

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM
POSGRADO** 

**FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**RADIOSENSIBILIZACIÓN DEPENDIENTE DE p53 EN LA
LÍNEA DE CÁNCER DE VÉJIGA T24**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
ALMA DELIA CHAVEZ BLANCO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ANDRÉS A. GUTIÉRREZ LÓPEZ



MÉXICO, D. F.

MARZO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Esta tesis de maestría fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología, SSA en la Subdirección de Investigación Básica. Bajo la dirección del Dr. Andrés A. Gutiérrez López.

El comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

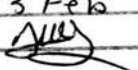
Dr. Andrés A. Gutiérrez López	Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA
Dr. Marco A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dr. Alberto Huberman	Instituto Nacional de la Nutrición S.Z., SSA

El proyecto fue apoyado por CONACYT (26059-M). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Marco A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Maria I. López Villaseñor	Instituto Investigaciones Biomédicas, UNAM

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alma Delia
Chávez Blanco
FECHA: 13 Feb 2004
FIRMA: 

DEDICATORIA:

A DIOS, POR SER PARTE DE SU OBRA Y PERMITIRME LA GRANDIOSIDAD DE SER MAMA.

A MIS PADRES, POR EL AMOR INCONDICIONAL QUE ME HAN DADO A MÍ Y A MIS HERMANOS, Y POR DARNOS LOS PRINCIPIOS Y VALORES QUE RIGEN MI VIDA.

A MIS HERMANOS, LOS MEJORES DEL MUNDO Y CON QUIEN HE APRENDIDO QUE LA VIDA SE PASA MUY RÁPIDO CUANDO SE ES FELIZ.

A ROMMEL POR EL AMOR QUE ME HA DADO Y CON QUIEN SOY MUY FELIZ.

A MI PAO, MI PEQUEÑITA QUE SIEMPRE ME ESPERA CON UNA SONRISA Y DE QUIEN SOLO HE RECIBIDO CARIÑO Y AMOR. MI OBRA MÁS GRANDE.

A MIS AMIGOS CON QUIENES HE COMPARTIDO MOMENTOS DE LA VIDA MALOS, FEOS, BUENOS Y CHISTOSOS. SUS NOMBRES LLENARÍAN OTRA TESIS. SIEMPRE ESTÁN EN MI CORAZÓN.

A LA GENTE QUE PADECE CÁNCER.

**RADIOSENSIBILIZACIÓN DEPENDIENTE DE p53
EN LA LÍNEA DE CÁNCER DE VEJIGA T24**

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1 El gen supresor de tumor p53.....	3
3.1.1 Estructura de la proteína p53	6
3.2 Regulación y Activación de p53.....	11
3.2.1 Regulación de la estabilidad	12
3.2.2 Regulación de la localización de la proteína p53	13
3.2.3 Regulación de la actividad de p53	13
3.3 Ciclo celular y su regulación.....	17
3.3.1 Cinasas-Dependientes de Ciclinas (CDK's).....	18
3.3.2 Ciclinas.....	19
3.3.3 Regulación del ciclo celular.....	20
3.3.4 Puntos de control o "Chekcpoints".....	22
3.4 Cáncer de vejiga (CaVe).....	24
3.5 Aplicación de la radicación ionizante (RI) en humanos.....	27
3.5.1 Efectos de la RI en células.....	28
3.5.2 Daño celular.....	29
3.5.3 Radiación ionizante y ciclo celular.....	31
3.5.4 Radioresistencia celular.....	31
4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	33
5. HIPÓTESIS.....	34
6. OBJETIVO GENERAL.....	34
6.1 Objetivos Particulares.....	34
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35
7.1 Materiales y método.....	36
8. RESULTADOS.....	42
9. DISCUSIÓN	51
10. CONCLUSIONES.....	58
11. REFERENCIAS.....	59
ANEXO	75

1. RESUMEN

La habilidad de p53 para inhibir el crecimiento celular en respuesta al daño del ADN es la principal función asociada con su papel de sensor del genoma y supresor de tumores. Sin embargo los efectos de las mutaciones de p53 en la sensibilidad celular a daño genotóxico son poco entendidas. El estudio de las alteraciones producidas por las mutaciones de p53 en respuesta a irradiación permitiría, por ejemplo, intentar restaurar las funciones de este gen con beneficios terapéuticos. Un caso concreto sería la de los cánceres transicionales de vejiga avanzados (TCC) que muestran mutaciones de p53 y radioresistencia en casos localmente avanzados.

El objetivo de este estudio fue analizar la relación entre el status de p53 y la respuesta a radiación ionizante (RI) en la línea de cáncer de vejiga T24^{p53mut} trasfectada con p53^{wt} haciendo un seguimiento de : 1) el ciclo celular; expresión de la proteína p53 y 14-3-3 σ ; 2) y de la viabilidad celular.

En las células trasfectadas con p53^{wt} se observó un arresto en la fase G₂/M del 45% de la población a las 24h después de RI (6Gy), lo que no sucedió con las células parentales y trasfectadas con los diferentes plásmidos control (p53^{mut}, pCMV^{neo}). Esto indica que p53^{wt} puede activar una vía de arresto en respuesta a RI.

Los inmunoanálisis tipo "Western Blot" y de citometría de flujo mostraron que la expresión de p53 aumentaba en las primeras horas post-RI (6Gy). De manera interesante, este aumento de p53 fue acompañado de la expresión de la proteína 14-3-3 ϵ y no de la isoforma σ .

El porcentaje de células viables post-RI, fue significativamente menor en las células trasfectadas con el p53^{wt} en comparación con los controles.

Nuestros resultados sugieren la posible reversión del fenotipo radioresistente de células de cánceres transicionales de vejiga (TCC) mediante la sobreexpresión de la proteína p53^{wt}.

2. INTRODUCCIÓN

La actividad bioquímica de la proteína p53 está asociada con la supresión tumoral. Dicha función es consecuencia de la capacidad de p53 para unirse a secuencias específicas en el ADN y a la de actuar como factor de transcripción que controla la expresión de un gran panel de genes cuyos productos están implicados en una gran variedad de procesos celulares, tales como: 1) proliferación; 2) senescencia; 3) reparación de ADN; 4) arresto del ciclo celular; 5) apoptosis; 6) angiogénesis; 7) regulación del estado redox; 8) metástasis y 9) producción de óxido nítrico.

En células sin estrés, la localización celular de p53 es variable y depende de la fase del ciclo celular, p Ej., p53 es predominante en el núcleo al aproximarse la célula a la fase G₁/S (Decraene, 2001). En respuesta al daño genotóxico, la proteína supresora de tumor p53 protege a las células de mamíferos del desarrollo neoplásico mediante el arresto del ciclo celular o induciendo la muerte celular.

Como se ha mencionado, una gran variedad de estímulos activan la habilidad de p53 para unirse a ADN e inducir la acumulación de la proteína. Esta acumulación es atribuida en parte a un incremento de su estabilidad (Jiménez, 1999), la cual es debida en gran parte a las modificaciones post-transcripcionales, p Ej. fosforilación y acetilación; que conducen a la acumulación nuclear de p53 (Fritsche, 1993; Chikayama, 2000).

La respuesta de p53 a los estímulos varía en los diferentes tipos celulares y depende del nivel de expresión de p53. En algunas células los niveles altos de p53 inducen apoptosis, mientras que bajos niveles inducen arresto del ciclo celular. Por ejemplo, los timocitos entran más rápidamente en apoptosis que los fibroblastos (Kastan, 1991; Scott, 1993).

En el caso de daño al ADN por radiación ionizante (RI), radiación UV, agentes químicos mutagénicos y privación de nucleótidos. La proteína p53 media el arresto en G₁, previniendo la síntesis de ADN y evitando el daño celular. Este arresto depende de la actividad de p53 como factor de transcripción sobre genes específicos como el p21/Waf1. Este último es un inhibidor de los complejos formados por las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's) 2, 4 y 6, las cuales son requeridas para entrar en la fase S.

En cambio, el mecanismo por el cual p53 induce el arresto en la fase G₂/M en respuesta al estrés,

se desconoce. Se sabe que en esta vía está involucrada la desregulación de la cinasa Cdc2 y de la ciclina B las cuales son esenciales para la entrada a mitosis. También se han tratado de identificar otras vías por las cuales p53 pudiera llevar el arresto en la fase G₂/M (Park, 2000; Yang, 2000).

Se sabe que la inactivación de la proteína p53 por mutaciones en el gen es uno de los eventos genéticos más comunes en la carcinogénesis humana. Este antecedente le da una gran importancia a p53 como un supresor de tumor. Por ejemplo, se ha caracterizado plenamente que algunas mutaciones del gen p53 confieren un fenotipo más agresivo a las células de tumores superficiales de vejiga que las hace capaces de invadir músculo (Wu, 1996). Pero, lo que aún no se ha definido, es si las mutaciones también son las responsables de la emergencia de radioresistencia celular en este tipo de tumor.

Estas propiedades biológicas y celulares han sido estudiadas previamente manipulando la expresión de p53 en modelos *in vivo* e *in vitro*. Los resultados experimentales justifican la esperanza de la investigación básica para tratar de entender las bases moleculares del cáncer humano y que apuntan a una posibilidad real de aplicaciones terapéuticas tratando de reestablecer la función de p53.

En las siguientes secciones se describen la estructura y las funciones conocidas de p53 en el ciclo celular y el desarrollo de cáncer, y al papel que p53 desempeña en el tumor transicional de vejiga, así como en el desarrollo de la radioresistencia terapéutica.

3. ANTECEDENTES

3.1 El gen supresor de tumor p53

La historia de investigación del gen supresor de tumor p53 (también conocido como TP53), es un paradigma en la investigación en cáncer. Esta proteína fue originalmente identificada por la observación de que los anticuerpos contra el antígeno largo T del SV40 (virus 40 del simio) de animales con tumores producidos con células transformadas con SV40, coimmunoprecipitaban una proteína celular de un peso aparente de 53 Kda. De estas observaciones se concluyó que p53 interactúa con el antígeno largo T de SV40 (Chang, 1979; Linzer, 1979).

