



p53: UN ACERCAMIENTO AL ENTENDIMIENTO DEL CÁNCER

Margarita Hernández y José A. García
Centro de Investigación, Universidad La Salle

RESUMEN

Los antioncogenes o genes supresores de tumores actúan como reguladores negativos de la división celular y representan los genes más frecuentemente mutados en la mayoría de los cánceres humanos. Uno de los principales representantes de este grupo es p53, el cual codifica para una fosfoproteína involucrada en la regulación del ciclo celular y que se ha encontrado mutada en aproximadamente un 50% de todos los tipos de cánceres. El estudio de las características bioquímicas de p53 ha permitido una mayor comprensión sobre los mecanismos que llevan a la transformación neoplásica; a su vez, este conocimiento redundará en la elaboración de mejores protocolos para el tratamiento del cáncer.

ABSTRACT

The antioncogenes or tumor suppressor genes act as negative regulators of cell division and represent the more frequently mutated genes within the vast majority of human cancers. One of the main representatives of these genes is p53, which codes for a phosphoprotein involved in the regulation of the cell cycle and which is mutated in about 50% of all kinds of human cancers. The study of the biochemical properties of p53 has improved the knowledge of the neoplastic transformation mechanisms; this knowledge is also helpful to design better prophylactic treatments for human cancer.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los organismos puede implicar mutaciones en las células que lo constituyen. Muchas de estas alteraciones genómicas son subsanadas por la intervención de los sistemas enzimáticos reparadores del DNA (1). Cuando estas mutaciones no son reparadas se generan células aberrantes que, si son viables y no son eliminadas por el sistema inmune, se convertirán en células neoplásicas. Estas células, a su vez, crecen incontroladamente y tienen la capacidad de invadir al tejido circundante (2).

Muchas de las alteraciones se suceden como consecuencia de modificaciones en genes críticos que codifican para las proteínas relacionadas con la multiplicación o diferenciación celular, de tal modo, que la mayor parte de los cánceres se originan debido a pequeñas variaciones sobre oncogenes o sobre genes supresores de tumores (1).

Los genes supresores de tumores o antioncogenes se pueden definir como aquellos que codifican para productos que intervienen en la regulación del ciclo celular, y que si se encuentran ausentes o mutados, inducen a la célula a la transformación neoplásica (3).

El gen p53 es un supresor tumoral potente y suele encontrarse alterado en una gran variedad de neoplasias del ser humano (1). Este gen se encuentra ubicado en el brazo corto o brazo "p" del cromosoma 17 humano. Codifica para una fosfoproteína de 53 kDa compuesta por 393 aminoácidos, reensamblados estructuralmente como un factor activador de la transcripción, que ejerce su acción en el núcleo celular y que recibe el mismo nombre del gen (p53) (4-6). Mutaciones en este gen se han reportado en casi todos los tipos de tumores de personas adultas, incluyendo colon, pulmón, esófago, hígado, mama, cerebro, etc. Estos hallazgos, resaltan el papel fundamental de la p53 en la regulación del crecimiento celular.



CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

El extremo amino terminal de la p53 es altamente ácido con una carga negativa neta. En cambio, el extremo carboxilo terminal es rico en aminoácidos básicos; tiene una serina en la posición 315, la cual fosforilada puede tener una influencia en la carga de la proteína y como consecuencia alterar la localización subcelular y la actividad biológica de la proteína en el ciclo celular (7-9).

Recientemente, se han conseguido cristalizar algunos dominios de la proteína p53, lo que ha permitido definir mejor su estructura. Cho y cols. reportaron la estructura cristalina del "dominio central", el cual abarca los residuos 102 a 292 (10). Este dominio comprende los sitios de unión específicos al DNA, como son los que se presentan alrededor de los residuos 278 al 286 y del 248. Asimismo, se reportaron sitios de unión al cinc, aunque no se encontró la estructura clásica de dedos de cinc (10). Por otra parte, Clore y cols. reportaron la estructura del dominio de oligomerización por el método de resonancia magnética nuclear (NMR) (11). Este dominio comprende los residuos 319 al 360 y se sugiere que pueda jugar un papel primordial en la transformación celular, dado el requisito de oligomerización de la proteína p53 para ejercer su capacidad supresora.

En general, la p53 nativa (silvestre) tiene una vida media corta (generalmente menos de los 30 minutos) (12); inhibe el crecimiento de células tumorales en cultivo (13-15); inhibe la transformación de fibroblastos primarios con la ayuda de oncogenes (16,17); está implicada en la señal de muerte celular programada (apoptosis) (18); es requerida para que se realice la transactivación transcripcional (19); puede formar complejos con el antígeno T (20-21), del virus SV40, lo que provoca la transformación neoplásica. La p53 nativa puede identificarse, por su afinidad con el anticuerpo monoclonal PAb 1620 (22-23).

