la anulación directa de p53, o la sobreexpresión de *bcl-2*, y muy especialmente, la

presencia de una P53 mutada dominante oncogénica, permite a fibroblastos murinos (recién obtenidos) desarrollarse en suspensión, en medios semiliquidos de metil-celulosa, completamente bien. También determinaron la habilidad para causar metástasis de células tumorales con P53 normal y de células tumorales con P53 mutada por inyección vía intravenosa de tales células en ratones atímicos. La mayoría de las neoplasias inducidas correspondieron al fenotipo P53 mutado, por lo que este hecho apoya la idea de que mutar a *p53*, confiere mayor potencial invasivo a la célula tumoral. El estudio antes descrito puede ayudar a explicar por qué no todas las células tumorales que se liberan a la circulación son capaces de sobrevivir al ataque del sistema inmune o a un proceso de apoptosis al encontrarse en un medio extraño (7,8): se demostró que las células neoplásicas que pueden ocasionar metástasis distante, han sobrevivido a su estancia en el torrente sanguíneo por haber inactivado la función de *p53*.

2.3.7. Mutaciones en *p53*.

Si bien la inactivación de *p53* puede darse por la pérdida total del gen, la presencia de oncoproteínas virales o celulares, u otros mecanismos, se ha encontrado que la mayoría de los tumores tanto humanos como inducidos en modelos experimentales, registran la inactivación de la proteína, por mutación en un locus, acompañada generalmente por la delección del alelo restante (24,31,78). Desde el inicio de la caracterización biológica de *p53*, uno de los rasgos más distintivos fue la presencia de mutaciones en la región central de la proteína (77).

Se calcula que de un 80 al 90 % de las mutaciones de tipo puntual encontradas en tumores humanos, se presentan en los exones 5 al 8, que codifican para las regiones conservadas de la proteína (II, III, IV y V), las cuales son fundamentales para la participación de *p53* en la detención del ciclo celular y apoptosis (21,25,79). También pueden ocurrir mutaciones puntuales en los exones 4, 9 y 10, pero el porcentaje que aportan al total se calcula en menos del 10% (78,81). Además pueden presentarse mutaciones en la región que codifica para el extremo amino, pero son raras y éstas casi siempre son mutaciones sin sentido que detienen los procesos de transcripción y de traducción, produciendo proteínas truncadas, sin actividad alguna (78).

Las mutaciones en las regiones intrónicas son escasas, pero en realidad no se ha secuenciado un número de muestras tal, que permita decir que este tipo de anomalías sea el que inactiva a la proteína en cierto número de tumores humanos (25,79). Fuera de la región comprendida entre los exones 5 al 8, parece haber mayor probabilidad de encontrar deleciones o inserciones que cambien el marco de lectura del ADN (81). No hay que dejar de señalar que el patrón de mutaciones es diferente para cada tipo de cáncer (31), si bien existen similitudes a nivel general. Por las evidencias hasta ahora encontradas, todo parece apuntar al hecho de que, al menos en tumores sólidos, el cambio de una sola base en la secuencia de nucleótidos que codifica para la región central de unión a ADN, es el requisito suficiente para anular la función normal de *p53* (80).

El cambio de un aminoácido en la región central de la proteína, producto de una mutación puntual en el gen, cumple un doble propósito: anular la función de supresor tumoral, y hacer de *P53*, una especie *dominante* oncogénica. Una pérdida total de la proteína, **no es** tan útil a la célula tumoral como el poseer una *P53* estructuralmente distinta (29,36,78), ya que las mutaciones son capaces de conferirle propiedades transformantes. Se sabe que en realidad surge una oncoproteína *P53* por varias observaciones experimentales, tales como

- a) Las proteínas mutantes no pueden unirse al ADN o lo hacen débilmente, pero sí pueden unirse por su región de oligomerización a la proteína silvestre e impedir su actividad de supresor tumoral (29), actuando como verdaderas oncoproteínas. A las *P53* mutadas capaces de inactivar la proteína normal, se les conoce como "dominantes oncogénicas". Por ejemplo, suprimen la capacidad de transactivación de la transcripción de la proteína nativa (36).
- b) La presencia de una proteína *P53* mutada en la célula, la hace capaz de saltar los bloqueos al ciclo celular en G1 y en G2 y promover la entrada a la fase de mitosis (39).
- c) *P53* mutada puede tener funciones aún desconocidas, que podrían explicar la sobrevivencia de células tumorales. En líneas celulares se presentan el doble de mutaciones de *p53*, en comparación con lo encontrado en tumores humanos (25,78). ¿Es la mutación de *p53* un requisito de inmortalización? El tiempo de vida media de células en cultivo es mayor en aquellas con una proteína *P53* mutada,

que ha sido introducida artificialmente a líneas celulares con P53wt o incluso, en líneas que carecen del gen p53 (29,34)

d) P53 mutada pero no P53 silvestre es capaz de activar al gen de multiresistencia a fármacos *mdr-1* (29,34) Esto es un indicio para explicar por qué P53 mutante puede evitar la apoptosis. Una célula con P53 mutada posee mayor probabilidad de causar metástasis, que una célula carente del gen *p53*, la cual se encuentra más propensa a sufrir apoptosis durante su estancia en la sangre, por ejemplo (76). En varios estudios, se ha confirmado que las metástasis o tumores secundarios, presentan más mutaciones de *p53* que el tumor original, por lo que seguramente las clonas más agresivas y capaces de invadir otros tejidos, son aquellas en las que se ha mutado *p53* (82,83)

Las mutaciones puntuales en *p53* como decíamos, se acumulan en la región de unión a ADN. Es curioso observar que las mutaciones tampoco se hallen distribuidas uniformemente a todo lo largo de esta región, sino que se encuentran confinadas a ciertas zonas. Existen regiones de alta probabilidad de mutaciones o hotspots, que son los codones 175, 245, 248, 249 y 273, en la mayoría de tumores estudiados (25,79). El 40% de las mutaciones de *p53* se presenta en tales codones (34). Este dato también sirvió para esclarecer la estructura terciaria de la proteína, que como se explicó anteriormente utiliza estas posiciones como puntos de unión al ADN. De esta forma, el cambio de un aminoácido compromete la conformación y por ende la función de *p53*. La frecuencia y el tipo de mutaciones encontradas se muestran en la figura 2.6

Debido al cúmulo de diversas mutaciones en la región central, estudios teóricos por computadora han especulado sobre los diferentes efectos ejercidos por las mutaciones puntuales y por tanto, se ha clasificado a P53 mutada en (34,79): 1) **Mutantes por contacto**, establecida por la mutación en los residuos 248 y 273 de unión directa al ADN, y 2) **Mutantes estructurales**, con una alteración total de la estructura tridimensional de la lámina beta y del motivo LSH, que sirven de superficie de unión al ADN.

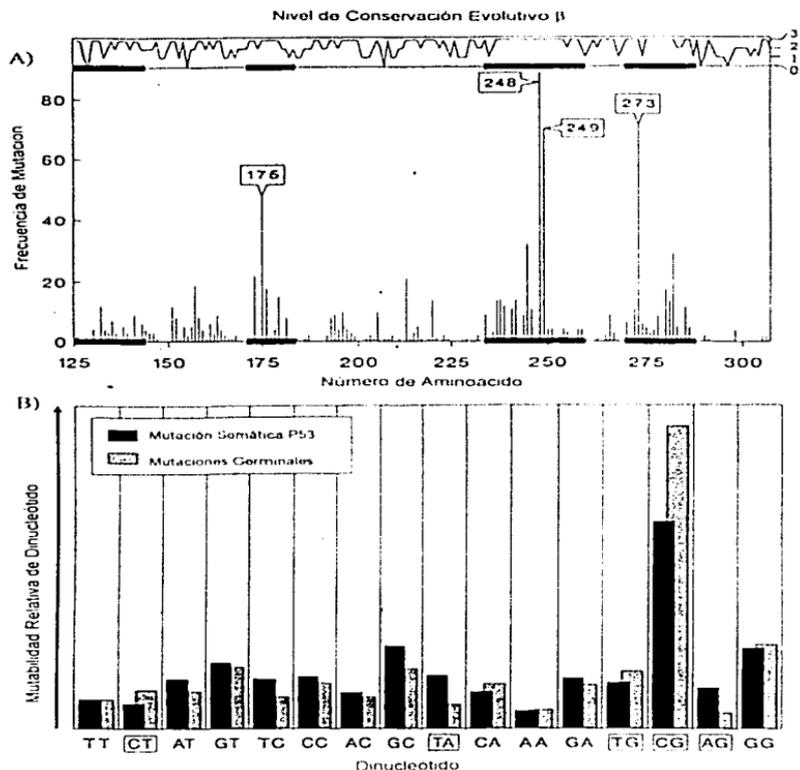


FIGURA 2.6: Frecuencia de Mutaciones en P53. A) Se muestra la relación entre las mutaciones más frecuentes, y el nivel de conservación evolutivo de la proteína β - 1 conservación entre primates, β - 2 conservación entre mamíferos, β - 3 conservación entre vertebrados. B) Gráfica en la que se muestra la mutación somática de P53 más frecuente, en el dinucleótido CpG, lo cual se asemeja a mutaciones germinales en otros genes humanos *Tomado de KRAWCZAK et al(80)*

Tipo de Mutaciones.- Se han encontrado transiciones y transversiones de todo tipo en el dominio central, pero el tipo de mutación que predomina, sin lugar a duda en los cánceres esporádicos, es la transición de C a T o de G a A, lo cual hace pensar que el origen de la anomalía es endógeno y no causado por agentes mutagénicos (79,80). Esto debido a que tanto citosina como guanina son blanco de metilación endógena por metiltransferasas involucradas en la regulación de la expresión de genes (78).

El caso de las mutaciones C a T es especialmente interesante y sólido para sustentar la teoría de mutación por mecanismos endógenos, ya que se sabe que los dinucleótidos CpG (en secuencias CCGG) son los sitios de metilación del ADN por excelencia, y que la citosina de CpG, una vez metilada en la posición 5, es susceptible a desaminación oxidativa espontánea y por tanto, de transformarse en timina, apareándose con adenina en una próxima replicación (78,84a y b,85). Sabiendo que las células tumorales no tienen un buen control de sus mecanismos de reparación de ADN, lo dicho anteriormente se encuentra respaldado por el hecho de que 50% de las mutaciones puntuales en cánceres humanos son transiciones C a T (84a y b), mientras que en *p53* alrededor de un 25% de las mutaciones se presenta en sitios CpG (25,78,80) y 5 de los 6 codones más frecuentemente mutados o hotspots, presentan el dinucleótido CpG (84a y b,85).

Sin embargo, la mutación de *p53* en dos tipos de cáncer escapa a las estadísticas. Estos son el cáncer de pulmón y el cáncer de hígado (hepatocarcinoma celular), en los que la mutación más frecuente es la transversión G a T (G C a T:A) (24,25,78,79). Esto puede ser explicado gracias a los agentes etiológicos más comunes de ambos tipos de neoplasia, que son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (como el benzo[*a*]pireno) para cáncer de pulmón, y la aflatoxina B en el hepatocarcinoma, y que se sabe son potentes carcinógenos que interactúan con la guanina (78,86). De hecho, se ha demostrado con experimentos *in vitro* que el gen *p53* sufrirá selectivamente este tipo de mutación si se encuentra expuesto a tales sustancias (87).

La aflatoxina B, un producto fúngico que contamina granos y semillas comestibles, puede muy bien ser señalada como la causante de la mutación en el tercer nucleótido del codón 249, lo cual es característico en muestras de tumores de

ciertas áreas geográficas (como en China y Sudáfrica) con un elevado índice de hepatocarcinoma y en las cuales se ha detectado a la vez, el consumo de alimentos contaminados con aflatoxina (25,78,86)

Por último, es importante señalar que las mutaciones de *p53* no se encuentran restringidas a tumores esporádicos. Existe un síndrome de tipo hereditario conocido como *Síndrome de Li-Fraumeni*, en el cual las mutaciones del gen se presentan en las células germinales parentales y por consiguiente, en todas las células somáticas de sus descendientes (31,88,89). Las familias con Síndrome de Li-Fraumeni presentan un alto índice de cáncer de mama y sarcomas. La mutación más común en esta patología es, curiosamente, la transición de C a T en sitios CpG, particularmente en la región de los codones 240-253, si bien se han detectado otras mutaciones hereditarias en otras regiones del gen (89)

2.3.7.1. Importancia de la detección de anomalías en *p53*.

Ya se han descrito las características de *P53* normal y mutada, pero ¿Qué importancia tienen en relación a un paciente con cáncer? Como se ha comprobado a nivel experimental, *p53* es vital para detener el ciclo celular e inducir apoptosis. La generalidad del tratamiento a pacientes oncológicos, incluyen la **quimioterapia** y la **radioterapia**. Ambas actúan dañando directamente el ADN, por lo que una célula tumoral, que presenta un índice de replicación mayor que una célula normal, por probabilidad es más susceptible al daño que sufre por sustancias como el cis-platino, 5-fluorouracilo o la radiación ionizante (118). Y es *p53* el encargado de eliminar a las células bajo estas circunstancias (52a,b). En diversos estudios con aplicación a la clínica (la mayoría de carácter retrospectivo), se ha establecido que en muestras de tumores de pacientes que presentan *p53* mutado o inactivado, se tiene un mal y pobre pronóstico en cuanto al tiempo de supervivencia, aparición de metástasis y otros indicadores, en relación con tumores de pacientes en los que *p53* fue hallado normal (90,91) Esto es especialmente cierto en pacientes con cáncer colorrectal (92,93,94).

De esta forma, la evaluación de la funcionalidad de *p53* se ha manifestado como muy útil en cuanto a definir esquemas de tratamiento y atención al paciente con cáncer, y en varios centros hospitalarios se lleva a cabo esto de forma regular,

como en el Hospital de Oncología del CMN siglo XXI (comunicación personal, Doctores Luna y Santiago-Payán, Departamento de Patología).

2.3.7.2 Técnicas para la detección de mutaciones en p53.

Si bien el análisis de la secuencia del gen *p53* resultaría idóneo para encontrar mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, etc. que son las que preferentemente inactivan a *p53*, hay que recordar que los métodos de secuenciación son de costo elevado, y demandan una cantidad de tiempo y esfuerzo considerables (95a) Aunque existen métodos de secuenciación automáticos, hay que recordar que **no todas** las muestras de tumores presentan anomalías de *p53*, por lo que se ha recurrido al empleo de técnicas y metodologías de tamizaje, o simplemente, que sean más prácticas, sencillas y rápidas para poder determinar el estado de este supresor tumoral, y dar un pronóstico acerca del curso de la enfermedad y sugerir el tipo de terapia del paciente (en pacientes con *p53* inactivado, se opta por tratamientos más agresivos) (90,91)

Una de las opciones más viables para evaluar el estado de *p53* en el tumor, es mediante inmunohistoquímica. Como sabemos, el tiempo de vida media de P53 mutada o estabilizada por oncoproteínas es mucho mayor que el de una P53 normal, por lo que anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína y unidos a un sistema de "revelado" mediante tinción como el de avidina-biotina, permiten detectar la presencia de la proteína (53,96). Se prefieren anticuerpos que reconozcan los extremos amino y carboxilo y no los de unión a la región central, ya que ésta puede variar en su conformación y dar resultados no fidedignos (97). En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (53), se comprobó que los pacientes de cáncer de recto con P53 determinada como normal mediante IHO con anticuerpo 1801 (que se une al extremo amino terminal) en muestras de tumor embebido en bloque de parafina, respondieron mejor al tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia previo a la resección quirúrgica, evaluado por el porcentaje de tumor residual (53, Tabla 2.1). El valor de tumor residual, determinado por el oncólogo después de la cirugía, se refiere a la cantidad de tumor resistente al tratamiento, se fija en relación al tamaño de la neoplasia antes

de la quimio y/o radioterapia, que se considera como un 100 % (comunicación personal, Dr. Pedro Luna, Hospital de Oncología C.M.N. Siglo XXI)

Aunque el método es adecuado, sobre todo para una evaluación inicial del paciente a nivel hospitalario, se ha reportado que la sensibilidad del método puede variar, pueden existir reacciones inespecíficas o cruzadas de los anticuerpos empleados (99), así como existe controversia sobre su veracidad, ya que se ha confirmado que pueden presentarse tanto falsos positivos como falsos negativos al realizar la secuencia del gen (97,98) La presencia de una P53 "normal" en pacientes como los casos 13 y 15, con tumores residuales del 80%, fue lo que motivó este trabajo de investigación.

TABLA 2.2. DETECCIÓN POR INMUNOHISTOQUIMICA DE P53 (Arriola *et al*, 53,149)

Detección Positiva * (P53 mutada)		Detección Negativa (P53 normal)	
Paciente No.	% Tumor Residual	Paciente No.	% Tumor Residual
5	10	1	10
9	42	2	0
10	50	3	0
11	10	6	60
12	50	7	25
14	40	8	15
18	90	13	80
19	75	15	80
23	75	16	49
24	75	17	25
25	75	20	25
26	60	21	0
<i>promedio</i>	<i>54.3</i>	<i>promedio</i>	<i>30.4</i>

Un punto importante a tratar en la detección de anomalías en p53 mediante anticuerpos, es el hecho de que se pueden encontrar anticuerpos anti-P53 en la sangre de pacientes con ciertos tipos de cáncer, como el de mama, colon e hígado (97,100). Esto representa una oportunidad única para poder evaluar el estado de p53 mediante serología, de manera fácil y oportuna, sin necesidad de biopsias u otros procedimientos más drásticos. Desgraciadamente, se encuentra

restringida a ciertos tipos de cáncer, y en el caso de cáncer de mama, es de muy mal pronóstico (97). Afortunadamente, parece ser que son las neoplasias causadas por agentes carcinógenos en personas con alto riesgo ocupacional en las que es más probable la aparición de los anticuerpos anti-P53, incluso años antes de que se presente el cáncer (97). Un ejemplo de ello lo constituye el estudio de Trivers y colaboradores (100) sobre la aparición de cáncer de hígado en trabajadores franceses y americanos expuestos a cloruros de vinilo, y esto puede servir de fundamento para incluir una prueba de presencia de anticuerpos anti-P53 como parte de la evaluación del estado de salud general de personal ocupacionalmente expuesto a carcinógenos.

El por qué surge una respuesta de tipo *autoimmune* en contra de P53, es fácil de explicar. P53 *nunca* debe salir de la célula, por lo que aún la proteína nativa es inmunogénica (31). Ya que P53 se acumula efectivamente en el citoplasma de algunas células tumorales, es muy probable que la necrosis de éstas, o la ruptura de su membrana plasmática por agentes tan reactivos como el cloruro de vinilo, ocasionen la salida de P53 de su *ambiente natural* y la pongan en contacto con el sistema de defensa del organismo (100).