Al mismo tiempo se encontró sobreexpresión de p53 en tumores inducidos químicamente (Deleo, 1979), en células de tumores primarios y en una gran variedad de células transformadas sin importar la vía mediante la cual se transformaron. Por el contrario, la expresión de p53 en células no transformadas fue generalmente baja (Kress, 1979; Lane, 1979). Esta diferencia fue atribuida a una alteración en la estabilización de proteína en células transformadas (Oren, 1982).

Durante la decadas de 1980 varios estudios demostraron que p53 es una proteína esencial y dependiente del ciclo celular (Mora, 1980). La idea de que p53 era una proteína reguladora del ciclo celular fue compatible con su localización y vida media de 5-10 min en células no transformadas (Rogel, 1985). En 1984 se documentó que la exposición de células no transformadas a radiación ultravioleta estimulaba la acumulación de p53, debido a su estabilización post-transcripcional (Maltzman, 1984).

Más tarde se descubrió que las proteínas de algunos virus (proteínas oncovirales) tienen la capacidad de unirse a p53. Entre estas se encuentran: E1B de adenovirus (Sarnow, 1982); la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV) (Scheffner, 1990); el antígeno nuclear de Epstein Barr virus (Szekely, 1993); la proteína X del virus de la hepatitis B (Wang, 1994), y la proteína IE84 del citomegalovirus humano (Speir, 1994) (Fig. 1).

La obtención del ADNc de p53 (Zakut-Houri, 1985) permitió incrementar el conocimiento sobre su función en la transformación celular *in vitro* y en la tumorigénesis *in vivo*.

En la actualidad se conoce que los genes implicados en la transformación celular y progresión del tumor pueden dividirse en dos categorías; A) Los protooncogenes: genes que al sobreactivarse generan una función excesiva; y B) los genes supresores de tumor, que al deletarse o mutarse llevan a la pérdida de heterocigocidad y a la pérdida de su función (Cordon-Cardo, 1997).

Chen y cols reportaron que la forma de p53 silvestre (p53^{wt}) actúa como un supresor de tumor (Chen, 1990). Posteriormente se demostró que p53 puede estar deletado o contener mutaciones inactivadoras en más de la mitad de todos los tipos de cáncer humano (Nigro, 1989; Levine, 1991; Caron de Fromentel, 1992; Hansen, 1997).

Algunas proteínas mutantes de p53 pueden actuar como proteínas inhibitorias que compiten y bloquean la actividad de la proteína p53^{wt}. Se sabe que p53 forma tetrámeros para ser funcional

(Kraiss, 1988). Por ejemplo, estas proteínas mutantes dominantes negativas de p53 tienen una conformación inadecuada y, al unirse con p53^{wt}, producen una mezcla de tetrámeros con una función transcripcional reducida o ausente. Se han logrado obtener anticuerpos que reconocen epitopes de las proteínas p53 mutadas (Gannon, 1990).

Se han reportado un gran número de mutaciones que han sido llamadas mutaciones fuertes ya que tiene un efecto negativo dominante (Milner, 1991). Además de la pérdida de función, algunas proteínas mutantes pueden adquirir nuevas funciones que contribuyen a la transformación y al potencial tumorigénico (Dittmer, 1993).

La observación de que p53 suprime la transformación oncogénica celular fue un hecho interesante. Ésta se acompañó del descubrimiento de que p53 podía causar arresto del ciclo celular en la fase G₁/S debido a que transactivaba genes por medio de su unión a secuencias específicas en el ADN (Hansen, 1997). La historia de p53 ha sido complicada con respecto al su papel en el arresto del ciclo celular en la fase G₂/M (ver más adelante).

Asimismo se ha especulado un modelo dual en el que p53 no está inducido activamente, pero en el que existen formas latentes que pueden estar implicadas en la vigilancia y reparación de la integridad genómica cuando las células tienen una mutación endógena y/o una deficiente replicación o recombinación del ADN. Todo esto es atribuido a la actividad que tiene p53 como 3'-5' exonucleasa y a su posible asociación con las ADN polimerasas α y β (Albrechtsen, 1999).

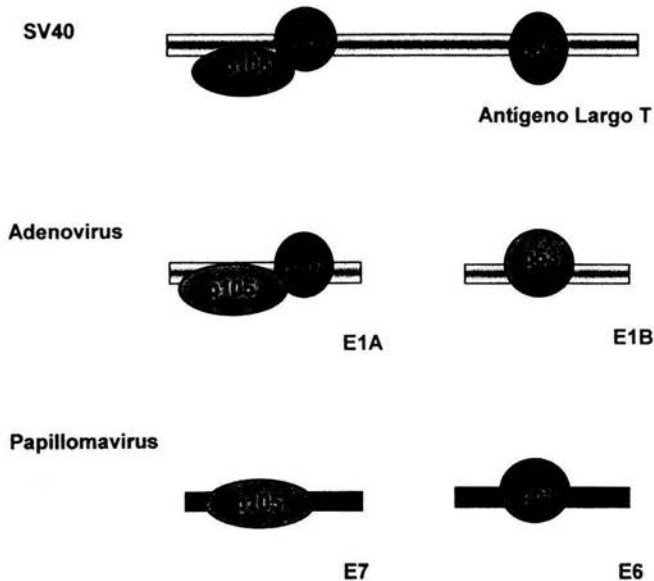


Figura. 1. Las proteínas de algunos virus (proteínas oncovirales) pueden unirse a p53, por ejemplo: E1B de adenovirus; la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV); el antígeno nuclear de Epstein Barr virus; la proteína X del virus de la hepatitis B; y la proteína IE84 del citomegalovirus humano.

3.1.1 Estructura de p53

El gen se encuentra en el cromosoma 17 p13.1. Está constituido por 11 exones (20 kb) y da lugar a un ARNm de 2.5kb. En la proteína se han localizado 4 dominios: 1) La región amino terminal, 2) la región central y 3) la región carboxilo terminal (que incluye también un 4º dominio) (Fig. 2):

1) Región amino terminal: El extremo amino terminal de p53 es altamente fosforilado y es el blanco de una gran variedad de cinasas, cada una de las cuales es activada en respuesta a estrés celular (daño a ADN o cambios en externos de crecimiento).

Esta región de la proteína comprende dos dominios discretos pero complementariamente funcionales: 1) un dominio de transactivación (aminoácidos¹⁻⁴²) que cuando se une a un dominio de unión a ADN heterólogo, puede funcionar independiente del resto de la molécula de p53 (Raycroft ,

1991) y 2) un dominio independiente de transactivación, rico en prolinas (aminoácidos⁶³⁻⁹³), que es necesario para una eficiente supresión de crecimiento (Walker, 1996). Por lo tanto el extremo amino de p53 puede funcionar como un sensor que integra las señales de cambios en el ambiente intra- y extracelulares .

La región que contiene los dominios de transactivación (aminoácidos¹⁻⁴²) permite que p53 interaccione con componentes de la maquinaria transcripcional (Unger,1992). También se encuentra una pequeña y conservada región BOX-I la cual interacciona directamente con otras proteínas entre las que se encuentran: 1) p300 esta proteína adaptadora de la transcripción es requerida para la expresión dependiente de p53, 2) TAF_{11,31} o TAF_{11,70} que son factores asociados a TBP (TATA-BINDING PROTEIN) (Avantaggiati,1997; Scolnick, 1997).

El extremo amino de p53 también interacciona con la proteína RP-A de unión a una sola cadena de ADN, y a la unidad p62 del factor de reparación TFIIH (Dutta, 1993; He, 1993). La proteína de adenovirus E1B-55 kDa, la proteína MDM2 y la proteína X del virus de la hepatitis B, se unen a la región amino terminal de p53 e inhiben su función de transactivación (Yew, 1992; Oliner 1993). Los residuos de los aminoácidos 22 y 23 desempeñan un papel clave en la unión de p53 a las proteínas E1B-55 y a MDM2. Además los aminoácidos 19, 22 y 23 son esenciales para la activación transcripcional mediada por p53 *in vivo* (Lin, 1994).

El extremo amino también contiene una región rica en prolinas (aminoácidos⁶³⁻⁹⁷) con mucha homología a las proteínas de unión-SH3. Está región es necesaria en algunos modelos experimentales para mediar la apoptosis (Sakamuro, 1997), para la supresión del crecimiento de células tumorales (Walker, 1996), y para la degradación de p53 mediada por la proteína del papilomavirus humano E6 (Li, 1996).

El hecho de que esta región sea rica en prolinas y contenga cinco motivos de unión repetidos de SH3 (PXXP) sugiere que pueda estar involucrada en la interacción física con los elementos de vías de transducción de señales de c-abl. Por último, se ha observado que la delección de los dominios de prolinas no afectan la transactivación de algunos promotores como WAF-1, MDM2, y BAX (Venot, 1998).

2) Región central: la parte central de la proteína está comprendida entre los aminoácidos¹⁰²⁻²⁹² donde se encuentran cuatro regiones conservadas (II-V). Es en esta región en donde se localiza entre el 80-90% de las mutaciones de p53 asociadas a diferentes tipos de tumores. Aquí también se encuentran los dominios de unión al ADN que se unen a secuencias blanco (El-Deiry, 1992).

Se ha observado que este dominio es resistente a la proteólisis por enzimas como la termolisina o subtilisina (Bargonetti, 1993, Pavletich, 1993). A esta región se unen proteínas como el antígeno largo T SV40 (Jenkins, 1988) y las proteínas celulares 53BP1 y 53BP2 (Ruppert, 1993; Gorina, 1996).

La estructura del dominio de unión a ADN consiste en una cadena β -plegada que forma una hendidura que actúa como un andamio de tres asas (loops). La hendidura está formada por dos cadenas β -plegadas antiparalelas que contiene cuatro y cinco cadenas β respectivamente. La primera asa L1 (por sus siglas en inglés LHS: loop-sheet-helix) une el ADN a la hendidura principal. La segunda asa L2 une el ADN a la hendidura menor. La tercera asa L3 presiona contra L1 y estabiliza la unión p53-ADN (Cho, 1994) (Fig. 2).

Las asas L2 y L3 están conectados por un átomo de zinc tetrahédrico coordinado en los residuos de los aminoácidos Cys¹⁷⁶, His¹⁷⁹, Cys²³⁸ y Cys²⁴². Este átomo de zinc estabiliza la estructura de las asas (Hainaut, 1993) (Fig. 3).

