

ANÁLISIS MUTACIONAL DE p53 EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

ÍNDICE

PRESENTACIÓN

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

PRESENTACIÓN

I. INTRODUCCION

I.1 Definición y concepto de neoplasia hematológica

I.1.1 Aspectos históricos

I.1.2 Clasificación OMS

I.2 Los genes implicados en la génesis del cáncer

I.2.1 Los oncogenes

I.2.2 Los genes supresores

I.2.3 Los genes de reparación

I.3 Los mecanismos moleculares de transformación neoplásica

I.3.1 Mutaciones puntuales

I.3.2 Deleciones

I.3.3 Amplificaciones

I.3.4 Reordenamientos

I.4 La proteína p53

I.4.1 Historia y descubrimiento de p53

I.4.2 Estructura y función

I.4.3 Mutaciones puntuales de p53

I.4.4 Modelos animales

I.4.5 Síndrome de Li-Fraumeni

I.4.6 Bases de datos y recursos de la web

I.5 p53 y neoplasias hematológicas

I.5.1 Patología neoplásica mieloide

I.5.1.1 Leucemias agudas mieloblásticas

I.5.1.2 Síndromes mieloproliferativos crónicos: LMC, TE, PV y TE

I.5.1.3 Síndromes mielodisplásicos

I.5.2 Patología neoplásica linfoide

I.5.2.1 Linfoma de Burkitt

I.5.2.2 Síndromes linfoproliferativos crónicos B

I.5.2.3 Mieloma Múltiple

I.5.2.4 Leucemias agudas linfoblásticas

I.5.2.5 Linfomas

I.5.2.6 Otra patología neoplásica linfoide: linfoma/leucemia NK

II. OBJETIVOS.

III. RESULTADOS.

III.1 Metodológicos

III.2 Leucemias agudas mieloblásticas, Síndromes mieloproliferativos y síndromes mielodisplásicos.

III.2.1 Publicaciones y anexos

III.2.2 Mutaciones de p53 asociadas a neoplasias mieloides con reordenamientos de 17p.

III.2.3 Mutación de p53 en LAM con reordenamiento MLL

III.3 Leucemias agudas linfoblásticas/ Linfoma de Burkitt

III.3.1 Publicaciones y anexos

III.3.2 Mutación de p53 en un caso de Linfoma de Burkitt

III.4 Síndromes linfoproliferativos crónicos.

III.4.1 Publicaciones y anexos

III.4.2 Mutaciones de p53 en linfomas NK

III.4.3 Mutaciones de p53 en linfomas foliculares

III.4.4 Mutación de p53 en un caso de linfoma del manto

III.5 Síndrome de Li-Fraumeni

III.6 Espectro mutacional

IV. DISCUSIÓN.

IV.1 p53 en neoplasias mieloides

IV.1.1 Síndromes mieloproliferativos crónicos

IV.1.2 Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos

IV.2 p53 en neoplasias linfoides: LAL y SLPC

IV.2.1 Leucemias agudas linfoblásticas-T

IV.2.2 Leucemias agudas linfoblásticas de línea B del niño

IV.2.3 Linfoma de Burkitt

IV.2.4 Síndromes linfoproliferativos crónicos

IV.3 Espectro mutacional

V. CONCLUSIONES

VI. REFERENCIAS

Índice de Figuras

Figura 1. Localización de oncogenes.

Figura 2. Mecanismos cromosómicos implicados en la génesis del retinoblastoma.

Figura 3. Las vías de transformación neoplásica.

Figura 4. La deaminación espontánea de la 5-metilcitosina conduce a un cambio a timina (**C->T**).

Figura 5. Esquema de la organización genómica de p53 .

Figura 6. Estructura de la proteína p53.

Figura 7. Estructura tridimensional de la proteína p53 y su interacción con el ADN.

Figura 8. Mecanismos de activación de p53.

Figura 9. Estructura de la región de p16.

Figura 10. Esquema de los mecanismos de inactivación de p53.

Figura 11. Espectro mutacional en neoplasias mieloides.

Figura 12. Espectro mutacional en neoplasias linfoides.

Figura 13. Distribución de las mutaciones descritas en la presente tesis.

Figura 14. Tipo de cambio de base en las mutaciones descritas.

PRESENTACIÓN

Las mutaciones de p53 representan la lesión molecular más común en neoplasias humanas. Además, su presencia es indicativa de escasa respuesta terapéutica y mala evolución. Planteamos esta tesis como un intento de analizar la contribución de las mutaciones de p53 a la patogenia de diferentes neoplasias hematológicas: estudiar la importancia de dichas mutaciones en los fenómenos de evolución clonal, recaídas y refractareidad al tratamiento tanto en procesos linfoides como mieloides. Otro aspecto que se aborda es el de la asociación de las mutaciones de p53 con otras lesiones moleculares que desempeñan un papel primordial en el origen de diferentes tipos de leucemias y linfomas (reordenamientos MLL, TEL/AML1, c-myc, bcl2/Jh).

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar quiero dedicar mi trabajo a la memoria de quien fue mi maestro y amigo el Dr Jesús Soler, que me enseñó y ayudó al comienzo de mi trayectoria como hematólogo. Su recuerdo es fuente inagotable de estímulo.

A la Dra Montserrat Baiget , que ha dirigido esta tesis doctoral por transmitirme fuerza, orden y estímulo por aprender y al Dr Jordi Sierra, codirector del trabajo, por su apoyo y generosidad. A la Dra Salut Brunet con quien empecé la etapa de médico residente en el Hospital de Sant Pau y al Dr Miquel Rutllant que siempre ha estado dispuesto a echarme un cable y se ha mostrado como un jefe comprensivo.

A mis amigos italianos por su estupenda acogida durante mis estancias en el Ospedale San Luigi de Turín. Gracias a ellos aprecio aún más su maravilloso país. Ellos son los Profesores Beppe Saglio, Gianluca Gaidano y Umberto Mazza y sus colaboradores Enrico Gottardi, Anna Serra, Adele Parziale, Daniela De Michelis, Cristina Pastore y Carlo Lanza.

Al Dr Enric Gimferrer por definir la palabra ilusión.

A mis compañeros, los Dres Adriana Lasa, Elena Bussaglia, Orland Díez y Pía Gallano con quienes ha surgido del trabajo cotidiano una amistad que se perpetuará en el tiempo. Con ellos espero comer y hablar durante muchos años.

A los compañeros del Laboratorio de Hematología que siempre han estado a mi lado, en los que siempre he confiado y en los que siempre pensaré con agradecimiento: Camino Estivill, Josep Úbeda, Maria Jose Carnicer, Mar Bellido, Olga López, Luz Muñoz y Joana Rego-Araujo. A Enriqueta Rubiol por su amistad incondicional y a la Dra Anna Aventín a la que respeto y admiro en el trabajo.

A mis amigos del Servicio de Genética: Elisabeth del Río, paradigma de rigor y perfeccionismo, Montse Domenech, Mónica Cornet (banda perfecta), Ramón Seminago, Mari Jose, Monica Calaf, Ivón, Loreto y el Dr Eduardo Tizzano. Trabajar con ellos ha sido para mí un enorme placer y la evidencia de un ejemplo inolvidable.

A mis compañeros y amigos de residencia: Roser Mateu, Albert Altès, Rodrigo Martino, Mario Montagut, Anna Sureda, Angel F. Remacha, Joan Carles Souto, Jose Mateo, Carme Canals, Clara Martínez y Charo López.

A los Dres Ramón Pujol, Ramón Bordes y Isabel Badell con los que comparto inquietudes y afinidades profesionales.

A Gemma Marigó, por ayudarme en el laborioso formato de este trabajo. A Mari Badía por su eterno buen humor. A Laura y a Nancy.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias.

A los enfermos que he visto sufrir. No quiero olvidar sus nombres ni sus caras. Sirvan sus punzadas de recuerdo para obligarme a hacer mejor las cosas en mi profesión.

Por último, a Gemma y a mis hijos, tesoros encontrados y abiertos cada día.

Abreviaturas

REAL: Revised European American lymphoma classification
FAB: French American British , clasificación de leucemias
LMC: Leucemia mieloide crónica
LAM: Leucemia aguda mieloide
LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica
SMD: Síndrome mielodisplásico
MLL: Mixed leukemia locus (gen)
PML/RARA: Promyelocytic locus/Receptor α de retinoides
CBFB/MYH11:Core binding factor b/Myosin heavy Chain11(genes reordenados en LAM)
AML1/ETO: Acute myeloid locus 1/ETO (genes reordenados en LAM)
NK: Linfocitos *natural killer*
GS: Genes supresores
LOH: Loss of heterozygosity
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
PCR: Reacción en cadena de polimerasa
Bcr/abl: breakpoint cluster region gene/Abelson locus(genes reordenados en la LMC)
MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas
HTLV-I: Virus humano linfotrópico tipo I
RB: Retinoblastoma (gen)
APC: Adenomatosis polipósica del colon (gen)
WT-1.Tumor de Wilms (gen)
NF-1 y 2: Neurofibromatosis (genes)
VHL: Von Hippel-Lindau (gen)
DCC : Delecionado en carcinoma de colon (gen)
BRCA1 y 2: Breast cancer 1 y 2 (genes)
RT: retrotranscripción
TEL/AML-1: ets-like leukemia (gen)/acute myeloid locus-1 (genes reordenados en LAL)
SV-40: Simian virus-40
KDa: kilodalton
cADN: ADN complementario
ARF: Alternative reading frame
Missense: cambio de sentido
Non-sense: sin sentido
Stop: mutaciones de terminación
MDM: Mouse double minute
IPI: Índice Pronóstico Internacional

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Definición y concepto de neoplasia hematológica

El término neoplasia hematológica engloba los diversos tipos de proliferaciones tumorales de las células sanguíneas o de sus precursores localizados en la médula ósea y en los órganos linfoides. Se han definido dos grandes categorías de neoplasias hematológicas: las leucemias y los linfomas. Las primeras afectan a la médula ósea y se extienden a la sangre periférica, mientras que los linfomas se originan en los diferentes tejidos linfoides (ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado a mucosas, bazo).

I.1.1. Aspectos históricos.