2.3.7.3. Detección de mutaciones en p53 por SSCP.

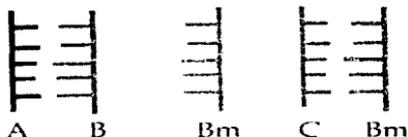
Como decíamos, la secuencia del ADN genómico o del cDNA es un trabajo laborioso y de altos costos. Existen técnicas que permiten identificar cualitativamente mutaciones en una cantidad considerable de muestras, para posteriormente confirmar por secuencia sólo las que hayan resultado positivas en la prueba de "tamizaje". Uno de los métodos de mayor uso debido a su buena especificidad y sensibilidad (aproximadamente del 90%) es el de SSCP, o de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (95b,101,102,103). Este método está basado en el hecho de que cadenas cortas de ADN (de hasta unos 400 pb), producidas por amplificación de la muestra original por PCR, una vez desnaturalizadas y cargadas en un gel de acrilamida como hebras sencillas, presentarán una movilidad diferente, si difieren incluso, en una sola de las bases de su secuencia. Cadenas idénticas migrarán en el gel de acrilamida a la misma altura, no así las cadenas que presentan una conformación tridimensional diferente por mutación de una o más de las bases originales. La esquematización

de la técnica de SSCP se presenta en la Figura 2.7. La presencia de las bandas puede determinarse por revelado del ADN con sales de plata (93) o mediante autorradiografía, si el ADN se encuentra marcado con un isótopo radiactivo, como P-32 (101).

La resolución de las bandas mutadas (sensibilidad de la prueba), depende de la temperatura ambiente, la composición del gel y la diferencia de potencial aplicada al gel (95,103). La técnica de SSCP ha resultado muy útil en detectar mutaciones en el gen *ras* (104,105), en el gen de la fibrosis quística (106), y en el diagnóstico de porfiria (107) por mencionar algunos, así como en el diagnóstico de otras enfermedades de origen genético. Pero muy especialmente para *p53*, ya que se tiene la ventaja de amplificar exones o partes del gen por separado y someterlos al análisis electroforético de SSCP (78,93,102,103,105).

Otros métodos son viables para detección de mutaciones, como el análisis de Polimorfismos mediante Fragmentos de Restricción (RFLPs), pero hay que recordar que las mutaciones en *p53* pueden ser de diversos tipos y encontrarse en muchos codones de la región conservada, por lo que el análisis por SSCP se presenta como una buena opción para buscar un patrón de mutaciones en una población que no ha sido estudiada, como es el caso de la población mexicana con cáncer colorrectal. El único informe de caracterización de mutaciones de *p53* en pacientes mexicanos del cual tenemos conocimiento es el de Soini *et al* (108), en el que los tumores de pacientes mexicanos con cáncer de hígado, presentaron la mutación por transversión de G a T, en el codón 249, debido a su exposición a la aflatoxina. Este tipo de mutación es bien conocida y ya se ha comentado anteriormente.

FUNDAMENTO DE LA TECNICA DE SSCP



sd 1 2 3 b cN cM

sd = control sin desnaturalizar
 1 y 2 = homocigotos normales
 3 = heterocigoto con mutacion
 b = blanco
 cN = Control normal
 cM = Control mutado
 (homocigoto)

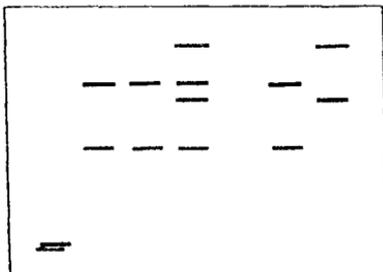


FIGURA 2.7: SSCP. El producto de amplificación por PCR- P^{32} se somete a desnaturalización por calor en presencia de formamida. La diferencia de movilidad electroforética entre el control normal (o de secuencia conocida) y cualquier muestra, denotará un cambio en la secuencia de ésta última.

2.4. CÁNCER COLORRECTAL

Un buen número de neoplasias humanas se originan de cualquier segmento del tracto gastrointestinal, siendo los tumores colorrectales y del estómago los más importantes, en cuanto a número de casos que se presentan anualmente en cualquier país. De hecho, los tumores de colon y recto representarán uno de los tipos de cáncer más frecuente en la población mundial al iniciar el siglo XXI (92,109,129). Esta consistencia está determinada por la prevalencia tanto en países en desarrollo como en países industrializados. No obstante que para los últimos se ha registrado una disminución de cáncer colorrectal debido al cambio en hábitos alimenticios y sedentarios (toma de conciencia y adquisición de información por parte de la población), en países como México, la tasa sólo ha ido en rápido aumento, muy probablemente quizás también, por el cambio en las costumbres alimenticias y la tendencia a adoptar costumbres de países industrializados (110,117,129).

El aumento en la frecuencia de cáncer colorrectal (CC) tal vez sea una consecuencia del aumento en la expectativa de vida del individuo común y corriente: el cáncer colorrectal se ha descrito como una enfermedad de la tercera edad (111, 117), cuya probabilidad de aparición aumenta considerablemente al traspasar la barrera de los 50 años.

El cáncer colorrectal se presenta como un problema formal de salud pública en nuestro país (110). Esto demanda una atención y estudio serios para dilucidar las causas y proponer esquemas de tratamiento y apoyo adecuados a los pacientes que sufren este tipo de cáncer.

2.4.1. Origen del Cáncer Colorrectal.

Aunque existe la teoría de que la aparición de cáncer es inherente a procesos celulares y fisiológicos correspondientes a un organismo en etapa de senectud, es preocupante notar la aparición de cáncer en individuos menores de 50, 40 o hasta 30 años. Esto puede ser explicado por la interacción entre carga genética de un individuo y el medio ambiente al que se encuentra expuesto, en cualquier tipo de cáncer. Sin embargo para cáncer colorrectal, podemos decir que la enfermedad

en individuos jóvenes puede presentarse por predisposición genética o por el conjunto definido por alimentación y hábitos, siendo ambos independientes y capaces de propiciar el proceso neoplásico por cuenta propia, en células de la pared y mucosa intestinal que debido a sus características fisiológicas y anatómicas, presentan *per se* un elevado índice de mitogenicidad y recambio (111).

2.4.1.1. Cáncer Colorrectal Hereditario.

Existen familias propensas a presentar cáncer entre sus miembros a una edad temprana, debido a la presencia de anomalías en los genes de estas personas. En el caso del cáncer colorrectal, existen dos síndromes bien definidos y descritos en la literatura, comunes en la población mundial, que cuentan para un 10% de todos los casos de cáncer colorrectal

- **Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF o FAP):** Se caracteriza por la aparición de cientos a miles de pequeños pólipos (protuberancias en forma de dedo) en una amplia porción de la superficie interna del colon y del recto, en la 2ª o tercera décadas de vida del individuo (111, 112). Algunas de estas protuberancias o adenomas benignos seguramente progresarán a neoplasias malignas por lo que se tiene un grado de riesgo elevado en la aparición de cáncer. Es por ello que en muchos casos, se opta por la resección quirúrgica de la zona afectada por los pólipos, aún cuando no se tenga indicios de cáncer.

La condición de síndrome hereditario se piensa que está dada por la presencia en estas familias, de una copia mutada o de otra forma defectuosa, del gen *apc* (por *adenomatous polyposis coli*) en el cromosoma 5q (112). Otro gen tal vez involucrado en PAF es el denominado *mcc* (por *mutado en cáncer colorrectal*), que también se encuentra en 5q y presenta conjuntamente alguna anomalía (113) en tales familias.

- **Cáncer colorrectal hereditario no-polipoideo (HNPCC).** De carácter autosómico dominante, aunque no se presenta una multiplicidad de adenomas como en el caso de FAP, es frecuente la aparición de adenocarcinomas de colon en la tercera o cuarta décadas de vida, lo cual puede estar acompañado por

aparición de tumores extracolónicos en las vías genito-uritarias, y otras regiones del sistema gastrointestinal (esófago, estómago, páncreas y ducto biliar, intestino delgado, etc.) (114)

Se cree que la causa de esta patología es la adquisición por herencia de copias defectuosas de genes cuyos productos proteicos son importantes en la reparación de daño al ADN, lo cual seguramente lleva a la aparición de un fenotipo celular de alta inestabilidad genética, demostrado en parte por la alta frecuencia de inestabilidad en microsátélites de ADN en células tumorales estos pacientes (114,115)

Otros síndromes hereditarios involucrados en la aparición de cáncer colorrectal, son el de Gardner, el del Adenoma Plano, el de Peutz-Jegher e incluso, el de Li-Fraumeni (111,116), los cuales presentan rasgos y características propios, pero se presentan con mucho menor frecuencia que los dos anteriores

2.4.1.2. Cáncer Colorrectal Esporádico.

Aunque se denomine como esporádico, constituye el tipo de tumor colorrectal más común, contabilizando de un 80 a 90% de los casos. Como ya se dijo, es muy probable su aparición en personas de edad avanzada, pero la tendencia a presentarse en personas de menor edad con mayor frecuencia (sobre todo en países no-industrializados o subdesarrollados) se ha visto asociada a la alimentación sobre todo, y a ciertos hábitos personales. Esto si bien no ha sido totalmente comprobado por la ciencia aún, es muy lógico pensar que si influye, debido a que el tracto gastrointestinal es uno de los sitios del cuerpo humano con mayor contacto a sustancias exógenas, a presencia de reacciones químicas y a colonización por parte de microorganismos y virus (111,117).

De esta forma, las estadísticas principalmente, y algunos estudios en particular, señalan que en la aparición de CC esporádico contribuye una alimentación inadecuada, con características tales como:

- a) Alta ingesta calórica total (3,15)
- b) Consumo elevado de carbohidratos (15,116).
- c) Consumo elevado de grasas de origen animal (117,129).

d) Baja ingesta de productos vegetales altos en fibra y vegetales verdes y crucíferas (116,117,129).

e) Dietas bajas en metionina y folatos (118), asociadas a una ingesta abundante de alcohol.

En cuanto a hábitos personales, se consideran factores de riesgo en la aparición de cáncer colorrectal :

a) Fumar. Se ha determinado como un factor de riesgo para CC, tal vez en menor proporción que para cáncer de pulmón, pero hay que señalar que los fumadores se encuentran menos "protegidos" contra CC debido a una mala asimilación de vitaminas y carotenoides consumidos (119,120), presuntos antioxidantes fisiológicos.

b) La combinación de ingesta de alcohol, con fumar habitualmente, ya que se pueden potenciar los efectos del humo del tabaco en el organismo (120,129)

c) Patrones de vida sedentarios (falta de ejercicio diario, poca actividad corporal, por ejemplo) se han asociado con una mayor probabilidad de aparición de CC (116,117), que de cualquier otro cáncer.

Por último, la determinación de un estado de obesidad (en especial a partir de un 40% de sobrepeso), se asocia con riesgo incrementado de presentar cáncer colorrectal, tanto en hombres como en mujeres (116,129)

2.4.2. Alteraciones Genéticas en Cáncer Colorrectal.

El cáncer colorrectal ha sido extensamente estudiado en cuanto a su evolución a través de los cambios genéticos que presentan las células tumorales de neoplasias colónicas o rectales. Esto gracias a que la neoplasia colorrectal presenta una gran ventaja en comparación con otro tipo de cáncer: el tejido afectado puede ser removido quirúrgicamente de una forma relativamente sencilla por lo que se ha podido caracterizar histológicamente la progresión de la neoplasia desde el estado de adenoma (displasia: hiperproliferación de células de tejido epitelial) hasta un carcinoma (anaplasia: aparición de células poco o nada diferenciadas) que puede ser origen de metástasis, a través de una serie de estados clínico-patológicos bien definidos y fácilmente reconocibles (8,113).

Basándose en lo anterior, el grupo de Bert Vogelstein y colaboradores, fue el primero en proponer un modelo de Tumorigénesis para cáncer colorrectal, sobre la base de una serie de datos contundentes a partir del estudio molecular de tumores de pacientes (121). Este modelo es aceptado abiertamente, si bien se trata de un punto de partida para la expansión del conocimiento sobre los eventos a nivel de ADN, que propician un cáncer de origen epitelial. Además, se insiste en que es el *conjunto* de alteraciones y no la aparición de las mismas en determinado orden cronológico, el encargado de sentar las bases para la aparición de un fenotipo celular transformado (122)

El modelo de Fearon y Vogelstein para cáncer colorrectal, propone que :

- a) Cualquier célula normal de la mucosa o pared intestinal, puede sufrir mutación o pérdida del gen *apc* en el cromosoma 5, lo que conduce a un tipo celular *hiperproliferativo*.
- b) El tejido hiperproliferativo de alguna manera, se vé sometido a hipometilación de ADN por lo que se perdería el control de la regulación en varios genes y a un incorrecto enrollamiento de los cromosomas (113). La hipometilación predispone a la aparición de un adenoma o pólipo benigno, pequeño.
- c) Se presenta la activación de un oncogén, particularmente *c-Ki-ras*, que promueve el crecimiento y displasia del adenoma.
- d) Se pierde el brazo largo del cromosoma 18, que contiene a un supuesto supresor tumoral, *dcc*. Ya que este gen codifica para una glicoproteína de membrana, que media interacciones célula-célula, se promueve la independencia de las células respecto al tejido.
- e) Se muta y/o se pierde el brazo corto del cromosoma 17, que contiene al supresor tumoral *p53*. Con esto, se pasa de adenoma a carcinoma con potencial de invasividad a ganglios linfáticos y a tejidos distantes

El esquema de la aparición de un tumor explicado bajo este modelo se presenta a continuación (Figura 2.8).

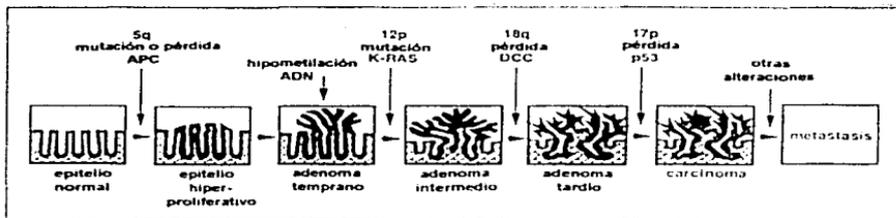


FIGURA 2.8 Modelo de Tumorigénesis Colorrectal según Fearon y Vogelstein. Tomado de GALLICK et al (122)

Si bien son pocos los genes involucrados en el modelo de Fearon-Vogelstein, también es cierto que existe evidencia suficiente para sustentarlo

- La delección o mutación de *apc* es del orden de 40 a 50% en muestras de tumores humanos de CC (113,122).
- La mutación del oncogén *ras* es frecuente (50%) y se asocia al grado de avance o malignidad del cáncer (101,113,122)
- Las delecciones de *dcc* y *p53* en 18q y 17p, respectivamente, se presentan frecuentemente en tumores colorrectales humanos (20,123). La pérdida de *p53* correlaciona bien con el paso de adenoma a carcinoma, y con la presencia de metástasis (82,83,121). De hecho, *p53* se pudo localizar gracias a la elevada frecuencia de delección del cromosoma 17p, lo cual indicó la presencia en esta región del genoma, de un gen con marcada importancia funcional para la célula (27,28).

Ahora bien, éstas no son las únicas alteraciones genéticas, pero sí las más sólidas por lo antes mencionado, por el número de estudios realizados y debido a

que el mismo patrón de eventos se ha descrito para diversas poblaciones (122,123). También se presentan deleciones alélicas en los cromosomas 1p, 8p y 22q, en distintas proporciones, por lo que se especula que estas regiones contienen genes supresores tumorales aún desconocidos (116).

Datos adicionales recientes y futuros, deberán integrarse al modelo de Fearon y Vogelstein y ampliarlo y/o modificarlo. Uno de ellos lo constituye la identificación del gen *nm23* en el cromosoma 17q, cuya proteína posee actividad de cinasa y parece ser capaz de regular la actividad en vías de transducción de señales importantes para la célula. Además de que su inactivación por deleción del gen, correlaciona muy bien con el proceso de metástasis, tal vez incluso, mejor que lo encontrado para *p53* (124). Otro dato reciente es la expresión consistente del ARNm del gen *dcc* en etapas avanzadas de cáncer colorrectal (125) por lo que probablemente sea la proteína y no el gen, el blanco de inactivación en ciertos tumores colorrectales.

El punto más controversial del modelo, es sin duda alguna, la parte concerniente a hipometilación del ADN, lo cual no es exclusivo del cáncer colorrectal y constituye una de las áreas más activas y discutidas en el estudio del cáncer. Si bien se sabe que la metilación del ADN sirve para regular la expresión de genes, es paradójico encontrar que mientras que la mayor parte del genoma se encuentra hipometilada, existen genes como *p53*, en los que las mutaciones más frecuentes son transiciones de C a T, producto de una metilación extensa de las citosinas en su secuencia (84,85). En contraposición, otros autores señalan que la hipometilación en lugar de contribuir al proceso neoplásico, lo detiene o contrarresta (126). Algo lógico resulta proponer que en las células neoplásicas, mientras que los genes supresores tumorales son metilados selectivamente para reprimir su función, otros genes -los oncogenes en especial- carecen completamente de esta regulación y contribuyen al proceso de transformación por lo que apoyan efectivamente la selección y sobrevivencia de células más agresivas (113).

El mecanismo por el cual se produce una metilación totalmente discriminatoria hacia ciertos genes es desconocido. Pero la observación de que dietas deficientes en folatos y metionina, se asocian con la aparición de tumores colorrectales

(117,118) puede marcar la pauta a seguir en este campo, al igual que el estudiar detalladamente los procesos de metilación celulares (84).

2.4.3. Cáncer de Recto.

El recto constituye la porción final del intestino grueso, conecta el segmento distal de éste con el esfínter anal y posee una longitud de unas 8 a 10 pulgadas (15-20 cm). Se encuentra muy perfundido por la circulación sanguínea y posee una red amplia de ganglios o nódulos linfáticos a su alrededor (111)

La aparición de neoplasias en este segmento del intestino grueso es muy frecuente; tan sólo en colon sigmoides (la porción inmediata que antecede al recto) y recto, se presentan más de la mitad de los tumores de CC (111). Los tumores de recto presentan una semejanza elevada en su proceso de evolución y metástasis con respecto a sus contrapartes en el colon, pero se ha especulado que debido a la posición anatómica del recto, existan otros factores etiológicos además de la dieta y el envejecimiento del tejido

Las metástasis de cáncer rectal son frecuentes en los ganglios linfáticos cercanos a la zona afectada y al hígado, incluso algunas veces, se pueden presentar metástasis distantes en pulmón y hasta cerebro. Para poder definir el grado de avance del cáncer de recto, es frecuente utilizar en clínica la clasificación de Dukes (aplicada también a tumores de colon) que asocia grado histológico con malignidad y resulta muy útil para proponer un tratamiento terapéutico y dar un pronóstico sobre la recuperación del paciente (111,125):

DUKES A.- Crecimiento confinado al epitelio del intestino

DUKES B.- Invasión del tumor hacia el interior de la pared intestinal, llegando al músculo liso.