Cuando el gen que codifica para la proteína sufre mutaciones puntuales o deleciones, debido a la agresión de distintos agentes, se origina una proteína con acciones biológicas muy diferentes a la forma nativa, que se conoce sencillamente como p53 mutada. Esta proteína es reconocida por el anticuerpo monoclonal PAb 240 (22-23); tiene una vida media prolongada por varias horas (24); fracasa en la supresión de células en crecimiento de tumores (13,14); no inhibe la transformación de fibroblastos primarios por cooperación de oncogenes (16,17). Por lo tanto la p53 mutante desarrolla la proliferación celular, un efecto inverso al de la p53 nativa.

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE P53

La p53 puede inducir la detención del crecimiento en la fase G1 del ciclo celular (25,26), por lo tanto, es capaz de actuar como un regulador negativo en la progresión del ciclo. El mecanismo por el cual la p53 pone en juego esta acción no está totalmente dilucidado, aunque, los últimos resultados obtenidos parecen indicar que su estructura helicoidal le permite asociarse con zonas específicas del DNA, encargadas de iniciar la replicación celular (27). Su efecto inhibitorio, bloquea la entrada de la célula en la fase S del ciclo, cuando se lleva a cabo la duplicación del DNA. De modo alternativo, la p53 podría estar regulando la transcripción del DNA, que es cuando se codifican las proteínas que se relacionan con el pase de la fase G1 a la duplicación.

La p53 induce a las células al suicidio. La apoptosis es parte del desarrollo normal y también puede ser disparado por daño del DNA, radiaciones, algunos compuestos químicos, etc. También se ha mostrado que después del daño celular, los niveles de p53 y de su actividad transcripcional, se incrementan dramáticamente (28). En líneas celulares de leucemia mieloide murina, la activación de la p53 nativa guía a una muerte celular rápida, con distintas características de muerte celular programada (29). En células progenitoras mieloides, la apoptosis sigue al retiro de factores de sobrevivencia como la IL-3 (30). La p53 puede participar en el cambio de eventos de iniciación de la ausencia de factores de sobrevivencia que eventualmente guían a la eliminación de células innecesarias. En cada caso, la pérdida de función de p53 puede permitir la supervivencia de estas células. Esto permite que células con alta selectividad, ayuden al avance y faciliten el establecimiento de poblaciones celulares neoplásicas *in vivo*. Por otra parte, se ha

reportado que la apoptosis, mediada por la p53 es inhibida por la IL-6 (31), por lo que en presencia de p53 activa, IL-6 puede proveer la función necesaria para el crecimiento celular. La observación de que la p53 puede causar apoptosis, hace posible que otros supresores de tumores puedan estar también involucrados en el control de la muerte y supervivencia celular. Otra manifestación importante de la actividad de p53 es la inducción a la diferenciación.

Las bases bioquímicas para una actividad supresora de tumores de la p53 nativa no han sido bien establecidas. La proteína p53 nativa está localizada en el núcleo donde ejerce sus funciones antiproliferativas, por lo que sus actividades están asociadas con los procesos nucleares (32,33). Otros estudios muestran que p53 adquiere una función en la replicación del DNA. La p53 puede ser esencial en la organización de la replicación del DNA seguida del daño del mismo (34).

La proteína p53 nativa puede reprimir la transcripción de diversos promotores, incluyendo el gen *c-myc*, en sistemas transcripcionales *in vitro*, por lo que la represión transcripcional por p53 puede representar un efecto inhibitorio de la proteína en la maquinaria transcripcional. La p53 actúa como factor transcripcional, unida específicamente con otros genes y controlando su expresión. Por ejemplo, el *mdm2* aparece en la retroalimentación negativa con p53 (35). Si esto no ocurre el *mdm2* es amplificado y se produce cáncer (múltiples copias de *mdm2* son encontrados en 30% de los sarcomas).

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

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

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

La primera sorpresa, fue comprobar que cánceres totalmente diferentes desde el punto de vista histológico, clínico, sistémico, etc. responden a una fisiopatología común, en otras palabras el cáncer parece ser una enfermedad molecular única con diferentes manifestaciones sistémicas. Esta afirmación se basa en evidencias experimentales del papel de los protooncogenes y de los factores de crecimiento en la malignización celular (3).

Es así, que hoy se sabe que pueden existir hasta 300 diferencias fenotípicas entre una célula normal y una maligna; la incógnita que resta descubrir es cuáles de ellas son primarias -esto es, generadoras directas de la neoplasia- y cuáles secundarias o accesorias.

