

Proteína p53: sinais e o papel no processo de carcinogênese

Revision Bibliografica de p53: Vias de Senalizacion Y Papel en el Proceso de Carcinogenesis

Protein p53: Signaling Pathways and Role in Carcinogenesis: a Review

Recebido em 01/11/2006
Aprovado em 15/01/2007

*Doris Ballesteros Castañeda*¹
*Paula Andrea Gonzalez*²
*Milvia Rocío Riascos Ortega*²
*Héctor Iván Zambrano Torres*²

RESUMO

O gen P53 se localiza na posição 1.3 do braço curto do cromossomo 17, codifica para uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa, cuja principal função é manter a integridade e a estabilidade do genoma em condições normais a proteína p53 se mantém em baixos níveis nas células, devido a uma rápida degradação mediada por Mdm2 via ubiquitina/proteosoma. A p53 é estabilizada através de modificações pós-traducionais (fosforilações e acetilações) em resposta ao estresse celular derivado do dano ao DNA, hipoxia, destruição de ribonucleotídeos ou ativação de oncogenes dentre outros, convertendo-a em uma proteína funcional, capaz de unir-se aos elementos de resposta de seus genes para regular sua transcrição, iniciando os programas celulares que levam à realização de suas funções como gen supressor de tumores: detenção do ciclo celular, reparação do dano do DNA ou apoptose. A inativação do gen supressor de tumores p53 é o evento genético mais freqüente no câncer humano (50%), principalmente devido a mutações no domínio da união do DNA. A alta proporção de tumores com defectos na p53 e o aumento da informação detallada sobre sua biologia molecular faz dessa molécula um foco particularmente atrativo no desenvolvimento de novos tratamentos.

Descritores: Neoplasias; Apoptose; Mutação.

RESUMEN

El gen P53 se localiza en la posición 1.3 del brazo corto del cromosoma 17, codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa cuya principal función es mantener la integridad y estabilidad del genoma, en condiciones normales la proteína p53 se mantiene en bajos niveles en las células, debido a una rápida degradación mediada por Mdm2 vía ubiquitina/proteosoma. p53 es estabilizada, a través de modificaciones postraduccionales (fosforilaciones y acetilaciones) en respuesta a estrés celular derivado del daño al ADN, hipoxia, depleción de ribonucleótidos o activación de oncogenes entre otros, convirtiéndola en una proteína funcional, capaz de unirse a los elementos de respuesta de sus genes blanco para regular su transcripción, iniciando los programas celulares que llevan a la realización de sus funciones como gen supresor de tumores: detención del ciclo celular, reparación del daño al ADN o apoptosis. La inactivación del gen supresor de tumores p53 es el evento genético más frecuente en el cáncer humano (50%), principalmente debido a mutaciones tipo missense en el dominio de unión al ADN. La alta proporción de tumores con defectos en p53 y el aumento de información

1. Profesora Asociada de la Facultad de Odontología - Universidad Nacional de Colombia.

2. Odontólogos de la Universidad Nacional de Colombia.

detallada sobre su biología molecular hacen de esta molécula un foco particularmente atractivo en el desarrollo de nuevos tratamientos.

Descriptores: Neoplasias; Apoptosis; Mutación

ABSTRACT

Gene p53 is located at position 1.3 on the short arm of chromosome 17 (17p 1.3) and codes for a nuclear phosphoprotein, 53 kDa, whose main function is to maintain the integrity and stability of the genome. In normal conditions protein p53 is present at low levels in the cells, owing to a rapid degradation mediated by the Mdm2 ubiquitin/proteosome pathway. p53 is stabilized through posttranscriptional modifications (phosphorylation and acetylation) in response to cell stress resulting from damage to the DNA, transforming it into a functional protein able to bind to the promoter sites of its target genes to regulate its transcription, initiating the cell programs that lead to the performance of its following functions as a tumor-suppressing gene: cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis. The inactivation of the suppressor gene of p53 tumors is the most frequent genetic event in human cancer (50%), due mainly to missense mutations in the DNA-binding domain. The high proportion of tumors with a defective p53 and the increase in detailed information on its molecular biology make this molecule a particularly attractive focus in the development of new treatments.

Descriptors: Neoplasms; Apoptosis; Mutation.

INTRODUCCIÓN

El cáncer, aparece como una consecuencia de múltiples eventos genéticos y moleculares en muchos cromosomas y genes. La consecuencia de este daño es la alteración en la regulación de los procesos involucrados en la regulación del ciclo de crecimiento y en los mecanismos de reparación al daño celular (Scully et al, 2000).

Desde el punto de vista genético puede encontrarse frecuentemente la mutación o sobreexpresión del gen p53 (Agarwal Munna et al), el cual está directamente implicado en detener la formación y desarrollo de tumores y es activado cuando la célula sufre daños en su ADN o cuando es sometida a estrés celular. En condiciones normales la proteína p53 está presente en bajos niveles en todas las células. Cuando la célula es agredida por agentes externos, p53 activa sus funciones que conlleva a la detención del ciclo celular, la reparación del ADN por daño o la entrada en apoptosis (Meredith, 2001). En el presente manuscrito se presenta una revisión y análisis crítico de la literatura sobre las vías de señalización y el

papel de p53 en el proceso de carcinogénesis, con el fin de hacer aporte al conocimiento en este tema como primer paso para posteriores investigaciones.

TP53 (TUMOR PROTEÍNA P53): GEN SUPRESOR DE TUMORES

- El gen supresor de tumores p53 es un factor de transcripción importante que juega un papel central en los mecanismos de regulación del ciclo celular y su inactivación es considerada un evento importante en la carcinogénesis.

ESTRUCTURA

El gen que codifica la proteína p53 tiene un tamaño de 20Kb, se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (Woo et al., 1998), está constituido por 11 exones, de los cuales el exón 1 contiene una secuencia no-codificante; en el exón 2 existen dos sitios putativos de inicio de la transcripción y el exón 11 contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante (Hainaut, Pierre, Hollstein, 2000). TP53 (ha sido llamado el "último

gatekeeper," (guardián del genoma) y contiene además: 393 codones, cuatro "sitios calientes" para la mutación: codones 129-146, 171-179, 234-260, y 270-287 (Agarwal Munna et al., 1998).

P53 PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES

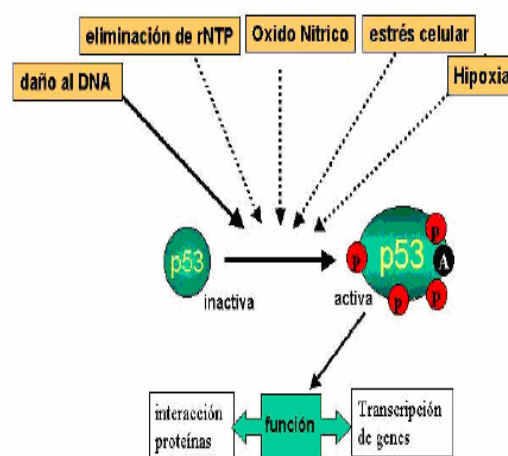
p53 es una fosfoproteína nuclear que funciona como un factor de transcripción de secuencia específica inducido por daño al ADN (Alarcon Dania et al., 2002). La proteína p53 tiene la anatomía de un factor de transcripción oligomérico de 393 residuos organizados en 5 regiones estructurales y funcionales. Estas regiones incluyen un dominio N-terminal, un dominio de activación transcripcional (residuos del 1-44), un dominio regulador rico en prolina (residuos del 62-94), un dominio de secuencia específica de unión al ADN (residuos del 110-292), un dominio de oligomerización (residuos del 325-363) y un dominio multifuncional C-terminal involucrado en la regulación de la unión al ADN (residuos del 363-393) (Hainault, Pierre, Hollstein, 2000).