Cuando se analizaron las diferentes mutaciones que presenta p53 se encontró que las mutaciones más frecuentes de p53 se localizan en la región de unión a ADN (Figs. 2 y 3).

Se han encontrado de acuerdo a la estructura dos clases de mutaciones :

Las mutaciones clase I afectan residuos que interactúan directamente con el ADN, Estas incluyen los aminoácidos Arg²⁴⁸ y Arg²⁷³ los cuales se encuentran frecuentemente mutados. Las mutaciones clase II afectan residuos que no tienen contacto con el ADN pero que tienen contacto con otros residuos que ayudan en la estabilización de la proteína (May, 1998).

Por ejemplo, algunas formas mutantes de p53 tetramerizan con p53^{wt} e interfieren con su unión al ADN (Monti, 2002; de Vries, 2002). Otras mutantes alteran la conformación de la proteína y producen proteínas que no reaccionan con determinados anticuerpos, esto indica que los epítopos blancos no están accesibles (Stephen, 1992).

3) Región carboxilo terminal: Residuos 300-393. Incluye dos subdominios bien caracterizados: 1) una región de unión flexible (aminoácidos ³⁰⁰⁻³¹⁸) que conecta el dominio central con la región carboxilo terminal y 2) un dominio de tetramerización (aminoácidos ³²³⁻³⁵⁶) (Kraiss 1988).

La estructura del dominio de tetramerización ha sido deducida por resonancia magnética nuclear (Clare, 1994). La tetramerización es requerida para la transactivación eficiente *in vivo* y para la supresión mediada por p53 del crecimiento de células tumorales (Pietenpol, 1994).

En esta misma región se han encontrado tres Secuencias de Localización Nuclear (NLS), y se ha demostrado experimentalmente que si se producen mutaciones dirigidas en sitios de NLS1 la proteína se presenta totalmente citoplasmática; mientras que las mutaciones dirigidas a NLS2 y NLS3 resultan en la localización citoplasmática y nuclear (Dang, 1989; Shaulsky, 1990).

Junto al dominio de tetramerización se encuentra una región (aminoácidos ³⁶³⁻³⁹³) que ha sido referida como un dominio apoptótico (Wang, 1996) y como un dominio de regulación transcripcional (Wang, 1995).

Se conocen varias proteínas virales y celulares que se unen al extremo C-carboxilo de p53. Estas incluyen la proteína X del virus de la hepatitis B; las subunidades XPD y XPB de TFIIH (que actúan como helicasas *in vitro*) (Wang 1996; Horikoshi, 1995); una tercera helicasa, llamada CBS también se une al extremo carboxilo y está involucrada en la reparación del ADN (Ko, 1996). Se ha observado que este extremo también puede unirse a las regiones extrahelicales del ADN dañado involucrado en la formación de imparidad dada por deleción ó inserción (Lee, 1995).

Este extremo une inespecíficamente a extremos de ADN y cataliza la transferencia y renaturalización de las cadenas de ADN (Reed, 1995).

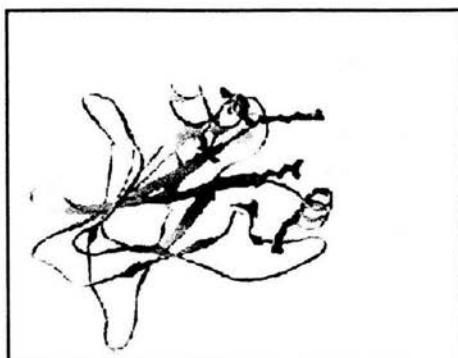


Figura 3. Modelo tridimensional de la estructura cristalográfica de p53. Estructura del dominio de unión a ADN de la proteína p53 (cafe) uniéndose al ADN. Los seis residuos de aa que se encuentran mutados con frecuencia en las neoplasias humanas (azul), son residuos de aa importantes para la unión a ADN. (Tomado de Cho Y., *et al.* 1994, Science, 265: 346-355).

3.2 Regulación y Activación de p53

La activación de p53 es un evento central en respuesta a diferentes tipos de estrés o estímulos que involucran la estabilización y posterior activación de proteínas por una variedad de mecanismos moleculares.

p53 es un factor de transcripción que regula varios mecanismos mediante la activación o supresión de genes específicos. Por ejemplo, estudios recientes muestran que un gen de p53 deficiente para la transcripción, por medio de recombinación homóloga, provoca la pérdida de su actividad inhibitoria en la proliferación celular (Chao, 2000; Jimenez 2000).

Aunque la regulación transcripcional mediada por p53 es quizá su principal función, otras funciones mediadas por p53 han sido poco exploradas como son la re-localización de los receptores de muerte en la superficie celular (Bennett, 1998), el papel directo de p53 en la mitocondria (Marchenko, 2000), y la habilidad de p53 para regular la traducción por unión directa a la región 5' de ciertos RNA's mensajeros (Miller, 2000).

Como p53 también es un potente inhibidor de la proliferación celular esta función debe ser controlada a través de varios mecanismos que incluyen: 1) regulación de transcripción y traducción; 2) estabilidad de la proteína; 3) localización celular y actividad. La rápida inducción de la función de p53 es llevada a cabo en respuesta a las diferentes formas de estrés celular por medio de mecanismos post-transcripcionales que conducen a la estabilización y la activación de la proteína p53 (Tabla1).

3.2.1. Regulación de la estabilidad

Uno de los principales reguladores de p53 es la proteína MDM2, que puede inhibir la actividad transcripcional de p53 e inducir su degradación. Para esta función MDM2 actúa como una E3 ligasa, que une a la p53 con ubiquitina para su degradación por la vía del proteasoma. Su vez MDM2 es un blanco transcripcional de p53. En los casos de estrés celular la inducción de p53 involucra la inhibición de MDM2, solo se lleva a cabo a través de diferentes vías dependientes de la señal de estrés (Woods, 2001).

La importancia de este circuito es demostrada en ratones en los que la expresión deficiente de MDM2 conduce a la muerte embrionaria causada por apoptosis aberrante inducida por p53 (de Rozieres, 2000). Por el contrario, en la ausencia de p53, los ratones deficientes en MDM2 se desarrollan normalmente. Estos experimentos demuestran el papel crítico de MDM2 en la regulación negativa de p53 durante el desarrollo.

Los mecanismos que regulan la degradación de p53 mediada por MDM2 incluyen: 1) la represión directa de MDM2; 2) las modificaciones post-traduccionales de p53 y MDM2; 3) la expresión de proteínas que inhiben la función de p53 y 4) la regulación de la localización celular de p53 o de MDM2. A continuación damos algunos ejemplos de las vías señaladas: A) se ha observado que las cinasas Chk1 y Chk2 pueden fosforilar un sitio del extremo N-terminal de p53. Esta fosforilación inhibe la interacción de p53 con MDM2 y por lo tanto previene la degradación de p53 (Chehab, 2000; Shieh, 2000). B) otro mecanismo establecido para la degradación de p53 es mediante la proteína E6. Esta proteína es producto de un gen viral perteneciente a los papilloma virus humanos (HPV) y tiene el papel de una ligasa de ubiquitina. La proteína E6 forma un complejo con

p53 marcándola para su eficiente degradación. En los experimentos *in vitro* e *in vivo* las células que expresan E6 son incapaces de poseer niveles basales de p53 debido a que la proteína p53 no puede ser estabilizada (Nuber, 1998).

3.2.2 Regulación de la localización de la proteína p53

La función de p53 depende de su localización nuclear. Por ello la importación y exportación del núcleo son altamente reguladas (Vousden, 2000). La importación al núcleo es dependiente de su interacción con la red de microtúbulos y de una proteína nuclear conocido como Dineina (Giannakakou, 2000). Esto indica que p53 es importada activamente hacia el núcleo. La importación es dependiente de las señales de localización nuclear encontradas en el extremo carboxilo de la proteína p53, donde también se encuentran señales de exportación al citoplasma (Stommel, 1999). Otros estudios recientes también han demostrado que la actividad de ligasa de ubiquitina de MDM2 es crítica para la exportación de p53 al citoplasma (Boyd, 2000). Se ha observado que la ubiquitinación de p53 ocurre en el extremo carboxilo y que si se presentan mutaciones en algunos residuos de lisina de esta región esto inhibe el exporte nuclear dependiente de MDM2 (Geyer, 2000).

3.2.3. Regulación de la actividad de p53

Además de los mecanismos de regulación de la estabilidad y localización de la proteína p53 existen mecanismos para modular la capacidad de unión de p53 al ADN. Varias modificaciones post-transcripcionales en el extremo carboxilo terminal de p53 generan un aumento de su unión a secuencias específicas de ADN. Estas modificaciones son principalmente: fosforilación y acetilación (Tabla1).

A) Fosforilación: varias cinasas pueden fosforilar distintos dominios de p53 *in vitro*. Por ejemplo, la ADN-PK (DNA-activated protein kinase), la cinasa ATM (Banin,1998), CK1 (casein kinase I-like protein cinasa) y CAK (CDK-activating kinase) fosforilan diferentes sitios del extremo de transactivación N- terminal de p53 (Chernov, 1998).

Estos eventos de fosforilación afectan la función de transactivación de p53. Por ejemplo, la mutación de tres residuos de serina del extremo N-terminal que son blancos de las cinasas (antes

mencionadas) resultan en un decremento significativo en la función supresora y transactivadora mediada por p53 (Mayr 1995). También las mutaciones de varios residuos de serinas tienen un efecto diferencial en la velocidad de unión de p53 a varios promotores blanco (Lohrum, 1996).

B) Acetilación: La acetilación de las lisinas en el extremo carboxilo de p53 es mediada por acetiltransferasas como p300/CBP y pCAF, que también pueden unirse al extremo amino-terminal de p53 (Gu, 1997; Liu 1999). La fosforilación en el extremo amino-terminal de p53 aumenta la interacción con las acetiltransferasas, estableciéndose así una cascada de fosforilación/acetilación que resulta en un aumento de la actividad de p53 (Sakaguchi, 1998).