Virchow , uno de los pioneros en el estudio de la leucemia, la definió a mitades del siglo XIX como “ un proceso *sui generis* debido a una alteración en la diferenciación normal de las células productoras de sangre. Conocemos las secuelas de la enfermedad pero no su causa". En 1845 Virchow describió un paciente que presentaba un material blanquecino en los vasos sanguíneos. En el examen microscópico observó que la mayoría de los corpúsculos eran descoloridos y consideró que, probablemente, no se trataba de un proceso piémico, empleando el término “weisses blut” (sangre blanca) para definir la enfermedad. Sin embargo no había sido éste el primer caso publicado: en 1827 Velpeau describió unos hallazgos necróticos muy sugestivos de lo que hoy conocemos como leucemia mieloide crónica. Otros casos similares fueron publicados por Barth en 1839 y Bennett en 1845. Estos autores los consideraron como procesos infecciosos y en Virchow recae el mérito de valorar su distinta naturaleza. El primer caso descrito en vida del paciente fue reportado por Vogel en 1851.

En 1847 Virchow acuñó el término de leucemia (leukos, blanco y haima, sangre). En 1856 publicó un trabajo en el que se describieron las características patológicas de esta entidad, reafirmando en que se trataba de una proliferación de los corpúsculos descoloridos. Virchow aceptó la teoría vigente en aquella época que asumía que los corpúsculos descoloridos (leucocitos) eran los precursores de los corpúsculos coloreados (eritrocitos) y sugirió que la leucemia se producía por un retraso en la transformación de las formas descoloridas en las coloreadas. Al mismo tiempo describió un tipo de leucemia esplénica y otra linfática.

En 1878, Neumann añadió un nuevo tipo: la mielógena. Este mismo autor había descrito previamente que la médula ósea era un lugar importante en la fabricación de corpúsculos hemáticos.

Gowers, en 1879, clasificó las leucemias agudas en leucocitemia esplénica y linfadenosis, haciendo equivalente este término a la enfermedad descrita por Thomas Hodgkin en 1832. Este

hecho inició un período de confusión que se arrastró durante más de un siglo. A finales del siglo XIX y principios del XX los términos leucemia, pseudoleucemia, leucosarcoma, cloroma, linfosarcoma, reticulosis, mielosis, mieloma, y aún otros fueron empleados por distintos autores sólo o en combinación y con diferentes criterios.

En 1863, Virchow propuso el término linfosarcoma para definir la afectación localizada de los ganglios linfáticos.

Treinta años más tarde, Kundrat resucitó el término linfosarcoma para definir la afectación primaria de los ganglios linfáticos con diseminación por contigüidad. En un intento de superar la dicotomía leucemia/linfoma Turk, en 1903, propuso el concepto de linfomatosis que englobaba las leucemias linfoides y los linfosarcomas, anticipándose al concepto de enfermedades linfoproliferativas propuesto por Dameshek en 1964.

En 1889, Ebstein describió los primeros casos de leucemia aguda y en 1896 Ehrlich aplicó las tinciones panópticas para reconocer los diferentes tipos de leucemias. Naegeli en 1900 y Schilling en 1913 describieron las leucemias mieloblásticas y monocíticas, respectivamente (Revisado por Soler, 1989).

I.1.2 Clasificación OMS

En la clasificación de la OMS de las neoplasias hematológicas, de 1997 se agrupan aquellas entidades con trascendencia clínica bien establecida, atendiendo a los siguientes criterios:

1. Cuadro clínico.
2. Características morfológicas utilizando microscopía convencional.
3. Inmunofenotipo.
4. Lesiones genéticas.

Esta clasificación incorpora, con algunas matizaciones, los logros normalizadores que representaron las clasificaciones del grupo FAB para las leucemias agudas y síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos y por otra parte la clasificación REAL de los linfomas.

Las cuatro categorías más importantes son:

- I. Neoplasias mieloides.
- II. Neoplasias linfoides.
- III. Enfermedades de las células cebadas.
- IV. Neoplasias histiocíticas.

I. Neoplasias mieloides

En la clasificación FAB se reconocían tres grandes grupos de neoplasias mieloides: las leucemias agudas mieloides, los síndromes mielodisplásicos y los síndromes mieloproliferativos crónicos. El recuento de elementos blásticos, la diferenciación en una línea concreta y el grado de maduración

servían como criterios diagnósticos y se definían mediante morfología, histoquímica e inmunofenotipo. El reconocimiento de las diferentes lesiones citogenéticas y moleculares, así como la presencia de mielodisplasia asociada como factores que modifican el pronóstico de este grupo de enfermedades ha sido recogido en la nueva clasificación que incluye:

- a. Síndromes mieloproliferativos (LMC bcr/abl+, leucemia neutrofilica crónica, leucemia eosinofílica crónica, mielofibrosis idiopática, policitemia vera, trombocitemia esencial).
- b. Síndromes mieloproliferativos/mielodisplásicos (leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mieloides crónica atípica, leucemia mielomonocítica juvenil).
- c. Síndromes mielodisplásicos (anemia refractaria con o sin sideroblastos en anillo, citopenia refractaria con displasia multilineal, anemia refractaria con exceso de blastos, síndrome 5q- y síndrome mielodisplásico no clasificable).
- d. Leucemias agudas mieloides (leucemias agudas mieloides con translocaciones cromosómicas recurrentes (AML1/ETO, CBFβ-MYH11, PML/RARA y MLL), leucemias agudas mieloides con displasia multilineal con o sin síndrome mielodisplásico previo, leucemias agudas mieloides o síndromes mielodisplásicos relacionados con algún tratamiento- agentes alquilantes, epipodofilotoxinas u otros-, y leucemias agudas mieloides no categorizadas - mínimamente diferenciadas, sin maduración, leucemia aguda mielomonocítica, monocítica, eritroide, megacariocítica, basofílica, panmielosis aguda con mielofibrosis y leucemia aguda bifenotípica).

Como principales cambios respecto a clasificaciones previas conviene destacar por su importancia: i) el descenso a un 20% de blastos para sentar el diagnóstico de LAM, ii) la identificación de lesiones moleculares en LAM, iii) la separación de la LMMC del grupo de SMD y iv) el reconocimiento de la citopenia refractaria con displasia multilineal como SMD. Además en las LAM se valora la presencia de displasia multilineal.

II. Neoplasias linfoides

En la clasificación de las neoplasias linfoides se han adoptado los criterios y categorías adoptados por el grupo REAL en 1994 (Harris,1994)

Las diferentes entidades se agrupan atendiendo al fenotipo de la célula transformada en:

a. Neoplasias B

1. De precursores: leucemia aguda linfoblástica de línea B
2. Maduras: leucemia linfática crónica, leucemia prolinfocítica B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma esplénico de la zona marginal con o sin linfocitos vellosos, tricoleucemia, mieloma, linfoma de la zona marginal extranodal de tipo MALT, linfoma nodal de la zona marginal con o sin células B monocitoides, linfoma folicular, linfoma del manto, linfoma B difuso de célula grande en el que se incluyen

las formas mediastínicas y los de cavidades.

b. Neoplasias T y NK

1. De precursores: leucemia aguda linfoblástica T.
2. Maduras: leucemia prolinfocítica T, leucemia de linfocitos granulares, leucemia agresiva NK, leucemia/linfoma T del adulto asociada a infección por HTLV-I, linfoma NK extranodal del tipo nasal, linfoma T tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico gamma-delta, linfoma T del tipo paniculitis subcutánea, micosis fungoide/síndrome de Sézary, linfoma anaplásico de células grandes sistémico y cutáneo, linfoma T periférico y linfoma T angioinmunoblástico.

c. Linfoma de Hodgkin: esclerosis nodular (grados 1 y 2), predominio linfocítico, celularidad mixta y depleción linfocitaria.

I.2. LOS GENES IMPLICADOS EN LA GÉNESIS DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad genética que resulta de la acumulación de lesiones moleculares heredadas o adquiridas en genes que participan en el control del crecimiento, diferenciación celular y en el mantenimiento de la integridad del genoma.

Los genes implicados en el desarrollo del cáncer pueden clasificarse en:

1. Oncogenes o genes cuya activación anómala conduce a lesiones neoplásicas.
2. Genes supresores (GS), son aquellos cuya inactivación funcional se asocia al cáncer.
3. Genes que intervienen en la reparación del genoma.

I.2.1 Oncogenes

Los oncogenes se identificaron como los genes transformantes virales y son formas alteradas de genes celulares normales llamados proto-oncogenes. En el genoma humano, la mayoría de proto-oncogenes se localizan en la zona adyacente a las distintas roturas cromosómicas identificadas en el cáncer. Los proto-oncogenes, altamente conservados a lo largo de la evolución, regulan la cascada de eventos que mantiene la progresión ordenada del ciclo, la división y la diferenciación celular. En una célula cancerosa esta progresión ordenada se pierde cuando uno o más componentes de esta cascada se altera. El proceso de control de crecimiento o diferenciación celular se inicia por la interacción de factores de crecimiento y citoquinas extracelulares con sus correspondientes receptores de membrana. Esta activación desencadena una serie de señales intracelulares que finalmente dan lugar a una activación y/o inhibición de la expresión de genes celulares. Los proto-oncogenes funcionan como puntos críticos en estas vías, así tenemos proto-oncogenes que codifican citoquinas, receptores, proteínas citoplasmáticas que transmiten señales a otras proteínas o al núcleo y finalmente proteínas nucleares (factores de transcripción) (Figura 1). La activación oncogénica y la consiguiente proliferación continua se asocia a cambios

morfológicos celulares. El mecanismo oncogénico inmortalizador de descubrimiento más reciente es la abolición de la muerte celular programada (apoptosis) que se activa en todos los tejidos con alta remodelación tisular (médula ósea, intestino, etc).

El método clásico de identificación de oncogenes es el de la transfección de ADN que consiste en la introducción mediante métodos físicos o químicos de un fragmento de ADN en el interior de un grupo de células. En este sistema, una línea celular no tumoral (fibroblastos, NIH3T3) se somete a transfección de un ADN obtenido de un tumor. La transferencia de un ADN que contiene un oncogén activado origina unos focos con diferente morfología y se pierde la inhibición del crecimiento celular por contacto. La utilización de este sistema de transfección permitió identificar genes tan relevantes como los de la familia *ras* así como otros genes (*neu, met, trk, mas, ret, hst* y *erb-2*).