ACTIVACION DE P53

La proteína p53 inactiva se localiza en el citoplasma a baja concentración y tiene una vida media relativamente corta, de unos 20-30 minutos (Agarwal Munna et al., 1998). Bajo estas condiciones, la proteína p53 debe recibir señales o sufrir modificaciones que la activen convirtiéndola en proteína funcional. Las señales o sucesos que conducen a la activación de p53 están principalmente asociados a situaciones de estrés celular (daño al ADN por radiaciones ionizantes o ultravioleta), al reducir el contenido de nucleótidos (ocurre con muchas drogas quimioterapéuticas), por hipoxia, por activación de oncogenes, o por cambios en moléculas redox en la célula (Satoshi et al., 1994).

Estos estímulos provocan un rápido incremento en los niveles de proteína p53 en la célula, tanto por el aumento en la estabilidad de la proteína como por su activación bioquímica a través de fosforilaciones

y acetilaciones, todo lo cual permite a la proteína actuar como un factor de transcripción, unirse al ADN a regiones determinadas por secuencias de bases específicas localizadas en regiones promotoras y regular la expresión de sus genes (Liu Yangang, Kulesz Molly, 2001). La duración y la cinética del aumento en los niveles de proteína difieren según cual haya sido el factor productor de la activación de p53, y de los genes que transcripcionalmente hayan sido regulados por la proteína (Robles Ana et al., 2001).



Activación de p53

Figura 1. Activación de p53. Tomada de www.p53_Curie_fr Soussi mutation database.html

MECANISMOS ESPECÍFICOS INVOLUCRADOS EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Radiaciones Ionizantes (RI)

La rotura de una cadena en el ADN parece ser una señal suficiente para la inducción de p53 (Nelson e Kastan, 1994; Huang et al., 1996), pero se ha demostrado formalmente que las radiaciones ionizantes inducen a p53 únicamente por la rotura en la cadena del ADN causada por la generación de especies reactivas de oxígeno. Aunque el mecanismo exacto aún debe ser esclarecido, los incrementos en los niveles de la proteína p53 seguida de RI parece ser el resultado de una combinación en el incremento de la vida media de la proteína y un incremento en la transcripción de su ARNm. Las RI inducen la fosforilación de la serina 15 (Shieh e Cik, 1997; Siciliano et al.,

1997) y esta modificación pos-traducciona es disminuida marcadamente después de RI en células deficientes en ATM (Siciliano et al., 1997).

ATM es capaz de fosforilar a p53 sobre la serina 15 *in vitro* y su actividad es incrementada después de RI (Canman et al., 1998; Banin et al., 2003). Esos resultados sugieren que ATM estaba fosforilando directamente a p53 sobre su sitio en respuesta a RI. ATM también ha sido implicada en un evento desfosforilativo inducido por RI. RI causan una pérdida de uno de los grupo fosfato de la serina 376 en el extremo carboxilo de p53 de una forma ATM dependiente; esta desfosforilación crea un sitio de unión para proteínas 14-3-3 que aumenta la secuencia de unión específica al ADN (Watermna et al) . Aunque no es común una actividad fosfatasa intrínseca de la proteína ATM, es concebible que una fosfatasa que actúan sobre la serina 376 es activada por ATM después de RI. Finalmente, se ha sugerido que la actividad de la DNA-PK es necesaria pero no suficiente para la inducción de la unión de p53 al DNA y su actividad transcripcional, pero no participa en el incremento en los niveles de p53 inducido por daño (Woo et al., 1998).

Los inhibidores de topoisomerasa quienes también rompen una cadena en el ADN como el etoposide o camptotecina, han mostrado activar una quinasa que fosforila un sitio en el extremo amino de p53, señalando como implicada la caseín quinasa I (Knippschild et al., 1997). Sitio también fosforilado ante inducción de RI. La fosforilación sobre la serina 33 *in vitro* después de RI se ha reportado pero se desconoce la quinasa *in vivo* (Sakaguchi et al., 1998). CAK fosforila la serina 33 *in vitro* y es un atractivo candidato para los eventos inducidos por RI (Ko et al., 1997). Además de la inducción de la fosforilación de la serina 15 y la desfosforilación de la serina 376, la otra modificación postraducciona es la acetilación de la lisina 382 que ocurre *in vivo* en células expuestas a RI; que puede modificar reversiblemente la conformación de p53 y por lo tanto su función

(Sakaguchi et al., 1998).

Radiación UV

Las radiaciones UV son también un potente inductor de la proteína p53 y los mecanismos de señalización usados parecen tener pasos en común y otros distintos a los involucrados en las RI. Se ha sugerido al igual que en las RI que la señalización inicial es a partir de la rotura de una hélice de ADN. La rotura para el caso de UV, es por reparación de escisión o después de la replicación con dímeros de timidina, al parecer la señal no es por el daño de las bases en sí mismo (Nelson, Kastan, 1994). También se ha sugerido que las señales UV sobre p53 llevan a la generación de dímeros de timidina que inducen la detención de la transcripción de complejos (Dumaz et al., 1993; Ljungman e Zhang, 1998). La inducción de la acetilación sobre lisinas 320 y 382 parecen ser compartidas tanto por radiaciones ionizantes como por UV (Sakaguchi et al., 1998).

También, se han reportado claras diferencias entre estos dos tipos de radiaciones. Por ejemplo, la señalización UV no depende de la quinasa ATM. La inducción de p53 y la fosforilación de la serina 15 ocurre en células ataxia telangiectasia (AT humana) después de ser sometidas a UV. Lo que sugiere a otra quinasa involucrada en UV capaz de fosforilar el mismo sitio. Así también, UV en contraste con RI, no incrementa la actividad de la quinasa ATM en la célula (Canman et al., 1998). Otra diferencia es la fosforilación de la serina 392 vista después de tratamiento con UV más no en RI (Kapoor e Lozano, 1998). Además en los eventos corriente abajo, como la detención del ciclo celular y apoptosis, que existen en ambas radiaciones, difieren sobre el tipo distinto de modificaciones pos-traduccionales.

Hipoxia

Al igual que las RI, condiciones con bajo oxígeno causan acumulación nuclear de p53 y un incremento de la capacidad de unión al ADN y de su actividad

transactivadora en células p53 silvestres (Graeber et al., 1994; Kim et al., 1997). A diferencia de las RI, la acumulación de las células en fase G1 por hipoxia no depende exclusivamente de la función de la proteína p53 silvestre en condiciones con escaso oxígeno (0,02%) (Graeber et al., 1994; Green e Giaccia, 1998). Estos resultados sugieren que múltiples vías conducen a la detención del ciclo celular, y que la vía de transcripción de señales para la detención del crecimiento inducida por hipoxia es al menos parcialmente distinta de las vías de transducción de señales para la detención del crecimiento inducida por RI. Las condiciones de hipoxia no causan daño al ADN directamente, y existe poca evidencia sobre un daño indirecto. Al respecto, un grupo reportó incremento de la actividad de endonucleasas en fibroblastos cultivados en ausencia de oxígeno por 16 horas o más (Stolet et al., 1992).

sobre la serina 15 bajo estas condiciones. Otros estudios han reportado que quizá una proteína sensible al estado redox como HIF-1a (An et al., 1992) y Ref-1 (Jayaraman et al., 1997) pueden interactuar con p53 y alterar su actividad y niveles. Son requeridos futuros estudios para comprender el papel de la fosforilación proteica, e interacciones proteína-proteína en la estabilización de la proteína bajo condiciones de hipoxia, y cómo estas interacciones afectan la actividad biológica de p53 en la promoción de apoptosis (Graeber et al., 1994; Kim et al., 1997).