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

Muchos de estos conceptos nacen a partir del descubrimiento del p53, una proteína considerada como supresora de tumores -capaz de inhibir la proliferación celular anómala *in vitro*- y su actividad durante la fase final del período G1, de tal manera que interactuaría directamente con las proteínas responsables de la entrada de la célula en el período S o sobre el DNA impidiendo su duplicación.



Las consecuencias de la experimentación son muchas, brindan la posibilidad de encarar medidas de prevención con fundamentos lógicos, favorecen la creación de métodos de detección cada vez más precisos y tempranos y, fundamentalmente, dieron a la terapéutica un vuelo espectacular al permitir dirigir la acción farmacológica hacia niveles cada vez más específicos. Uno de los enfoques que se han empleado en el área de diagnóstico, por ejemplo, es la detección de anticuerpos séricos específicos para p53 (36).

Está aceptado que el cáncer involucra a un polimórfico grupo de enfermedades malignas. Algunas de ellas incluyen en su etiología distintos agentes virales que determinan el origen y el establecimiento de la proliferación neoplásica. En estos casos, las vacunas que logren inmunizar al hospedero contra los virus específicos actuarán en forma preventiva y evitarán una gran parte del cáncer relacionado con esos agentes. Puede decirse, con mucha satisfacción, que ya se encuentra disponible y en uso la primera vacuna contra el virus de la hepatitis B, la cual puede prevenir el establecimiento de la enfermedad hepática crónica, que es el soporte patogénico del carcinoma hepatocelular humano.

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

Los métodos tradicionales de diagnóstico del cáncer se han ido enriqueciendo con las técnicas de la genética molecular. No quedan dudas de que el cáncer es una enfermedad genética y que las alteraciones del genoma son adquiridas a nivel somático. Esas lesiones genéticas no son las únicas relacionadas con la patogenia del cáncer, pero pueden constituirse en blanco para el diagnóstico. Por otra parte, la proteína p53 mutada posee diferentes comportamientos biológicos y bioquímicos de acuerdo con el lugar en que se produce la alteración. Tal vez el pronóstico varíe en relación con el tipo de mutación que afectó el gen de la p53. Si bien el gen de la p53 se muestra como blanco más frecuente de las alteraciones genéticas del cáncer del ser humano, es de esperar que sus efectos sobre el crecimiento celular se combine en una trama compleja con el de otros genes involucrados. Es posible que de esta interacción entre genes mutantes se origine la proliferación descontrolada que caracteriza la gran diversidad de tipos de cáncer que se conocen.

Cuando se busca la prevención del cáncer utilizando vacunas, el problema se complica con los tumores que no incluyen virus en su etiología. Lamentablemente, éstos representan la gran mayoría de los cánceres en el ser humano. Aproximadamente un 50% de estos casos se han encontrado asociados a mutaciones en p53, lo que puede implicar mejores perspectivas en el tratamiento. De esta manera, se han publicado varios reportes donde se demuestra que la acción de ciertos agentes cancerígenos como la luz ultravioleta y el tabaco, se deben a mutaciones sobre p53 (3). Asimismo, la importancia de p53 resalta en casos como el síndrome de Li-Fraumeni, donde los individuos afectados sufren de continuas apariciones neoplásicas desde temprana edad, debido a la ausencia de los dos alelos que codifican para la p53 (37). Esto también ha sido demostrado *in vivo* en ratones con deficiencia inducida de p53 (ratones "knockout") (38).

Todo este avance en la biología molecular moderna abre un espacio en el tratamiento del cáncer. Aunque en algunos casos restan delinear protocolos; en otros, los blancos terapéuticos asoman en forma tibia y se requiere de mucho ingenio y experimentación. En este sentido, Lowe y cols. reportaron recientemente la importancia de p53 en la efectividad de la radio y quimioterapia (39).

Otra de las perspectivas que es importante considerar es el caso de la restenosis, ya que estudios recientes indican que en pacientes con angioplastia coronaria, se puede presentar una activación del citomegalovirus y, como consecuencia, éste sintetiza una proteína denominada IE84, la cual se une con la proteína p53 y la desactiva, generando con ello la restenosis, que está caracterizada por la proliferación excesiva de células de músculo liso (40). La alternativa propuesta para combatir esta enfermedad es dirigir drogas con antiviral para inhibir la actividad del citomegalovirus, o bien drogas que replacen la supresión de actividad de crecimiento de p53. Esto sugiere una cierta relación entre las enfermedades arteriales y el cáncer.