DUKES C.- Diseminación del tumor a ganglios linfáticos.

DUKES D.- Metástasis a distancia del tumor primario.

Obviamente, en cada nivel de la clasificación, se presentan grados intermedios de avance del tumor (como C1, C2, etc.) y existen diferentes clasificaciones paralelas a la clasificación según Dukes. De hecho, el Instituto Nacional de Cáncer de E.U. maneja un sistema muy parecido, de Etapas 0 a 4 y recurrente para cáncer de

recto (127). Existe a su vez la clasificación denominada TNM (Tumor-Nódulo Linfático-Metástasis) que también utiliza la invasividad del tumor primario como parámetro central para diagnosticar la progresión del cáncer (111).

Es sabido que un diagnóstico temprano es lo más adecuado para poder manejar a un paciente con cáncer ya que ofrece mayores probabilidades para su recuperación (128). De esta forma, se recomienda que se realice un examen regular, cada año a partir de los 50 años, al menos, consistente en palpación rectal, y proctosigmoidoscopia o colonoscopia para detectar la presencia de anomalías en el intestino grueso (111,129). De hecho, la disminución en tasas de mortalidad por cáncer colorrectal en Norteamérica y Europa se atribuye en parte a la detección en etapas muy tempranas, por estas técnicas convencionales, ya que la mayoría de pacientes que muere por cáncer es debido a las metástasis o tumores secundarios y no por el tumor primario (3,8).

El tratamiento para cáncer de recto consiste generalmente en resección quirúrgica de la zona afectada, debido a su accesibilidad y a la edad promedio de los pacientes, generalmente avanzada (111,127). El empleo de quimioterapia y radioterapia adyuvantes dependen según la institución hospitalaria tratante: en Estados Unidos el tratamiento de quimio y radioterapia combinado se aplica *durante* (estadio de Dukes B/C) o *después* de la intervención quirúrgica (estadio C/D de Dukes), con el objeto de minimizar el riesgo de recurrencia y anular células tumorales que se hayan movilizado hasta nódulos linfáticos. En México (Hospital de Oncología, C M N S XXI) la quimio y radioterapia para cáncer de recto de aplican *antes* de la resección del tumor primario, para disminuir el tamaño de éste y evitar en lo posible la aparición de metástasis. El éxito de la terapia depende en gran medida de las características genéticas y fenotípicas de las células tumorales (53), por lo que de nuevo se pone en evidencia la importancia de caracterizarlas a un nivel molecular oportunamente, para dar una mejor opción de diagnóstico y tratamiento a los pacientes con cáncer (128,129).

Capítulo 3
Objetivos e Hipótesis

CAPÍTULO 3 : OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL :

* Detectar mutaciones del gen *p53* en muestras de tumores de recto de pacientes mexicanos con cáncer, al analizar la región más conservada del gen (exones 5 - 8) mediante la técnica de SSCP.

Objetivos específicos:

- * Comparar la detección de mutaciones de *p53* entre una metodología indirecta (Inmunohistoquímica) y una metodología directa de Biología Molecular (SSCP), en el mismo grupo de tumores de pacientes analizados por ambas técnicas.
- * Realizar una correlación entre el grado de malignidad del tumor y datos clínicos de los pacientes, con la presencia de mutaciones en el gen *p53*.
- * Definir la frecuencia de mutaciones del gen *p53* presente en cáncer de recto en la población estudiada, en relación a otras poblaciones con cáncer colorrectal de otros lugares del mundo.

HIPÓTESIS :

Al realizar el análisis de los exones 5 - 8 del gen supresor tumoral *p53*, mediante la técnica de SSCP, será posible detectar mutaciones que inactiven la función de la proteína y se traduzcan en un grado de avance significativo de la neoplasia rectal. Ya que *p53* juega un papel importante en el control del ciclo celular y apoptosis, deberán encontrarse mutaciones que inactiven a este supresor tumoral, en la región estudiada, ya que codifica para la región central de la proteína (unión al ADN), de vital importancia en el desempeño de estas funciones.

Capítulo 4
Metodología Experimental

CAPITULO 4 : METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. OBTENCIÓN DE ADN

4.1.1. Material y equipo

Baño maría calibrado a 37°C
Bloque de calentamiento (Heat-Block MultiLab)
Campana de flujo laminar
Celdas de cuarzo
Centrífuga Beckman
Desecador Nucerite (Nalge-Sybron)
Espátula de cromo - níquel
Espectrofotómetro con lámpara de Tungsteno
Guantes de látex
Microcentrifuga Brinkmann 5415 c
Micropipeta Gilson 20 μ L
Micropipeta Gilson 200 μ L
Microtomo
Mortero de porcelana y pistilo
Parafilm
Pipetas graduadas de 5 mL
Pipetas graduadas de 10 mL
Pipetas pasteur
Propipeta
Puntas para micropipeta
Termómetro
Tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL (Robbins Scientific)
Tubos para centrifuga, de 25 mL (Corex)
Vasos de precipitados

Vortex

4.1.2. Reactivos y soluciones

Alcohol isoamílico (J.T.Baker)
Cloroformo (Merck)
Cloruro de potasio (Químicos Monterrey)
Cloruro de sodio (J.T.Baker)
EDTA (J.T.Baker)
Etanol absoluto (J T. Baker)
Fenol saturado (Mallinckrodt)
Fosfato dibásico de sodio (Heptahidrato-Mallinckrodt)
Fosfato monobásico de potasio (Anhidro-Sigma)
Nitrógeno líquido
Proteinasas K (Sigma)
SDS -Dodecil Sulfonato de Sodio- (Sigma)
Tripsina - EDTA (Gibco)
Tris base (TRIZMA BASE -Sigma)
Tris clorhidrato (TRIZMA Hydrochloride -Sigma)
Xileno (J T Baker)

Sevag

Cloroformo - Alcohol isoamílico, en proporción 24 : 1, V/V

Solución Amortiguadora de Fosfatos PBS

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ y 0.24 g KH₂PO₄ en 800 mL de agua destilada. Ajustar pH a 7.4 y aforar a 1 L .

Solución de Proteasa (Proteinasas K) :

Extracción de ADN de cortes de tejido embebido en Parafina.

100 mM Tris pH 8.0, 4 mM EDTA pH 8.0 y 0.5 mg/mL Proteinasas K

Extracción de ADN de tumor fresco o células:

Solución de Proteinasas K 10 mg/mL en agua destilada, desionizada.

Solución SDS al 20% , W/V en agua destilada

Solución T.E.N. 10-10-0.15

Tris HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 8.0 y cloruro de sodio 0.15 M

Solución T.E.N. 10-10-0.65

Tris HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 8.0 y cloruro de sodio 0.65 M

Solución T.E. 1:1

Tris HCl pH 7.5, EDTA 1mM pH 8.0

Medio D - MEM (Dulbecco's Modified Eagle Media)(GIBCO)**4.1.3. PROCEDIMIENTOS.****4.1.3.1. Extracción de ADN de cortes de tumores embebidos en bloques de parafina.**

- i. Los cortes de bloques de parafina en los que se encuentra embebido el tumor se cortan con microtomo (se recomienda un espesor de entre 10 y 20 μm). El corte se deposita en tubo Eppendorf de 1.5 mL, estéril.
- ii. Al tubo se le adiciona 1 mL de xileno. Se agita gentilmente con el vortex para disolver la parafina, por 2 minutos. Se centrifuga a 14 000 rpm, durante 2 minutos.
- iii. Se decanta el xileno con cuidado para no eliminar tejido. Se lava con 0.5 mL de etanol absoluto, y se agita y centrifuga como se indica en el paso ii.
- iv. Se hacen dos lavados más con etanol al igual que en el punto anterior.
- v. Habiendo decantado el etanol del último lavado, se evapora cualquier residuo del mismo mediante vacío: se cubre la boca del tubo abierto con Parafilm y se le hacen dos o tres pequeños orificios. Se coloca en un desecador conectado a vacío y se deja secar el tejido (aproximadamente, 1 hora).
- vi. Se depositan en el tubo con ayuda de micropipeta, de 50 a 100 μL de solución de proteinasa K-Tris-EDTA, dependiendo de la cantidad de tejido a disolver. Se agita con vortex.
- vii. Se incuba de 12 a 16 horas en baño maría a 37°C.

viii. La solución de proteasa se inactiva calentando a 95°C en termoblock por 5 minutos mínimo.

ix. Se centrifuga para separar los restos de tejido, a 14 000 rpm por 5 minutos.

x. El sobrenadante se trasvasa y alícuota otros Eppendorf de 1.5 mL. Este se utiliza como solución de ADN para amplificación y debe almacenarse a - 20°C.

4.1.3.2. Extracción de ADN a partir de tumores y tejido normal almacenados en congelamiento bajo nitrógeno líquido.

- En el Laboratorio de Biología Molecular se mantiene un Banco de Tumores Colorrectales y Tejidos Control Normales (116) procedentes del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del I.M.S.S., recolectados a partir de la resección quirúrgica. Las muestras recién extraídas se enjuagan en solución amortiguadora PBS estéril para eliminar sangre y fluidos intestinales, y ya lavadas se almacenan en tubos eppendorf (etiquetados debidamente) en tanque de nitrógeno líquido a una temperatura de - 195.8 °C. -

i. El tejido tumoral o normal, aproximadamente 1 g, se coloca en el mortero y se homogeniza con ayuda del pistilo, cuidando de que siempre se encuentre congelada la muestra, mediante la adición de pequeñas cantidades de nitrógeno líquido al mortero. El tejido debe quedar reducido a polvo fino, el cual se transfiere a un tubo Corex que contiene 5 mL de TEN 10-10-0.15, el cual se ha mantenido previamente en hielo.

ii. Se agregan al tubo 100 μ L de solución de proteinasa K, 10 mg/mL.

iii. Se adicionan 125 μ L de solución de SDS al 20 %.

iv. Se agita suavemente la mezcla, hasta que se forme una suspensión del tejido. El tubo perfectamente cerrado se coloca en un baño de agua a 65°C, en donde se incuba por un mínimo de 3 horas.

v. Una vez digerido el tejido, se agregan a la mezcla 5 mL de TEN 10-10-0.65. Se mezcla gentilmente.

vi. Agregar 10 mL de fenol a la mezcla, bajo campana de extracción. Agitar hasta

homogeneizar y formar una sola fase.

vii. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.

viii. Transferir con mucho cuidado la fase acuosa a otro tubo Corex de 25 mL, con ayuda de pipetas pasteur sin punta o pipetas graduadas estériles.

ix. A la fase acuosa se le añaden 10 mL de Sevag. Agitar hasta formar una sola fase.

x. Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.

xi. Transferir nuevamente la fase acuosa. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto.

Deberá formarse un precipitado viscoso.

xii. El ADN obtenido debe lavarse con etanol al 70% (en TEN 10-10-0.15) dos veces, y al menos una vez con etanol absoluto.

iii El ADN debe secarse a temperatura ambiente con o sin ayuda de vacío.

xiv. Resuspender el ADN en el menor volumen posible de solución T.E. 1:1, y si es necesario, incubando a 37°C para facilitar el proceso.

xv. Cada muestra de ADN extraído se cuantifica mediante absorbancia leída a 260 nm en espectrofotómetro (método 4.1.3.4.). Se toma una alícuota y se hace una dilución con agua desionizada y estéril para obtener una solución de aproximadamente 100 nanogramos de ADN / microlitro para la reacción de PCR.

xvi. Almacenar el ADN extraído y dilución a -20°C.

4.1.3.3. Extracción de ADN de células en cultivo.

i. Decantar el medio de la caja petri o botella donde se encuentra el cultivo celular en confluencia (al término de la fase logarítmica de crecimiento).

ii. Lavar la monocapa 2 veces con PBS frío utilizando de 3 a 4 mL, enjuagar y decantar.

iii. Agregar 3 mL de tripsina (concentración 1:250 PV), para despegar las células de la superficie de la caja o botella.

- iv. Incubar a 37°C por 3-4 minutos, hasta observar aparición de turbidez en el medio (lo cual demuestra el desprendimiento de las células).
 - v. Añadir 4 mL de medio D-MEM (para inactivar la tripsina). Con pipeta pasteur o graduada, tomar el medio y vaciar en tubos eppendorf de 1.5 mL.
 - vi. Centrifugar cuatro minutos a 2 000 rpm
 - vii. Decantar y desechar el sobrenadante. La pastilla se resuspende en 0.5 mL de TEN10-10-0 15
 - viii. Agregar 5 microlitros de solución de Proteinasa K 10 mg/mL
 - ix. Agregar 12.5 microlitros de SDS al 20 %.
 - x. Homogeneizar e incubar la mezcla en baño de maría a 65°C por 2-3 horas.
 - xi. Agregar 250 mL de TEN 10-10-0 65 y homogeneizar.
 - xii. Agregar 1 mL de fenol saturado y agitar hasta formar una sola fase
 - xiii. Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos
 - xiv. Transferir la fase acuosa a otro tubo. Añadirle 1 mL de Sevag. Homogeneizar y centrifugar nuevamente a 2000 rpm por 10 minutos
 - xv. Separar la fase acuosa y añadirle 2 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar y centrifugar para precipitar el ADN.
 - xvi. Decantar el etanol y secar a temperatura ambiente, con o sin vacío. Resuspender el ADN en la mínima cantidad de solución TE posible.
 - xvii. Cada muestra de ADN extraído se cuantifica mediante absorbancia leída al espectrofotómetro (1d)
- Tomar una alícuota de cada muestra, diluyendo con agua desionizada, estéril para obtener una solución de aprox. 100 ng ADN/ mL para reacción de PCR.*
- xviii. El ADN extraído y alícuotado deberá mantenerse a -20°C.

4.1.3.4. Cuantificación de ADN.

- Indicado para extracción a partir de tejido conservado en nitrógeno líquido y de células en cultivo.

- i. Tomar una alícuota de la suspensión de ADN, de 5 ó 10 μ L y llevar a 500 μ L con TE. El factor de dilución a considerar es de 100 y 50, respectivamente

ii. Con la solución TE como blanco para calibración, se toma lectura de absorbancia a 260 y 280 nm para cada muestra.

iii. Se determina la concentración de ADN de la muestra, mediante la fórmula.

$(20 \times \text{Lectura absorbancia } 260 \text{ nm}) \times \text{Factor de dilución} = \text{mg ADN/ mL solución}$

iv. La pureza del ADN se obtiene por la relación A_{260}/A_{280} , la cual es aceptable si el cociente es mayor o igual a 1.7.

4.2. AMPLIFICACION DE ADN MEDIANTE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.2.1. Material y equipo.

Guantes de látex.

Micropipeta Gilson de 200 microlitros

Micropipeta Gilson de 20 microlitros

Puntas para micropipeta

Termociclador Perkin - Elmer 2400 GeneAmp System

Tubos para PCR con tapa, Perkin - Elmer

4.2.2. Reactivos y soluciones

a) Reactivos Perkin - Elmer :

- Solución amortiguadora 10x PCR (Contiene MgCl_2)

- dCTP 10 mM

- dATP 10 mM

- dGTP 10 mM

- dTTP 10 mM

- Amplitaq DNA Polimerasa- - 5 U / μL

b) Reactivos BIOSELEC (Operon Technologies Inc.):

- Oligonucleótidos Cebadores, 0.05 mMol

Secuencias tomadas de A.FAILLE *et al*(102) y comparadas contra la secuencia de *p53* (32).

exón 5: S 5' - TTC ACT TGT GCC CTG ACT TTC - 3'

AS 5' - CTC TCC AGC CCC AGC TGC TC - 3'

Temperatura de unión a ADN: **60°C**

Tamaño del fragmento amplificado: **250 pb**

exón 6: S 5' - ATT CCT CAC TGA TTG CTC TT - 3'

AS 5' - CCC CTC CTC CCA GAG ACC CC - 3'

Temperatura de unión a ADN: **55°C**

Tamaño del fragmento amplificado: **169 pb**

exón 7: S 5' - ACA GGT CTC CCC AAG GCG CA - 3'

AS 5' - TGC AGG GTG GCA AGT GGC T - 3'

Temperatura de unión a ADN: **65°C**

Tamaño del fragmento amplificado: **184 pb**

exón 8: S 5' - GGT AGG ACC TGA TTT CCT TAC TGC C - 3'

AS 5' - CCC TTG GTC TCC TCC ACC GCT TCT TG - 3'

Temperatura de unión a ADN: **60°C**

Tamaño del fragmento amplificado: **227 pb**

* La solución concentrada de oligonucleótidos se preparó resuspendiendo cada oligo (0.05 mMol) en 500 microlitros de agua desionizada, estéril.

* Las soluciones de trabajo corresponden a una concentración de 10 picomol / μL (preparadas a partir de la solución concentrada por dilución 1 : 10 en agua desionizada, estéril).

c) Reactivos AMERSHAM:

- dCTP Redivue (alfa - P^{32}), 10 mCi/mL .
Actividad específica: 3,000 Ci / mMol.

d) OTROS

- Agua para PCR (grado HPLC, agua desionizada, esterilizada y filtrada)
- ADN extraído de cortes de tumores, tejido fresco o células en cultivo (Procedimientos 4.1.3.1, 4.1.3.2 y 4.1.3.3, respectivamente). Concentración ajustada aproximada a 100 ng / μL .

4.2.3. PROCEDIMIENTOS

4.2.3.1. Amplificación de ADN para ajuste de condiciones de reacción y verificación de la extracción.

20 microlitros de volumen final por reacción, conteniendo:

Reactivo	Cantidad
Amortiguador 10 X	2 μL
Oligo sentido	20 picomoles
Oligo antisentido	20 picomoles
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	100 mMol
Taq polimerasa	0.5 U
ADN	100 ng
H ₂ O	c.b.p.

A) Programa de amplificación, ADN de cortes de tumor en bloque de parafina:

- 1) Desnaturalización Inicial ... 4 minutos, 94°C
- 2) 40 Ciclos : Desnaturalización ... 1 minuto, 94°C
Unión cebadores ... 1 minuto, *
Elongación ... 1 minuto, 72°C.
- 3) Elongación Final ... 5 minutos, 72°C

* La temperatura de unión depende del par de oligonucleótidos utilizado.