Disminución de Ribonucleótidos

La depleción de ribonucleótidos ocasionada por radiaciones UV (rNTP) activan p53 a través de una vía de señalización independiente de la causada por daño al ADN (Link et al., 1996). El mecanismo de señalización y las señales metabólicas para la inducción de p53 por ribonucleótidos es aún incierta pero quizá puede figurar como un nueva vía para la activación de p53 que podría ser usado en farmacología a fin de modular la proteína p53 de una forma distinta a la tradicional.

AUTORREGULACION DE p53

Mdm2

Mdm2 (murine double minute) es un protooncogen, que codifica una proteína de 491 a.a. que regula la actividad de p53 por:

- Bloqueo de la actividad transcripcional. La proteína Mdm2 se une a p53 y la inactiva. La unión ocurre entre el dominio de transactivación de p53, interfiriendo con el reclutamiento de los componentes de la maquinaria de transcripción basal TAFII31, los cuales se asocian a p53 en la misma región que es utilizada por Mdm2 (Vargas e Ronai, 2002).
- Exportación de la proteína p53 a el citoplasma
- Promoción de la degradación de la proteína p53.

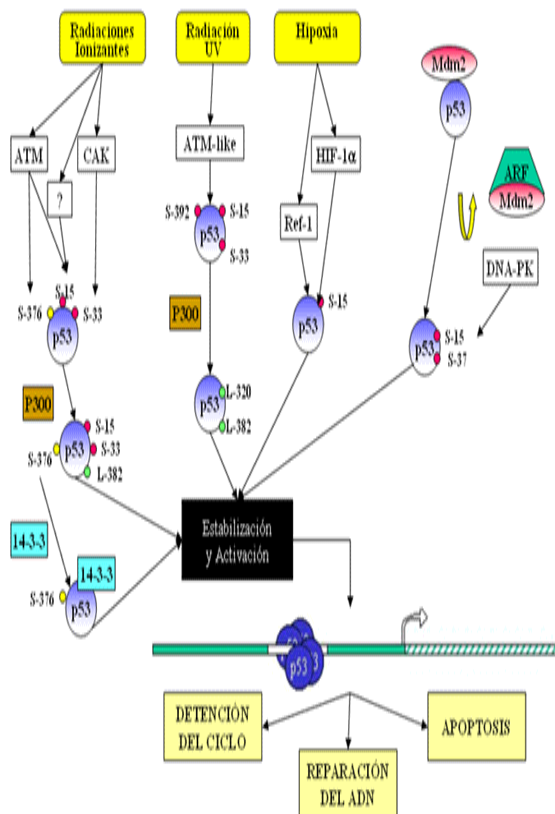


Figura 2. Señales que activan a p53. Elaborada por Gonzáles Paula, Riascos Malvía, Zambrano Iván. 2004.

Aunque el daño al ADN no se ha visto como la señal inductora de p53 bajo condiciones de hipoxia, estudios preliminares sugieren que p53 es fosforilada

Por otro lado, p53 se une específicamente al

gen Mdm2 y estimula su transcripción. Esta dualidad define una retroalimentación negativa (Kubbutat et al., 1997).

Regulación de la degradación de la proteína p53

Esta bien establecido que la rápida degradación de p53 es obtenida a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, que se une covalentemente a proteínas blanco, llevándolas a su ubiquitinización. Las proteínas marcadas con ubiquitina, son degradadas por el proteosoma, que es un complejo proteolítico dependiente de ATP de 2000 kDa (Yan e Yu, 2003).

Mdm2 juega un papel importante en este proceso. Elevados niveles de la proteína Mdm2, producen una rápida degradación de la proteína p53, lo cual es dependiente de la habilidad de las dos proteínas de tener una unión directa (Kawai et al., 2003). ¿Cómo la proteína Mdm2 promueve la degradación de la proteína p53? Cuando la actividad proteolítica del proteosoma es bloqueada por inhibidores específicos, los excesos de Mdm2 aumentan la acumulación de las formas ubiquitinizadas de p53 (Vargas e Ronai, 2002), sugiriendo que la proteína Mdm2 facilita la ubiquitinización de p53. Los soportes para esta conclusión, muestran que Mdm2 funciona directamente *in vitro* como una proteína específica ubiquitin ligasa E3 p53 específica, la cual une covalentemente grupos ubiquitina a p53.

La rápida estabilización y activación de p53, involucra varias modificaciones tanto en p53 como en Mdm2, tales como:

- Fosforilación de p53 como respuesta a daño en el ADN.
- La estabilización de p53 puede obtenerse por modificación no solo de p53 si no también de Mdm2. La proteína Mdm2, puede ser fosforilada en su dominio C-terminal indispensable para la ubiquitinización de p53, lo que ocasiona que siga unido con la proteína p53 pero interfiriendo con su actividad de ubiquitin ligasa E3 (Freedman et al., 1999).

- La habilidad de Mdm2 para promover la ubiquitinización de p53 puede ser alterada no solo por modificaciones covalentes, sino también por la unión de proteínas reguladoras como: ARF (alternative reading frame)(Kubbutat et al., 1997).
- Existen componentes que afectan la interacción de retroalimentación negativa entre Mdm2 y p53, entre los cuales encontramos a la proteína supresora de tumores p14^{ARF} (p19^{ARF} en ratones) (Kamijo et al., 1998). La proteína p14^{ARF} se une a la proteína Mdm2, e inhibe su actividad E3, además, secuestra a Mdm2 dentro del núcleo. En consecuencia, p14^{ARF} interrumpe la inhibición por retroalimentación negativa de p53 por la unión con Mdm2.

FUNCIONES DE p53 INHIBICIÓN DEL CICLO CELULAR

La proteína p53 funciona como un regulador negativo del ciclo celular, p53 esta involucrado en varios controles del ciclo celular, en G1, G2, y en la mitosis con la consiguiente disrupción de la fase mitótica.

• Detención del ciclo en G1

p21WAF1/CIP1/SD11

La proteína p21 bloquea el ciclo celular en la transición G1-S, uniéndose a complejos ciclina-CDK (ciclina D/CDK4 y ciclina E/CDK2), responsables de conducir a la célula a la fase S, previniendo ir a la activación del factor transcripcional de la familia E2F (factor de elongación 2). Al inhibir los complejos se evita la fosforilación del Rb necesaria para que la célula entre en la fase S, bloqueando la progresión del ciclo celular en presencia de un ADN dañado permitiendo la reparación de éste o actuando directamente frenando la replicación del ADN, ya que esta proteína se une a un antígeno (PCNA) que es una subunidad de la DNA polimerasa sigma (Tomoak et al., 2001).

Gadd45

(GADD grow arrest and DNA-damage inducible). Detiene el ciclo celular cuando se

sobreexpresa. La detención en G1 a menudo ha sido interpretada como un mecanismo que permite el tiempo para que se lleve a cabo la reparación del ADN antes de la replicación. En algunas líneas celulares de cáncer, la detención en G1 es transitoria. En fibroblastos humanos diploides normales, la detención en G1 es dependiente de p53 en respuesta a radiación gamma y es irreversible; las células que escapan de la detención inicial más tarde realizan la detención en fases subsecuentes del ciclo celular (Hainaut, Pierre, Hollstein, 2000). Sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado el mecanismo por el cual Gadd45 detiene el ciclo celular en la fase G1.