Además de regular la actividad transcripcional de p53, las modificaciones post-transcripcionales de p53 juegan un papel muy importante para determinar la respuesta celular correcta para la activación de p53.

Varios estudios han demostrado que p53 participa en la determinación de la respuesta correcta por activación diferencial de distintos grupos de genes para inducir un arresto del ciclo celular o la apoptosis según las circunstancias y el grado de daño genotóxico (Fig. 4).

La regulación de la represión transcripcional por p53 es otro mecanismo por medio del cual las respuestas apoptótica y de ciclo celular pueden ser reguladas independientemente. La represión transcripcional por p53 puede ser mediada por una interacción con mSin3a y desacetilasas de histonas (Murphy, 1999) que incrementan su actividad apoptótica. Además de marcar a p53 para su degradación, la unión de MDM2 a el dominio amino-terminal de transactivación de p53 conduce a una inhibición de la unión a ADN.

En resumen, tanto la transcripción del gen de p53, como la función y la degradación de su proteína están finamente controlados por múltiples mecanismos que se activan dependiendo de los estímulos a los que sea sometida una célula. Además según las circunstancias, p53 inducirá sus efectos sobre el ciclo celular, proliferación, reparación de ADN ó apoptosis (Fig. 4).

Regulador positivo	Unión a p53 ó Modificación de p53	Efectos en p53
ATM	Fosforilación (ser 15)	Estabilización, activación
ADN-PK	Fosforilación (ser 15, 37)	Estabilización, activación
ATR	Fosforilación (ser 15)	Estabilización, activación
JNK	Fosforilación (ser 33)	Estabilización
CDK7/CyCH/p36	Fosforilación (ser 33)	Activación
Cdk's	Fosforilación (ser 315)	Activación
P38	Fosforilación (ser 392)	Activación
CK II	Fosforilación (ser 392)	Activación
PKC	Fosforilación (ser 371, 376, 378)	Activación
P300	Acetilación	Estabilización, activación
PCAF	Acetilación	Activación
c-Abl	Unión a p53, antagonista MDM2	Estabilización, activación
P19 ^{ARF}	Antagonista MDM2	Estabilización, activación
E2F-1	Inducción de p19 ^{ARF}	Estabilización, activación
c-Myc	Inducción de p19 ^{ARF}	Estabilización, activación
Rb	Antagonista parcial de MDM2	Estabilización
HIF-1 α	Unión a p53	Estabilización
Ref-1	Regulación del estado redox	Activación
WT1	Unión p53	Estabilización, activación, reduce transrepresión
PARP	Unión a p53	Estabilización, activación
BRCA1	Unión a p53	Activación
P33 ^{ING}	Unión a p53	Activación

Tabla 1. Regulación de p53. Las proteínas que la regulan positiva y negativamente pueden hacerlo a través de una unión física con p53, por modificación post-transcripcional de p53 o por una acción indirecta. Tomado de Sionov, *et al.* 1999. *Oncogene*, 18: 6145- 6157.

Regulador negativo	Unión a p53 ó Modificación de p53	Efectos en p53
MDM2	Unión a p53, exportación nuclear-citoplásmico	Inhibición, desestabilización
Bcl-2	Bloqueo del importación nuclear de p53	Inhibición
BRCA2	Unión a p53	Inhibición
MDMX	Unión a p53	Inhibición
IGF-1, bFGF	Inducción de la expresión de MDM2	Antagonista de p53 a través de MDM2

Tabla 1 (continuación). Regulación de p53. Las proteínas que la regulan positiva y negativamente pueden hacerlo a través de unión física con p53, por modificación transcripcional de p53 o por una acción indirecta. Tomado de Sionov, *et al.* 1999. *Oncogene*, 18: 6145- 6157.

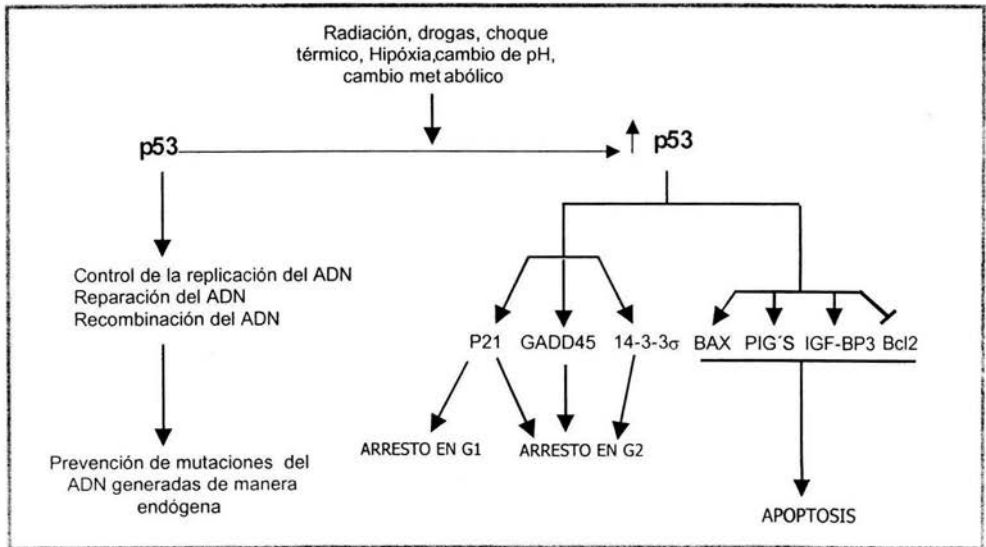


Figura 4. Esquema de las diferentes respuestas mediadas por p53 que se pueden obtener por diferentes tipos de estrés celular. También se propone a p53 como un sensor de la integridad genómica

3.3 Ciclo celular y su regulación.

Las células de mamífero se propagan por mitosis. Cuando una célula se divide se obtienen dos células hijas y cada una lleva consigo una carga genética de cromosomas idéntica a la célula parental. Después de un intervalo de tiempo las células hijas también se dividirán por mitosis.

El tiempo entre las divisiones es conocido como ciclo mitótico somático. Este ciclo mitótico consiste en cuatro fases: fase Gap 1 ó fase G₁, cuando la célula se prepara para sintetizar ADN; fase S, en la cual la célula sintetiza ADN y se replica un número idéntico de cromosomas; fase G₂, en la cual la célula se prepara para la división; y la mitosis ó fase M, en la que la célula se divide en dos células con idéntica carga genética, todas las fases están reguladas por unas proteínas llamadas Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK's) que forman heterodímeros con otras proteínas llamadas ciclinas, estos heterodímeros, a su vez son regulados principalmente por cinasas (Fig.5).

La mitosis a su vez se subdivide en 4 fases; profase: cuando se condensan los cromosomas; metafase: cuando los miembros de cada par de cromátidas se unen a los microtúbulos; anáfase: cuando las cromátidas hermanas se separan a los extremos opuestos por los microtúbulos; telofase: se forma el núcleo y se descondensan los cromosomas, (Martínez, 2001) (Fig.5).

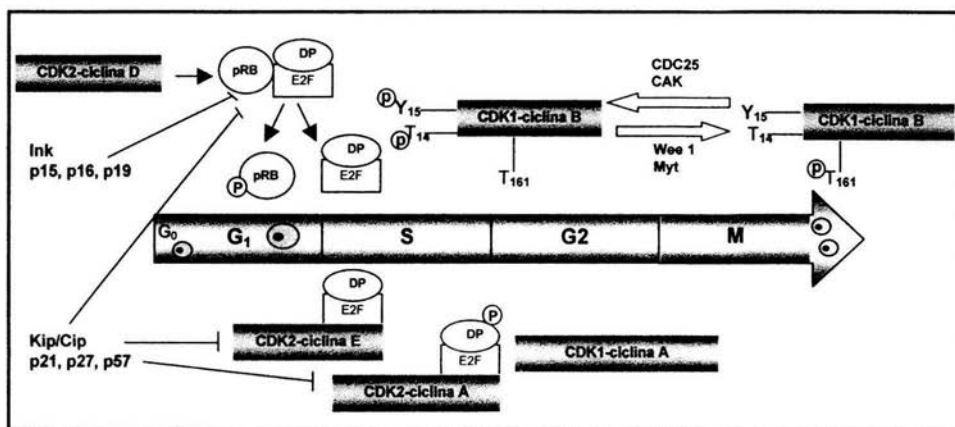


Figura 5. Diagrama que muestra las vías más importantes de activación e inactivación de varios complejos CDK's-ciclinas que gobiernan las diferentes fases del ciclo celular en células eucariotas.

3.3.1 Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK's)

La progresión a través de un ciclo de división celular es regulada por una compleja red de señales extra- e intracelulares, que activan o desactivan de manera coordinada y secuencial a la maquinaria básica de reguladores clave conocidos como Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK's), todos los miembros de estas proteínas pertenecen a la familia de las cinasas de residuos de serinas-treoninas (Zhang, 1999; Martínez, 2001).

Estas CDK's son inactivas como monómeros y requieren de fosforilación y asociación con otras proteínas reguladoras llamadas Ciclinas para ser funcionales. Sólo el heterodímero Ciclina-CDK proporciona la actividad a estos complejos que son ensamblados y activados a tiempos diferentes durante ciclo celular (Tabla 2). Así los diferentes complejos ciclina-CDK controlan actividades específicas del ciclo celular como la síntesis de ADN y mitosis, entre otras (Nigg, 1995) (Fig. 6).

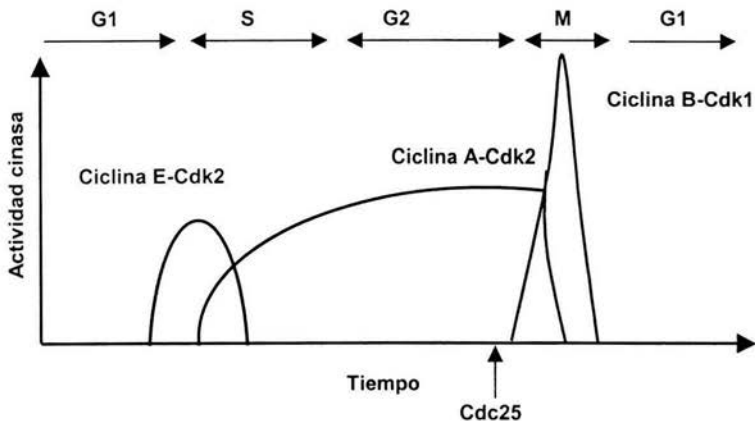


Figura 6. Los diferentes complejos ciclina-CDK son activados y desactivados a través del ciclo celular.