B) Programa de amplificación, ADN de tumor fresco y células en cultivo:

- 1) Desnaturalización Inicial ... 3 minutos, 94°C
- 2) 30 Ciclos : Desnaturalización ... 30 segundos, 94°C
Unión cebadores ... 40 segundos, *
Elongación ... 40 segundos, 72°C.
- 3) Elongación Final ... 5 minutos, 72°C

* La temperatura de unión depende del par de oligonucleótidos utilizado

4.2.3.2. Amplificación de ADN de cortes de tumores embebidos en parafina para ensayo por SSCP.

10 microlitros de volumen final, conteniendo:

Reactivo	Cantidad
Amortiguador 10 X	1 μ L
Oligo sentido	20 picomoles
Oligo antisentido	20 picomoles
dATP, dGTP, dTTP	1 mMol
dCTP	0.5 mMol
dCTP (P^{32})	1 μ L
Taq polimerasa	0.5 U
ADN	2 L
H ₂ O	c.b.p

Programa de amplificación:

- 1) Desnaturalización Inicial ... 4 minutos, 94°C
- 2) 40 Ciclos : Desnaturalización ... 1 minuto, 94°C
Unión cebadores ... 1 minuto, *
Elongación ... 1 minuto, 72°C.
- 3) Elongación Final ... 5 minutos, 72°C

* La temperatura de unión depende del par de oligonucleótidos utilizado.

4.2.3.3. Amplificación de ADN extraído de tejido fresco conservado en nitrógeno y de líneas celulares tumorales, para ensayo por SSCP.

10 microlitros de volumen final por reacción, conteniendo:

Reactivo	Cantidad
Buffer 10 X	1 μ L
Oligo Sentido	10 picomoles
Oligo Antisentido	10 picomoles
dATP, dGTP, dTTP	1 mMol
dCTP	0.5 mMol
dCTP (P ³²)	1 μ L
Taq polimerasa	0.5 U
ADN	1 μ L (100 ng)
H ₂ O	c. b. p.

Programa de amplificación:

- 1) Desnaturalización Inicial ... 3 minutos, 94°C
- 2) 30 Ciclos : Desnaturalización ... 30 segundos, 94°C
Unión cebadores ... 40 segundos, *
Elongación ... 40 segundos, 72°C.
- 3) Elongación Final ... 5 minutos, 72°C

* La temperatura de unión depende del par de oligonucleótidos utilizado.

4.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

(Para análisis de los productos de amplificación de ADN)

4.3.1. Material y equipo

Balanza digital Sartorius
Cámara de electroforesis DNA subcell (BIO-RAD)
Cinta adhesiva
Goggles para protección de luz UV
Fuente de poder EPS 500/400 (Farmacia)
Matraz Erlenmeyer 250 mL
Micropipeta Gilson de 20 microlitros
Placa de acrílico
Peines para electroforesis
Puntas para micropipeta
Transiluminador 3UV.

4.3.2. Reactivos y soluciones

Agarosa grado electroforesis (Seakem)
Marcadores de 10 y/o 100 pb - (Gibco-BRL)

Amortiguador de carga (loading buffer): 0.25% Azul de Bromofenol (Merck)
0.25% Xilencianol FF (Sigma)
30% Glicerol (Merck)
en agua destilada, desionizada

Solución de bromuro de etidio (Sigma) 10 mg/mL *Debe manejarse con extremo cuidado (el bromuro de etidio es cancerígeno) y protegida de la luz.*

Solución TBE 5X. Para 1 L - Tris Base (Sigma) 54 g

Acido Bórico (P.Q. Monterrey) 27.5 g
20 mL EDTA (J.T.Baker) 0.5 M a pH 8.0

Disolver y aforar con agua destilada cbp 1000 mL.

La solución de trabajo es TBE 0.5 X, dilución 1:10 de la anterior.

4.3.3. PROCEDIMIENTO.

- i.** Elaboración del gel de agarosa al 2%: Se pesa 1 g de agarosa para 50 mL de solución TBE 0.5X. Se calienta hasta disolver completamente los grumos de agarosa. Se deja enfriar a 50°C y se añaden 3 mL de solución de bromuro de etidio. Se homogeniza y se vierte en una placa de acrílico del tamaño apropiado a la cámara de electroforesis. El peine adecuado se inserta en el gel, a 1 cm de la orilla superior y a una profundidad de 2/3 el grosor del gel.
- ii.** Una vez solidificado el gel, se retira con cuidado el peine e inmediatamente se coloca en la cámara de electroforesis. Esta se llena con solución TBE 0.5X, hasta cubrir completamente el gel y llenar los pozos formados por el peine.
- iii.** Preparación de las muestras. A las reacciones de PCR (procedimiento 4.2.3.1) se le añaden 2 μ L de amortiguador de carga. Se agita para mezclar y se centrifuga en microfuga para asegurar tomar el volumen total de la mezcla.
- iv.** El marcador de peso molecular se deposita en el primer pozo del gel como referencia. Se toma el volumen total de cada muestra con micropipeta y se deposita en los pozos subsiguientes.
- v.** Una vez finalizada la carga de las muestras en los pozos del gel, se cierra la cámara, se conectan los electrodos (debiendo las muestras recorrer el cuerpo del gel hacia el cátodo) y la fuente de poder se ajusta a 80 volts. La corriente eléctrica se apaga cuando el colorante Azul de Bromofenol (azul oscuro) ha recorrido más de 2/3 del largo del gel, hasta 3 o 4 cm de su borde inferior.
- vi.** El gel se retira de la cámara de electroforesis y se coloca en el transiluminador. Con las medidas de precaución apropiadas (goggles o lentes de vidrio y placas de acrílico) se enciende el aparato para revelar las bandas de ADN, a 302 nm (UV-B).

4.4. ENSAYO DE SSCP, POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENA SENCILLA. (*Single-Strand Conformational Polymorphism*)

4.4.1. Material y equipo

Cámara de secuencia
Cinta adhesiva o aislante
Fuente de poder 1000 volts Buchman (microprocesador integrado)
Matraz Kitasato con manguera
Micropipeta Gilson de 200 mL
Micropipeta Gilson de 20 mL
Papel filtro Whatman 3 mm
Peines para Electroforesis
Pipeta graduada de 10 mL
Probetas de 500 y 1000 mL
Propipeta
Puntas para micropipeta
Secador de gels
Vidrios para gel de secuencia

4.4.2 Reactivos y soluciones

a) Productos de PCR - P³² (Procedimientos 4.2.3.2 y 4.2.3.3)

b) Gel de Acrilamida

- Solución de acrilamida al 30% - 29 g Acrilamida (Sigma)
1 g N,N,-metilénbis-acrilamida (Sigma)
H₂O cbp 100 mL

Prepararla utilizando guantes y cubrebocas.

Guardar en frasco ámbar a 4°C.

Persulfato de amonio (J. T. Baker) - Preparar solución al 15% w/v *justo antes de hacer el Gel.*

- Solución amortiguadora TBE 0.5X (4.3.2)

- Glicerol (J.T. Baker)
- Sigmacote (silicón - Sigma)
- TEMED (Sigma)

c) Reacción de Desnaturalización:

- Solución "Stop" para detener reacción de secuencia, 10 mL:

Sol. EDTA (J T Baker) 0.5 M, pH 8.0	...	0.4 mL
Formamida al 99.5 % (Merck)	...	9.6 mL
Xilencianol (Sigma)	...	5 mg
Azul de Bromofenol (Merck)	...	5 mg
- Solución NaOH 0.1 M 0.1 g de NaOH (J T Baker) se disuelve y afora a 25 mL con agua destilada

d) Otros.

- Solución amortiguadora de carga (Punto 4.3.2)
- Agua desionizada
- Etanol absoluto (J T Baker)
- Hielo

4.3 PROCEDIMIENTOS.

4.3.1. Preparación del Gel de Acrilamida 6% - Glicerol 5%

- i. Los vidrios deben encontrarse completamente limpios. Es aconsejable frotar las superficies con etanol absoluto para remover cualquier resto orgánico. Bajo campana de extracción, uno de los 2 vidrios se siliconiza en la superficie que soportará el gel, de manera uniforme. Esto permitirá separar ambos una vez finalizada la corrida de electroforesis, quedando el gel adherido al otro vidrio para facilitar su manejo y análisis.
- ii. Se colocan los peines laterales entre los vidrios y se sellan tanto los lados como la parte inferior con cinta de aislar.
- iii. Se prepara una solución de acrilamida al 6%. Para 100 mL de gel, se requieren:

20 mL de Acrilamida - Bisacrilamida 30%

10 mL TBE 5X (concentración final en gel 0.5 X)

5 mL Glicerol

Agua desionizada, cbp 100 mL

iv. Se adicionan a la mezcla el persulfato de amonio al 15% (500 μ L) y el TEMED (35 μ L). Rápido, con ayuda de una pipeta graduada de 10 o 20 mL, se deposita entre los vidrios, colocados verticalmente o ligeramente inclinados para facilitar el llenar todo el espacio entre éstos. Debe tenerse cuidado para evitar la formación de burbujas. Una vez lleno, se inserta el peine con el que se formarán los pozos, en la parte superior entre los vidrios.

v. Una vez gelificada la acrilamida, se retira la cinta adhesiva de los vidrios y se procede a colocar el gel en la cámara de electroforesis. Ésta se llena con amortiguador TBE 0.5 X, cuidando de que el gel mantenga pleno contacto con la solución.

4.3.2. Desnaturalización de las Muestras de PCR y carga en Gel.

i. Se toman 2.5 μ L de producto de reacción de PCR con P^{32} y se depositan en un tubo eppendorf de 500 mL conteniendo 9 μ L de solución "stop" de secuencia y 2 μ L de solución NaOH 0.1 M.

ii. Se mezcla con ayuda de vortex y se centrifuga en microcentrifuga para homogeneizar la mezcla.

iii. Los tubos se colocan en un block de calentamiento, calibrado a 95°C. Se desnaturaliza el ADN por 5 minutos.

iv. Los tubos se colocan en hielo y las muestras se cargan inmediatamente en el gel. Se depositan 3 μ L de muestra por pozo.

v. En el gel se debe tener al menos un control de ADN sin desnaturalizar, por lo que 2 μ L de reacción de PCR- P^{32} de cualquier muestra o del control de tejido normal se mezclan con 10 μ L de solución amortiguadora de carga. De esta mezcla -que NO SE DEBE colocar en el termoblock o baño de calentamiento- se toman 1.5 μ L y se depositan en el gel.

4.3.3. Electroforesis y Secado.

- i. Una vez cargadas en el gel las muestras y los respectivos controles, se conectan los electrodos y se enciende la corriente eléctrica. (Se realizaron corridas a 30 y 3 Watts, que duran 3 y 15 horas respectivamente)
- ii. Una vez que la banda de xilenciano ha recorrido 2/3 del cuerpo del gel, se procede a quitar la corriente eléctrica
- iii. Con cuidado se retiran los vidrios que soportan el gel de la cámara de electroforesis y el peine de la parte superior entre los vidrios.
- iv. Se colocan los vidrios en posición horizontal, debiendo quedar el vidrio silicizado en la parte superior. Se introduce en una esquina, una espátula entre ambos vidrios. Con la espátula como palanca, se levanta con cuidado y lentamente el vidrio de arriba, el cual debe resbalar fácilmente debido al silicón. El gel debe quedar adherido al vidrio inferior.
- v. Una vez retirado el vidrio superior, se coloca encima del gel y en la región donde se encuentre el ADN (monitoreando con ayuda del contador Geiger), papel filtro de un tamaño apropiado al secador de geles. Se recorta y elimina el sobrante de gel antes de levantar el papel filtro.
- vi. El gel adherido al papel filtro, debe cubrirse con ega-pack antes de colocarse en el secador de geles, en el que se mantiene la temperatura constante a 80°C.

4.3.4. Exposición y revelado del gel.

El gel seco se coloca en una camisa o cassette con pantallas amplificadoras para autorradiografía, y se cubre con placas para rayos X. *Dependiendo de la actividad específica del P^{32} se permite la interacción de la radiactividad con la emulsión en las placas.* Las placas se revelan para observar las bandas de ADN y analizar el corrimiento electroforético de las mismas. Una movilidad electroforética diferente al del control de tejido normal revelará la presencia de una mutación en el fragmento de ADN analizado mediante esta técnica.

4.5. FOTOGRAFIA Y REVELADO. Material, equipo y reactivos.

a) Fotografías de geles de agarosa:

Cámara 34 DS Polaroid - con adaptador -
Rollo Fotográfico Polapan B&W Polaroid

b) Exposición y revelado de geles de SSCP:

Placas: X - OMat, Kodak

Camisas para autorradiografía (11 x 14 pulgadas) Halsey Rigidform y
Okamoto

Revelador: GBX Kodak Cat 1901859 Developer & Replenisher

Fijador: GBX Kodak Cat 1901859 Fixer & Replenisher

Charolas y pinzas para Revelado

Cuarto Oscuro - DEPg, Facultad de Química.

Capítulo 5 **Resultados**

CAPITULO 5: RESULTADOS

El estudio para la detección de mutaciones se llevó a cabo en dos grupos de pacientes bien definidos: Los incluidos en el estudio de IHQ (pacientes 1-26) antes mencionado (53), y la ampliación con 22 pacientes cuyo ADN se obtuvo de tejido fresco conservado en nitrógeno líquido, en el banco de tumores del grupo de Cáncer del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Química

5.1. Extracción de ADN y Determinación de la Población a Estudiar.

El estudio realizado fijó como objetivos en un principio, la detección a nivel molecular de las presuntas mutaciones de *p53* identificadas previamente mediante inmunohistoquímica (53,148) De esta forma se pudo realizar una comparación entre las técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular como métodos para evaluar la funcionalidad de *p53* en pacientes con cáncer de recto, y tratar de establecer una correlación entre los tratamientos de quimioterapia y radioterapia, la respuesta del paciente a los mismos, y el estado de *p53* (funcional o no-funcional) Este planteamiento fue necesario debido a que en el trabajo de Arriola y colaboradores (149), se demostró una correlación entre el estado de la proteína P53 y el valor de tumor residual, el cual generalmente es elevado si P53 se encuentra mutada. Sin embargo, anteriormente se señaló (Antecedentes) la existencia de casos específicos con un alto tumor residual, en los que P53 se encontró normal por IHQ. Estos resultados fueron inesperados, por lo que se decidió verificar a nivel molecular la integridad del gen *p53*

a) Extracción de ADN y amplificación por PCR.

Con el ADN obtenido del tejido embebido en bloques de parafina (sección 4.1., 93) se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación de los exones 5 al 8 de *p53*.

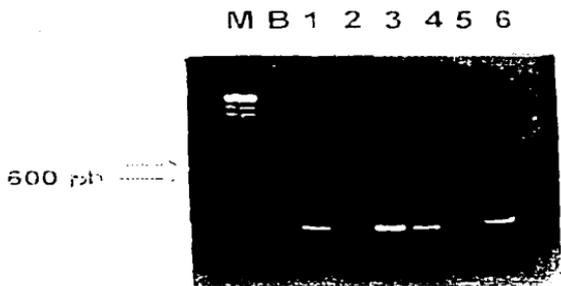


FIGURA 5.1. Productos de amplificación del exon 5, 250 pb (Carriles 1-4) y del exon 8, 227 pb (carriles 5 y 6). Se comprueba que las condiciones de PCR son adecuadas para el análisis de ADN por SSCP.

Como se puede observar en la figura 5.1, las condiciones de amplificación resultaron adecuados para obtener ADN cuantitativamente y poder ser utilizado en el ensayo de SSCP. En la figura se muestran los productos de amplificación esperados de los exones 5 (250 pb) y 8 (227 pb).

Ahora bien, no todas las extracciones de ADN a partir de bloques de parafina fueron exitosas, ya que se tuvieron problemas con los cortes de ciertos tumores (del paciente 8, por ejemplo, figura 5.2a), en los que no se observó producto alguno de amplificación, ni aún cuando esto se llevó a cabo varias veces. Debido a esta dificultad, sobre todo con muestras de pacientes del grupo definido como normal por IHO, y a la falta de muestras de los pacientes 21 y 25, se optó por concentrar los esfuerzos en caracterizar las anomalías del gen *p53* en las

muestras de bloques de parafina del grupo de muestras mutadas detectadas por IHQ de las que efectivamente se obtuvo ADN, y de muestras de pacientes con alto tumor residual pero con P53 determinada por IHQ como normal (pacientes 6, 13 y 16).

De los pacientes 5,6,18 y 19 se tenía muestra de tejido fresco en congelación, por lo que se prefirió trabajar con el ADN extraído de esta fuente, y no con el ADN de bloques de parafina, para realizar el ensayo de SSCP.

b) Amplificación de p53 y ras para pacientes con alto tumor residual y P53 detectada como normal por inmunohistoquímica.

En el estudio previo (53,148) se demostró una correlación en la disminución del tumor primario, con la viabilidad de p53, y sólo pocos casos que fueron detectados como p53 normal por IHQ presentaron un tumor residual alto (pacientes 13,15,16). Estos datos llaman la atención por salirse del comportamiento observado, en el que p53 normal se relaciona con un tumor residual nulo o bajo (Tabla 2.1).

Durante la amplificación de ADN para la paciente 15, la cual presentó un 80% de tumor residual, no se pudo observar producto de PCR para ninguno de los exones 5 a 8 de p53, pero esto no se debe a falla en la extracción de ADN, como en el caso del paciente 8. Este caso es particular, ya que se trata de una joven de 18 años de edad al momento de la intervención quirúrgica, en cuyo tumor al ser analizado por IHQ, p53 se determinó como normal. Además, el valor de tumor residual es muy elevado, y la paciente murió pocos meses después de la cirugía.

Debido a tales datos, tanto contradictorios como interesantes (tumor residual alto, P53 normal por IHQ, edad de la paciente y muerte) se analizó la posibilidad de que el gen p53 no se encontrara presente en el ADN de esta paciente. Para ello se realizó como control positivo de extracción de ADN la amplificación de otro

gen, *c-ki-ras*, con oligonucleótidos específicos. Esto mismo se efectuó para los pacientes 13, 16, 17 y 20, con tumores residuales de 80, 45, 20 y 25 %, respectivamente, y cuyo resultado por IHQ también resultó como P53 normal.

Los resultados obtenidos pueden observarse al comparar las figuras 5.2a y 5.2b, en las que se puede apreciar que para la paciente 15, se encuentra presente el producto de amplificación del gen *c-ki-ras*, pero no se encuentra presente el correspondiente de *p53*. En contraste, para ningún otro de los pacientes analizados se observó el mismo resultado, ya que si se amplificó *p53*. Por lo anterior pensamos que se presentó una delección de ambos alelos del gen *p53* en la neoplasia de la paciente 15 y por eso no se registra amplificación para el mismo. El resultado de *p53* normal por IHQ concuerda con este hecho, ya que si no existe el gen en la célula, no podrá haber expresión de la proteína y tampoco reacción de ésta con anticuerpos específicos anti-P53, lo que constituye el fundamento de la prueba inmunológica.