Ciclina G1

El mecanismo por el cual la ciclina G1 potencia la inhibición del crecimiento mediada por ARF parece ser independiente de p53. Sin embargo la detención en la fase G1 inducida por altos niveles de la expresión de la ciclina G1 se correlaciona con su habilidad de unión a Mdm2 y p53 y con la estabilización y activación de p53. Los mecanismos moleculares de activación de p53 por la ciclina G1 son indefinidos pero se cree que la función de Mdm2 de algún modo es bloqueada (Zhang, 1998). Recientes reportes muestran que la ciclina G1 recluta PP2A (proteína fosfatasa 2A) para desfosforilar Mdm2 y de esta forma regula a p53. La ciclina G1 es un regulador de las vías de ARF-Mdm2-p53 y de Rb.

• **Detención del ciclo en G2**

Reprimo

Reprimo depende de la expresión de p53 por que se ha visto que la expresión ectópica de p53 resulta en la inducción de su ARNm. Se encuentra involucrado en la vía de regulación del complejo CDK2-ciclina B1; y su función como mediador de la detención en G2 se dedujo porque no se observó traslocación de la ciclina B1 ni condensación cromosomal en las células que expresaban Reprimo. Parece ser que Reprimo puede regular la actividad del complejo Cdc2- ciclina B1 interfiriendo con un mecanismo de control en G2/M todavía desconocido que opera en el citoplasma. Esto es un importante objeto de estudios futuros (Ohki

et al., 2000).

14-3-3s

14-3-3s secuestra el complejo ciclina B1-CDK1 fuera del núcleo lo que permite mantener el bloqueo en G2 (Dumaz et al., 1993; Ljungman e Zhang, 1998). Se une a p53 e incrementa su actividad de unión al ADN (Heng-Yin Yang et al., 2003). Interactúa con CDKs y puede inhibir su actividad para bloquear la progresión del ciclo celular; regula a p53 transcripcional y funcionalmente, incrementa su estabilidad y refuerza su actividad transcripcional. La región C-terminal de 14-3-3s (aminoácidos 153 a 248) se une a p53 muy eficientemente comparado con otros dominios, 14-3-3s puede ayudar a p53 a formar un dímero a través de unión directa, facilitando la intervención de p53 dímero-dímero, interacción necesaria para la estabilización de la unión de p53 al ADN. 14-3-3s tiene una actividad supresora de tumores, es un regulador negativo del ciclo celular, y su sobreexpresión puede neutralizar el crecimiento mitogénico y la tumorigenicidad de células cancerosas (Heng-Yin Yang et al., 2003).

Gadd45

Recientes hallazgos indican que Gadd45 interactúa con la proteína Cdc2 bloqueando su actividad quinasa a través del dominio inhibitorio ubicado en la región central de la proteína Gadd45 (aminoácidos 65-84). El dominio inhibitorio de Cdc2 de Gadd45 contribuye sustancialmente a la supresión del crecimiento, indicando que Gadd45 induce la detención del ciclo y se correlaciona con la detención del ciclo celular en G2/M mediado por Gadd45. El péptido que contiene el dominio de unión al Cdc2 (aminoácidos 65-84) rompe el complejo Cdc2- ciclina causa inestabilidad genética (Hainat, Pierre, Hollstein, 2000).

REPARACION DEL DAÑO AL ADN

La maquinaria de reparación del ADN ha evolucionado para mantener la integridad y estabilidad del genoma

B1, sugiriendo que la disociación de este complejo resulta en una interacción directa entre Gadd45 y la proteína Cdc2 (Hainaut, Pierre, Hollstein, 2000).

p21

El papel crucial de p21 en el punto de control de G2 sobre el daño al ADN y la interacción de p21 con el complejo Cdc2-ciclina B1 es mediado por PCNA (Tomoak et al., 2001). La interacción PCNA-p21 es probable sea requerida para el reconocimiento de la reparación del ADN. p21 puede prevenir la incorporación de CDC25C dentro del complejo cdc2-ciclina B1 y así inducir la detención del ciclo celular en G2. La expresión de p21 es regulada transcripcionalmente por p53 cuando hay daño al ADN o senescencia celular, se sabe induce la detención del ciclo celular en G2 así como en G1 por inhibición de Cdc2 (Tomoak et al., 2001).

IGF-BP3

Genera una proteína de unión al factor IGF (factor de crecimiento insulínico) que bloquea señales mitogénicas (Yuangang e Molly, 2001). La inducción de IGF-BP3 por el tipo silvestre de p53 está asociado con el incremento de la secreción de una forma activa de IGF-BP3 capaz de inhibir la señalización mitogénica por el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). Los resultados indican que IGF-BP3 se une a p53 como un nuevo blanco en las vías de señalización autocrina y paracrina en los procesos dependientes de IGF(s) como son el crecimiento celular, la transformación y la supervivencia (Buckbinder et al., 1995).

Punto de control mitótico

Existe un punto de control mitótico gobernado por p53, en estudios realizados con Nocodazole, una droga que inhibe el ensamblaje de los microtúbulos, se ha visto que detiene el crecimiento de los fibroblastos embrionarios normales de ratones, mientras que los fibroblastos de embriones de ratones deficientes en p53 sufren varias rondas de síntesis de ADN con segregación de cromosomas. Ambos fibroblastos de

p53+/+ (homocigoto para p53 silvestre) y p53 -/- (homocigoto para p53 mutada) tratados con nocodazole detienen transitoriamente la mitosis por la misma longitud de tiempo, pero p53 es específicamente requerida para prevenir que las células tratadas con nocodazole vuelvan a entrar en el ciclo celular e iniciar otra ronda de síntesis de ADN (Hainaut, Pierre, Hollstein, 2000). De esta forma la célula adquiere una dotación cromosómica aberrante denominada aneuploidia, por la alteración a nivel de los microtúbulos.

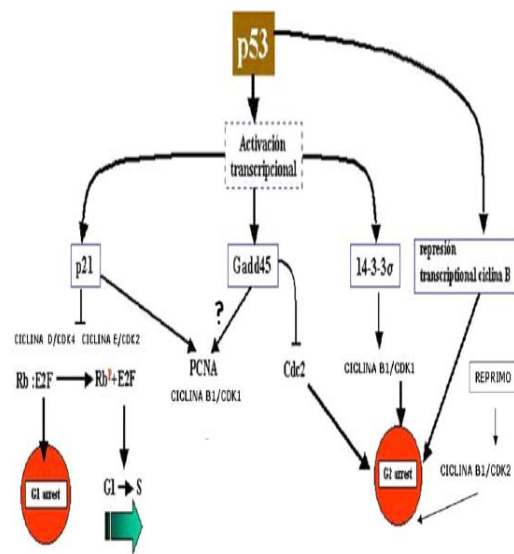


Figura 3. Tomada de: Journal of Cell Science. The p53 functional circuit. Shengkan Jin y col. 2001

Control de la duplicación del centrosoma

En células normales el proceso de división celular necesita de la duplicación del centrosoma (centro organizador de microtúbulos) puesto que estos forman los dos extremos del huso mitótico. En p53 -/- de fibroblastos embrionarios de ratones, múltiples centrosomas son generados durante un solo ciclo celular, resultando en una segregación desigual de los cromosomas; se ha reportado que dicha amplificación centromérica altera la fidelidad mitótica que origina células con complementos cromosómicos anormales. En la duplicación de los centrosomas anormales puede primar la activación de p53 y la detención del ciclo celular. La disrupción de este control es uno de los posibles mecanismos por los cuales la pérdida de p53

nucleótidos repara eliminando dímeros de pirimidina causados por la luz UV. La escisión de bases repara modificando las bases blanco causadas por la hidrólisis y alquilación del ADN. La desigualdad es reparada corrigiendo errores de replicación del ADN. Las cadenas rotas del ADN son remediadas por recombinación de ADN usando alelos irrompibles como plantillas (Adimoolam e Ford, 2003).