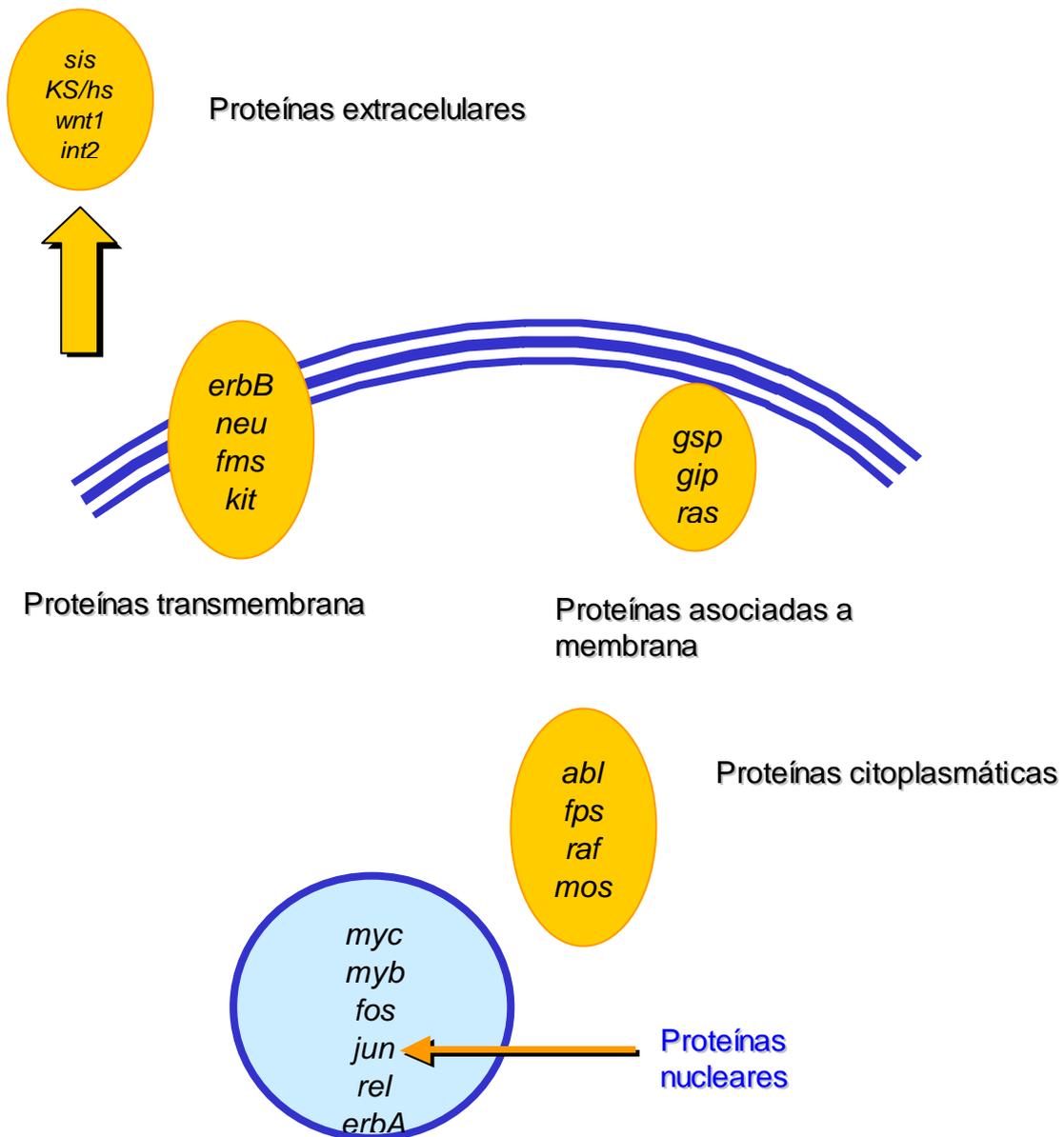


Figura 1. Representación esquemática de los compartimentos celulares y extracelulares donde se localizan oncogenes y proto-oncogenes. Se muestran factores de crecimiento, receptores transmembrana de factores de crecimiento, proteínas asociadas a la membrana celular que intervienen en la transducción de señales, proteínas intermedias de estas vías de señalización de localización citoplasmática y proteínas nucleares que intervienen en la regulación de la expresión génica (factores de transcripción).

I.2.2. Genes supresores

Los genes supresores (GS) codifican proteínas que intervienen en la regulación del crecimiento o diferenciación celular mediante un proceso de control negativo y la pérdida de su función contribuye directamente a la aparición de un fenotipo tumoral. Los estudios epidemiológicos de Knudson (Knudson,1971) en casos de retinoblastoma condujeron a la hipótesis de los “dos eventos” (two-hits): se necesitan dos mutaciones inactivantes para que aparezca el retinoblastoma. La primera en el locus de susceptibilidad al retinoblastoma (13q) puede estar en la línea germinal o somática mientras que la segunda mutación siempre se adquiere en las células somáticas. Esta hipótesis no sólo explica como pueden colaborar las mutaciones germinales y somáticas en el proceso de tumorigénesis sino que también explica el patrón de herencia recesivo observado en algún tipo de neoplasia (Figura 2).

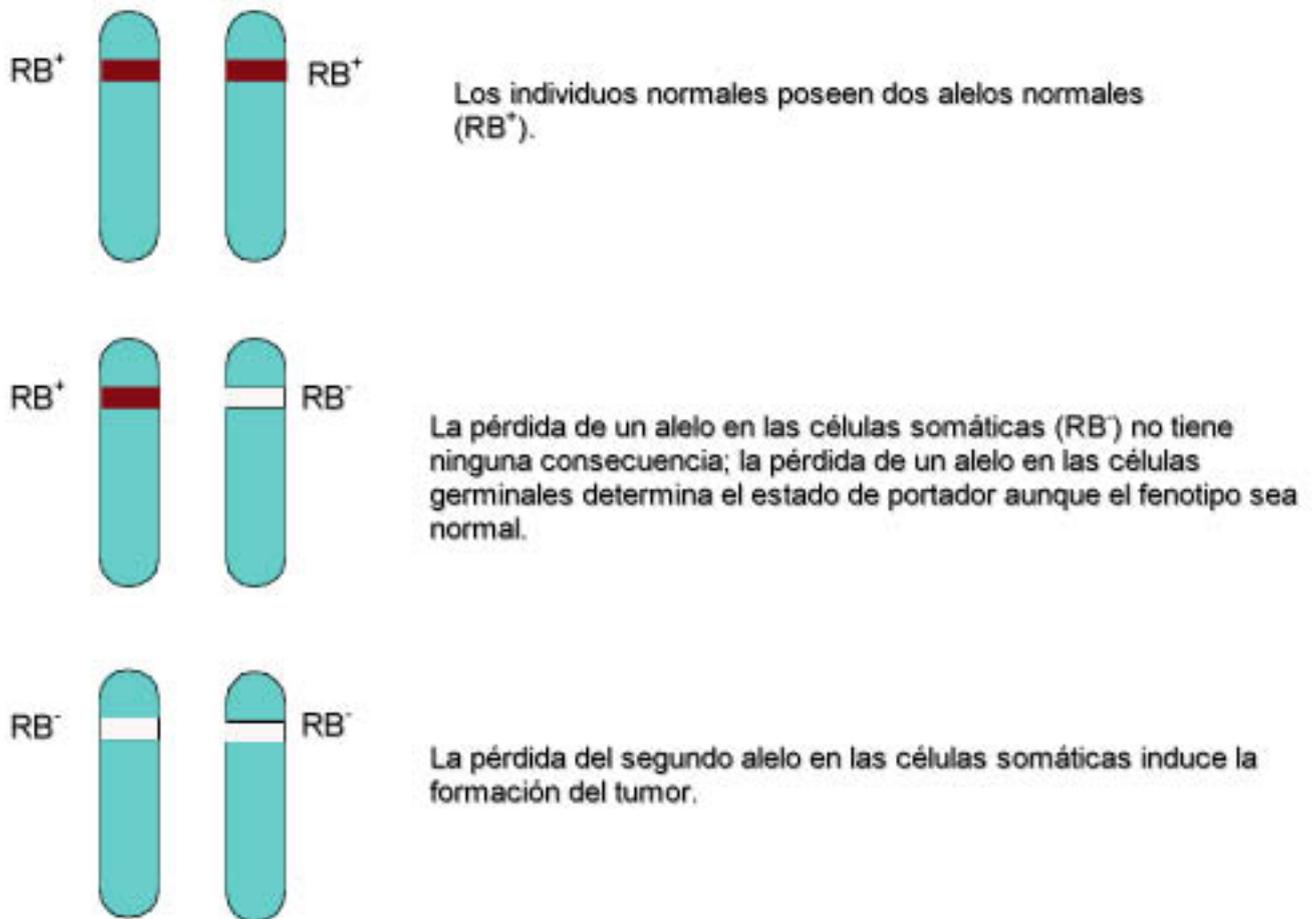


Figura 2. Mecanismos cromosómicos implicados en la génesis del retinoblastoma. Este tumor aparece cuando se encuentran los dos alelos de RB inactivados en la retina. El segundo evento inactivador puede producirse por una no separación y reduplicación del primer alelo anormal, por recombinación mitótica o por mutaciones puntuales en el segundo alelo añadidas a las ya presentes en el primer alelo.

La aproximación metodológica más utilizada para identificar GS son los estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH). Estos estudios se basan en la comparación de ADN obtenido de la muestra tumoral con el ADN de un tejido sano. Utilizando técnicas de PCR específicas para determinadas regiones del genoma se pueden detectar zonas en el tumor que no amplifican (pérdidas alélicas). Estas regiones cromosómicas no amplificables en el tumor pueden contener un GS. Estos datos se completan con los hallazgos citogenéticos correspondientes (deleciones) y con estudios mutacionales del alelo conservado en muestras tumorales.

La autenticación de un GS se obtiene cuando concurren dos circunstancias:

- a. Identificación de mutaciones inactivantes en la línea germinal que cosegregan, es decir que se heredan de forma conjunta a la predisposición al cáncer en las familias afectadas y
- b. Presencia de mutaciones somáticas en el alelo conservado en muestras tumorales.

Los genes que cumplen estas condiciones son: *p53*, *RB1*, *APC*, *WT-1*, *NF-1*, *NF-2*, *VHL*, *p16*, *BRCA1*, *BRCA2* y *TSC2*.