5.2 a)

5.2 b)

20

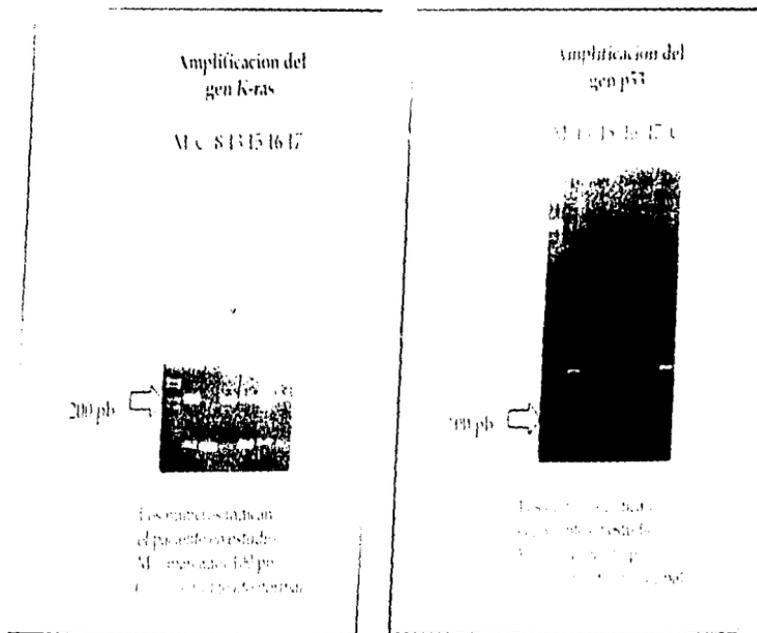


FIGURA 5.2. Comparación entre la amplificación de ADN para el gen *c-K-ras* y el gen *p53* de muestras de pacientes con elevado tumor residual tras la terapia y *p53* determinada como mutada por IHQ (*in vivo*)

c) Determinación de la muestra poblacional para detección de mutaciones en p53 por SSCP.

De esta forma, la población de tumores caracterizadas mediante IHQ del estudio (53,149) cuyas muestras también fueron analizadas por SSCP para los exones 5 al 8 del gen p53, se muestra en la Tabla 5.1.

TABLA 5.1
Pacientes con estudio previo de IHQ
para el análisis del gen p53 mediante SSCP

Paciente	Edad ^a	Sexo	Estadio Dukes	TR ^b	IHQ ^c	ADN ^d
4	22	M	C2	60%	M	BP
5	44	M	B1	10%	M	TF
6	63	F	B1	60%	N	TF
9	61	M	B3	42%	M	BP
10	54	F	B1	50%	M	BP
11	53	M	C3	10%	M	BP
12	65	F	B1	50%	M	BP
13	60	F	C2	80%	N	BP
14	55	M	C2	40%	M	BP
16	29	F	D	45%	N	BP
18	62	F	C2	90%	M	TF
19	52	M	B5	25%	M	TF
24	46	F	B3	75%	M	BP

- a. Edad en el momento de la resección quirúrgica del tumor.
 b. TR: Tumor residual tras la quimio y radioterapia
 c. IHQ: Resultado del Estudio de Inmunoquímica M = P53 mutada
 N = P53 normal
 d. ADN: Origen del ADN extraído para PCR/SSCP.
 BP = Tejido en bloque de parafina
 TF = Tejido fresco, conservado en N2.

Se decidió ampliar la población en estudio, con muestras de pacientes cuyos tumores se mantienen en congelación. Se eligieron 22 pacientes específicamente con cáncer de recto, para tener así un total de 35 individuos en los que efectivamente se llevara a cabo la investigación de mutaciones en los exones 5-8 de p53. Los datos de los pacientes 27 a 48 se muestran a continuación.

TABLA 5.2
 Lista de Pacientes 27 a 48,
 para análisis del gen p53 mediante SSCP

Paciente	Edad ^a	Sexo	Act. T. ^b	Estado Duker ^c	rtx/rqtx ^d
27	76	F	VSAT	B1	
28	44	M	VSAT	B2	X
29	72	F	MSAT	C	
30	58	M	VSAT	B2	
31	71	M	VSAT	B1	X
32	87	F	VSAT	B2	X
33	63	M	MSAT	NEG	X
34	60	M	VSAT	C3	
35	59	F	VSAT	B2	
36	74	M	VSAT	A	
37	66	M	VSAT	B2	X
38	67	M	MCAT	C2	
39	47	M	VSAT	NEG	X
40	78	F	VSAT	IND	X
41	64	F	MCAT	D	
42	53	F	VSAT	B2	X
43	56	F	VCAT	NEG	
44	66	M	VSAT	B2	X
45	66	M	VSAT	B1	X
46	73	M	VSAT	C2	X
47	69	M	VSAT	NEG	X
48	49	F	VSAT	B3	X

a. Edad en el momento de la resección quirúrgica del tumor primario.

b. Actividad Tumoral

VSAT = Vivo sin actividad tumoral

MSAT = Muerto sin actividad tumoral

MCAT = Muerto con actividad tumoral

c. Estado de Duker:

NEG = negativo, el tejido extraído mediante cirugía, no contenía células tumorales.

IND = Estado de Duker indeterminado (pérdida de la pieza tumoral)

d. X = paciente sometido a terapia (quimio/radioterapia) antes de la cirugía.

Aunque para la mayoría de estos pacientes se aplicó un tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia previo a la resección quirúrgica del tumor, no se cuenta con el porcentaje de tumor residual, un parámetro importante por la idea que aporta sobre el comportamiento del tumor primario y la eficacia de la terapia adyuvante. Sin embargo, contamos con otros datos clínicos como es la supervivencia y la presencia o ausencia de actividad tumoral actual.

5.2. Análisis de las muestras por PCR-P³²/SSCP.

a) Determinación de las condiciones de ensayo.

Se sabe que la especificidad y capacidad de la técnica de SSCP depende de la composición del gel, la temperatura ambiente y el potencial o voltaje al cual se someten las muestras (89,90). Por lo tanto, se procedió en primer término a determinar las condiciones óptimas para la identificación de mutaciones en *p53*. Por este motivo la búsqueda de mutaciones se inició con el análisis del exón 8, ya que se cuenta en el laboratorio, con las líneas celulares SW480 y C33, las cuales presentan la mutación G a A en el codón 273, perteneciente a esta región de *p53* (77,130,131) y cuyo ADN sirvió de control positivo de mutación.

Sólo en el exón 8 se pudo contar con el control positivo de mutación, pero hay que recordar que la técnica de SSCP se basa en el cambio de movilidad de las bandas de ADN, por lo que si se emplea un control negativo de mutación (ADN de tejido control normal) es suficiente para determinar la mutación en la región de ADN analizada.

En todos nuestros experimentos posteriores se introdujo un control negativo de mutación (ADN de tejido normal), y un control de amplificación negativo (blanco de agua) para evitar errores de contaminación con ADN o detectar reacciones inespecíficas, lo cual nunca se registró.

Las condiciones de corrida para el gel de SSCP se tomaron de Spinardi y colaboradores (103) y de Faille *et al* (102), sin embargo, fue necesario optimizar la técnicas descritas por estos autores. Se determinó que los geles de acrilamida al 6% con un 5% glicerol (TBE 05X) efectivamente resuelven mejor las bandas a temperatura ambiente, pero no pudimos discriminarlas al utilizar una diferencia de potencial de 30 W (fig. 5.3a) en 3-5 horas de corrida, lo que si sucede al someter las muestras a 3 W por 15-17 horas (fig 5.3b), por lo que todos los experimentos se efectuaron bajo estas condiciones.

Con el objeto de corroborar la presencia de mutaciones, todas las muestras se corrieron por duplicado como mínimo para cada exón.

5.3 a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 c33 SW N b



5.3 b)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 c33 SW N b

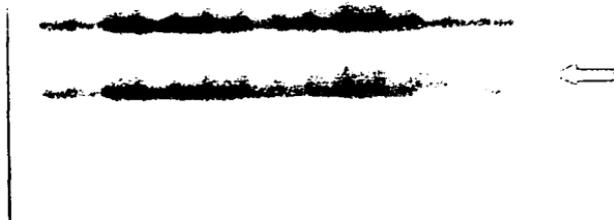


FIGURA 5.3 Determinación de las condiciones de corrida para SSCP (EXON 8) a) Electroforesis en gel a 30 W por 4 horas, b) Electroforesis en gel a 3 W por 15 horas. Controles positivos de Mutación: Líneas celulares SW 480 y C33 (Codón 273)

b) Detección de mutaciones en el exón 8.

Sorprendentemente, y contrario a lo publicado en los análisis correspondientes al exón 8, no se encontró ningún corrimiento diferente al control normal para alguna de las 35 muestras (figuras 5.3b y 5.4)



FIGURA 5.4. EXON 8. No se observan bandas de movilidad alterada de muestras de pacientes, en relación al control normal. La flecha indica la banda mutada del control de mutación SW480 (codón 273, cambio de CGT a CAT) (130). También se muestra el corrimiento del ADN no-desnaturalizado, diferente al de las hebras sencillas.

c) Detección de mutaciones en el exón 7.

- En relación al exón 7, la única mutación que se encontró en las muestras de ADN extraído de bloques de parafina fue en la muestra del paciente 10 (este paciente presentó 50% de tumor residual), lo cual se puede observar en la figura 5.5, carril número 3. En esta figura se puede constatar la dificultad para amplificar ADN a partir de bloques de parafina, ya que no se observa el producto de amplificación en los carriles 7 o 9.

- Se registraron corrimientos electroforéticos alterados en el caso de los pacientes 18 y 48, los cuales indican presencia de una mutación. Esto puede apreciarse en la figura 5.6 con respecto al control normal. Para muestras de los pacientes 36 y 37 (y otra muestra del paciente 48) se presentan de forma similar bandas de corrimiento diferente a las normales en la figura 5.7

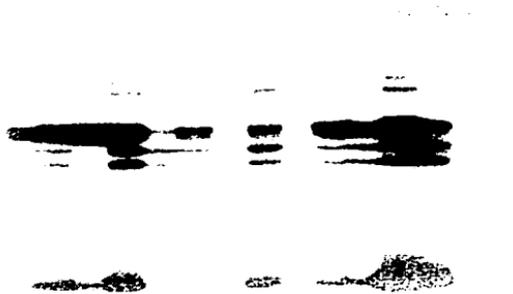


FIGURA 5.5, EXON 7. Autorradiografía del gel de SSCP para muestras de ADN de tejido conservado en parafina

Figura 5.6

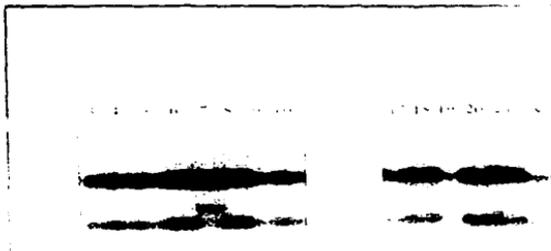


FIGURA 5.6. EXON 7.

Autorradiografía de gel de SSCP

Las flechas indican la movilidad alterada de las bandas mutadas en los carriles 7 y 21 (Pacientes 18 y 48, respectivamente)

FIGURA 5.7. EXON 7.

Los números indican el paciente en estudio. Detalle de autorradiografía de gel de SSCP, donde las flechas indican las bandas mutadas, en relación al control de ADN normal



Figura 5.7

d) Detección de mutaciones en el exón 6.

En el exón 6 sólo se registraron 2 corrimientos diferentes, correspondientes a los pacientes 6 y 31. El caso del paciente 6 es interesante, ya que se encontró a p53 normal por inmunohistoquímica y en el caso del ensayo por SSCP que el gen resultó mutado. Es preciso mencionar que el experimento para este caso se repitió desde la amplificación por PCR para confirmar que efectivamente existe una mutación en el exón 6 de p53 de la paciente no. 6.

Las mutaciones encontradas para el exón 6 se presentan en la figura 5.8.

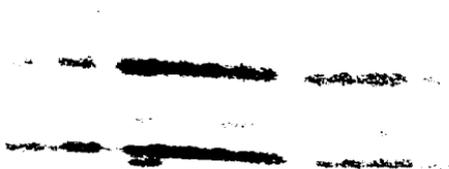


FIGURA 5.8. EXON 6 La flecha indica la posición de la banda que denota la presencia de mutación en los carriles 5 y 14 (Pacientes 31 y 6, respectivamente).

e) Detección de mutaciones en el exón 5.

LOS análisis del exón 5 en tumores de 3 pacientes demostraron posibles mutaciones de $p53$ en esta región altamente conservada en la escala evolutiva. En la figura 5.9 se muestra una fotografía de un experimento de SSCP para este exón. En las figuras 5.10a y 5.10b se muestran en detalle el corrimiento de bandas de ADN para los pacientes 35 y 43, en comparación con los controles normales. Aquí se destaca la importancia de realizar el análisis de SSCP para las muestras al menos dos veces, ya que en ambos casos, las posibles mutaciones son más claras en el segundo gel. De hecho, el indicio de mutación para el paciente 35 observado en la fig. 5.9, carril 5, sólo se pudo confirmar al realizar un segundo PCR y el gel de SSCP correspondiente (Fig. 10.b).

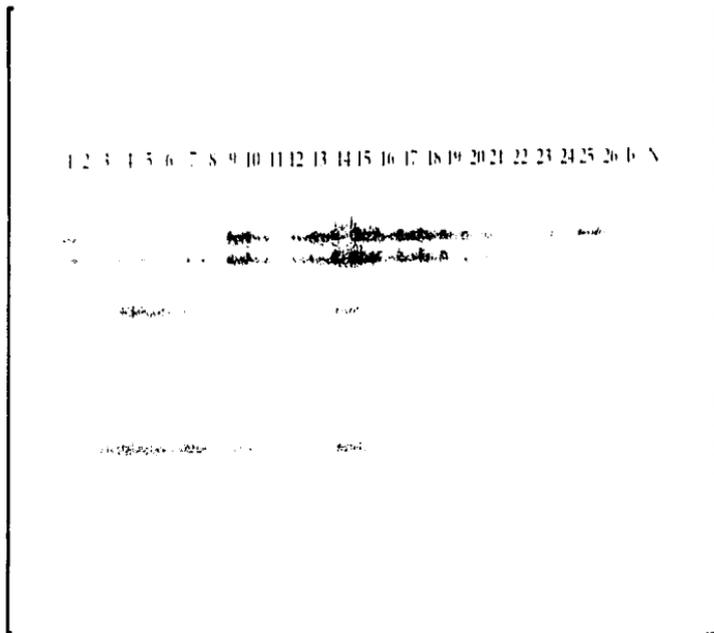


FIGURA 5.9. EXÓN 5. Autorradiografía de un Gel de SSCP, en donde se puede observar el corrimiento electroforético de las hebras sencillas de ADN como conformómeros de estructura tridimensional distinta. En los carriles 5 y 21 puede observarse un indicio de mutación en la parte inferior, lo cual se corroboró al realizar un segundo gel de SSCP.

5.10 a)



5.10 b)



FIGURA 5.10. Detalles del segundo gel de SSCP realizado para el exón 5 de p53

Los números indican al paciente en estudio y las flechas la presencia de bandas mutadas en relación al ADN de tejido normal. a) Mutación encontrada para el paciente No. 35

b) Doble banda que denota la mutación de p53 en el tumor del paciente No. 43

En resumen, los experimentos realizados con ADN de 35 tumores de recto para la detección de mutaciones en el gen *p53*, en su región más conservada, exones 5-8, nos proporcionan los siguientes resultados (Tabla 5.3):

TABLA 5.3

Relación de mutaciones encontradas por SSCP en el gen *p53* en la muestra de tumores de población mexicana con cáncer de recto estudiada.

Paciente	Edad / Sexo	Mutación en:	Estadio Dukes.	Act. Tumoral
6	63 / F	EXON 6	B1	VSAT
10	54 / F	EXON 7	B1	VSAT
18	62 / F	EXON 7	C2	VSAT
27	76 / M	EXON 5	B1	VSAT
31	71 / M	EXON 6	B1	VSAT
35	59 / F	EXON 5	B2	VSAT
36	74 / F	EXON 7	A	VSAT
37	66 / M	EXON 7	B2	VSAT
43	56 / M	EXON 5	Neg	VCAT
48	49 / F	EXON 7	B3	VSAT

Si a los resultados anteriores añadimos como alteración del gen la posible delección total de *p53* en la paciente 15, tenemos a 11 pacientes con anomalías en el gen *p53*, de un total de 35 en estudio, lo que corresponde a 31.4 % en la muestra de población analizada

Aproximadamente la tercera parte de las neoplasias de recto, entonces, contienen una alteración en este gen supresor tumoral en la región conservada (exones 5-8).

Capítulo 6
Análisis de Resultados

CAPITULO 6: ANALISIS DE RESULTADOS

I. Comparación de las técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ) y Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) en la detección de mutaciones de p53.

Por SSCP se analizaron muestras de ADN de tumores de 13 pacientes a los que también se les analizó por IHQ el estado funcional de p53 (53, 149). Se detectó alteración para 4 muestras, entre ellas sólo 2 en las que se definió a P53 mutada por inmunohistoquímica (53, 149) Estos datos confirman otros en los que se comparan ambos tipos de metodologías, ya que los resultados siempre resultan dispares. Por lo general, las técnicas de IHQ detectan más muestras supuestamente mutadas que las técnicas de biología molecular (tabla 6.1) en diversos tipos de cáncer (93, 132, 133)

TABLA 6.1
Comparación entre Técnicas de IHQ y Biología Molecular para detección de p53 mutado en tejido tumoral

Autor / Año	Tipo de Cáncer	% Muestras Mutadas IHQ	% Muestras Mutadas Biol. Mol.
Leahy D. et al (93) 1996	Colorrectal	52	41 (SSCP)
Martínez-Delgado et al (132) 1997	Linfoma	18	7 (Sec Directa)
Coggi G et al (133) 1997	Carcinoma Esofágico	57	53 (SSCP)
Arriola E L. et al (149) 1997	Rectal *	50 (13/26)	-----
Solano A et al (150) 1997	Rectal *	-----	31 (4/13) (SSCP)

* Es la misma población bajo estudio.

Cabe señalar que en la mayoría de las muestras en las que se determinó mutación de P53 por IHQ, se confirma la alteración por técnicas moleculares con mayor grado de sensibilidad, pero también se presentan casos en que no hay detección por acumulación de proteína mediante IHQ y se registran alteraciones a nivel genético.