Genes regulados por p53 que participan en la reparación del ADN

Rad51

Un homólogo eucariótico de la proteína implicada en la recombinación de *E. coli* RecA, juega un papel central en la reparación de las roturas de doble hélice de ADN (DSBs). Rad51 muestra una localización nuclear en células humanas, denominada focos de Rad51, hallazgo típico de la fase S en donde también es común la localización de la proteína de replicación A (RPA) y PCNA. Las formas helicoidales de Rad51 sobre hélices sencillas de ADN (ssDNA) y sobre hélices dobles (dsDNA) promueve el apareamiento homólogo. La proteína Rad51 humana interactúa con Rad52, RPA, p53, BCRA1 y BCRA2 pero el mecanismo permanece aún desconocido (Satoschi et al.,

Gadd45

Reciente evidencia sugiere que Gadd45 puede tener alguna similitud funcional con la proteína ensambladora del nucleosoma NAP-1, que son un número de proteínas asociadas con la estabilidad del nucleosoma y la estructura de la cromatina. Algunas de ellas participan en la transferencia de histonas desde la proteína ácida al complejo de histonas del ADN.

Gadd45 facilita el clivaje y la actividad de distensión de la cromatina en presencia de núcleos de histona. Al parecer Gadd45 reconoce la cromatina lesionada a través de la desestabilización de las interacciones histona-ADN, cuando Gadd45 interactúa directamente con el núcleo de histona; previniendo la for-

mación de los complejos oligoméricos de histona-ADN. Gadd45 afecta la actividad topoisomerasa por modificación local del acceso a la cromatina, especialmente en los sitios alterados por la acetilación de las histonas o radiación UV. Gadd45 particularmente contribuye a la respuesta de la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y puede influenciar la sensibilidad celular a ciertos agentes dañinos para el ADN. Un mecanismo potencial por el cual Gadd45 podría interactuar con NER fue sugerido recientemente en un estudio, mostrando que Gadd45 interactúa con la cromatina como se mencionó anteriormente (Carrier et al., 1998; Glockzin, 2003; Li et al, 1994).

hHR23A

Es una proteína reparadora del ADN humano, capaz de unirse a p53 poliubiquitinizada gracias a su dominio asociado a ubiquitina (Uba) en el extremo carboxi-terminal protegiendo a p53 de una desubiquitinización tanto *in vitro* como *in vivo*. Otro dominio, el similar a ubiquitina (ubiquitina like, Ubl) por su parte entrega la proteína p53 poliubiquitinizada al proteosoma. La información indica un papel de hHR23A en la degradación de p53 sirviendo como intermediario entre la proteína p53 poliubiquitinizada y proteosoma 26S (Li et al., 1994).

DDB2

Es un gen regulado por p53 que codifica para una proteína de unión al ADN lesionado, p48, que es defectuosa en un subgrupo de los pacientes con xeroderma pigmentoso, el grupo E (p48-XPE). Las células XP contienen mutaciones en genes NER que conduce a xeroderma pigmentoso. p48 junto a Gadd45 representan un nuevo paradigma en las funciones de p53 (Adimoolan e Ford, 2003).

después de varios tipos de daño al ADN. La escisión de p21

p21, es uno de los mecanismos más estudiados de p53 en respuesta al daño del ADN. Además de la inhibición de las cdk, p21 se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Esta unión inhibe el procesamiento de la ADN polimerasa en la duplicación del ADN pero no en la reparación del ADN, lo que puede contribuir a coordinar la detención del crecimiento y la reparación del ADN en la fase S (El-Deiry et al., 1993).

Sin embargo la participación de p21 en la reparación del ADN es relativamente poca en etapas tempranas después del daño (3 o 4 horas) y nula pasado el tiempo. La respuesta a NER mediada por p53 parece ser distinta a la involucrada en el punto de control de G1 del ciclo celular, y por tal motivo esta aún sujeta a estudios (Adimoolan e Ford, 2003).

PCNA

Un mecanismo por el cual los factores de accesibilidad a la cromatina podrían contribuir a NER es facilitando la unión de proteínas de reconocimiento y/o la de otros factores asociados en el procesamiento de ADN, sobre los sitios de daño. La unión de PCNA, a ADN lesionado es defectuosa en células XP, sugiriendo que el reclutamiento de PCNA hacia la cromatina lesionada, refleja un papel en NER. Esto sugiere además, que PCNA podría interactuar con sitios de daño al ADN y se cree que está afectada por la presencia o ausencia de Gadd45. No obstante el papel de PCNA en la reparación del ADN es todavía tema de grandes investigaciones (Glockzin, 2003).

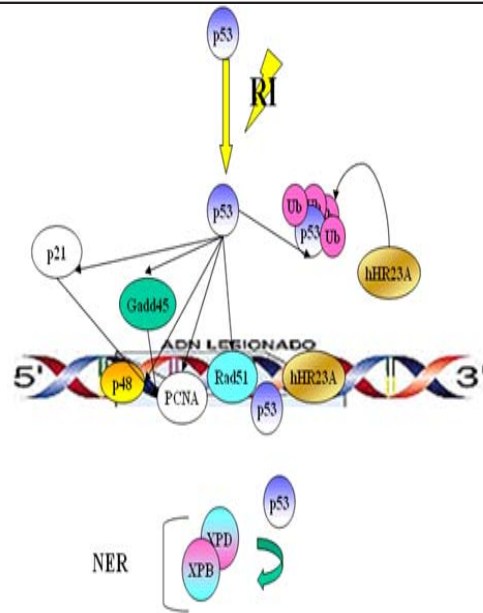


Figura 4 - Señales que activan a p53. Elaborada por González Paula, Riascos Milvia, Zambrano Iván. 2004

La importancia de p53 en la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

NER es una vía de reparación evolutivamente conservada con la habilidad de retirar un amplio rango de aberraciones al ADN causadas por el medio ambiente o como resultado de un proceso endógeno, los más relevante son al parecer los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) inducidos por UV y los fotoproductos pirimidina-pirimidona. El proceso de NER se subdivide en dos vías genéticamente distintas: la reparación de lesiones sobre la totalidad del genoma, llamado Reparación Genómica Global (global genomic repair GGR) y la eliminación rápida bloqueando la transcripción de lesiones presentes en las hélices de ADN transcrito, conocida como reparación por acoplamiento transcripcional (TCR). En un estudio se observó que las células mutantes homocigotas para p53 (utilizando fibroblastos con síndrome de Li-Fraumeni, LFS) eran deficientes en GGR seguida de radiación UV, pero hábiles para TCR, resultado que fue corroborado por otros estudios. De forma simultánea Wang y col, reportaron la unión directa de p53 a los factores NER, XPD y XPB y la inhibición de su actividad helicasa, además, notaron una reducción en la reparación de CPDs en células LFS mutantes hete-

cigotas para p53. También se ha observado un papel de p53 en NER como respuesta a otros tipos de daño al ADN como el causado por los carcinógenos del tabaco. Estas observaciones sugieren que p53 podría modular NER a través de interacciones proteína-proteína, por la unión directa a las helicasas TFIIH, XPB y XPD. Jayaraman y Prives proponen un mecanismo alternativo que involucra la unión directa del extremo C-terminal de p53 a estructuras alteradas de ADN, para posteriormente activar la secuencia de unión específica al ADN y la transcripción de genes (Adimoolan e Ford, 2003).

p53 en la Reparación por Escisión de Bases (BER)

Muchas investigaciones recientes han notado una deficiencia en BER en células p53 mutantes en aproximaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque el mecanismo permanece incierto. En contraste a la forma p53 en NER, la evidencia sugiere que p53 puede interactuar directamente con el complejo de BER. Pero también, se ha sugerido que p53 podría regular la transcripción de genes involucrados en BER, esta afirmación resultó luego de observar cómo los daños en las bases a causa de agentes alquilantes en células p53 nulas exhiben baja BER. No obstante son muy pocos los estudios que muestran un papel de p53 en BER y los datos que se han reportado proveen sólo una provocativa evidencia (Adimoolan e Ford, 2003).