REFERENCIAS

1. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. y Harris, C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
2. Bishop, J. 1987. The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311
3. Knudson, A.G. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 1914-1921.
4. Matlashewsky, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L. y Benchimol, S. 1984. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* 3: 3257-3262.
5. Pennica, D., Goeddel, D., Hayflick, J., Reich, N., Anderson, C. y Levine, A. 1984. The amino acid sequence of murine p53 determined from a cDNA clone. *Virology* 134: 477-483.
6. Soussi, T., Caron de Fromental, C., Mechali, M., May, P. y Dress, M. 1987. Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene* 1: 71-78.
7. Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Zeev, A. y Rotter, V. 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6565-6577.
8. Milner, J., Cook, A. y Mason, J. 1990. p53 is associated with p34 in transformed cells. *EMBO J.* 9: 2885-2889.
9. Sturzbecher, H., Maimets, T., Chumakov, P., Brain, R., Addison, C., Simains, V., Rudge, K., Philip, R., Grimaldi, M., Court, W. y Jenkins, J. 1990. p53 interacts with p34 in mammalian cells: implication for cell cycle control and oncogenesis. *Oncogene* 5: 795-801.
10. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. y Pavletich, N. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355.
11. Core, M., Omichinski, J., Dakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E. y Gronenborn, A. 1994. High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science* 265: 386-391.
12. Gronostajski, R., Goldberg, J. y Pardee, A. 1984. Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. *Mol. Cell. Biol.* 4: 442-448.
13. Baker, S., Marhowitz, S., Fearon, E., Willson, J. y Vogelstein B. 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249: 912-915.
14. Chen, P., Chen, Y., Bookstein, R. y Lee, W. 1990. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250: 1576-1579.
15. Mercer, W., Shields, M., Lin, D., Appella, E y Ullrich, S. 1991. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 1958-1962.
16. Finlay, C., Hinds, P. y Levine, A. 1989. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093.



17. Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. y Oren, M. 1989. Wild-type can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8763-8767.
18. Zhu, Y.M., Bradbury, D.A. y Russell, N.H. 1994. Wild-type p53 es required for apoptosis induced by growth factor deprivation in factor-dependent leukaemic cells. *Br. J. Cancer* 69: 468-472.
19. Lane, D. y Gannon, L. 1983. Cellular proteins involved in SV40 transformation. *Cell Biol. Int Rep.* 7: 513-514.
20. Lane, D. y Crawford, L. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
21. Linzer, D. y Levine A. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen in SV40 transformed cells. *Cell* 17: 43-52.
22. Gannon, J., Greaves, R., Iggo, R. y Lane, D. 1990. Activating mutations in p53 produce common conformational effects a monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 9: 1595-1602.
23. Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J. y Lane, D. 1990. Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells. *J. Virol.* 59: 444-452.
24. Reich, N. y Levine, A. 1984. Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308: 199-201.
25. Mercer, W., Shields, M., Amin, M., Sauve, G., Apella, E., Romano, J. y Ullrich, S. 1990. Negative growth regulation in a glioblastoma cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 6166-6170.
26. Michalovitz, D., Halevy, O. y Oren M. 1990. Conditional inhibition of transformation and cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62: 671-680.
27. Diller, L., Kassel, J., Nelson C., Gryka, M., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Otzurk, M., Baker, S., Volgestein, B. y Friend, S. 1990. p53 mutations as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5772-5781.
28. Culotta, E. y Koshland, D. 1993. p53 sweeps through cancer research. *Science* 262: 1958-1961.
29. Kimchi, A., y Oren, M., (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352,345-347.
30. Williams, G., Smith, C., Spooner, E., Dexter, R. y Taylor D. 1990. Haemopoietic colony stimulating factores promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343: 76-79.
31. Kimchi, A. y Oren, M. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352,345-347.
32. Martínez, J., Georgoff, I., Martínez J. y Levine, A. 1991. Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature sensitive p53 protein. *Genes & Dev.* 5: 151-159.
33. Gannon, J. y Lane D. 1991. Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein wich is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* 349: 802-806.
34. Braithwaite, A., Sturzbecher, H., Addison, C., Palmer, C., Rudge, K. y Jenkins, J. 1987. Mouse p53 inhibits SV40 origin-dependent DNA replication. *Nature* 329: 458-460.

35. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. y Oren, M. 1993. *mdm-2* expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12: 461-468
36. Preudhomme C., Lubin, R., Lepelley, P., Vanrumbeke, M. y Fenaux, P. 1994. Detection of serum anti p53 antibodies and their correlation with p53 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 8: 1589-1591.
37. Markin, D., Li, F., Strong, L., Fraumeni, J., Nelson, C., Kim, D., Kassel, J., Grika, M., Bischoff, F., Tainsky, M. y Friend, S. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233-1238.
38. Hursting, S.D., Perkins, S.N. y Phang, J.M. 1994. Calorie restriction delays spontaneous tumorigenesis in p53-knockout transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7036-7040.
39. Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E. y Jacks, T. 1994. p53 status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*. *Science* 266: 807-810.
40. Speir, E., Modali, R., Huang, E., Leon, M., Shawl, F., Finkel, T. y Epstein, S. 1994. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265: 391-394.