La anterior, puede explicarse de varias formas:

1) Las técnicas de Inmunohistoquímica por lo general se realizan en cortes de tejido embebido en parafina, por lo que muchas veces se presentan reacciones cruzadas o inespecíficas de los anticuerpos con artefactos celulares producidos durante el proceso de fijación y conservación de la biopsia o muestra del tumor, o con otras proteínas celulares (97,98). La reacción depende en mucho de los anticuerpos utilizados y de la metodología empleada

2) A pesar de que la localización celular normal de P53 (aunque se encuentre mutada) se supondría, es en el núcleo (21,53), existe bibliografía abundante en la que se describe la detección de P53 por IHQ en el *citoplasma* (34,36,39,131). Lo anterior ha llevado a proponer que una forma en la que las células tumorales pueden inactivar a p53 sin mutación del gen, es impidiendo la entrada de P53 a su principal sitio de acción, el núcleo. En varios estudios publicados se señala que la acumulación de P53 detectada en las células tumorales se presenta en el citoplasma.

Los mecanismos que propician la entrada o salida de P53 del núcleo son desconocidos, pero se ha especulado que juegan un papel importante en la regulación de la actividad de la proteína, al pasar de una forma latente a una activa, con el cambio de compartimento celular(36,39).

3) Pueden existir proteínas celulares o de origen viral, algunas tal vez aún desconocidas, que estabilizan e inactivan a P53 (recordemos a Mdm2 y SV40-

TL, por ejemplo (36)), aumentando con ello el tiempo de su vida media, acumulándose P53. Un ejemplo de ello es la sobreexpresión de metalotioneínas que se ha demostrado complejan el Zn y con ello, anulan la formación correcta del dominio de unión a ADN de P53 (36). Estas formas de inactivación podrían ser otra causa para observar una tinción positiva para la proteína, sin estar mutado el gen. Esto es muy importante, ya que por IHQ se estaría evaluando, de todas formas, la presencia de una proteína incapaz de llevar a cabo sus funciones normales

4) Es posible que se tengan resultados positivos de mutación con técnicas de Biología Molecular, pero negativos por IHQ. Esto dependería de la conformación tridimensional que adopte la proteína P53 mutada y del anticuerpo utilizado en la prueba inmunológica, ya que existen epitopes típicos de una P53 normal y otros que solamente se expresan cuando se encuentra presente determinada mutación puntual. Ya que se ha descrito la presencia de varios tipos de P53 mutada con distinta conformación estructural del dominio central, se prefiere utilizar en las pruebas de IHQ anticuerpos (como Ab1801) que se unan al extremo amino o carboxilo, ya que la estructura terciaria de estas regiones generalmente no se ve afectada por la mutación puntual en la región central (21,77,93). El empleo de tales anticuerpos también sirve para detectar acumulación anómala de P53 normal (39)

II. Correlación de los datos clínicos de los pacientes y la detección de mutaciones en p53.

1) En las muestras de ADN de 10 pacientes se detectó la presencia de una mutación en la región conservada del gen p53 mediante SSCP. En 7 de estos pacientes, se determinó un estadio B de Dukes, el cual indica que existe invasión de la pared intestinal, por parte del tejido tumoral. Es probable que la alteración de p53 contribuya en el avance de la malignidad de las células neoplásicas del tumor primario y les haya conferido capacidad invasiva. Es

también probable que por este motivo los pacientes hubieran presentado metástasis si no se hubiera extirpado el tumor. La intervención quirúrgica oportuna se refleja en el hecho de que la mayoría de los pacientes en los que se detectó una mutación de $p53$, se encuentran vivos y sin actividad tumoral (TABLA 5.3).

Es interesante hacer notar que en investigaciones como la correspondiente a Zhang y colaboradores (83) o a Leahy *et al* (93) con diferentes poblaciones bajo estudio, también se ha relacionado la presencia de mutaciones en $p53$ con un estado de Dukes B o C, en forma preferencial en relación a las etapas A o D de Dukes.

2) Para 5 de las 10 muestras en que se determinó una mutación para $p53$, ésta se presentó en el exón 7. Una vez más se confirma que esta región se encuentra selectivamente alterada en las células neoplásicas y esto se debe a su importancia en la unión al ADN, que media las funciones de P53 como vigilante del ciclo celular y ejecutor de apoptosis (24,33,79)

3) Aunque no se tienen los datos del tumor residual para todos los pacientes, en investigaciones previas ya se ha demostrado la utilidad de este parámetro en relación con la determinación del estado funcional de P53 y la efectividad de la terapia pre-operatoria (53,149). La presencia de mutaciones de $p53$ en los pacientes 6, 10 y 18, para los que se determinaron valores de 60, 50 y 90% de tumor residual, respectivamente, ratifica que un tumor residual alto se asocia a la alteración de $p53$, ya que los mecanismos por los cuales la quimio y radioterapia producen apoptosis de las células tumorales, son ejecutados en buena parte a través de este gen supresor de tumores.

En el caso de encontrar mutaciones en el gen, pero falta de positividad en las pruebas de IHQ, como se determinó para la paciente no. 6 en este estudio, y

que además concuerda con un tumor residual alto (60%), es probable que la mutación, por encontrarse en el dominio de unión al ADN, anule las funciones normales de p53 al cambiar la conformación tridimensional de la proteína (33,78,83), y cambie la estructura de los epítopes o regiones de unión de los anticuerpos seleccionados para IHQ. En el caso de la paciente 6, es probable que haya cambiado la conformación del epítipo localizado entre los aminoácidos 32 y 79, que es el que reconoce el anticuerpo 1801 con el cual se llevó a cabo la prueba de IHQ en la muestra (53). Esta posibilidad queda abierta ya que es necesario realizar la secuencia de la región afectada, y verificar cuál es el cambio de aminoácido o aminoácidos, para poder proponer que efectivamente se altera de forma tal la estructura de la región central de la proteína (dominio de unión al ADN), que incluso el extremo amino-terminal se ve afectado.

4) Entre los casos que arrojaron resultados interesantes, se encuentra el de la paciente 15, una joven de 18 años al momento de la intervención quirúrgica en cuya muestra de tumor no se detectó P53 mutada por IHQ (53,149), pero tampoco se pudo demostrar la presencia del gen p53 (Ver Resultados).

La determinación por IHQ de la funcionalidad de P53 en células tumorales, se basa en la detección por acumulación de la proteína. Por lo general, la proteína P53 que se acumula es mutante con un tiempo de vida media mayor a la normal, ésta posee un tiempo de vida media muy corta y por ello se encuentra en cantidades muy pequeñas en una célula común y corriente (21,96,97). Pero si se presenta una delección total de ambos alelos, no se produciría proteína P53 y por ende, la IHQ resultaría negativa y la interpretación de esta prueba sería que la proteína P53 (y el gen que le da origen) es normal (98,138).

En este trabajo no se pudo demostrar la existencia del gen p53 de la paciente 15, sin embargo si se demostró la presencia de ADN por amplificación de otra

región del genoma, la del gen *c-Ki-ras*. Esto nos lleva a pensar en una marcada agresividad e inestabilidad genética de las células del tumor en la paciente, provocada por una delección o pérdida de la región 17p de ambos cromosomas (delección total del gen *p53*), ya que posteriormente presentó cáncer recurrente y muerte a una edad temprana. Recordemos que existen síndromes hereditarios para cáncer, asociados en su mayoría a una predisposición a inestabilidad genética mediada por la inactivación de supresores tumorales como *p53*, *BRCA1* y *BRCA2* (19,21).

Este caso, extremadamente raro, nos lleva a reflexionar sobre la importancia que tiene, además de la prueba de IHQ, el realizar una prueba a nivel genético de un marcador tumoral tan importante como *p53*. A este respecto, podemos decir, al igual que otros autores (93,133), que la IHQ en realidad es una técnica más práctica y de menor costo que las pruebas moleculares para describir el estado de *p53* en una célula, pero es necesario asociar los datos clínicos al resultado de la prueba molecular o inmunológica para poder emitir un pronóstico más acertado en relación a la evolución del paciente.

6) En el caso de la paciente 43, resultó ser el único en el que se detectó mutación de *p53*, aunque histopatológicamente no se detectaron residuos de tumor. Por ello se le asignó un estadio negativo de Dukes a la pieza, ya que el examen del tejido recolectado en cirugía no pudo establecer la presencia de células tumorales en el mismo.

En este caso se pone de manifiesto la importancia de realizar un análisis a nivel molecular, de genes supresores de tumores u oncogenes del tejido extraído en cirugía, además de utilizar las técnicas convencionales de histopatología para establecer la eliminación total de todas las células tumorales mediante la combinación de quimio y radioterapia adyuvantes a la extracción quirúrgica del tumor. Es muy probable que las células observadas al microscopio hayan

poseído alteraciones moleculares en *p53* a pesar de haber presentado una morfología "normal". Este tipo de casos ya ha sido comentado en la literatura, en donde se pone de manifiesto la posibilidad de que se presente un tumor recurrente en el mismo lugar de origen del tumor primario, debido a tales alteraciones genéticas (128).

III. Comparación de la frecuencia de las mutaciones de *p53* en encontradas en relación a otros estudios de cáncer colorrectal.

La presencia de mutaciones en la muestra de población estudiada, es de 31.4% (11/35), lo cual concuerda con los resultados de otros estudios recientes, y para los cuales también se ha empleado el método de SSCP y/o la técnica de secuenciación directa para detectar mutaciones de *p53* en su región altamente conservada (exones 5 a 8), en muestras de tumores de pacientes con cáncer colorrectal (83,134,135). En estos estudios se reporta un nivel de mutaciones de *p53*, de alrededor del 30% (TABLA 6.2).

Es importante señalar que los datos de los estudios de la tabla 6.2, se encuentran por debajo de lo informado en otros estudios realizados a principio de los 90 (27,77), ya que estos señalaban que la mutación en *P53* para tumores colorrectales y del tracto digestivo era del orden del 50%. Una diferencia importante a tomar en cuenta entre tales estudios y los señalados en la tabla 6.2, es que en los primeros el origen de las células neoplásicas no era de tumores de pacientes, sino principalmente de líneas celulares (77,130,138).

Esto es muy importante, ya que como se ha mencionado en la parte de antecedentes (capítulo 2), no tan sólo para cáncer colorrectal sino también para otros tipos de cáncer, el porcentaje de mutaciones para *p53* es incluso del doble para células en cultivo que para células de tumores humanos. Esto puede

señalar a la inactivación de *p53* por mutación como uno de los principales responsables de la inmortalización de células en cultivo (138)

TABLA 6.2
Estudios de Análisis de Mutaciones de *p53* (Dominio Central)

Autor	No. de Casos Estudiados	Tipo de Tumor	Técnica	% de mutación encontrado
Zhang J.S et al (83) 1997	40	adenocarcinoma colorrectal (Dukes C)	SSCP	35%
Leahy D. et al (93) 1996	66	carcinoma colorrectal	SSCP	41%
Hanski C. et al (134) 1996	16	carcinoma colorrectal mucino	secuencia directa	31%
Frogatt N.J. et al (135) 1995	35	carcinoma colorrectal	secuencia directa	22%
Lin S.Y. et al (136) 1995	42	carcinoma colorrectal	RFLP	14%
Lim B.H. et al (137) 1996	116	carcinoma gástrico	SSCP	28%
Solano A. et al (150) 1997	35	carcinoma rectal	SSCP	31.4%

El porcentaje de mutaciones encontrado en el presente trabajo, por lo tanto, confirma y extiende los resultados de los estudios citados en la tabla 6.2. Estos podrían representar datos más confiables con respecto a lo que sucede sobre la frecuencia de mutaciones en *p53* en tumores colorrectales humanos, y que sería menor en relación a lo publicado en los primeros trabajos sobre caracterización de *p53* y en los que se utilizaron líneas celulares (124). Esto no resta importancia a la función de *p53*, ya que la mutación puntual del gen no es la única forma de inactivar la proteína *in vivo* (29,34,38).

Aunque la técnica de SSCP no detecta el 100% de las mutaciones, se reconoce que una vez optimizadas las condiciones de corrimiento del gel se tiene un mínimo de 90% de sensibilidad y especificidad (78). Es posible que en algunas muestras de tumores las mutaciones de *p53* hayan escapado a la detección en nuestro estudio al igual que en otros. Si bien han surgido técnicas alternas para detectar mutaciones de forma cualitativa, se sigue prefiriendo a la SSCP como metodología de elección para detectar mutaciones de manera eficiente en muestras de archivo (como los bloques de parafina) para estudios retrospectivos, y en muestras de tejido fresco para estudios prospectivos (93,105)

Como puede observarse de la tabla 6 2, el análisis por RFLPs, consistente en el corte de secuencias específicas de ADN mediante enzimas de restricción, detecta los niveles más bajos para frecuencia de mutación en *p53*. Esto se debe a la naturaleza de la metodología empleada, ya que se restringe el análisis del gen, a las regiones de los codones más frecuentemente mutados, y esta metodología no puede ser aplicada en muestras de una población para la cual no ha sido caracterizada la frecuencia de mutaciones en *p53*, lo cual es el caso de este trabajo. Por esto es que la técnica de SSCP se presenta como la mejor opción para analizar una cantidad apreciable de ADN de tumores

Es posible que la subpoblación de células neoplásicas del tumor primario con mutaciones de *p53*, aumente en número conforme avanza la malignidad del tumor. Esto lo corrobora la asociación de la mutación en *p53* con los estadios de Duke B y C, (83,93), incluidos los resultados de este trabajo.

IV. p53 y la inactivación de su función.

p53 no necesariamente se inactiva por mutación.

En nuestro estudio encontramos que la tercera parte de los tumores analizados presentan una anomalía en la región conservada de p53. Esto se relaciona con un mal pronóstico para los pacientes que presentan este tipo de tumores (93,94). Lo anterior no significa que en el resto de las muestras de tumores en los que no se registraron mutaciones, las funciones de p53 como regulador del ciclo celular e inductor de apoptosis, se encuentren completamente intactas. p53 tiene a su cargo la activación de varias señales bioquímicas que pueden ser dañadas y nulificadas a otros niveles, y no necesariamente por la inactivación directa de este gen (29,39). Es probable que la alteración de p53 sea un requerimiento esencial para que los tumores alcancen cierto nivel de desarrollo y malignidad (29,31,78).

A) Si p53 no está mutado, ¿Cómo se inactivan las vías en que participa?

1.- Como sabemos, muchos de los mecanismos en los que se involucra a p53 aún no se esclarecen, pero en el caso de la detención del ciclo celular en G1/S mediado por P21/Waf, la inactivación indirecta de la función de este supresor tumoral puede presentarse al menos, de dos formas:

- a) Una cuarta parte de todos los cánceres humanos registran durante su evolución, la alteración (por mutación o delección del gen correspondiente) de supresores tumorales como Rb y P16 (34), y/o la amplificación o sobreexpresión de CDK4 y de la ciclina D, proteínas que intervienen en la fosforilación de Rb, y de esta forma se puede contrarrestar la actividad de P21 (30,35,56,70)
- b) Ya se han descrito mutaciones en el gen waf/cip1 (que codifica para P21), en células de cáncer de piel y esto resultaría un método novedoso de inactivar la función de p53 (139).

2.- La interacción de P53 con otras proteínas es de valor para que se produzca a) el reconocimiento del daño al ADN, y b) detención del ciclo o apoptosis, ambos procesos en los que p53 toma parte (42,55,70,130). La disfuncionalidad de genes involucrados con la maquinaria de reparación de ADN, o con el reconocimiento del daño al material genético y cuyas proteínas interaccionan con p53 podría también interferir con el correcto desempeño de esta proteína. El establecer sólidamente las vías de participación de p53, permitirá conocer e identificar a genes que al ser dañados, no ejecutarán las funciones y que éste supresor tumoral activa.

3.- Inactivación de P53 silvestre por proteínas virales. Resulta muy interesante, cómo ciertos virus han desarrollado mecanismos específicos a través de los cuales se anula a P53 y sus funciones. Ejemplos de ello, se describen a continuación:

a) Se sabe que las proteínas E1B y E4orf6 de adenovirus, se unen al extremo amino y carboxilo terminal respectivamente de P53 (140) impidiendo su unión al ADN.

b) El virus de papiloma humano, HPV, señalado como el agente etiológico del cáncer cérvico-uterino (71,131) produce la proteína E6, que se une a P53 y la presenta activamente al sistema de degradación por ubiquitina (49,141). Es muy curioso que los tipos de HPV con mayor potencial tumorigénico, los tipos 16 y 18, sean los productores de una proteína E6 con una afinidad más alta por P53, que los tipos de HPV de menor riesgo en relación al cáncer y que también producen una proteína E6, cuya afinidad por P53 es menor (141).

c) En fechas recientes se ha identificado a una proteína codificada por el genoma del virus de la hepatitis B, HBV, denominada antígeno X, que se sobreexpresa en las células infectadas y que se une a la región amino terminal de P53, en forma similar a E1B y a E6 (27,142). Parece ser que la presencia del virus de la hepatitis B, agrava o sinergiza los efectos que el alcohol y los carcinógenos ambientales pudieran tener sobre la aparición de células

tumorales en el hígado. Todo indica a que esto realmente sucede, ya que buena parte de la regulación del ciclo y división celulares efectuada por P53 en los hepatocitos, podría ser anulada mediante HBV-X.

A) La anulación total de p53, así como las mutaciones presentes fuera de la región central no son una vía principal para inactivar las funciones de este supresor tumoral.

Este estudio confinó la búsqueda de mutaciones en el gen p53 a 4 de sus 11 exones (5 a 8), que corresponden a la región central de la proteína, de vital importancia para las funciones de la proteína, ya que constituye los dominios L2, L3 y LSH que interactúan directamente con el ADN (33). La secuencia de los exones 5 al 8, como se ha descrito en una extensa literatura, es la más frecuentemente alterada, con sólo pocas mutaciones puntuales reportadas para los exones 4, 9 y 10, y prácticamente ninguna para los exones 1,2,3 y 11 (78,80,81).