APOPTOSIS

La habilidad de p53 para eliminar exceso, daño o células infectadas por medio de la apoptosis es vital para la apropiada regulación de la proliferación celular en organismos multicelulares (Haupt et al., 2003). p53 es activada por señales de estrés internas en la forma activa. p53 esta implicada en la inducción de la apoptosis por dos vías de señalización diferentes, que llevan a la activación de las caspasas que median este proceso.

- Vía extrínica: p53 puede activar la vía apoptótica extrínica a través de la inducción de genes que codifican tres proteínas de membrana: Fas, Dr5 y PERP.

- FAS: Es un receptor de membrana celular capaz de inducir señales de apoptosis. Este receptor se denominó Fas o Apo-1 y es miembro de la superfamilia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF). La unión del receptor de membrana Fas/Apo-1 con su ligando, es una de las vías de inicio de señales para la apoptosis (Bennett et al., 1998).

- DR5/KILLER: El segundo miembro de esta familia de receptores, que es inducido por p53, es DR5/KILLER, el dominio de muerte contiene un receptor para el ligando que induce apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). DR5 es inducido por p53 en respuesta a daño en el ADN y promueve la muerte celular a través de la caspasa 8 (Jayaraman et al., 1997).

- PERP: La cinética de la inducción de PERP en respuesta a daño en el ADN y la presencia de elementos de respuesta a p53 en el promotor de PERP soporta la noción, que es un blanco directo de p53. Un papel de PERP en la apoptosis, es sugerido por los niveles significativamente altos del ARNm de PERP en células que experimentan apoptosis. Sin embargo, los mecanismos por los cuales PERP contribuye a la apoptosis mediada por p53, están todavía sin definir (Attardi et al., 2000).

- Vía intríneca: La vía apoptótica intríneca esta dominada por las proteínas de la familia Bcl-2, las cuales dirigen la expresión del citocromo C de la mitocondria. Las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladores críticos de la apoptosis.

Un grupo clave de genes de la familia Bcl-2 marcados por p53 incluyen a Bax, Noxa, PUMA y el mas recientemente identificado Bid.

- Bax: Es el primer miembro de este grupo que demostró ser inducido por p53, los elementos de respuesta a p53 han sido recientemente identificados en el gen Bax. En respuesta al estrés, Bax forma un homodímero y libera el citocromo C de la mitocondria, lo cual resulta en la activación de la caspasa 9 (Skulachev, 1998).

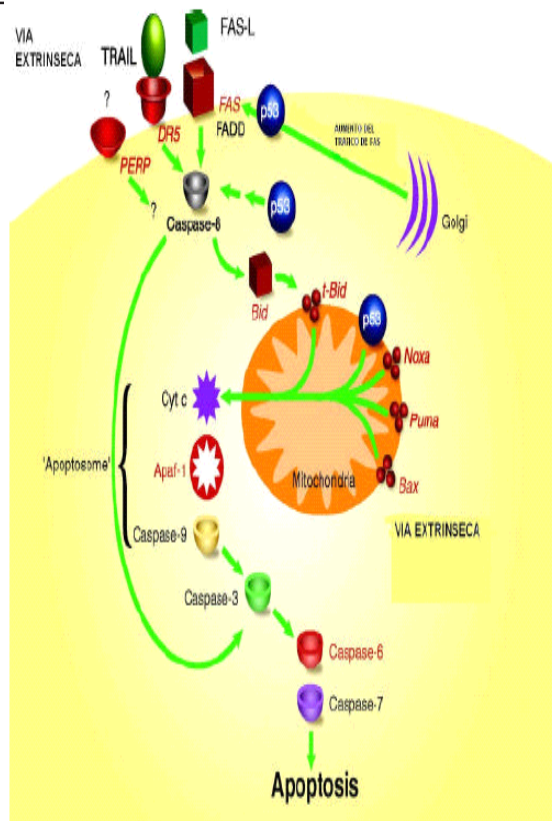


Figura 5. Apoptosis-p53network. Molecular cell Biology

- **PUMA**: El gen PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis), es también inducido directamente por p53 en respuesta a daño en el ADN, a través de elementos de respuesta en el primer intrón de PUMA. PUMA, actúa modulando la actividad de Bax y facilitando la liberación del citocromo C de la mitocondria, y por consiguiente iniciando la cascada apoptótica (Oda et al., 2000).
- **Noxa**: El gen Noxa, contiene un solo elemento de respuesta a p53 en su promotor y es inducido en respuesta a radiaciones X. Noxa codifica una proteína con dominio BH3 y por lo tanto igualmente contribuye a la apoptosis mediada por p53 de igual manera que PUMA y Bax (Oda et al., 2000).
- **Bid**: El gen Bid pro-apoptótico, es reconocido por su única habilidad de conectar la vía extrínseca de receptores de muerte para activar el proceso de disrupción mitocondrial, asociándolo con la vía intrínseca. El gen Bid es transcripcionalmente regulado por p53 en respuesta a radiación gamma a través de elementos de respuesta en el primer intrón del gen humano (Haupt et al., 2003).

- **p53**: La mitocondria juega un papel importante en la apoptosis. En un estudio se muestra que una fracción de la proteína p53 localizada en la mitocondria, se acumula por cerca de una hora después de la activación de p53, y produce cambios en el potencial de membrana, liberando el citocromo C y activando la procaspasa 3. La localización mitocondrial de p53, es específica para apoptosis dependiente de p53 y no durante la apoptosis independiente de p53 (Haupt et al., 2003).

Activación del apoptosoma por p53

La formación del apoptosoma requiere de la liberación del citocromo C y APAF-1 (factor que activa la proteasa apoptótica 1) de la mitocondria y la formación de un complejo con la pro-caspasa 9. p53 promueve la liberación del citocromo C a través de la inducción de genes blanco que codifican proteínas con dominios BH3. Es importante que p53 también induzca la expresión de APAF-1 a través de un elemento de respuesta en el promotor de APAF-1 (Skulachev, 1998).

p53 activa la caspasa 6 de una manera más convencional. En respuesta al daño en el ADN, p53 induce directamente la expresión de la caspasa 6 a través de un elemento de respuesta en el tercer intrón del gen. p53 media la apoptosis revelando un intrincado trabajo de vías de señalización dirigidas por p53 para asegurar una apropiada respuesta a mecanismos de estrés. Además, p53 puede intervenir en cada paso de las vías de apoptosis: desde la señalización extrínseca de los receptores de muerte, a través de la vía convergente del componente Bid, a la vía mitocondrial intrínseca involucrando la formación del apoptosoma, y culminando con la activación directa de las caspasas. Muchos de estos efectos son mediados a través de la activación de genes blanco específicos. También, p53 puede inducir el mismo grupo de genes blanco bajo diferentes condiciones, la especificidad es determinada por otros factores celulares. Por lo tanto es mucho lo que falta por dilucidar

de la interacción de p53 en las vías de señalización que llevan a la muerte celular programada (Haupt et al., 2003).