En la actualidad se conocen trece distintas familias de ciclinas y diez de CDK's. Cada CDK interactúa con un grupo específico de ciclinas. Por lo que, aquí solo citaremos las más relevantes involucradas en el ciclo celular.

-CDK4 y CDK6: Estas CDK's se unen selectivamente a las ciclinas del tipo D durante la fase G₁ y regulan la fosforilación de pRB en la fase G₁/S del ciclo celular.

-CDK3: Ha sido propuesta como una cinasa reguladora de la fase G₁ tardía (Matsuoka, 2000). Contribuye a la activación de los factores de transcripción E2F-1, E2F-2 y parcialmente a la de E2F-3. Por lo tanto contribuye en el de inicio de la fase S (Hofmann, 1996). También se ha encontrado que CDK2 o CDK3 pueden promover la apoptosis por interferencia con la respuesta celular a los factores de sobrevivencia (Braun, 1998).

-CDK2: Esta CDK en unión a la ciclina E Interviene en el termino de la fase G₁ y tempranamente en la fase S del ciclo celular. Se ha encontrado recientemente que esta proteína es esencial para la duplicación del centrosoma en células de mamíferos (Meraldi, 1999).

-CDK1 (Cdc2): Juega un papel importante en la fase mitótica del ciclo celular. Es conocido que CDK1 ésta unido a la ciclina B y puede fosforilar el extremo C-terminal de la RNA pol II (Desai, 1995) y la proteína Eg5. Esta última es requerida para la adecuada separación de los centrosomas y el ensamble del huso mitótico (Blangy, 1995). Otro papel que recientemente se le ha atribuido a CDK1 es el arresto del ciclo celular en la fase G₂/M (Roulblevskaia, 2000).

-CDK7: Esta proteína se une a la ciclina H y forman un complejo llamado CAK (Clarke, 1995), que fosforila y activa a otros complejos Ciclina's-CDK's. Este complejo en mamíferos, puede fosforilar a Cdc2 y CDK2 cuando se encuentren formando complejos con sus respectivas ciclinas (Poon, 1993).

-CDK5: Aparentemente CDK5 no tiene un papel importante en el control del ciclo celular.

3.3.2 Ciclinas

Las ciclinas son un grupo de proteínas altamente conservadas a través de la evolución en diferentes especies. La homología entre ciclinas se encuentra en el dominio responsable de la unión y activación a CDK's (Lees, 1993) y se ha demostrado que las mutaciones en esta región inhibe ambas actividades. Cada CDK interactúa con un grupo específico de ciclinas, para controlar una función determinada dentro del ciclo celular.

La función de las ciclinas, es controlada principalmente por cambios en niveles de RNAm en las células mamíferas, se ha demostrado la oscilación secuencial de los niveles de las principales ciclinas (E, A y B) (Pines, 1991). Estos datos han permitido documentar el papel de cada una de ellas durante el ciclo celular, en particular el complejo ciclina E-Cdk2 tiene un papel crítico en el avance a la fase S; el complejo ciclina A-Cdk2 uno en la fase S y otro en la fase G₂-M; y el complejo ciclina B-Cdk1 es activado en la parte final de la fase G₂ por la fosfatasa Cdc25 (Fig. 6).

Tabla 2. CDK's y proteínas relacionadas

Cinasa	Subunidad reguladora	Substratos	Función
CDC2	Ciclina A y B	pRb, NF, histona H1	G ₂ /M
CDK2	Ciclina A, E y D	pRb, p27	G ₁ /S, S
CDK3	Ciclina E	E2f1/DP1	G ₁ /S
CDK4	Ciclina D1, D2 y D3	pRb	G ₁ /S
CDK5	P35, ciclina D1 y D3	NF, Tau	Diferen. Neuronal.
CDK6	Ciclina D1, D2 y D3	pRB	G ₁ /S
CDK7	Ciclina H	CDC2, CDK2/4/6	CAK
CDK8	Ciclina C	RNA pol II	Regulación Transcripción.
CDK9	Ciclina T	PRb, MBP	G ₁ /S

3.3.3 Regulación del ciclo celular

Los niveles de la ciclinas son controlados por 3 factores principales que son: 1) a nivel transcripcional; 2) por modificaciones post-traduccionales y 3) la proteólisis dependiente de ubiquitinación (Martinez, 2001).

Dentro de las modificaciones post-traduccionales se encuentran (Pines, 1999), por ejemplo:

-Fosforilaciones de CDK's para adquirir su actividad catalítica, estas fosforilaciones afectan el sitio de unión a la ciclina aumentando su afeidez para formar algunos complejos CDK-ciclina (Ducommun, 1991).

-Los complejos ciclina-CDK's pueden inactivarse por fosforilación en uno o dos de los residuos que se encuentran en el sitio de unión de ATP de las CDK's (p.ej. los residuos treonina14 y tirosina 15 en Cdc2 y CDK2 humanas). Un ejemplo de este tipo de fosforilación se lleva a cabo como un punto de control en la fase G₂/M en el caso de daño a ADN (ver más adelante) (Fig. 5 y 7). Las tirosinas conservadas en varias CDK's pueden ser fosforiladas por la cinasa Wee1/Mik1 y el residuo de treonina por Myt1 (Coleman, 1993).

-Las fosfatasa de la familia Cdc25 son las encargadas de activar el complejo ciclina-CDK al remover los grupos fosfato de los residuos de tirosina y treonina en el sitio de unión de ATP de las CDK's (Fig.7). A la fecha se conocen tres miembros de esta familia de fosfatasa en células de mamífero, éstas son: Cdc25C, que está relacionada a la activación del complejo ciclina B-CDC2 en la mitosis; Cdc25A que regula la progresión de la fase G₁ y que puede ser fosforilada y activada por la ciclina E-CDK2 en el inicio de la síntesis de ADN y por último, Cdc25B cuyo papel es desconocido hasta el momento (Galaktionov, 1991).

-También se conocen dos familias de inhibidores de CDK's específicos que pertenecen a las familias CIP/KIP e INK4 (Tabla 3). Algunos de estos inhibidores pueden actuar como factores de ensamble entre algunas ciclinas y sus CDK's (Hengest, 1998; Carnero, 1998). Los miembros de estas familias son inhibidores generales de todos los complejos y se acumulan en respuesta a un amplio rango de estímulos antiproliferativos. Estas proteínas se asocian de preferencia con el complejo CDK-Ciclina y su sobreexpresión induce el arresto de las células en diferentes fases del ciclo celular. Los miembros de la familia CIP/KIP más conocidos son las proteínas p21, p27 y p57 estas moléculas son consideradas inhibidores universales debido a que estas pueden unirse e inhibir la actividad cinasa de diferentes complejos formados por las cinasas dependientes de ciclinas (CDK2, CDK4 y CDK6).

Tabla 3. Inhibidores de CDK's.

Fase del ciclo celular	Complejo-CDK-ciclina	INK4				Kip/Cip		
		p15	p16	p18	p19	p21	p27	p57
G ₁	Ciclina D/CDK 4-6	+	+	+	+	+	+	±
G ₁ /S	Ciclina E/CDK-2	-	-	-	-	+	±	+
S	Ciclina A/CDK2	-	-	-	-	+	-	+
G ₂ /M	Ciclina B/CDC2	-	-	-	-	+	-	-

3.3.4 Puntos de control ó "Checkpoints"

El ciclo celular requiere de la coordinación precisa de una variedad de eventos que van desde la síntesis macromolecular, el ensamble de reguladores y la degradación proteica. El ADN debe ser replicado, los cromosomas condensados y segregados. El huso mitótico debe ser duplicado y separado para migrar; los cambios en la membrana celular y nuclear deben completar una duplicación correcta (Carnero, 2000).

La progresión del ciclo celular debe ser entonces finamente controlada por la integración de señales positivas y negativas. Dentro de estas últimas están los llamados puntos de control ó "checkpoints" que son puntos de monitoreo y control, formados por vías de transducción específicas para impedir la progresión del ciclo celular en respuesta al daño genotóxico (Fig. 4) (Lowndes, 2000).

El concepto de un "Checkpoint" fue introducido por Hartwell, para referirse a los mecanismos celulares envueltos en la fidelidad de la transmisión genética. Un "checkpoint" de daño a ADN es un mecanismo de vigilancia que evalúa la integridad del genoma. De esta forma, los puntos de control pueden inhibir la progresión del ciclo celular hasta que las anomalías del genoma son reparadas (Hartwell, 1989).

La demora o arresto del ciclo celular está frecuentemente mediada por la desregulación de la actividad de las Cdk's, que como se mencionó anteriormente son esenciales para la ejecución de la mayoría de los puntos de control (Grana, 1995). Algunos puntos de control conocidos son:

1) START: integra las señales tempranas intrínsecas y externas en G₁ para determinar si la célula puede continuar con otro ciclo de replicación (Pardee, 1989).

2) Punto de control de daño a ADN en G₁: La célula se arresta previo a la fase S para permitir la reparación de una lesión potencialmente mutagénica en el ADN (Kaufmann, 1996). La mayoría de los estudios sobre el papel de las oncoproteínas en la progresión del ciclo celular se habían concentrado en los puntos de revisión de START y G₁, (Fig. 4). Esto fue debido a que la transformación maligna está frecuentemente asociada con la pérdida de los puntos de control de G₁, en la cual se involucran mutaciones o desregulaciones de proteínas esenciales como pRB y E2F, donde este último actúa como un promotor de transcripción necesario para el avance del ciclo. La liberación de E2F se regula por la proteína p21, la cual junto con p27 pueden regular negativamente la función de los heterodímeros cdk-ciclina's y así poder detener el ciclo celular a la fase S, (Kamb, 1995; Martínez, 2001).