Si bien en estos últimos exones se ha encontrado una baja frecuencia de mutaciones, no se puede descartar que en las muestras analizadas por nosotros como las reportadas por otros autores puedan existir mutaciones en tales regiones del gen. Tampoco podemos excluir la presencia de mutaciones en regiones intrónicas. Las regiones intrónicas de p53 como se señaló en la sección 2.3., no han sido objeto de un análisis profundo para mutaciones (79,81), por lo que no se puede descartar completamente que se inactive a la proteína por una mutación puntual o sin sentido, o incluso deleciones o inserciones que alteren el marco de lectura durante la traducción, y esto elimine el control que ejerce p53 sobre la regulación del crecimiento celular. Ahora bien, el porcentaje de estas neoplasias, debe de ser pequeño, independientemente del tipo de cáncer en estudio, y las razones para ello, aunque ya se han expuesto se retoman a continuación:

i) La mayoría de los estudios realizados para la búsqueda de mutaciones en *p53* se limitan a los exones 5-8, o en los exones 4 al 9, debido a que es la región más conservada en relación a la escala evolutiva para *p53*. Esta región señalada como "blanco" de mutaciones en los primeros estudios (31), y confirmada en trabajos de investigación más recientes que aportan datos tanto contundentes como concluyentes (55,56,62) Estos trabajos vuelven a subrayar la singularidad de la región central, ya que al alterar su conformación se pierde toda capacidad para inducir apoptosis, y la puesta en marcha de mecanismos de detención del ciclo, en los que se vé involucrada al estimular o reprimir la expresión de otros genes

ii) Ya que la mayoría de los sitios CpG de la región central (y del resto de *p53*) se encuentran constitutivamente metilados, al menos en células tumorales como lo han establecido sólidamente varios grupos de investigación (84,85,143), es mayor la probabilidad de que ocurra una transición G a T en CpG, que de que ocurra cualquier otro tipo de mutación o daño al ADN (como inserción o delección que alteren el marco de lectura) Es posible que existan sitios CpG mutados en regiones intrónicas de *p53*, pero esto no ha sido caracterizado a la fecha.

iii) Jernvall y colaboradores en base a un estudio reciente (144), proponen que en cáncer colorrectal *distal*, la frecuencia de mutaciones en la región central del gen *p53* es mayor que en los tumores de otras regiones del colon. Una observación acertada de los autores que apoya los resultados de su estudio, es que los cánceres del recto, son mucho más agresivos y recurrentes que los del colon proximal, y que este comportamiento, *debe asociarse* a la alteración del dominio central de *p53*.

IV. Perspectivas.

1. Secuenciación de las muestras positivas para mutación por SSCP.

Las muestras identificadas en este estudio como mutadas por SSCP, serán confirmadas por secuencia directa. El análisis de la secuencia nos permitirá establecer qué tipo de mutación puntual se halla presente en cada muestra, ya sea transición o transversión. Es de esperarse que sean más comunes las mutaciones tipo transición, ya que en el caso del gen *p53* como lo hemos señalado reiteradamente, se ha observado un patrón de metilación constitutivo en sitios CpG (84,85,143).

Dado que se trata de una población diferente a las analizadas en otros estudios (92,93), queda abierta la posibilidad de que los resultados de la secuencia arrojen resultados distintos de los publicados hasta ahora. El conocer el tipo de mutación presente en *p53* es importante ya que podría ayudar a esclarecer si algún carcinógeno pudiera estar involucrado en la génesis de cáncer de recto en nuestra población.

A diferencia de lo reportado en otros trabajos, la falta de candidatos a mutación en el exón 8, es interesante ya que se ha descrito a la mutación en el codón 273 (la más frecuente en este exón [78,80]) como una mutación que no anula sino en un mínimo las funciones de *p53* (55), ya que el residuo de arginina en la posición 248 es un punto de contacto de *p53* con el ADN, y la mutación no altera la estructura terciaria de la proteína. La mutante en el codón 273, por tanto, *aún* retiene cierta capacidad de unión al ADN. Una ausencia de mutaciones en el exón 8 como es el caso de los resultados del presente trabajo, indicaría que tal vez en nuestra población las mutaciones en *p53* sean más selectivas y de tipo más agresivo al alterar regiones de la proteína *p53*, que sean más determinantes en la unión al ADN. El análisis de la secuencia nos permitirá determinar esto con exactitud.

2) ¿ Se encuentra P53 anulado por virus en cáncer de recto ?

Al tratar de explicar el origen y las causas del cáncer de recto, resulta importante tomar en cuenta la existencia de virus, como HPV, que pueden causar neoplasias (u otro tipo de enfermedades anogenitales) inactivando directamente a p53 (145). Además de cáncer cérvico-uterino, varios estudios también señalan al HPV como un participante activo en la aparición y desarrollo de cáncer anal (146,147,148). Debido a la relación anatomofuncional que guardan el ano y el recto ¿ No podría ser el virus del papiloma un participante activo en el origen de la neoplasia rectal de ciertos individuos ? Esta es una posibilidad interesante, sustentada en parte por dos hechos relevantes .

a) Se ha demostrado la presencia del virus del papiloma en tumores de cáncer anal de individuos jóvenes, generalmente con un comportamiento sexual promiscuo (146)

b) La tasa de cáncer anorrectal en E U aumentó en forma considerable a finales de la década de los 1980 Este dato se asocia a la infección con HPV, de la población afectada por ese tipo de cáncer

Las datos surgidos de nuestro estudio y de otros (tabla 6 1), demuestran que el gen p53 se encuentra normal en buena parte de las muestras analizadas Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas E6 de los virus del papiloma inactivan a la proteína de p53 (49,131,141), y este hecho presupone la aparición de un fenotipo celular transformado (neoplásico) debido a la anulación de las muy importantes funciones de este supresor tumoral En individuos jóvenes (menores a 50 años) con cáncer de recto, por lo tanto, tal vez sea la infección con HPV la causante activa de la enfermedad en algunos casos Y ya que la gran mayoría de individuos con cáncer de recto son mayores de 50 años, tal vez una infección por HPV, u otro tipo de virus o microorganismos durante el transcurso de su vida, haya promovido la aparición de la neoplasia.

Estas son sólo suposiciones, por lo que se pone de manifiesto la importancia de realizar un proyecto de investigación con muestras de tumores de recto, para determinar si existe o no infección por HPV asociada a la neoplasia rectal, tanto en nuestra población como en otras.

3. Investigación de mutaciones de *p53* en tumores secundarios (metástasis).

Los resultados de varios estudios (82,83,92,137) indican que los tumores provocados por metástasis presentan una mayor frecuencia de mutaciones en *p53* en relación al tumor primario. Esto apunta nuevamente a la existencia de subpoblaciones celulares en un mismo tumor (Teoría de la Heterogeneidad Clonal). Al alterar la función de *p53* mediante mutación del gen, aparece un fenotipo celular tumoral más agresivo. La proteína mutante actúa como dominante oncogénica (33,34,37), y además se ha descrito que las células con *p53* mutado promueven angiogénesis (75), y se liberan a la circulación e invaden nódulos linfáticos y tejidos distantes con mayor facilidad que células tumorales en las que *p53* no está mutado (76,82).

Lo anterior resulta interesante, y son escasos los estudios efectuados a la fecha, en los que además del tumor primario, se analizan las neoplasias secundarias para buscar mutaciones de *p53*. Esto puede ser debido a la dificultad para identificar y obtener muestras de metástasis. En la población estudiada por nosotros, sólo se contaba con la muestra de tumor primario. Sería interesante y conveniente que en estudios posteriores en tumores de cualquier tipo de cáncer, se pudiera detectar y caracterizar la mutación de *p53* tanto en el tumor primario como en las metástasis de los pacientes y comparar ambos tipos de neoplasia. Esto ha sido reportado por Zhang (82) y Bertorelle (83) en estudios en los que efectivamente se ha encontrado asociación de mutaciones específicas de *p53* con metástasis en cáncer colorrectal.

Capítulo 7

Conclusiones

CAPITULO 7 : CONCLUSIONES

- En la muestra de pacientes mexicanos con cáncer de recto estudiada, la frecuencia de mutaciones del gen *p53* en su región conservada (exones 5-8) es de un 31.4 %, lo cual se encuentra de acuerdo con lo informado para otras poblaciones en estudios recientes, y también con el avance del tumor según la clasificación de Dukes, que asocia la mutación de *p53* con los estadios B y C de cáncer colorrectal. Sin embargo, es interesante el hecho de que no se presentaron mutaciones en el exón 8, que alberga el codón 273, frecuentemente mutado en otras poblaciones

- La importancia de *p53*, discutida y demostrada en una extensa bibliografía, como un gen supresor de tumores, nos hace sospechar que si bien no existe una mutación en el gen que altere directamente a la proteína en la mayoría de los casos, si es probable que en los tumores analizados la función antitumoral de la proteína normal, sea anulada por oncoproteínas celulares o de origen viral: La disparidad entre los resultados obtenidos para el grupo de muestras analizado en común tanto por IHQ en un estudio previo como por SSCP, bien puede ser explicada por la existencia de mecanismos celulares oncogénicos en que se acumule a una *P53* latente o inactiva (normal), sin tener que mutar necesariamente al gen. Como ejemplo tenemos la descripción de la alteración del transporte de *P53* del citoplasma al núcleo, y el *splicing* incorrecto de la proteína.

- El empleo de la técnica de SSCP nos permitió identificar claramente mutaciones en la región conservada del gen de *p53*, en ADN de los tumores estudiados. Un análisis molecular del gen fuera de ésta región, no aportaría un número de alteraciones importante, ya que en la literatura se reportan como escasas.

Capítulo 8 **Bibliografía**

CAPITULO 8 : BIBLIOGRAFIA

- 1) GARDNER Eidon J., SIMMONS Michael E., SNUSTAD D. Peter.
Principles of Genetics, 8th Edition. John Wiley & Sons, N.Y., 1991.
 - a) Capitulo 5: "Genetic Material: Properties and Replication"
 - b) Capitulo 11: "Mutation"
 - c) Capitulo 17: "Genetic Control of Cell Division: Oncogenes and Protooncogenes"
- 2) LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKY S.L., MATSUDAIRA P. ,
DARNELL J. *Molecular Cell Biology, 3rd Ed* Capitulo 26, "Cancer".
Scientific American Books, N Y , 1995
- 3) FREI, Emil. *Biología del Cáncer.* Scientific American Medicine, Sección 13
(Oncología), subsección III. Sc Am Inc / Cia Médica Latinoamericana, México, 1989.
- 4) FIDLER Isaiah, ELLIS Lee M *The implications of angiogenesis for the biology and
therapy of Cancer Metastasis* Cell 79 185-188, 1994
- 5) FOLKMAN, Judah. *Fighting Cancer by Attacking Its Blood Supply.*
Scientific American Special Issue: "What you need to know about Cancer":
116-119, Septiembre 1996
- 6) DREWS Reed E., SCHNIPPER Lowell E. *Development of Tumor Heterogeneity,*
Capitulo 18, Comprehensive Textbook of Oncology, 2nd. Edition. A.R. Moosa, Ed
Williams & Wilkins, Baltimore 1991
- 7) RUOSHLATTI, Erkki. *How Cancer Spreads* Scientific American Special Issue
42-47, Septiembre, 1996
- 8) WEINBERG Robert A. *How Cancer Arises.* Scientific American Special Issue
32-40, Septiembre, 1996.
- 9) WHITE R.L., CAVANEE W.K *The Genetic Bases of Cancer.*
Scientific American 50-57, Marzo 1995.
- 10) CARBONE David P. *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes.*
Hospital Practice 77-85, Junio 1993.
- 11) SHAY J.W. *Telomerase assays in the diagnosis and prognosis of cancer.*
Proceedings of the AACR 38, 658-659, 1997.
- 12) WHITE Robert J. *Regulation of RNA polymerases I and III by the retinoblastoma
protein: A mechanism for Growth Control?*
Trends in Biochemical Sciences 22: 77-80, 1997.

- 13) WEINBERG Robert A. *Oncogenes y los mecanismos de la carcinogénesis*. Scientific American Medicine, Sección 13 (Oncología), subsección II. Sc. Am. Inc. / Cia. Médica Latinoamericana, México, 1989.
- 14) BISHOP J. Michael. *Cancer: The rise of the genetic paradigm*. Genes & Development 9, 1309-1315, 1995.
- 15) AMES Bruce N, SHIGENAGA Mark K., SWIRSKY Lois. *DNA lesions, inducible DNA repair and cell division: Three key factors in mutagenesis and carcinogenesis*. Environmental Health Perspectives 101 (Suppl 5):35-44, 1993.
- 16) SCHWAB Manfred, AMLER Lukas C. *Amplification of cellular oncogenes: A predictor of clinical outcome in human cancer*. Genes, Chromosomes & Cancer 1:181-193, 1990.
- 17) WEINBERG Robert A. *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell 81, 323-330, 1995.
- 18) HAHN Stephan A., SCHUTTE Mieke, HOQUE Shamsul, MOSKALUK Christopher et al. *DPC4, A candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q.21.1*. Science 271 350-353, 1996.
- 19) KINZLER Kenneth W., VOGELSTEIN Bert. *Gatekeepers and Caretakers*. Nature 386 761-763, 1997.
- 20) HEDRICK Lora, CHO Kathleen R., VOGELSTEIN Bert. *Cell Adhesion Molecules as tumor suppressors*. Trends in Cell Biology 3.6-39, 1993.
- 21) *The Oncogene Handbook: Tumor Suppressor Genes*. Robert Hesketh, Editor. Associated Press, N.Y., 1994.
- 22) SMITH Martin, FORNACE Albert. *Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis*. Mutation Research 340: 109-124, 1996.
- 23) DUKE Richard., OJCIUS David M. *Suicidio celular, en la salud y en la enfermedad*. Investigación y Ciencia, 44-52, Febrero 1997.
- 24) HOLLSTEIN Monica, SIDRANSKY David, VOGELSTEIN Bert, HARRIS C.C. *p53 Mutations in Human Cancers*. Science 253: 49-53, 1991.
- 25) HOLLSTEIN M., RICE K., GREENBLATT M.S., SOUSSI T. et al. *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines*. Nucleic Acids Research 22: 3351-3355, 1994.
- 26) KOSHLAND Daniel. *Editorial: (p53) Molecule of the Year*. Science 262: 1953, 1993.
- 27) BAKER Suzanne J., PREISINGER A.C., JESSUP J.M., PARASKEVA Christos et al. *p53 mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis*. Cancer Research 50: 7717-7722, 1990.

- 28) CAMPO E., De LA CALLE-MARTIN O., MIQUEL R., PALACIN A. *et al.* *Loss of Heterozygosity of p53 Gene and p53 Protein expression in human colorectal carcinomas.* Cancer Research 51: 4436-4442, 1991.
- 29) GOTTLIEB Tanya, OREN Moshe. *p53 in growth control and neoplasia.* Biochimica et Biophysica Acta 1287: 77-102, 1996.
- 30) LEVINE A.J., MOMAND J., FINLAY C. *The p53 tumour suppressor gene.* Nature 351: 453-456, 1991.
- 31) DONEHOWER Lawrence, BRADLEY Allan. *The tumor suppressor p53* Biochimica et Biophysica Acta, 1155, 181-205, 1993.
- 32) **GenBank Database Document Reader.**
EMBL/GenBank/DDJB Entry X01405 Secuencia completa del gen p53.
- 33) PRIVES, Carol. *How Loops, beta-sheets and alfa-helices help us to understand p53.* Cell 78: 543-546, 1994
- 34) LEVINE, A.J. *p53, the Cellular Gatekeeper for growth and division* Cell 88: 323-331, 1997
- 35) CHUMAKOV A., MILLER C., CHEN D.L., KOEFFLER P. *Analysis of p53 transactivation through high-affinity binding sites.* Oncogene 8: 3005-3011, 1993.
- 36) KO Linda, PRIVES Carol. *p53: Puzzle and Paradigm* Genes & Development 10 1054-1072, 1996.
- 37) BOURDON J.C., DEGUIN-CHAMBON V., LELONG J.C., DESSEN P. *et al.* *Further characterization of the p53 responsive element- Identification of new candidate genes for transactivation by p53* Oncogene 14: 85-94, 1997.
- 38) CHO Y., GORINA S., JEFFREY P.D., PAVLETICH N.P. *Crystal structure of a p53 tumor suppressor - DNA complex: understanding tumorigenic mutations.* Science 265: 346-355, 1994.
- 39) OREN Moshe, PRIVES Carol. *Meeting Report. p53: upstream, downstream and offstream (Review of the 8th p53 workshop).* Biochimica et Biophysica Acta 1288: R13-R19, 1996.
- 40) TARUNINA Marina, JENKINS John. *Human p53 binds DNA as a protein homodimer but monomeric variants retain full transcription transactivation activity.* Oncogene 8: 3165-3173, 1993.
- 41) LINKE S.P., CLARKIN K.C., Di LEONARDO A., TSOU A., WAHL G.M. *A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage* Genes & Development 10: 934-947, 1996.

- 42) JAYARAMAN L., MURTHY K., ZHU C., CURRAN T., *et al.* Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53
Genes & Development 11 558-570, 1997.
- 43) LEE Suman, ELENBAAS Brian, LEVINE Arnold, GRIFFITH Jack.
p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches Cell 81, 1013-1020, 1995
- 44) ABARZUA P., LoSARDO J.E., GUBLER M.L., NERI A. Microinjection of monoclonal antibody Pab421 into human SW480 colorectal carcinoma cells restores the transcription activation function to mutant p53. Cancer Research 55 3490-3494, 1995
- 45) HUPP T.R., SPARKS A., LANE D.P. Small peptides activate the latent sequence specific DNA binding function of p53 Cell 83 237-245, 1995
- 46) JAYARAMAN Lata, PRIVES Carol. Activation of p53 sequence specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus Cell 81 1021-1029, 1995
- 47) HAWLEY R.S., FRIEND S.H. Strange bedfellows in even stranger places: the role of ATM in meiotic cells, lymphocytes, tumors, and its functional links to p53
Genes & Development 10 2383-2388, 1996
- 48) WILL Katrin, WARNECKE Gabriele, BERGMANN Steffi, DEPERT Wolfgang.
Species- and tissue-specific expression of the C-terminal alternatively spliced form of the tumor suppressor p53 Nucleic Acids Research 23 (20) 4023-4028, 1995
- 49) MAKI Carl G., HUIBREGTSE Jon M., HOWLEY Peter M. In vivo Ubiquitination and proteasome-mediated Degradation of p53. Cancer Research 56 2649-2654, 1996
- 50) LIVINGSTON David M. Meeting Report 1995 Annual Cancer Research Symposium of the Pezcoller Foundation. Biochimica et Biophysica Acta 1242, 211-216, 1996
- 51) LEACH F.S., TOKINO T., MELTZER P., BURRELL M. *et al.* p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. Cancer Research 53, 2231-2234, 1993
- 52) a) LOWE S.W., RULEY H.E., JACKS T., HOUSEMAN D.E. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 74 957-968, 1993
b) LOWE S.W., SCHMITT E.M., SMITH S.W., OSBORNE B.A., JACKS T. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 362, 847-849, 1993
- 53) ARRIOLA GODFREY Emma Louise. Detección por Inmunohistoquímica de la proteína P53 en cáncer colorrectal de pacientes tratados con radio y quimioterapia. Tesis de Licenciatura, QFB Facultad de Química, UNAM, 1995

- 54) CHEN Yong Q., CIPRIANO Sherry C., ARENKIEL Julie M., MILLER Fred R.
Tumor Suppression by p21(WAF1). *Cancer Research* 55: 4536-4539, 1995.
- 55) ATTARDI Laura D., LOWE Scott W., BRUGAROLAS James, JACKS Tyler.
Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO Journal* 15 (14): 3693-3701, 1996.
- 56) HANSEN Roseanne S., BRAITHWAITE Anthony W. *The growth-inhibitory function of p53 is separable from transactivation, apoptosis and suppression of transformation in E1A and Ras*. *Oncogene* 13: 995-1007, 1996
- 57) BLAGOSKLONNY M., PRABHU N., EI-DEIRY W. *Defects in p21(WAF1/CIP1), Rb and c-myc signaling in phorbol ester-resistant cancer cells*. *Cancer Research* 57: 320-325, 1997
- 58) CROSS S.M., SANCHEZ C.A., MORGAN C.A., SCHIMKE M.K. et al.
A p53-dependent Mouse Spindle Checkpoint. *Science* 267: 1353-1356
- 59) Di LEONARDO A., HUSSAIN S., LINKE S.P., GRECO V. et al.
DNA reoperation in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Research* 57: 1013-1019, 1997.
- 60) MINN A.J., BOISE L.H., THOMPSON C.B. *Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage*. *Genes & Development* 10: 2621-2631, 1996
- 61) FUKASAWA F., CHOI T., KURIYAMA R., RULONG S, Vande WOUDE G.F.
Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271: 1744-1747, 1996
- 62) CHEN X., KO L.J., JAYARAMAN L., PRIVES C. *p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells*. *Genes & Development* 10: 2438-2451, 1996
- 63) SABBATINI P., LIN J., LEVINE A.J., WHITE E. *Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis*. *Genes & Development* 9: 2184-2192, 1995.
- 64) HALDAR S., BASU A., CROCE C *Bcl2 is the guardian of microtubule integrity*. *Cancer Research* 57: 229-233, 1997.
- 65) NUÑEZ Gabriel, CLARKE Michael F. *The Bcl2 family of proteins: regulators of cell death and survival*. *Trends in Cell Biology* 4: 399-404, 1994.
- 66) DECAUDIN Didier, GELEY Stephan, HIRSCH Tamara, CASTEDO Maria et al.
Bcl-2 and Bcl-xL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research* 57: 62-67, 1997.