PAPEL DE P53 EN EL PROCESO DE CARCINOGENÉISIS

El papel crítico del gen p53 manteniendo la integridad del genoma es evidente ya que p53 es el gen comúnmente más alterado en el cáncer humano, con una frecuencia de mutación que excede el 50% (Carrier et al., 1998). La mayoría de las mutaciones son mutaciones missense (de diferente sentido o de sentido falso) dentro del dominio de unión al ADN conservado evolutivamente (Meredith, 2001). La mutación del gen p53 no sólo produce pérdida de función de p53 sino también ganancia de funciones oncogénicas⁴⁹ y en la adopción de una estructura dominante-negativa capaz de volver inactivo el producto de la proteína del alelo normal a través de heterotetramerización (Solomon; Langdon, 1992). p53 puede ser inactivada a través de proteínas virales, como resultado de mutaciones y polimorfismos.

Inactivación por virus

La proteína p53 puede volverse inactiva por oncogenes virales y defectos en la vía de activación de p53. La proteína E6 del papilomavirus humano (HPV) en el carcinoma cervical degrada p53 a través de la proteólisis mediada por ubiquitina (Agarwal et al., 1998). El virus de la Hepatitis B (HBV) codifica HBXAg, que se une al dominio N-terminal de p53 bloqueando su actividad transcripcional (Alarcon et al., 2002). El antígeno viral T del SV40 anula la actividad de unión al ADN de p53 por asociación con el dominio de unión al ADN de p53 y E1B proteína adenoviral inhibe la actividad de transactivación de la proteína p53 (Robles et al, 2001; Langdon, Partridge, 1992).

Polimorfismos

Teóricamente, el mecanismo por el cual los polimorfismos podrían afectar la función de la proteína p53, es generando un codón apareado con un

ARNt que incrementa la mutabilidad debida a una alteración en la secuencia de ADN, o incrementando eventos de acoplamiento secretos y alterando la estabilidad de la transcripción. Sin embargo, datos experimentales sobre la relevancia de tales mecanismos para el gen p53 hacen falta.⁵ Las dos variantes genéticas que llevan a los polimorfismos de la proteína son de serina a prolina en el residuo 47 y de arginina a prolina en el residuo 72 (Hainalt, Pierre, Hollstein, 2000).

Mutaciones somáticas

Las mutaciones "missense" (diferente sentido) han sido observadas en 231 de los 393 codones, incluyendo todos los codones del dominio de unión al ADN excepto el codón 123. Este codón (codón ATC que codifica para el aminoácido treonina) es conservado evolutivamente, pero mutaciones experimentales (alanina) en este codón han mostrado activar en lugar de suprimir la actividad de unión al ADN. La inmensa mayoría de los codones mutados, están en sitios recurrentes (llamados puntos calientes de mutación) que resultan en disfunción de p53 (Hainalt, Pierre, Hollstein, 2000).

Mutaciones germinales en p53: síndrome de Li-Fraumeni

Aproximadamente la mitad de las familias con síndrome de Li-Fraumeni llevan un alelo de p53 mutado en las células somáticas. Esta enfermedad se caracteriza por agrupamiento familiar de varios cánceres, particularmente de aparición temprana (Hainalt, Pierre, Hollstein, 2000). Las mutaciones más frecuentemente observadas son G:C a A:T mutaciones "missense" a dinucleótidos CpG (citosina-fosfatoguanina) de dinucleótidos dentro de las secuencias codificadas conservadas en los residuos en la interfase p53-ADN. No hay ninguna evidencia actualmente que sugiera que ciertas mutaciones en la línea germinal provoquen un subconjunto de tipos de cáncer dentro del espectro de tumores que caracterizan el síndrome

de Li-Fraumeni (Hainalt, Pierre, Hollstein, 2000).

ANTICUERPOS p53

Existe generalmente una muy buena correlación entre la presencia de anticuerpos p53 y su acumulación y/o mutación en el tumor (Smith, 2000). Winter y col encontraron que solo mutaciones missense (de diferente sentido o mutaciones de sentido falso) pueden conducir a una respuesta humoral a p53, hallazgo que fue posteriormente confirmado por numerosos estudios. Se ha sugerido que sólo las mutaciones de p53 localizadas en los exones 5 y 6 con una alteración en la conformación de la proteína se asocian con anticuerpos p53 Smith, 2000).

Muchos estudios muestran que pese a la similitud de los diferentes tipos de cáncer, de las mutaciones y la acumulación de p53, los pacientes podrían ser positivos o negativos para la presencia de estos anticuerpos. Estas observaciones demuestran que otros factores contribuyen a la respuesta humoral; por lo tanto son requeridos estudios de seguimiento sobre muchos tipos de cáncer y la implementación de ensayos estandarizados con mayor sensibilidad que a su vez sean válidos para análisis cuantitativos Smith, 2000).

P53 COMO UN BLANCO EN NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

La alta proporción de tumores con defectos en p53 y el aumento de información detallada sobre su biología molecular, hacen de esta molécula un foco particularmente atractivo en el desarrollo de nuevos tratamientos. La reintroducción de p53 silvestre activa puede ayudar a eliminar la p53 deficiente de células tumorales por inducción de apoptosis, ofreciendo una diversidad de estrategias como se ilustra en los siguientes ejemplos:

- Péptidos diseñados para regenerar la función de p53 en células tumorales rescatando la capacidad de unión al ADN de la p53 mutante, una

aproximación que es particularmente atractiva, porque no causa daño global al ADN, en contraste con las drogas antineoplásicas de uso común.

- La función de p53 puede ser restaurada en tumores por liberación viral de la p53 de tipo silvestre.
- Destrucción selectiva de células deficientes de p53 puede ser completada por ingeniería genética, filtrando adenovirus incapaz de replicarse en células con p53 normal.
- La sobreexpresión de los homólogos descubiertos recientemente; p73 y p51/p40, pueden inducir apoptosis en células tumorales deficientes en p53.
- Otra potencial estrategia incluye la inducción de la exclusión del tumor por inmunización con anticuerpos p53 o péptidos derivados. En tumores que contienen p53 normal, la estimulación de la función por aumento de los niveles de p53, por ejemplo, por bloqueo de su degradación con péptidos que interrumpan la interacción p53-Mdm2, está siendo examinada.

Como los conocimientos de los mecanismos bioquímicos que regulan las funciones de p53 aumentan, puede también ser factible la identificación de nuevos blancos para intervenciones farmacéuticas que apunten a la restauración de las funciones de p53. Esto requerirá algún tiempo antes que se tenga experiencia suficiente y datos experimentales acumulados para identificar cuales estrategias son más efectivas y manejables en la clínica.

CONCLUSIONES

- El cáncer es una enfermedad monoclonal y de carácter multifactorial, se produce por la proliferación descontrolada de una célula, involucrando principalmente a genes que participan en el control del ciclo celular y la reparación del ADN.
- La transformación de una célula normal a neoplásica, es un proceso complejo y multifactorial que progresa en varias etapas y que lleva a la aparición de un clon de células, que

- escapa a un control normal de la proliferación. Este control esta dado en parte por un equilibrio entre la actividad de oncogenes y genes supresores de tumores.
- El gen supresor de tumores p53, esta directamente implicado en detener la formación y desarrollo de tumores.
 - Los genes regulados transcripcionalmente por p53 se agrupan dependiendo de las funciones que realizan como: inhibición del ciclo celular (p21, GADD45, 14-3-3 sigma, reprimos entre otros), reparación del daño en el ADN (Gadd45, p21, p48 entre otros), inhibición de la angiogénesis e inducción de la apoptosis (Bax, Noxa, PUMA, Apaf-1, DR5, PIG3 y Fas entre otros).
 - El primer gen activado transcripcionalmente por p53 es Mdm2, su propio regulador, con el cual tiene una relación de retroalimentación negativa.
 - La mayoría de las mutaciones de los genes supresores son recesivas, y la pérdida total de función requiere generalmente la inactivación de ambas copias cromosómicas; p53 es la excepción.
 - p53 cumple un papel crítico en el mantenimiento de la integridad del genoma, por lo cual es considerado "El Guardián del Genoma".
 - p53 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que participan en el control del ciclo; su inactivación es un evento importante en el proceso de carcinogénesis.
 - Cuando las células sufren daño en su ADN o cuando son sometidas a estrés celular, se activa p53 mediante modificaciones postraduccionales (fosforilación, acetilación). Estas modificaciones no solo aumentan la vida media de la proteína, si no que regulan su actividad biológica.
 - El entendimiento de los procesos moleculares que participan en la inestabilidad genómica, la susceptibilidad al daño, la reparación del ADN, el control del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis será requerida para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.
 - Los estudios de las mutaciones de p53 pueden proveer oportunidades para la terapia y diagnóstico en cáncer. El próximo paso sería modular selectivamente la actividad de p53 bajo condiciones patofisiológicas que generen daño, o restaurar en los tumores la sensibilidad anticáncer como terapéutica.