Las mutaciones en un determinado gen que aparecen únicamente en células tumorales y que se asocian a una baja expresión de la correspondiente proteína se consideran como evidencia indirecta del carácter supresor del gen en cuestión. En esta situación se encuentran genes como *a-catenina*, E-cadherina, DPC4 y DCC.

I.2.3. Genes de reparación del ADN.

Al principio de la década de los 80 se sugirió que las células cancerosas presentaban un fenotipo de hipermutabilidad que explicaría el gran número de mutaciones presente en los tumores. En 1993, el grupo de Perucho describió un nuevo tipo de anomalías en el genoma: inserciones o deleciones en zonas repetitivas del genoma (inestabilidad de microsatélites o también fenotipo RER por errores replicativos)(Ionov,1993; Rampino,1997). Este tipo de mutaciones se asoció a tumores de colon. El espectro mutacional en las secuencias repetidas era similar al observado en hongos y bacterias que carecían de maquinaria enzimática para corregir los alineamientos incorrectos del ADN (mismatch repair). Este sistema es un complejo multienzimático que corrige los errores en la replicación del ADN que ocurren durante la fase S del ciclo celular y algunos de los genes humanos implicados son hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2. La mutación de un alelo de estos genes en la línea germinal predispondría a la adquisición del fenotipo mutador que una vez activo (mutación del segundo alelo) podría actuar sobre multitud de genes.

Los genes que codifican proteínas que intervienen en la reparación del ADN ante diferentes tipos de agresiones celulares (radiaciones ionizantes, luz UV, mutágenos químicos) o bien en el proceso de replicación celular fisiológica, se han encontrado inactivados en un conjunto de síndromes familiares de predisposición a tumores. Estas enfermedades son: los síndromes NER (nucleotide excision repair), ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, cáncer colorrectal

hereditario no polipósico (genes hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2) y el síndrome de Werner. Todas estas entidades comparten las siguientes características: baja frecuencia, diferentes grados de alteraciones somáticas en los individuos afectados (malformaciones, adenomas, hipogonadismo, trastornos tróficos, baja estatura, etc) y desarrollo de tumores en zonas expuestas a mutágenos exógenos (piel y mucosas) o con alta tasa de replicación celular (médula ósea y mucosa colónica). Vogelstein y Kinzler (Kinzler, 1996 y 1997) idearon una nueva nomenclatura para definir las distintas funciones de los genes implicados en el desarrollo del cáncer. Establecieron dos tipos de funciones atribuibles a estos genes: i) regulación de la progresión del ciclo celular y/o del proceso de apoptosis (genes "Gatekeepers") y ii) salvaguarda de la integridad del genoma (genes "Caretakers").



Figura 3. Las vías de transformación neoplásica. La herencia de una mutación en un gen "gatekeeper" o "caretaker" predispone al individuo que la posee al cáncer. Sin embargo, se requieren cambios genéticos adicionales. En la vía de los "caretaker" se necesitan al menos tres mutaciones adicionales, aunque la inactivación del segundo alelo "caretaker" acelera mucho este proceso debido a la marcada inestabilidad genética que produce. En la vía del "gatekeeper" sólo se necesita una mutación adicional para iniciar la neoplasia.

En cada tipo celular, uno o muy pocos genes tienen una función de "gatekeeper". Los individuos con una predisposición genética debido a la herencia de un alelo mutado de dicho gen sólo necesitan una mutación adicional (somática) para desarrollar la neoplasia. Los tumores esporádicos aparecen en los individuos sin mutaciones en la línea germinal sólo cuando en la línea somática coinciden dos mutaciones. Debido a la baja probabilidad de esta coincidencia, los individuos con una mutación hereditaria en un gen "gatekeeper" tienen una probabilidad mil veces superior que la población general desarrollar un tumor (Hipótesis de Knudson).

La inactivación de un gen con función "caretaker" no promueve el desarrollo del tumor directamente sino como consecuencia de la inestabilidad genética originada por la pérdida de su función. La neoplasia aparece por el aumento de mutaciones de todos los genes incluyendo los "gatekeepers". Una vez formado el tumor, éste puede progresar de forma especialmente rápida debido a la facilidad de mutación de muchos otros genes que controlan el crecimiento y la muerte celular. En las familias con una mutación de un gen "caretaker" se necesitan 3 mutaciones adicionales para la aparición del cáncer: en la línea germinal viene mutado un alelo del "caretaker" y en la somática el otro alelo y los dos alelos del "gatekeeper". Es por la necesidad de tres mutaciones por lo que estas familias sólo tienen 5-50 veces más riesgo de tumor que la población general. La aparición de tumores esporádicos (inactivación de dos alelos "caretaker"+ dos alelos "gatekeeper") sería consecuentemente muy poco frecuente.

I.3. LOS MECANISMOS MOLECULARES DE TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA.

I.3.1. Mutaciones puntuales.

Las mutaciones se definen como cambios en la secuencia de ADN que determinan la aparición de un rasgo patológico.

Las mutaciones puntuales, o sustitución de un solo nucleótido, se originan por errores en diferentes procesos:

i) por un error en el proceso de replicación del ADN. Las ADN polimerasas intervienen en la replicación, la recombinación y el proceso de reparación. Su fidelidad a la hora de incorporar una nueva base es un factor crítico en la tasa de mutación celular. La mutación aparecería por errores de la polimerasa.

ii) En un modelo alternativo, (slipped mispairing), los nucleótidos se incorporarían de forma incorrecta durante la replicación del ADN debido a un pequeño desplazamiento de la hebra de ADN que sirve de molde en la replicación. Al producirse el realineamiento y reparación se fija una base incorrecta. Este mecanismo se vería favorecido en zonas repetitivas del ADN.

iii) Los dinucleótidos **CpG** son zonas particularmente susceptibles a las mutaciones debido a la metilación de la citosina (5-metilcitosina) que por una deaminación y un simple cambio tautomérico origina un cambio a timina. Esta timina no es reconocida por los mecanismos de

reparación del ADN. Las zonas ricas en CpG (islotos CpG) se localizan, habitualmente, en los extremos 5' de los genes eucariotas.

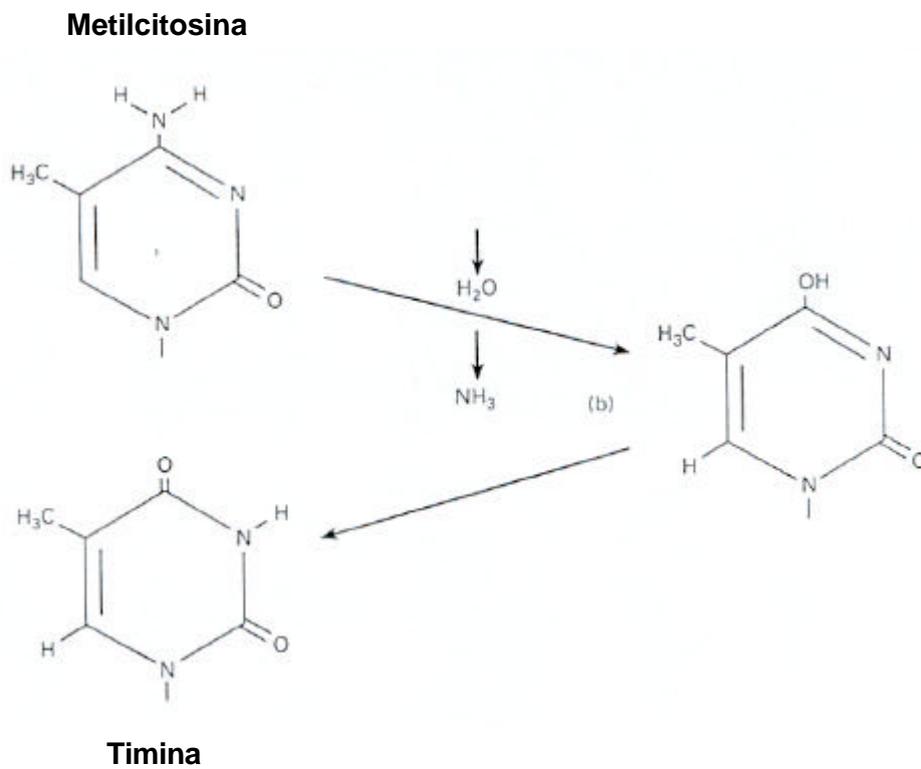


Figura 4. La deaminación espontánea de la 5-metilcitosina conduce a un cambio a timina (**C->T**). Si ocurre en un triplete CGA (Arg) de la hebra codificante, la transición origina la aparición de un TGA (stop). Si el cambio se produce en la hebra no codificante, es decir en el triplete complementario a CGA, se genera en la hebra codificante una transición **G->A**, y la formación en este caso de un triplete CAA (Gln).

La importancia de este fenómeno en el origen de mutaciones puntuales vino refrendada por el exceso de transiciones C->T en las variantes mutadas del gen del Factor VIII. También se da un exceso de transiciones G->A como consecuencia de los cambios C->T en la hebra del ADN antisentido. La hipermutabilidad de los dinucleótidos CpG en algunas enfermedades hereditarias sugiere que estas zonas están metiladas en la línea germinal y por lo tanto son susceptibles a la deaminación. Sin embargo, el patrón de metilación es diferente en las células germinales: el espermatozoide está altamente metilado mientras que el oocito está poco metilado. Cabe señalar que el gen p53 contiene zonas de CpG metiladas en la línea germinal.

iv) Existen tri-o tetra-nucleotidos que se encuentran con más frecuencia de la esperada en zonas próximas (10 bp) a mutaciones. Algunos como el **CTT**, corresponden a la diana de reconocimiento de la topoisomerasa I; la secuencia **TGGA** es muy similar al sitio de stop de la ADN polimerasa α . Así, podría ser que la pausa de la polimerasa predispusiera a una incorporación de bases incorrecta.

Un fenómeno a tener en cuenta es el de la mutabilidad desigual de las dos hebras de ADN debido al diferente grado de metilación y de reparación. Así las transversiones de purina a pirimidina son más frecuentes que las de pirimidina a purina. Sin embargo, las transiciones se presentan con una frecuencia muy similar.