3) Punto de control de daño en fase S: previene la iniciación de los replicones posterior al daño a ADN sin interrumpir la síntesis de ADN, aquí se ha visto involucrada la proteína inhibidora p53, la cual no permite la liberación de los factores de transcripción necesarios para avanzar en la fase S (Kaufmann, 1996).

4) Punto de control de replicación de ADN (S/M): revisa el estado de replicación del ADN para medir que células no entraron a mitosis por una replicación incompleta de sus cromosomas (Anderson, 1992).

5) Punto de control de reparación G₂: previene la entrada a mitosis si no se ha reparado el daño a ADN que podría resultar en anomalías de segregación cromosomal durante la mitosis (Kaufmann, 1996). El arresto de la fase G₂/M ocurre tardíamente y normalmente está asociado con la muerte celular.

Más recientemente se ha centrado el interés sobre el punto de control de la fase G₂/M. Se sabe que la mitosis no avanza sin la completa activación del complejo Cdk 1-ciclina B; esta activación requiere de la fosforilación en el residuo tirosina 161 de la CDK 1, de la desfosforilación de los residuos de treonina 14 y tirosina 15 la cual es llevada a cabo por Cdc25 (la fosforilación de inhibición de los residuos de treonina 14 y tirosina 15 es llevada a cabo por Wee1) y que se fosforile

el residuo de treonina 162 de la CDK 1 por la fosforilasa CAK (cinasa activadora de CDK) para que el complejo sea completamente funcional (Fig. 7).

Se ha visto que p53 también juega un papel muy importante en este punto de control. Por ejemplo, se sabe que p53 bloquea el ciclo celular al inhibir indirectamente a la CDK 1, por tres genes blanco de p53 que son: Gadd45, p21, 14-3-3 σ , (Bunz,1998; Jin, 2000; Peng,1997; Taylor, 1999). En este punto de control se han encontrado tres nuevas familia de proteínas que son reguladores negativos del complejo CDK1-ciclina B: Cds1 (Chk2/Rad 53), Chk (Chk1^{p56}) y las proteínas 14.3.3 (Rad 24/Rad25 (Martinez, 2001; Winters,1998).

Aun quedan varias incógnitas en las vías de señalización que inducen el arresto en G₂ bajo ciertas circunstancias. Más recientemente se empiezan a evaluar vías de arresto en G₂ que son independientes de p53 (Bache, 1999).

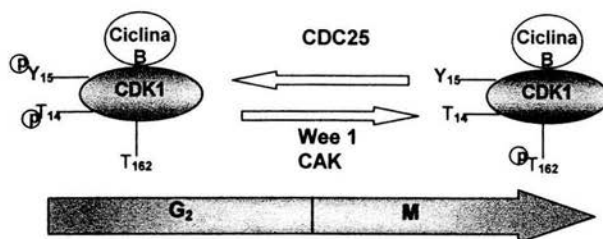


Figura 7. Ejemplo de la regulación de los complejos CDK-Ciclina.

3.4 Cáncer de vejiga (CaVe)

Una célula tumoral se distingue de una célula normal por adquirir ciertas características como son la inmortalidad, proliferación celular no restringida, transformación morfológica y en algunos casos la capacidad de metastatizar. Estos cambios son dados por transtornos genéticos y epigenéticos de las células. Hasta hoy solo se conocen algunos genes involucrados en el desarrollo tumoral; aún no se conocen bien las causas tempranas que desencadenan la inducción del desarrollo del cáncer.

El CaVe es la 8ª causa de muerte en México y es más frecuente en varones. El principal factor de riesgo asociado es el tabaquismo. Entre el 75 y 80% de los casos nuevos de CaVe son

superficiales y se limitan a la mucosa (estadio Tis o Ta) o a la lamina propia (T₁). La mayoría de estos tumores son extirpados por resección transuretral y se curan (Fig. 8). Sin embargo, después de la cirugía un 30 a un 85% de los casos recurren y del 10 al 30% de estos recurrentes progresan a tumores que invaden al músculo (Estadios T₂-T₄), o metastásicos (N+, M+) En estos casos el pronóstico cambia y se vuelve muy desfavorable (Jung, 2000). El manejo se torna más radical requiriéndose la extirpación de la vejiga (o cistectomía radical) y la supervivencia de pacientes es de solo 2 años.

El papel de la radioterapia en el tratamiento del carcinoma invasivo de la vejiga ha ido cambiando con el tiempo. Anteriormente la presencia de un tumor invasor era indicación precisa para la cistectomía radical. Sin embargo, hoy día, la radiación ionizante (RI) o radioterapia en combinación con quimioterapia (p.ej. cisplatino) es altamente efectiva para el control local del tumor y para la preservación de la vejiga (Rodel, 2001). Esta estrategia es al menos un 60 a 70% tan efectiva como la cistectomía radical para estos casos. Por ello sería deseable el que pudiéramos incrementar las tasas de respuesta local a radioterapia sin tener que utilizar la quimioterapia para evitar su toxicidad sistémica. Y una estrategia para lograrlo podría ser la radiosensibilización de las células tumorales (Benda, 1996; Pedraza, 1999).

Por citogenética se han documentado cambios específicos en el cromosoma 17 en relación a la progresión de los tumores superficiales de vejiga. En la evolución molecular del cáncer de vejiga la diferencia más significativa entre los tumores no invasivos contra los invasivos es que el gen y/o proteína de p53 está frecuentemente alterados ya sea a nivel de ADN o de su transporte al núcleo. Se han observado mutaciones de p53 en el 40-60% los tumores de vejiga analizados en diferentes trabajos con pacientes (Cordon-Cardo, 1997; Sarkar, 2000 Berggren, 2001), estos datos también concuerdan con los obtenidos al secuenciar el gen de p53 en la mayoría de las líneas tumorales de vejiga (Cooper, 1994).

Se ha encontrado en pacientes con cáncer de vejiga que la sobreexpresión de p53 está asociada con un alto riesgo de recaídas y progresión tumoral (Esrig, 1994; Cote, 1997; Toktas, 1999). Aún más, el hallazgo de mutaciones de p53 por medio de inmunohistoquímica en estos

tumores han sido relacionadas con una respuesta refractaria a la radioterapia (Wu, 1996; Osen, 1998).

Más recientemente se ha tratado de explicar el desarrollo del cáncer y la resistencia terapéutica a la teoría que explica los orígenes de los desequilibrios moleculares que modifican la genética normal de una célula son llevados a cabo en las células tronco (células madre, células tallo).

En tejido normal, las células tronco tienen una alta capacidad de autorenovación y de dividirse por división asimétrica dando lugar a una nueva célula tronco y otra célula más diferenciada con una tasa de proliferación más alta pero con una capacidad de autorenovación baja o ausente. Esta última célula puede progresar y conducir a diferentes linajes. Finalmente estos se pueden diferenciar en células especializadas que mantienen el tejido.

También las células tronco pueden entrar a una división simétrica para generar dos células tronco o dos células más diferenciadas. La decisión para entrar a la división asimétrica o simétrica está dictada por señales principalmente locales. Los eventos oncogénicos ocurren en la segunda generación de células con capacidad de dividirse y de comenzarse a diferenciarse, estos eventos inducen o incrementando la capacidad de autorenovación y reducen las propiedades de diferenciación terminal, (Perez-Lozada, 2003)

Todas las células de cáncer tienen la misma conducta, capacidad de autorenovación y bloqueo del programa de diferenciación. Otra conducta de algún subgrupo de estas células es que aparte de autorenovarse también adquieren la capacidad clonogénica. Esto se refleja principalmente en los tumores de tipo sólido. Los eventos oncogénicos ocurridos en las células tronco y sus cambios genéticos son propagados a todas las células hijas. Sin embargo, solo un linaje muestra propiedades de transformación, con un bloqueo en el programa de diferenciación terminal. Los cambios genéticos pueden ser encontrados en otro tipo de linaje, pero estas células no muestran cambio en el fenotipo (pueden diferenciarse normalmente, esto se ha observado en algunos cánceres hematopoyéticos). La mutación de iniciación ocurre primeramente en las células tronco, lo cual bloquea consecuentemente su capacidad de producir ciertos linajes. En esta situación, el destino de la célula tumoral es determinado por la naturaleza de los eventos oncogénicos (Perez-Lozada, 2003; Trosko, 2001).

Con estos antecedentes resulta del mayor interés investigar la restauración de las funciones normales de p53^{wt} como supresor de tumor y un posible nuevo agente terapéutico en el tratamiento y respuesta a la RI de células transicionales de cáncer de vejiga que presenten mutaciones de este gen.

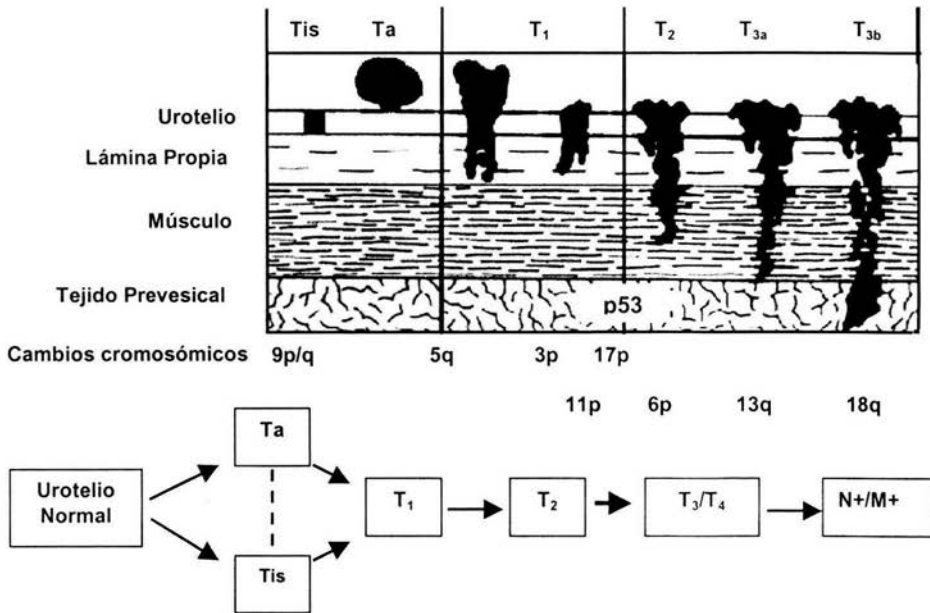


Figura 8. Modelo genético de la progresión del cáncer de vejiga. En este modelo se hipotetizan dos diferentes vías que caracterizan los eventos tempranos de tumorigénesis ocurridos en el urotelio. Estos eventos son seguidos por anomalías secundarias que están involucradas en la progresión del tumor (tomado de Cordon-Cardo, 1997).