REFERENCIAS

Scully, J, K. Field, H. Tanzawa. 2000. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology*. Vol. 36.

Agarwal Munna et al. 1998. The p53 Network. Minireview. *The journal of Biological Chemistry*. Vol 273. No1 January 2, (1-4).

Meredith. Irwin. P53 family up data: p73 and p63 develop their own identities. Review. *Cell Growth & Differentiation*. Vol 12 Julio 2001.

Guevara Pardo Gonzalo. 2001. Cáncer y evolución *Revista Colombiana de Cancerología*. Vol 5 No 2, Pág 14-21.

Hainaut, Pierre, Hollstein. 2000. P53 and Human Cancer: The first Ten Thousand Mutations. *Advances in Cancer Research*

Alarcon Dania et al. 2002. p53-Mdm2 the affair that never ends. Commentary. *Carcinogenesis* vol 23 No 2.

Satoshi et al. 1994. Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *Science*. Diciembre 23.

Liu Yuangang, Kulesz Molly. 2001. P53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence specific and non sequence specific DNA binding. *Carcinogenes* Vol 22 No 6.

Robles Ana et al. 2001. APAF-1 is a Transcriptional

Target of p53 in DNA Damage induced Apoptosis.

Advances in Brief. Cancer Research 61 Septiembre.

Nelson W. G, M. Kastan. 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol* 14: 1815-1823.

Huang L. C et al. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1-arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci* 93: 4827-4832 1996.

Shieh S. Y et al. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-334.

Siliciano et al. 1997. The Rb-related p107 protein can suppress E2F function independently of binding to cyclin A/cdk2. *Mol Cell Biol*; 15:338-344.

Canman C. E et al. 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*.

Banin S et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 2003

Waterman M. J et al. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genet.* 19:175-178.

Woo R A et al. 1998. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 394: 700-704.

Knippschild U et al. 1997. P53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase I and enhances the level of casein kinase I delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* 15: 1727-1736.

Sakaguchi K et al. 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Dev.* 12: 2831-2841.

Ko L. J et al. 1997. p53 is phosphorylated by CDK7-cyclin H in a p36MAT1- dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 17: 7220-7229.

Dumaz N et al. 1993. Prolonged p53 protein accumulation in trichothiodystrophy fibroblasts dependent on unrepaired pyrimidine dimers on the transcribed strands of cellular genes. *Mol. Carcinog.* 20:340-347.

Ljungman M, F Zhang. 1998 Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for UV light-induced apoptosis. *Oncogene* 13: 823-831.

Kapoor M, G. Lozano. 1998. Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2834-3837.

Graeber T. G et al. 1994. Hypoxia induces the accumulation of p53 protein, but the activation of a G1-phase checkpoint by low oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol. Cell. Biol* 14: 6264-6277.

Kim C Y et al. 1997. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer. Res* 57: 4200-4204.

Green S. L, A. J Giaccia. 1998. Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy. *Cancer. J. Sci. Am* 4: 218-223.

Stolet D.L et al. 1992. Anoxia-inducible endonuclease activity as a potential basis of the genomic instability of cancer cells. *Cancer. Res.* 52:4372-4378.

An. W. G et al. 1998. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1a. *Nature* 392: 405-408

Jayaraman, KG Murthy, C Zhu, T Curran, S Xanthoudakis, and C Prives 1997. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53 *Genes & Dev.*, Mar;

- 11: 558 - 570 ; 10.1101/gad.11.5.558.
- Linke S. P et al. 1996. A reversible, p53 dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & Dev* 10: 934-947.
- Vargas Alarcon Diana, Ronai Ze'ev. 2002. p53/Mdm2- the affair that never end. Vol.23. No.4. 541-547.
- Kubbutat, M H SN et al. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387: 299-303.
- Yang Yili y Yu Xiaodan. 2003. Regularion of apoptosis: the ubiquitin pathway. Vol. 17. 790-798.
- Kawai H. et al. 2003. Critical contribution of the Mdm2 acidic domain to p53 ubiquitination. Vol.23. No.14. 4934-4947.
- Freedman. D.A. et al. 1999. Funtions or the Mdm2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. (55) 96-107.
- Kamijo, T et al. 1998. Funcional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci*. Vol. 96. 8292-8297.
- Tomoaki et al. 2001. Involvement of the interaction between p21 and PCNA for the maintenance of G2/M after DNA damage. *Journal Bioquimical Chemistry*. Vol. 276. No.47.
- Zhang Y. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4A locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92: 725-734.
- Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T. 2000. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase *J Biol Chem*. Jul 28;275(30):22627-30.
- Heng-Yin Yang, Yu-Ye Wen, Chih-Hsin Chen, Guillermina Lozano, and Mong-Hong Lee. 2003. 14-3-3s positively Regulates p53 and Suppresses Tumor Growth. *Molecular and Cellular Biology*, October 2003, p. 7096-7107, Vol. 23, No. 20.
- Buckbinder et al. 1995. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature*. Octubre 19. 377.
- Adimoolam, Ford. 2003. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. Abril 23.
- Haupt Susan et al. 2003. Apoptosis-the p53 network. *Journal of Cell Science* Vol.116, No. 20.
- Bennett M et al. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282: 290-293.
- Attardi L et al. 2000. PERP an apoptosis-associated target of p53 is a novel member of the PMP-22/gas 3 family. *Genes. Dev* 14: 704-718.
- Skulachev V.P. 1998. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*. 423: 275-280.
- Oda E et al. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-1058.
- Carrier et al. 1998. Gadd45, a p53 responsive stress protein modifies DNA accesibility on damaged chromatin.
- Solomon, Berg Martin. *Biologia*. Capitulo 16 CANCER. 5 edición. Editorial McGraw Hill.
- Langdon I. D. Partridge M. 1992. Expresion of the tumour suppressor gene p53 in oral cancer. *British Journal of oral & maxillofacial surgery*. Vol. 30 (214-220)
- Alarcon Dania y col. 2002. p53-Mdm2 the affair that never ends. *Commentary. Carcinogenesis* vol 23 No 2.
- Schwartz. D.N y col 1993. Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* 8: 1487-1494.

Soussi. Thierry. Cancer Research. 2001. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review.

Smith martin. 2000. p53 mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cell lacking p53, p21 and/or Gadd45 genes. 2000. Febrero 22.

Glockzin. 2003. Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. Moll Cell Biology. Septiembre 11.

Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, 371, 534–537.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Persons R, Trent JMI. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor supressor gene. *Cell*; 75: 817-825.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Facultad de Odontología - Universidad Nacional de Colombia.

Doris Ballesteros Castañeda
mdballesterosc@unal.edu.co