Categorías de mutaciones:

- Sustituciones de bases en la secuencia codificante de una proteína: mutaciones por cambio de sentido (missense), mutaciones sin sentido (non-sense), mutaciones de terminación (stop). Son las más frecuentes en p53. A menudo afectan a los dinucleotidos CpG que representan zonas de hipermutabilidad.
- Mutaciones que afectan a la formación del ARNm: "splicing" (relicación) y de procesamiento: i) mutaciones en las zonas 5' y 3' de "splicing" que originan un "exon skipping" o la utilización de un sitio críptico de "splicing" ii) mutaciones intrónicas o de un exón que activan un sitio críptico de "splicing" y finalmente, iii) mutaciones en el "branch point", que es una secuencia conservada en el intron que hace posible que el "splicing" se lleve a cabo.
- Mutaciones en las secuencias reguladoras: afectan al proceso de transcripción.

I.3.2. Deleciones

El análisis citogenético de las células tumorales permitió identificar la existencia de frecuentes pérdidas de material genético asociadas al desarrollo del cáncer. El estudio de secuencias polimórficas del tipo microsatélite ha facilitado la identificación de las regiones cromosómicas en que se producen deleciones con mayor frecuencia. Las zonas del genoma en las que se demuestran deleciones indican la existencia de genes cuya inactivación puede favorecer el desarrollo del cáncer. Otro tipo de lesiones similares son las microdeleciones en las que sólo se pierden unos pocos nucleótidos o bien microinserciones cuando se trata de la incorporación de unas pocas bases. En ambos casos se produce una proteína no funcional o truncada como resultado de la alteración de la pauta de lectura.

I.3.3. Amplificaciones

La amplificación génica es uno de los mecanismos que pueden conducir a un aumento de la concentración de una determinada proteína en la célula. Este fenómeno se ha asociado exclusivamente a células neoplásicas. La amplificación génica consiste en un aumento del número de copias de uno o más genes. En ciertas ocasiones son tantas las copias amplificadas que pueden evidenciarse en el estudio citogenético en forma de los “diminutos dobles”, que son pequeños pseudocromosomas que carecen de centrómero, o de regiones cromosómicas con tinción homogénea (HSR, homogeneously stained regions). En la mayoría de casos de amplificación de oncogenes, su estructura molecular es normal, por lo que parece que las mutaciones no acompañan a la amplificación y que el mecanismo por el cual ésta contribuye a la neoplasia depende sólo de la dosis de proteína traducida. En ocasiones, la amplificación génica representa un hallazgo esporádico en un tumor, pero en otros casos se trata de una alteración reproducible en tumores de diferentes pacientes. El caso mejor estudiado es la amplificación de N-myc asociado al neuroblastoma, el retinoblastoma y el carcinoma de células pequeñas de pulmón.

I.3.4. Reordenamientos

Los reordenamientos génicos implican la unión de dos fragmentos de ADN del mismo o de distinto cromosoma que en condiciones normales no son adyacentes. Se distinguen dos tipos principales de translocaciones:

- 1) las que ponen en contacto un oncogén con las secuencias reguladoras (promotores y enhancers) de los genes de las inmunoglobulinas y el receptor de célula T. Estas lesiones son características de los linfomas.
- 2) las que producen un nuevo gen quimérico por la fusión de dos genes distintos, situados habitualmente en dos cromosomas diferentes. Estas lesiones son típicas de las leucemias agudas. En ambos casos el estudio citogenético puede mostrar las alteraciones estructurales correspondientes (ej. intercambio de los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 en la t(9;22). En otras situaciones sólo el estudio molecular (RT-PCR) puede evidenciar el ARNm quimérico (ej. TEL/AML-1 en LAL).

I. 4 LA PROTEÍNA P53

1.4.1 Historia y descubrimiento de p53.

El descubrimiento de la proteína p53 fue el resultado de dos tipos de estudios. En uno de ellos se utilizó el virus oncogénico SV-40 y en el otro se utilizó una aproximación de tipo serológico.

En los estudios virológicos, cuando se transformaron cultivos celulares con el virus oncogénico SV-40 y se efectuaron estudios de inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra el

antígeno T, se identificó una proteína de 53 kDa . Esta proteína se expresaba en muchas líneas celulares murinas transformadas pero también en células que no habían sido infectadas por el virus, por lo que se supuso que estaba codificada por el genoma del ratón.

Simultáneamente a estos hallazgos y empleando análisis de tipo serológico se descubrió que, al estudiar la respuesta inmune anti-tumoral en algunos ratones a los que se había inducido tumores con carcinógenos (metilcolantreno) se podían identificar anticuerpos dirigidos contra la proteína de 53 kDa (Deleo,1979). Estos anticuerpos también aparecían en suero de pacientes con neoplasias de mama (Crawford,1982) y linfomas de Burkitt (Caron de Fromental, 1987)

En trabajos posteriores, se evidenció que cuando se privaba del estímulo trófico (suero) a determinadas líneas celulares en cultivo, disminuían los niveles de ARNm de p53. Al inducir crecimiento con suero los niveles de ARNm y proteína de p53 aumentaban, alcanzando el pico en la transición de las fases del ciclo celular G1/S, justo antes de la replicación del ADN, lo que sugería que p53 era un regulador positivo del crecimiento celular. Se demostró además que la proteína p53 tiene una vida media corta y se localiza en el núcleo. En un trabajo posterior se comprobó que la inyección intranuclear de un anticuerpo frente a p53 en fibroblastos de ratón inhibía la entrada de las células en fase S tras exposición a suero. Además, la inhibición de la expresión de p53 prevenía la proliferación celular tanto en células transformadas como no transformadas.

Al final de la década de los 80 se observó que no todos los cADN de p53 presentaban la misma actividad en el ensayo de cooperación con Ha-ras en el establecimiento de un fenotipo tumoral. La determinación de la secuencia de dicho cADN reveló diferencias en zonas de p53 altamente conservadas entre las especies. Este hecho sugirió que aquellas diferencias funcionales de p53 podrían ser debidas a mutaciones puntuales patogénicas en el gen que codificaba dicha proteína.

I.4.2. Estructura y función.

El gen que codifica la proteína p53 se localiza en el cromosoma 17p13.1, se extiende a lo largo de 20kb de ADN genómico y contiene 11 exones (Figura 5).

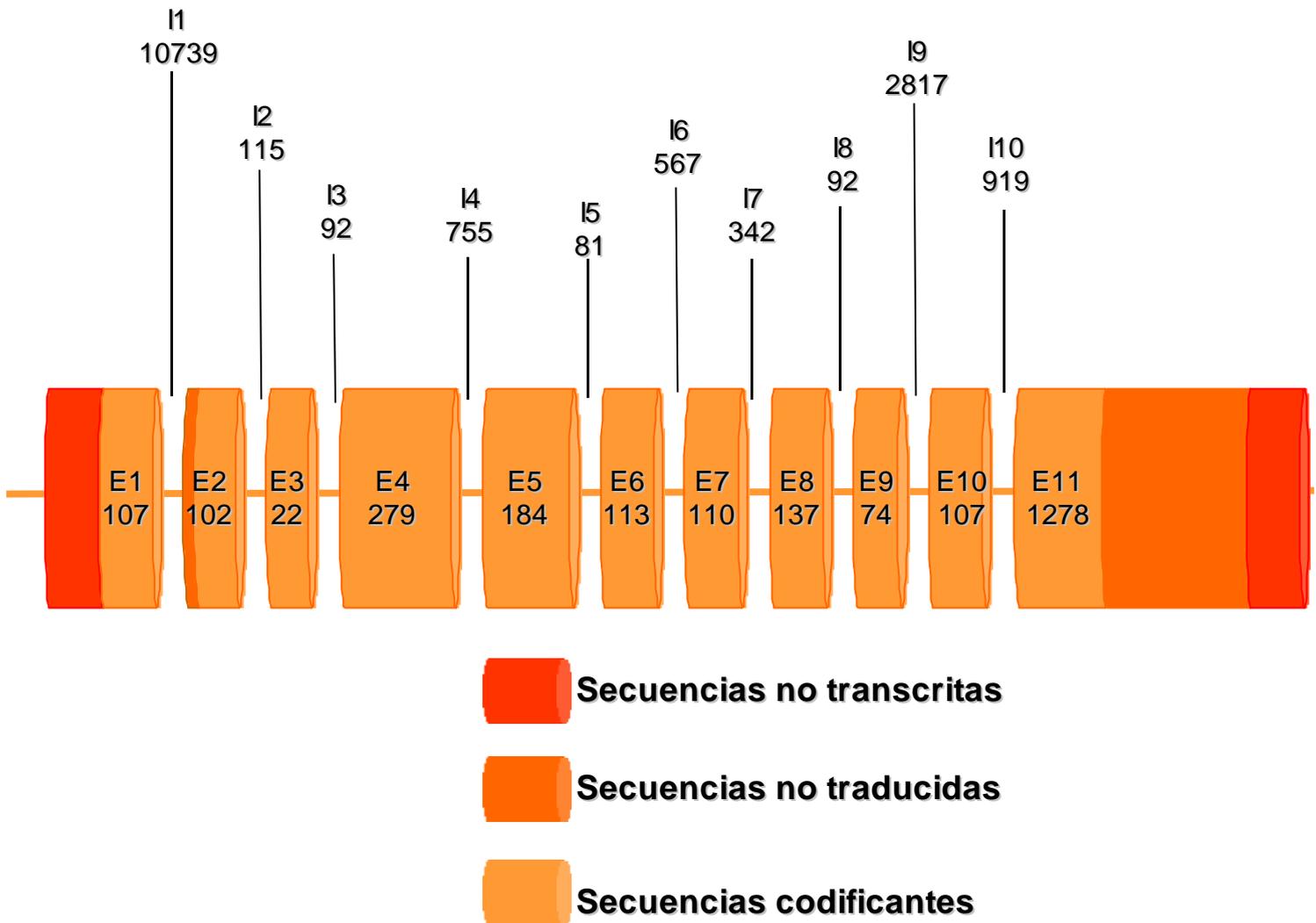


Figura 5. Esquema de la organización genómica de p53 en el que se indican el tamaño de los exones y los intrones.

El gen p53 posee dos promotores: p53p1 en la región 5' del primer exón que origina la proteína completa y un promotor localizado en el primer intrón, 1 Kb distal al primer exón y que origina un transcrito de menor tamaño (Hp53int) cuya función es, en la actualidad, desconocida. Existen también secuencias reguladoras en la porción 3' del gen (Fu, 1996).