- 67) SANCAR, Aziz. *Mechanisms of DNA excision repair*. Science 266: 1954-1956, 1994.
- 68) FRIEDBERG Errol C. *Xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome, helicases, and DNA repair: What's the relationship?* Cell 71: 887-889, 1992.
- 69) IWABUCHI K., BARTEL P.L., LI B., MARRACINO R., FIELDS S. *Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 6098-6102, 1994.
- 70) HANSEN R., REDDEL R., BRAITHWAITE A. *The transforming oncoproteins determine the mechanisms by which p53 suppresses cell transformation: pRb-mediated growth arrest or apoptosis*. Oncogene 11: 2535-2545, 1995
- 71) VARGAS Victor M. *Virus del papiloma humano Aspectos epidemiológicos, carcinoma - genéticos, diagnósticos y terapéuticos*. Ginecología y Obstetricia de México 64: 411-417, 1996
- 72) MACK D.H., VARTIKAR J., PIPAS J.M., LAIMINS L.A. *Specific repression of TATA-mediated but not initiator mediated transcription by wild-type p53*. Nature 365 281-283, 1993.
- 73) DONEHOWER L.A., HARVEY M., SLAGLE B.L., McARTHUR M.J. *et al*. *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors*. Nature (Lond) 356, 215-221, 1992
- 74) JOHNSON P., CHUNG S., BENCHIMOL S. *Growth suppression of Friend virus-erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin*. Molecular Cell Biology 13: 1456-1463, 1993
- 75) BOUCK Noel. *p53 and Angiogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta 1287: 63-66, 1996
- 76) NIKIFOROV M.A., HAGEN K., OSSOVSKAYA V., CONNOR T. *et al*. *p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis*. Oncogene 13 1709-1719, 1996
- 77) NIGRO J.M., BAKER S.J., PREISINGER A.C., JESSUP J.M. *et al*. *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. Nature 342: 705-707, 1989
- 78) GREENBLATT M.S., BENNETT W.P., HOLLSTEIN M., HARRIS C.C. *Mutations in the p53 Tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and Molecular pathogenesis*. Cancer Research 54: 4855-4878, 1994.
- 79) HAINAUT P., SOUSSI T., SHOMER B., HOLLSTEIN M. *et al*. *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects*. Nucleic Acids Research 25 (1): 151-157, 1997.

- 80) KRAWCZAK M., SMITH-SORENSEN B., SCHMIDTKE J., KAKKAR V.V. *et al.* *Somatic spectrum of cancer-associated single basepair substitutions by endogenous mechanisms of mutation and by selection* Human Mutation 5:48-57, 1995.
- 81) HARTMANN A., BLASZYK H., McGOVERN R.M., SCHROEDER J.J. *et al.* *p53 mutations inside and outside of exons 5-8: the patterns differ in breast and other cancers*. Oncogene 10 681-8, 1995.
- 82) BERTORELLE R., ESPOSITO G., DEL MISTRO A., BELLUCO C. *et al.* *Association of p53 gene and protein alterations with metastases in colorectal cancer*. The American Journal of Surgical Pathology 19(4). 463-471, 1995.
- 83) ZHANG J.S., CAPLIN S., BOSMAN F.T., BENHATTAR J. *Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastases*. International Journal of Cancer 70: 674-678, 1997.
- 84 a) SCHMUTTE Christoph, YANG Allen, BEART Robert, JONES Peter A., *Base excision repair of UG mismatches at a mutational hotspot in the p53 gene is more efficient than base excision repair of T.G mismatches in extracts of human colon tumors* Cancer Research 55, 3742-3746, 1995
 b) SCHMUTTE Christoph, YANG Allen, NGUYEN Tu Dung, BEART Robert, JONES Peter A. *Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis*. Cancer Research 56, 2375-2381, 1996
- 85) TORNALETTI Silvia, PFEIFER Gerd G. *Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutations in human cancers*. Oncogene 10 1493-1499, 1995
- 86) CERUTTI Peter, HUSSAIN Perwez, POURZAND Charareh, AGUILAR Fernando. *Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the p53 tumor suppressor gene*. Cancer Research (Suppl) 54. 1934s-1938s, 1994.
- 87) PUISIEUX Alan, LIM Susan, GROOPMAN John, OZTURK Mehmet. *Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens* Cancer Research 51, 6185-6189, 1991.
- 88) KLEIHUES P., SCHAUBLE B., ZUR HAUSEN A., ESTEVE J., OHGAKI H.. *Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families*. American Journal of Pathology 150 1-13, 1997
- 89) LAW J.C., STRONG L.C., CHIDAMBARAM A., FERRELL, R.E. *A germ line mutation in exon 5 of the p53 gene in an extended cancer family*. Cancer Research 51, 6385-6387, 1991
- 90) THOR A.D., MOORE D.H., EDGERTON S.M., KAWASAKI E.S. *et al.* *Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers*. Journal of the National Cancer Institute 84(11): 845-844, 1991.

- 91) FUKUYAMA Y., MITSUDOMI T., SUGIO K., ISHIDA T. *et al.* *K-ras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer.* British Journal of Cancer 75: 1125-1130, 1997.
- 92) GOH H.S., YAO J., SMITH D.R. *p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients.* Cancer Research 55: 5217-5221, 1995.
- 93) LEAHY D.T., SALMAN R., MULCAHY H., SHEAHAN K. *et al.* *Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis* Journal of Pathology 180: 364-370, 1996.
- 94) PRICOLO V.E., FINKELSTEIN S.D., HANSEN K., COLE B.F., BLAND K.I. *Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma* Archives of Surgery 132: 371-375, 1997.
- 95) **Genome Research in Molecular Medicine and Virology.**
Kenneth W. Adolph, Ed. Associated Press, New York, 1993
a) Capitulo 1: Normal DNA sequence variation Detection technologies and implications RUANO G., LICHTER J.B., KIDD K.A.
b) Capitulo 7: Detection of nucleotide sequence changes by Single-strand Conformation Polymorphism Analysis SEKIYA T
- 96) BAAS Inge, MULDER Jan, OFFERHAUS Johan, VOGELSTEIN Bert, HAMILTON Stanley. *An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms* Journal of Pathology 172: 5-12, 1994.
- 97) SOUSSI T., LEGROS Y., LUBIN R., ORY K., SCHLICHTHOLZ B. *Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer. a review.* International Journal of Cancer 57: 1-9, 1994.
- 98) HALL Peter, LANE David. *(Editorial) p53 in tumour pathology: Can we trust Immunohistochemistry ? - (II)* Journal of Pathology 172: 1-4, 1994.
- 99) SILVESTRINI R., RAO S., BENINI E., DAIDONI M.G., PILOTTI S. *Immunohistochemical detection of p53 in clinical breast cancers: A look at methodological approaches.* Journal of the National Cancer Institute 87(13): 1020, 1995.
- 100) TRIVERS G.E., CAWLEY H.L., DeBENEDETTI V., HOLLSTEIN M. *et al.* *Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl-chloride.* Journal of the National Cancer Institute 87(18): 1400-1407, 1995.
- 101) ORITA M., SUSUKI Y., SEKIYA T., HAYASHI H. *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.* Genomics 5: 874-879, 1989.
- 102) FAILLE A., De CREMOUX P., EXTRA E.M., LINARES G. *et al.* *p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers.* British Journal of Cancer 69(6): 1145-1150, 1994.

- 103) SPINARDI Laura, MAZARS Raoul., THEILLET Charles. *Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP*. Nucleic Acids Research 19 (4): 4009, 1991.
- 104) ICHIKAWA Y., NISHIDA M., SUZUKI H., YOSHIDA S. et al. *Mutations of K-ras protooncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors*. Cancer Research 54: 33-35, 1994.
- 105) NIKIFOROV Y.E., NIKIFOROVA M.N., GNEPP D., FAGIN J.A. *Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident*. Oncogene 13:687-693, 1996.
- 106) CHAVES M. *Identificación de nuevas mutaciones en el exón 13 del gen de fibrosis quística en pacientes mexicanos*. Memorias del II Congreso Nacional de la asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina, A.C.:1996.
- 107) KAUPPINEN R. *SSCP analysis applied to the diagnosis of acute intermittent porphyria*. Molecular and Cellular Probes 6: 527-530, 1992.
- 108) SOINI Y., CHIA S.C., BENNETT W.P., GROOPMAN J.D. et al. *An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico*. Carcinogenesis 17: 1007-1012, 1996.
- 109) *Fact Sheet: Twelve major cancers*. Scientific American Special Issue: 92-98, Septiembre 1996.
- 110) *Estadísticas Vitales de la Secretaría de Salud, México, 1995*
<http://www.ssa.gob.mx>
- 111) TAKAHASHI T., MORI T., MOOSA A.R. *Tumors of the Colon and Rectum: Clinical Features and Surgical Management*. Capítulo 91, Comprehensive Textbook of Oncology, 2nd. Edition. A.R. Moosa, Ed. Williams & Wilkins, Baltimore 1991
- 112) De BENEDETTI L., SCIALERO S., GISMONDI V., JAMES R. et al. *Association of APC gene mutations and histological characteristics of colorectal adenomas*. Cancer Research 54: 3553-3556, 1994.
- 113) CHO Kathleen, VOGELSTEIN Bert. *Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence*. Cancer (Suppl.) 70 (6): 1727-1731, 1992.
- 114) MARRA Giancarlo, BOLAND Richard. *(Review) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes and historical perspectives*. Journal of the National Cancer Institute 87(15):1114-1125,1995.
- 115) RHYU Michelle S. *Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma*. Journal of the National Cancer Institute 88(5): 240-251, 1996.

- 116) SEGURA URIBE Julia J. *Establecimiento de un banco de DNA de tumores de pacientes provenientes de pacientes con cáncer colorrectal*. Tesis de Licenciatura (Química). Facultad de Química, U.N.A.M. 1995.
- 117) TRICHOPOULOS D., LI F.P., HUNTER D.J. *What causes cancer?* Scientific American Special Edition: 50-57, Septiembre 1996.
- 118) GIOVANNUCI E., RIMM E.B., ASCHERIO A., STAMPFER M.J. *et al* *Alcohol, low methionine-low folate diets, and risk of colon cancer in men* Journal of the National Cancer Institute 87(4): 265-273, 1995
- 119) WU Anna, HENDERSON Brian. *Alcohol and Tobacco use: risk factors for colorectal adenoma and carcinoma?* Journal of the National Cancer Institute 87(4): 239-240, 1995
- 120) MARTINEZ M.E., McPHERSON S., ANNEGERS J.F., LEVIN B. *Cigarette Smoking and Alcohol consumption as risk factors for colorectal adenomatous polyps* Journal of the National Cancer Institute 87(4) 274-279, 1995
- 121) FEARON Eric R., VOGELSTEIN Bert. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 81: 759-767, 1990.
- 122) GALLICK G., GARCIA R., SATLEY C., MOSKAL T. *et al*. *Molecular alterations during colon tumorigenesis: an overview of growth regulatory pathways and potential therapeutic implications*. The Cancer Bulletin 46(4) 296-302, 1994.
- 123) KHINE Kyaw, SMITH Duncan, GOH Hak-Su. *High frequency of Allelic deletion on Chromosome 17p in advanced colorectal cancer*. Cancer 73:28-35, 1994.
- 124) COHN K.H., ORNSTEIN D., WANG F., DeSOTO-LaPAIX F. *et al*. *Significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma* Cancer 79: 233-244, 1997.
- 125) GOTLEY D.C., REEDER J.A., FAWCETT J., WALSH M.D. *et al*. *The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancer and metastases*. Oncogene 13: 787-795, 1996
- 126) LAIRD P.W., JACKSON-GRUSBY L., FAZELL A., DICKINSON S. *et al*. *Suppression of Intestinal Neoplasia by DNA hypomethylation*. Cell 81: 197-205, 1995.
- 127) NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Rectal Cancer*. CancerNet form the NCI. <http://cure.medinfo.org/nci/cancernet/2/200076>
- 128) SIDRANSKY, David. *Advances in cancer detection*. Scientific American Special Issue: 70-75, Septiembre 1996.
- 129) WILLET W., COLDITZ G.A., MUELLER N. E. *Strategies for minimizing cancer risk*. Scientific American Special Issue: 58-63, Septiembre 1996.

- 130) RODRIGUEZ N.R., ROWAN A., SMITH M., KERR I. *et al.* *p53 mutations in colorectal cancer* Proc Natl Acad Sci U S A 87: 7555-7559, 1990.
- 131) LECHNER M.S., MACK D.H., FINICLE A.B., CROOK T. *et al.* *Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription*. EMBO Journal 11 (9): 3045-3052, 1992.
- 132) MARTINEZ-DELGADO B., ROBLEDO M., ARRANZ E., INFANTES F. *et al.* *Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas* American Journal of Hematology 55: 1-8, 1997
- 133) COGGI G., BOSARI S., RONCALLI M., GRAZIANI D. *et al.* *p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma* Cancer 79: 425-432, 1997
- 134) HANSKI C, TIECKE F., HUMMEL M., HANSKI M.L. *et al.* *Low frequency of p53 gene mutation and protein expression in mucinous colorectal carcinomas*. Cancer Letter 103: 163-170 (1996)
- 135) FROGATT N.J., LEVESON S.H., GARNER R.C. *Low frequency and late occurrence of p53 and dcc aberrations in colorectal tumours* Journal of Cancer Research in Clinical Oncology 121: 75-15 (1995)
- 136) LIN S.Y., CHEN P.H., YANG M.J., CHEN T.C. *et al.* *Ras oncogene and p53 gene hotspot mutations in colorectal cancers* Journal of Gastroenterology Hepatology 10: 119-124, 1995
- 137) LIM B.H., SOONG R., GRIEU F., ROBBINS P.D. *et al.* *p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma*. International Journal of Cancer 69: 200-204, 1996.
- 138) FREBOURG Thierry, FRIEND Stephen H. *The importance of p53 alterations in human cancer: Is there more than circumstantial evidence?* Journal of the National Cancer Institute 85 (19): 1554-1557, 1993
- 139) MALCOWICZ S.B., TOMASZEWSKI J.E., LINNENBACH A.J., CANGIANO T.A. *et al.* *Novel p21/WAF/CIP1 mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas*. Oncogene 13: 1831-1837, 1996.
- 140) DOBNER T., NORIKOSHI N., RUBENWOLF S., SHENK T. *Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor*. Science 272: 1470-1472, 1996.
- 141) THOMAS M., MATLASHEWSKI G., PIM D., BANKS L. *Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV18-E6 through ubiquitin-mediated degradation*. ONCOGENE 13: 265-273, 1996.

- 142) GREENBLATT M.S., FEITELSON M.A., ZHU M., BENNET W.P., *et al.* Integrity of p53 in hepatitis B x antigen-positive and -negative hepatocellular carcinomas. *Cancer Research* 57: 426-432, 1997.
- 143) MAGEWU A.N., JONES P.A. Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hotspot in human cancer. *Molecular Cell Biology* 14: 4225-4232, 1994.
- 144) JERNVALL P., MAKINEN M., KARTTUNEN T., MAKELA J., VIHKO P. Conserved region mutations of the p53 gene are concentrated in distal colorectal cancers. *International Journal of Cancer* 74: 97-101, 1997.
- 145) PALEFSKY Joel M. Serologic detection of human papillomavirus-related anogenital disease: New opportunities and challenges. *Journal of the National Cancer Institute* 7: 401-402, 1995.
- 146) PALEFSKY J.M., HOLLY E.A., GONZALES J., BERLINE J. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Research* 51: 1014-1018, 1991.
- 147) ZAKI S.R., JUDD R., COFFIELD L.M., GREER P. *et al.* Human papillomavirus infection and anal carcinoma. *American Journal of Pathology* 140 (6): 1345-1355, 1992.
- 148) HEINO P., GOLDMAN S., LAGERSTEDT U., DILLNER J. Molecular and serological studies of human papillomavirus among patients with anal epidermoid carcinoma. *International Journal of Cancer* 53: 377-381, 1993.
- 149) LUNA P., ARRIOLA E.L., CUADRA Y., ALVARADO I., QUINTERO A. P53 overexpression and response to chemoradiation therapy for locally advanced rectal adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology* (En Prensa).
- 150) SOLANO A., SANTIAGO-PAYAN H., CERBON M.A., LUNA P., QUINTERO A. p53 mutations in rectal tumors from Mexican patients (Manuscrito en preparación).