3.5 Aplicación de la radiación ionizante (RI) en humanos

El uso de la radiación es una parte integral de la vida moderna. Las aplicaciones médicas de la radiación son aceptadas comúnmente, ya sea como rayos X para diagnóstico o las de radiación ionizante (RI) para el tratamiento del cáncer. Gracias a esa capacidad para liberar partículas

ionizantes en un volumen específico de tejido, la RI presenta una singular oportunidad para tratar enfermedades sin necesidad de cirugía y sin riesgo de toxicidad sistémica.

La medida o cantidad de radiación es usualmente llamada dosis, que es una medida basada en términos de la energía absorbida por el tejido. Luego, la unidad de dosis absorbida es el Grey (Gy) que se define como la energía de 1 joule por kilogramo de tejido. En algunas instancias, la dosis puede ser más baja que un Gy y se le conoce como miligrey (mGy) o microgrey (μ Gy) (Hall, 1998).

3.5.1 Efectos de la RI en células

La RI es aquella capaz de romper las uniones químicas de moléculas que son constitutivas de los seres vivos y que conlleva a cambios biológicos importantes. Esto se debe principalmente a la diferente longitud de onda que poseen cada una de estas formas de radiación (Fig. 9), (Dahm-Daphi, 2000).

La RI es energía electromagnética que es capaz de producir iones, directa o indirectamente. Esto significa que proveen de partículas individuales con la suficiente energía cinética que puede romper directamente la estructura atómica del receptor que atraviesan para producir los cambios biológicos y químicos. Las radiaciones emitidas por rayos X y γ son indirectamente ionizantes. Estas radiaciones por sí mismas no producen daño químico ó biológico pero, cuando son absorbidas por el material a través del cual pasan aumentan la energía del material y dan su energía para generar un movimiento rápido de electrones.

Cuando esta energía es absorbida por el tejido, un vasto número de fotones interactúa con un gran número de átomos para producir el movimiento de electrones. Estos a su vez ionizan otros átomos y producen el rompimiento de uniones químicas que desencadenan la serie de eventos que finalmente se expresan como daño biológico (Hall, 1998).

Aunque la causa exacta de muerte en las células de mamífero irradiadas depende de las dosis, también se ha observado que hay etapas y tejidos en los cuales se obtienen diferentes respuestas a la irradiación, en las etapas primarias de gestación los tejidos más afectados son el timo, la

médula ósea, y los tejidos involucrados en la gametogénesis, algo muy importante es que la muerte es acompañada de características morfológicas de apoptosis, (Takai, 2002).

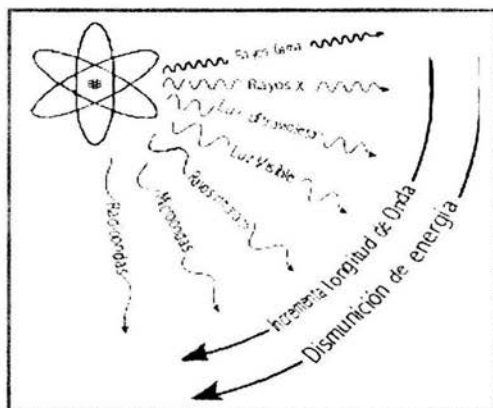


Figura 9. Esquema de las diferentes longitudes de onda que pueden ser liberadas de un átomo en excitación.

3.5.2 Daño celular

Varias líneas experimentales apoyan que el ADN es uno de los blancos principales de los efectos biológicos de la RI. La interacción de la radiación con el ADN se ha clasificado como una interacción directa o indirecta.

En la interacción directa, un fotón es absorbido por el medio resultando en un rápido movimiento rápido de electrones que rompe la cadena de ADN de manera directa.

En la interacción indirecta el movimiento rápido de electrones atraviesa las moléculas de agua existentes en el tejido generando radicales libres o Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (Borek, 1987; Garcia, 1997). Estos radicales libres pueden ser átomos o moléculas con electrones desapareados en su orbita externa, quedando en un estado que es asociado con un alto grado de reactividad química (Tabla 4) que causan rupturas sencillas y dobles en el puente de azúcar-fosfato de las cadenas de ADN (Fig. 10) (Hallahan, 1996).

Superóxido	O_2^-
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	OH
Singlete de oxígeno	1O_2

Tabla 4. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) conocidas en sistemas biológicos.

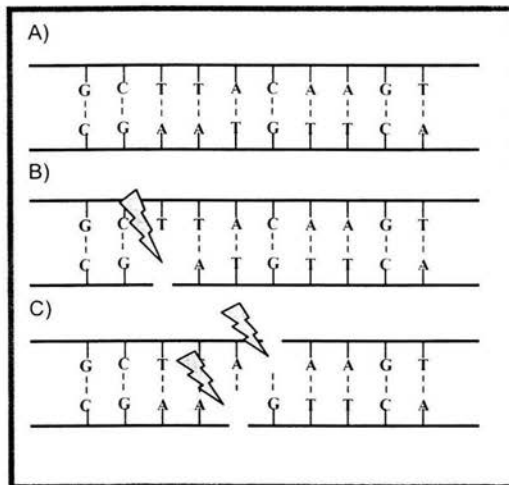


Figura 10. Diagrama del rompimiento sencillo y doble de las cadenas de ADN, producto de la exposición a RI. (A) representación de una doble hélice normal de ADN. (B) Un rompimiento en una sola cadena es un “daño menor” debido a que puede ser reparado con base a su cadena complementaria. (C) si el rompimiento ocurre en ambas cadenas y son directamente opuestas o están separadas por solo un par de bases puede conducir a un daño más grave.

3.5.3 Radiación ionizante y ciclo celular

La RI induce una cascada de eventos moleculares intracelulares muy importantes. Según la dosis de radiación y la sensibilidad de la célula, el daño a las células de mamífero puede ser de dos tipos: 1) daño letal, que es irreversible e irreparable y que por definición conduce a la muerte celular y 2) daño subletal, que en circunstancias normales puede ser reparado.

Por ejemplo, en células irradiadas se han obtenido curvas de supervivencia celular a diferentes dosis y se han evaluado los efectos de la radiación a diversos puntos del ciclo celular (Sinclair, 1966). Desde 1963 se demostró que las células HeLa sincronizadas eran más sensibles a la radiación durante las fases G₂/M y S temprana, y más resistentes durante las fases S tardía y G₁ temprana (Rudoltz, 1996). Estos antecedentes demuestran que, en general, hay mayor resistencia a la radiación en la fase tardía de S mientras que la fase G₂ es usualmente más sensible que la fase M. Ya que G₂/M es el último punto de control del ciclo celular, resulta crítico reparar el daño inducido por radiación en esta fase para permitir que la célula se divida correctamente, si el daño no puede ser reparado entonces la célula activará vías de muerte celular.

3.5.4 Radioresistencia celular

A nivel de organismo se ha relacionado la radioresistencia celular como la habilidad de sobrevivir después de una exposición a RI. A nivel de tejido u órgano se describe como la habilidad de mantener la integridad estructural y funcional después de la RI y a nivel celular esto se puede reflejar como la habilidad de las células para poder continuar una viabilidad y proliferación normal, (Wahl, 2001). La radioresistencia es un fenotipo de las células de mamíferos que consiste de un sistema complejo en el que interaccionan proteínas celulares constitutivas con los genes que son inducidos por la irradiación y con los cambios en el microambiente, dando lugar a la generación de resistencia a determinadas dosis de irradiación (Hallahan, 1996; Puck, 1997).

Como hemos señalado anteriormente, la proteína p53 está asociada a la apoptosis y a la reparación del ADN. p53, por ejemplo, se inducen normalmente en respuesta a la radiación. Recordemos que la proteína p53 es un regulador de la apoptosis en tejido normal. Otra de sus funciones es el arresto del ciclo celular después de irradiación para tratar de reparar el ADN por

medio de la recombinación homóloga o no homóloga. De ahí que las mutaciones en p53 en la mayoría de los tumores humanos pudieran ser las principales responsables de que la célula proliferara anormalmente o de que adquiriera el fenotipo de radioresistencia (Dahm-Daphi, 2000).

Se ha observado que en células tumorales hematológicas se asoció que la presencia de mutaciones de p53, ésta estrechamente relacionada con el incremento de radioresistencia (Lee, 1993; Lowe, 1993, 1994). Sin embargo, no se han podido establecer los mecanismos precisos por medio de los cuales estas mutaciones confieren radioresistencia a las células tumorales.

A pesar de los rápidos avances en el conocimiento de las funciones celulares que afectan la radiosensibilidad, hoy en día aún no se puede explicar exactamente la heterogeneidad observada de la respuesta a la radioterapia de los tejidos normales y tumorales.

Tampoco se puede predecir cuáles tumores pueden ser controlados localmente o que pacientes pueden desarrollar más tumores primarios o metástasis después de tratamiento con la radioterapia. Pero han surgido varios genes en los cuales se ha puesto la mira como terapia de pronóstico o tratamiento del cáncer. Estos genes pueden contener deleciones o pérdida de función por mutaciones que podrían asociarse a una radioresistencia celular (p. ej. ATM y p53 entre otros). Los mecanismos moleculares que explican la emergencia de la radioresistencia están siendo elucidados (Rosen, 1999; Li, 2001).

La recurrencia local de un tumor después de la radioterapia se debe principalmente a la falla de la erradicación de todas las células tumorales; en otras palabras, a la presencia de clones radioresistentes. Teóricamente, todos los cánceres deberían ser controlados localmente si una dosis lo suficientemente alta se aplicara a la masa tumoral. Sin embargo, en la práctica clínica, no es posible administrar dosis altas sin llegar a generar toxicidad local o sistémica (Rosen, 1999), ni tampoco se han mejorado las tasas de respuesta. Tampoco conocemos si la radiación administrada es la responsable de generar clones tumorales radioresistentes o si éstos ya existían previo a la irradiación.