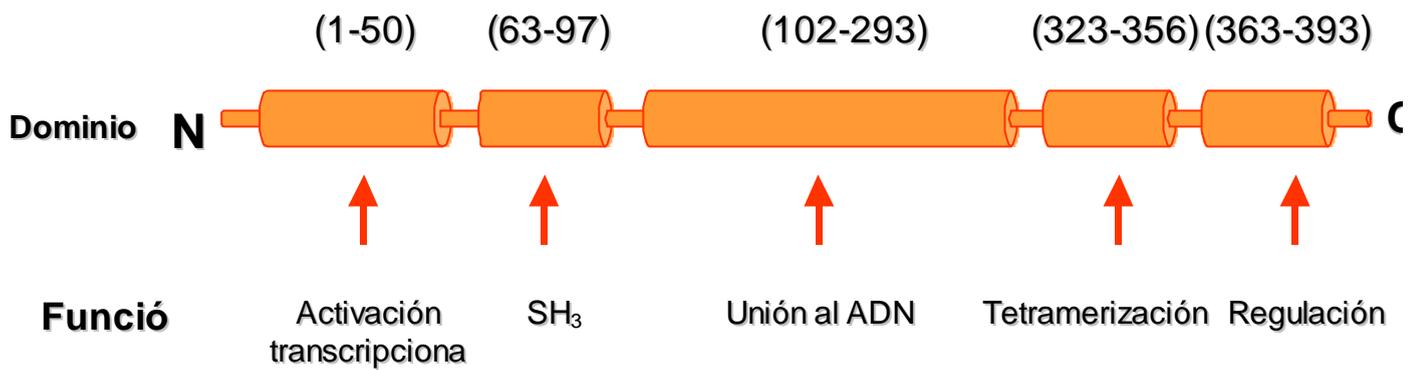


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la proteína p53. Se ilustran los dominios funcionales más importantes.

La proteína p53 está formada por 393 aminoácidos que se pueden agrupar en tres dominios (Figura 7). Las funciones de algunos fragmentos de la proteína no son bien conocidos en la actualidad (May, 1999).

1. Dominio aminoterminal.

Comprende hasta el aminoácido 102, de los que los primeros 50 residuos poseen una actividad transactivadora. Este dominio interacciona con la ARN polimerasa y aumenta la transcripción. Los residuos críticos son los aminoácidos 19, 22 y 23. Las proteínas que se unen a p53 en este dominio son: la proteína E1b de adenovirus, MDM2 y la proteína X del virus de la hepatitis B. En la región aminoterminal también se encuentra una región rica en prolina (aminoácidos 63-97) con elevada similaridad con las proteínas que unen SH3 (Walker, 1996), que es necesaria para la apoptosis y que interacciona con proteínas celulares como c-abl y virales (E6 de papiloma). En esta región rica en prolina reside un polimorfismo (Arg72) (Storey, 1998) que determina una mayor susceptibilidad a la degradación de p53 en tejidos infectados por el virus del papiloma (HPV), lo que explicaría la mayor predisposición al desarrollo de cánceres de cuello uterino.

2. Dominio de unión al ADN (entre los aminoácidos 102-293).

La región central es resistente a la acción de enzimas proteolíticas y además interacciona con el antígeno mayor del virus SV40. En este dominio se localizan cuatro regiones altamente conservadas entre diferentes especies y sirve de reconocimiento y de unión al ADN. Los aa 248 y 273 (ambos Arg) son los que se unen directamente al ADN y además son los que sufren mayor número de mutaciones en muestras tumorales. Los dominios 1 y 2 bastan para que p53 actúe como factor de transcripción.

3. Dominio carboxiterminal (aminoácidos 293-393).

La región C-terminal incluye: i) una región de enlace y ii) un dominio de tetramerización, de los aminoácidos 323-356. En esta zona se localizan tres tipos de funciones: la señal de localización nuclear (NLS), oligomerización (p53 es un tetrámero) y una diana de fosforilación para la CDK (kinasa dependiente de ciclina). Los mutantes en la región NLS 316-325 muestran una proteína p53 de localización exclusivamente citoplasmática con lo que no puede efectuar sus funciones como factor de transcripción. También este dominio interviene en la promoción de la apoptosis (Lassus, 1999), en la regulación de la transcripción, aunque de forma no tan importante como el extremo amino-terminal, y en el reconocimiento del daño de la doble cadena de ADN.

La proteína p53 posee una estructura básica beta con dos hojas antiparalelas ("sheets") compuestas cada una de ellas por 4 y 5 cintas o "strands". Esta estructura soporta tres bucles o loops externos con las siguientes funciones:

- 1 bucle se une a la curvatura mayor del ADN
- 1 bucle se une a la curvatura menor del ADN
- 1 bucle se empaqueta y comprime al bucle 2

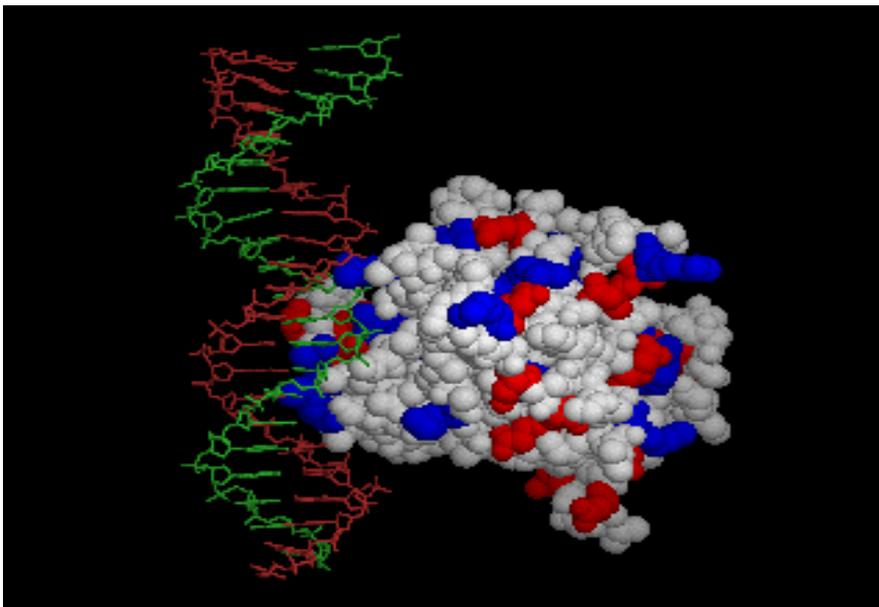


Figura 7. Estructura tridimensional de la proteína p53 y su interacción con el ADN.

La proteína p53 se encuentra conservada entre diferentes especies, de modo que las secuencias de p53 humana y de ratón presentan una identidad del 80%. En *Drosophila* se ha identificado un gen homólogo a p53 conocido como Dmp53 que se une a secuencias específicas de ADN reconocidas también por p53 humano. Cuando se expresa esta proteína se induce apoptosis y la inhibición conduce a la resistencia a la apoptosis post-radiación.

La proteína p53 forma tetrámeros y se une a secuencias específicas del ADN (dos copias de la secuencia 5'-PuPuPu-C(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' separadas por 0-13 nucleótidos) para realizar su función propia como factor de transcripción en colaboración con otras proteínas activadoras como CBP (Gu, 1997).

El estímulo fisiológico para la activación de p53 sería el daño del ADN causado por la radiación ionizante, agentes genotóxicos y oncogenes, como por ejemplo la forma oncogénica de *ras* (Serrano, 1997; Palmero, 1998). Esta activación de p53 se produce por fosforilaciones, defosforilaciones y acetilaciones (Lakin, 1999; Jianyuan, 2000) mediadas por la proteína codificada por el gen de la ataxia-telangiectasia, ATM (Banin, 1998; Waterman, 1998), por la ADN proteína quinasa (Woo, 1998) y por quinasas inducidas por el stress (Fuchs, 1998). (Figura 8).

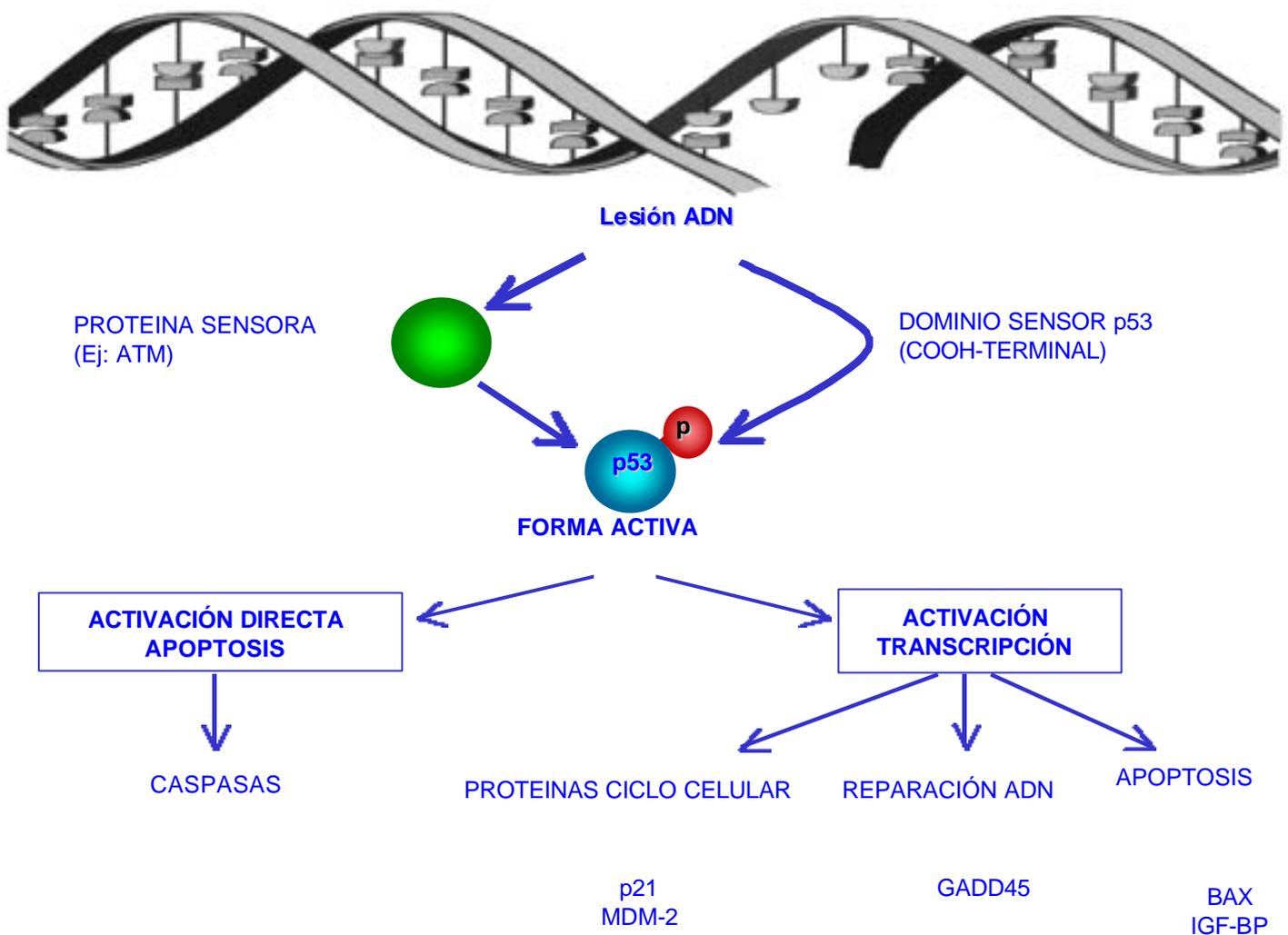


Figura 8. Mecanismos de activación de p53. Las lesiones del ADN son reconocidas por una o más proteínas “sensores” que identifican el tipo específico de lesión. p53 también es capaz de funcionar como proteína sensora a través de su dominio carboxi terminal. La proteína sensora modifica a p53 por fosforilación y esta forma es más estable, con lo que puede unirse a las secuencias reguladoras de diferentes genes (p21, MDM2, GADD45, Bax, IGF-BP, ciclina G). La apoptosis mediada por p53 se desencadena por mecanismos de activación transcripcional y por estímulo directo de la proteína p53 activa sobre otras proteínas.

La activación química de p53 produce un incremento de las formas activas de la proteína con capacidad de unión al ADN y con capacidad de funcionar como factor de transcripción. Gran parte de los efectos observados se deben a la liberación del inhibidor fisiológico de p53, la proteína MDM2 que, en condiciones normales, desplaza rápidamente a p53 del núcleo celular hacia el citoplasma y la introduce en las vías de degradación proteica dependiente de ubiquitina

(Chen,1994; Wu,1993; Sigalas,1996; Tao,1999). La proteína responsable de la liberación del efecto inhibitorio de MDM2 es p14^{ARF} que se origina por un "splicing" alternativo del locus de p16 (Tao,1999; Pomerantz 1998; Kamijo 1997; Radfar 1998;Sherr,2000) (Figura 9).

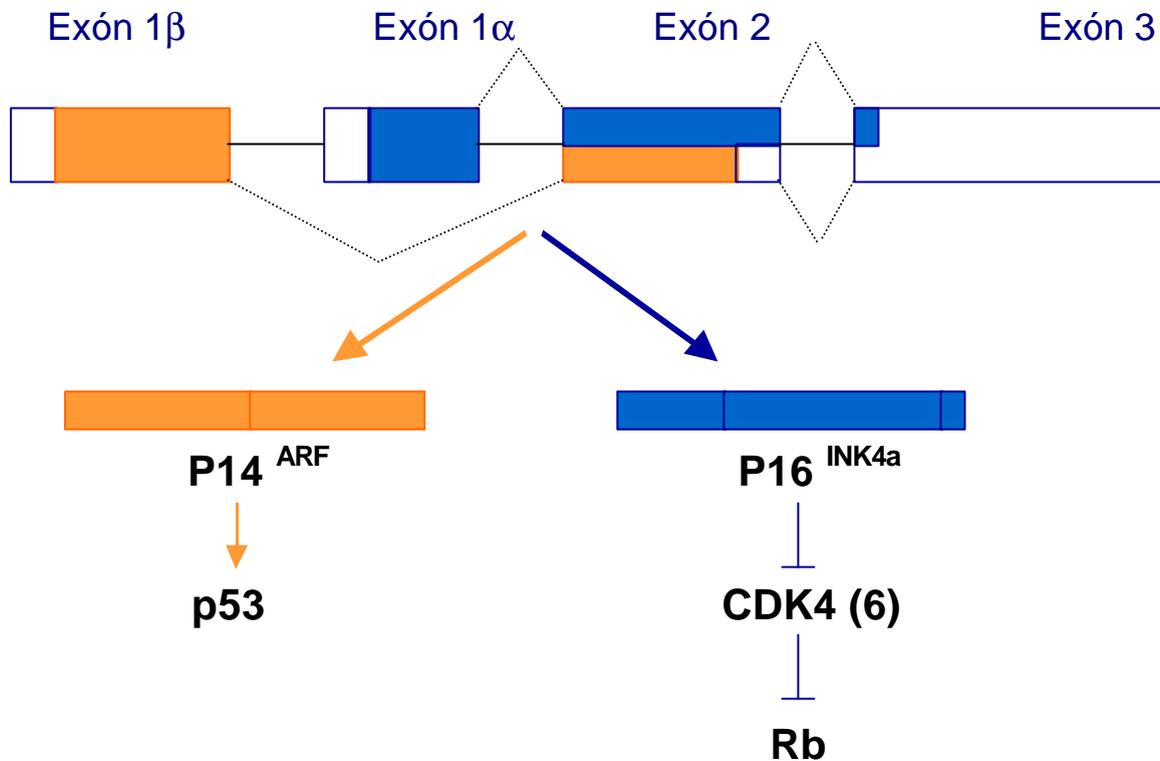


Figura 9. Estructura de la región de p16 localizada en los brazos cortos del cromosoma 9. En una misma región y por "splicing" alternativos se forman dos proteínas que intervienen en el control y regulación del ciclo celular : p14^{ARF} (p19^{ARF} en ratones) y p16. La vía de p14^{ARF} participa en la inhibición del crecimiento tumoral principalmente, aunque no exclusivamente, a través de p53. Las alteraciones de p16 tienen unas consecuencias funcionales equivalentes a las de CDK4, ciclina D y retinoblastoma.

La proteína p53, una vez activada, se une a las secuencias específicas que están presentes en las zonas promotoras de muchos genes, algunos todavía ni siquiera conocidos (Kern, 1992; Ginsberg,1991;Yu, 1999). Las consecuencias de estos procesos celulares comportan:

1. El freno en la progresión del ciclo celular en G1, mediado por p21(WAF) y GADD45. p21 es un potente inhibidor de varias CDK entre las que están ciclina D-CDK4/6, ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK. p21 también evitaría la fosforilación de Rb y por lo tanto se impide la progresión del ciclo celular. Esta función de parada de p53 o "checkpoint" (Huang, 1996;

Kuerbitz,1992; Shio,1992) permite que los enzimas de reparación de ADN corrijan los defectos inducidos (Taylor,1999) y en el caso de que éstos sean irreparables la célula es desviada hacia

2. La inducción de apoptosis, mediada por Bax, Apaf-1 y caspasa- 9 entre otras proteínas (Soengas, 1999; Simms 1998). En células tumorales sin p53 normal, la introducción del p53 conduce a un envejecimiento acelerado ligado a cambios morfológicos y activación del programa de apoptosis (Sugrue, 1997).

Es, en base a estas funciones, que se ha denominado a p53 como el guardián del genoma puesto que interviene, una vez activada, en el mantenimiento de su integridad. p53 contribuiría, también, a la estabilidad del genoma sin necesidad de sufrir procesos de activación gracias a su función exonucleasa (Albrechtsen,1999; Mummenbrauer,1996; Lee, 1995).

La carencia de p53 funcional determina amplificaciones génicas (Livingstone, 1992) que son corregidas con p53 normal (Yin,1992), un incremento de la recombinación homóloga (Mekeel,1997; Bertrand,1997), un incremento de la afinidad por la topoisomerasa I (Gobert, 1999), una duplicación centrosómica con la consiguiente alteración de la segregación cromosómica (Fukasawa,1996) y microdeleciones (Gebow, 2000). Sin embargo, las células deficientes de p53 no presentan una predisposición a la adquisición de mutaciones puntuales (Sands, 1995). No obstante, conviene mencionar que p48, la proteína deficiente en el xeroderma pigmentosum, presenta una expresión dependiente de p53 (Hwang, 1999).

I.4.3 Mutaciones puntuales.

Se ha identificado un gran número de mutaciones de p53 que se recogen en una base de datos específica (www.iarc.fr/p53). Habitualmente, uno de los alelos sufre una mutación puntual del tipo cambio de sentido que origina una proteína alterada mientras que el segundo alelo se pierde. Este es el patrón característico de los genes supresores de tumores en los que las alteraciones de ambos alelos determinan un fenotipo recesivo.

La mayor parte de las mutaciones descritas, aproximadamente el 95%, se localizan en el dominio de unión al ADN. El porcentaje restante se reparte entre los residuos 1-119 y 291 al 393. Las mutaciones que se localizan en el dominio de unión afectan, de forma preferente, a las zonas de la proteína conservadas entre las diferentes especies (Hussain,1998; Harris,1996). La importancia de la capacidad de unión al ADN como factor determinante de la funcionalidad normal de p53 se ilustra por el hecho de que mutantes que pierden su afinidad por el ADN por cambios estructurales de la proteína (Wong,1999) pueden ser corregidos no sólo por la presencia de una secuencia normal sino por la introducción de aminoácidos básicos capaces de unir p53 al DNA

(Wieczorek,1996). En estudios que utilizan experimentos de mutagénesis dirigida, se han identificado mutaciones capaces de corregir los efectos deletéreos de aquellas que conllevan pérdida de unión al ADN (G245S es compensada por N239Y y T123P, V143A por N268D) (Brachmann,1998).

El tipo de mutaciones puntuales identificadas en p53 muestra una cierta especificidad según el dominio en el que se localiza. En los dominios carboxi-terminal y amino-terminal predominan las mutaciones sin sentido y por desplazamiento del molde de lectura. En la zona de unión al ADN se ubican las mutaciones por cambio de sentido.

En esta región, existen determinados codones que presentan muy frecuentemente mutaciones sea cual sea el tejido analizado. Son los codones 175, 245, 248, 273 y 282. Se han identificado dos codones cuyas mutaciones son tejido-específicas: las mutaciones en el codon 249 aparecen en los tumores de hígado, mientras que las mutaciones que afectan al codon 157 han sido descritas en cáncer de pulmón.

Se ha postulado que las diferencias en la distribución del patrón mutacional y del tipo de tumor pueden deberse a la naturaleza del agente mutagénico o a la selección preferencial de la clona mutada en determinados tejidos.

Considerando la naturaleza del mutágeno, cabe indicar que las transiciones (C->T y G->A) se encuentran en la mayoría de tipos tumorales, aunque predominan mucho las C->T en tumores de piel. Esta asociación podría explicarse por el hecho de que la luz UV favorece la formación de dímeros de citosina y resulta en cambios de C->T. Las transversiones (G->T), en cambio, son muy frecuentes en tumores hepáticos y de pulmón. En el caso de los tumores hepáticos que se asocian a cambios G>T en el codon 249, se ha demostrado que la combinación de la aflatoxina B1 (presente en los cacahuetes contaminados con el hongo *Aspergillus flavus*) con los residuos de guanina (G) en las zonas ricas en GC favorece la conversión de G >T (Harris,1996).

Estudios cristalográficos han demostrado que los residuos en los que con más frecuencia se encuentran mutaciones son aquellos que se unen directamente al ADN. Se denominan mutaciones de contacto y afectan a los codones 248, 273 y 282. Se afectan, también de forma frecuente aquellos residuos (codon 175) que son críticos para la integridad estructural del dominio de unión al ADN (Rolley,1995).

Las consecuencias funcionales de las mutaciones de p53 son variadas y dependen no sólo de la región o dominio afectado sino también del tipo de mutación. Se han identificado, por ejemplo, mutaciones que pierden la actividad de transcripción para unos genes y no para otros (Flaman,1998) y mutaciones patogénicas sin alteraciones de la función como factor de transcripción y de inductor de apoptosis (Crook,1998), en las que se supone que se inactiva una nueva función de p53 como proteína transportadora núcleo/citoplasma.

Otra consecuencia de determinado tipo de mutaciones de p53 es la que comporta una ganancia de función (Dittmer,1993;Hann,1993). En cultivos de células desprovistas de ambos alelos de p53, la introducción de algunos mutantes de p53 determina un aumento de la capacidad tumorigénica cuando se implantan las células a ratones inmunodeprimidos. En el mismo sentido, los mutantes son capaces de sobreexpresar los genes localizados bajo la influencia del promotor de la "multi-drug resistance" (MDR), esta función de transactivación de MDR no la posee la proteína p53 normal (Chin,1992). Este tipo de mutantes serían particularmente eficaces en la generación de inestabilidad cromosómica (Gualberto,1998) probablemente debido a su interacción con topoisomerasa I o proteínas estructurales que intervienen en la recombinación homóloga (Albor, 1998; Müller,1996). Las mutaciones que se asocian a una ganancia de función se han identificado en muestras de pacientes y suelen afectar a las zonas de unión al ADN, confiriendo, además, resistencia a los tratamientos quimioterápicos (Brachmann, 1996; Epstein,1998; Blandino,1999). En cuanto a la importancia de la selección preferencial de la clona mutada en determinados tejidos, se demuestra porque existen 24 codones en los que las mutaciones no producen pérdida de función de la proteína. No se ha reportado la existencia de estas mutaciones (mutaciones prohibidas) en muestras tumorales (Tabla I).

Tabla I. Mutaciones “prohibidas” en el gen p53

Num	Codon	Aa	Num	Codon	Aa
122	GTG	Val	212	TTT	Phe
123	ACT	Thr	221	GAG	Glu
124	TGC	Cys	222	CCG	Pro
150	ACA	Thr	225	GTT	Val
180	GAG	Glu	226	GGC	Gly
185	AGC	Ser	228	GAC	Asp
188	CTG	Leu	231	ACC	Thr
189	GCC	Ala	243	ATG	Met
200	AAT	Asn	264	CTA	Leu
202	CGT	Arg	268	AAC	Asn
206	TTG	Leu	269	AGC	Ser
210	AAC	Asn	288	AAT	Asn

La selección de la clona con mutaciones de p53 en muestras tumorales se debe a la mayor resistencia de estas células a la carencia de oxígeno en las áreas poco irrigadas de los tumores (Kinzler, 1996).

Además de las mutaciones inactivantes y de las que comportan una ganancia de función, la simple delección de p53 (haploinsuficiencia) puede determinar la formación del tumor (Venkatachalam, 1998). Estos estudios explican porque en algunos tumores se encuentran delecciones de p53 sin presencia de mutaciones.

Los mecanismos moleculares implicados en la génesis de las mutaciones de p53 son:

1. Para las delecciones y micro-inserciones se invocan errores en los mecanismos generales de reparación del ADN, siguiendo el modelo de "slippage/misalignment" (Greenblatt, 1996).
2. Deaminación endógena de la citosina metilada (CpG). Además de la predisposición intrínseca de las secuencias CpG a las mutaciones, se ha demostrado que los carcinógenos se unen a estos tramos de la secuencia de p53 (Denissenko, 1997; Chen, 1998). La mayoría de las mutaciones de p53 en secuencias CpG se producen en células quiescentes (Rodin, 1998).

Las secuencias que se encuentran altamente metiladas se asocian con zonas de la cromatina de expresión reprimida. Así, un mecanismo habitual de la inhibición de la expresión de los genes supresores tumorales es la metilación de los promotores (Hollyday, 1998). Este mecanismo no parece ser operativo en p53.

Los mecanismos de inactivación de p53 que se ilustran en la Figura 10, pueden ser mutacionales o no mutacionales y en ambos casos se produce una reducción efectiva de los tetrámeros funcionantes de p53 en las secuencias reguladoras de múltiples genes.

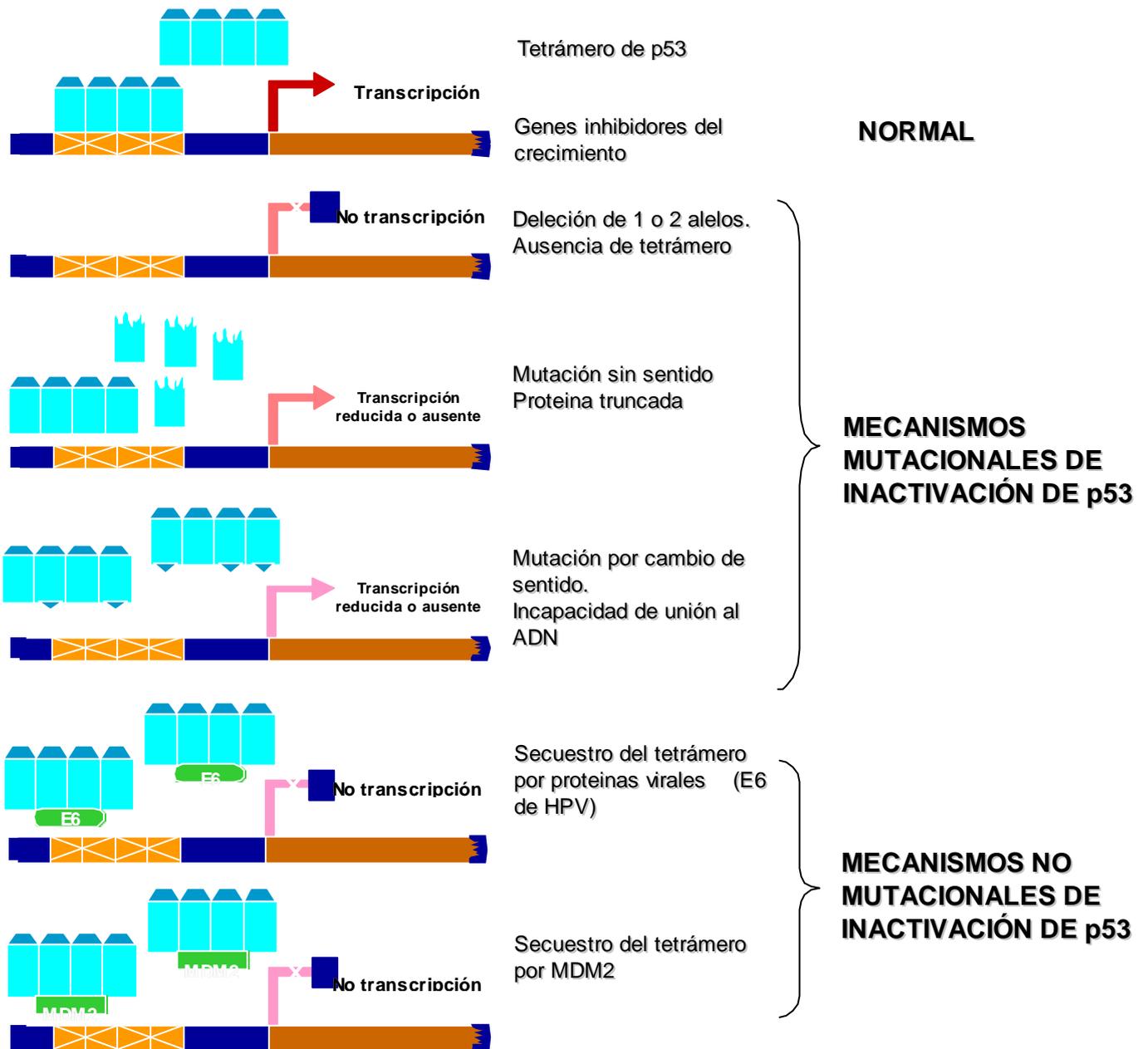


Figura 10. Esquema de los mecanismos de inactivación de p53. La función normal de p53 está ligada a la conservación de tetrámeros con capacidad de unión a secuencias reguladoras del ADN. Las mutaciones de p53 eliminan los tetrámeros de forma total o parcial o, más comúnmente, originan proteínas con incapacidad de unión al ADN. Los mecanismos no mutacionales de inactivación de p53 son debidos al secuestro de tetrámeros por proteínas virales o celulares.