4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En respuesta a la RI, las células activan de una serie de vías bioquímicas que tratan de promover la supervivencia celular, ya sea tratando de mantener la integridad genética de la célula o, en su defecto, inducir la muerte celular si el daño al ADN es extenso. Sin embargo, en células tumorales, estos mecanismos de control se pierden, y en este nuevo estado se puede generar resistencia a la RI.

Conociendo que en cáncer de vejiga hay una relación estrecha entre la inactivación de la proteína p53, la progresión tumoral y la radioresistencia, se ha propuesto evaluar el papel de la RI en asociación a la transfección de p53^{wt} en la viabilidad y ciclo celular de las células transicionales de cáncer de vejiga (T24) que presentan un p53^{mut}.

5. HIPÓTESIS

El cáncer de vejiga localmente avanzado acumula mutaciones de p53 causando radioresistencia de células tumorales que, extrapolado a la clínica, limitarían el éxito terapéutico de la radioterapia. Por lo tanto, conociendo el papel que desempeña p53^{wt} en el arresto del ciclo celular y la inducción de muerte en respuesta a la radiación ionizante, se espera que la sobre expresión de un gen p53^{wt} en la línea celular T24 pueda restablecer la sensibilidad de estas células a la radiación.

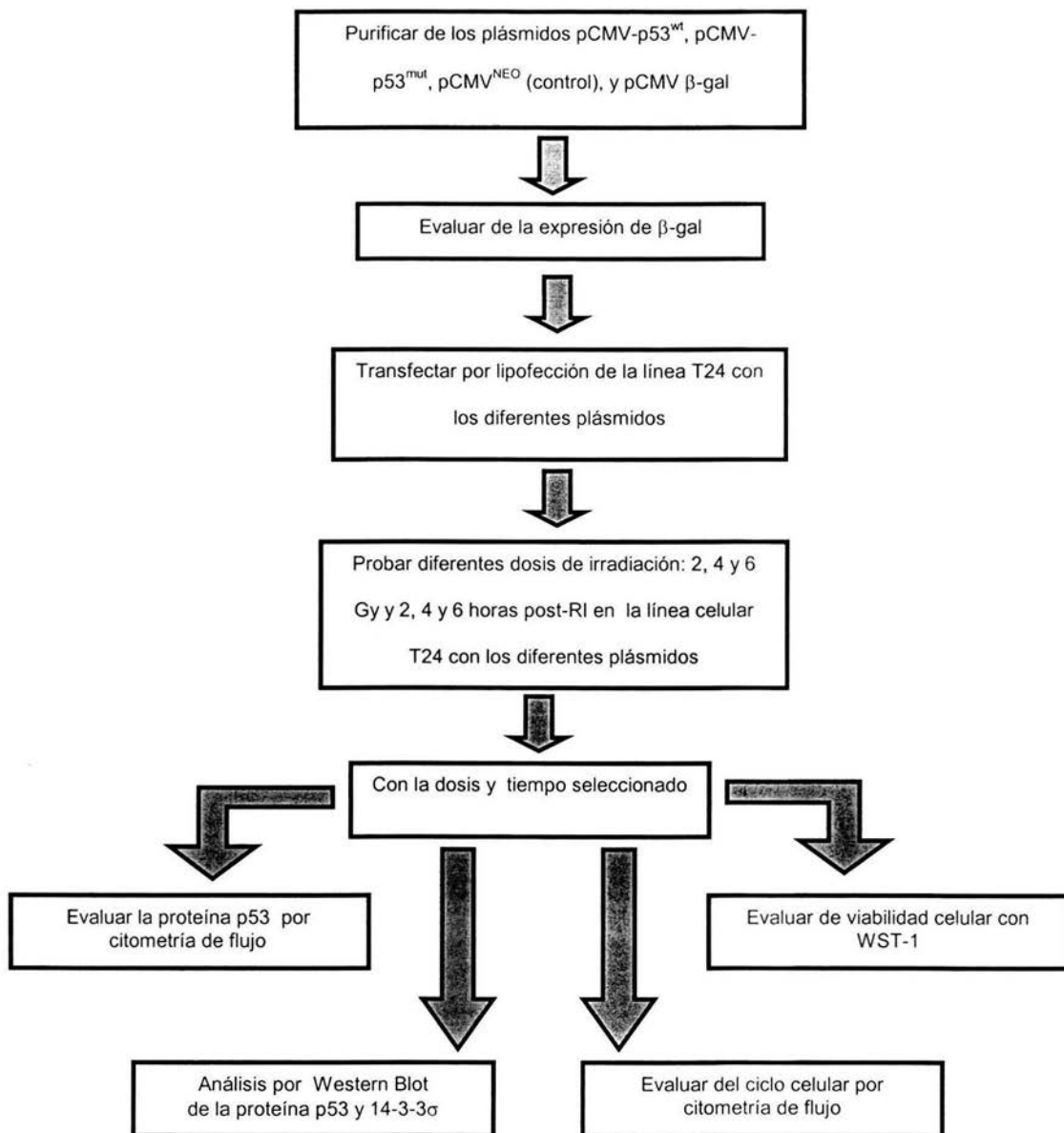
6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos biológicos inducidos por la RI en la línea de cáncer de vejiga T24 (p53^{mut}) al ser transfectada con p53^{wt}.

6.1 Objetivos Particulares

- Evaluar el tiempo máximo de expresión de proteína inducido por el promotor (pCMV) por medio del gen reportero β -galactosidasa en la línea T24.
- Transfectar la línea celular de cáncer de vejiga T24 con los plásmidos pCMV-p53^{wt}, pCMV-p53^{mut} y plásmido control (pCMV^{NEO}).
- Evaluar ciclo celular a diferentes dosis de RI 2, 4 y 6 Gy y 2, 4 y 6 horas post-RI en la línea celular T24 parental y en la misma línea transfectada con los diferentes plásmidos.
- Analizar el efecto de la RI en la expresión de la proteína p53 por citometría de flujo y la expresión de la proteína 14-3-3 σ por "western blot".
- Evaluar la viabilidad celular en la línea celular T24 parental y transfectada con los diferentes plásmidos.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL



7.1 Materiales y métodos

Plásmidos

Para el desarrollo del presente este trabajo, se emplearon los plásmidos siguientes: como control de transfección se utilizó pCMV- β -gal (Clontech), pCMV-p53^{wt} (p53 silvestre) y pCMV-p53^{mut} (p53^{mut}) fueron gentilmente donados por el Dr. Bert Vogelstein (John Hopkins Oncology Center) (Fig.11). Ambos plásmidos tienen 8.4 Kb, la construcción pCMV-p53^{mut} expresa una proteína p53 mutante en la que se realizó la mutación de una valina (val¹⁴³) por una alanina, en el sitio de unión a ADN. Finalmente, generamos una construcción de control denominada pCMV^{NEO} (6.6 Kb) la cual se obtuvo eliminando el inserto de p53^{wt} del plásmido pCMV-p53^{wt} por medio de restricción con la enzima Bam HI y la posterior religación.

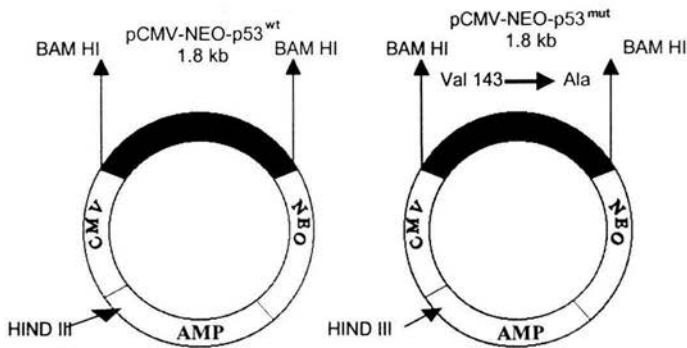


Figura 11. Estructura de los plásmidos utilizados que contienen el cADN de p53^{wt} y p53^{mut}.

Extracción de ADN.

Se cultivaron las diferentes bacterias *E. coli* transformadas con los diferentes plásmidos pCMV- β -gal, pCMV-p53^{mut}, pCMV-p53^{wt} y pCMV^{NEO}, en medio LB (VER ANEXO) suplementado con ampicilina a 100mg/ml. La extracción y purificación de ADN plasmídico se realizó con el Maxikit Quiagen (Cat: 12362)

Líneas celulares.

Se empleó la línea T24 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) derivada de un tumor primario transicional epidermoide de vejiga. Esta línea contiene una mutación de p53 por delección de la tirosina 126 que se ubica en el exón 5. Esta mutación no permite la unión del antígeno grande T SV40 y expresa bajos niveles de proteína, en comparación con líneas que expresan p53^{wt}, (Cooper, 1994). También esta línea se ha demostrado radioresistente hasta 8 Gy, (Hinata, 2003). La línea RT4 derivada de un tumor papilar recurrente de bajo grado y que mantiene la expresión de p53^{wt}, (Cooper, 1994)

Estas líneas se cultivaron en medio McCoy 5A (Gibco cat: 16600-082), enriquecido con 10 % de suero fetal de bovino (SFB, Gibco cat: 16000-044), 100,000 U de penicilina y 1000,000 U de estreptomycin (Gibco cat: 15140-148), a 37°C y 5% de CO₂.

La línea A431 que deriva de un carcinoma escamosos de vulva, se utilizó como control positivo de p53 por expresar constantemente durante el ciclo celular grandes cantidades de la proteína por que presenta tetraploidia del cromosoma 17 (Kurose,1995), se cultivó en medio DMEM alto en glucosa (Gibco cat: 11965-092) enriquecido con SFB al 10% y penicilina-estreptomycin a 37°C y 5% de CO₂.

Las líneas celulares se cultivaron a confluencia y fueron sincronizadas en su ciclo celular con privación de suero (1% de SFB, 8 hrs) para arrestarlas en la fase G₀ y posteriormente utilizarlas en los experimentos.

Todos los lavados se realizaron con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 (PBS, Sigma cat: P-4417).

Transfección de la línea T24

Para la lipofección se cultivaron 1x10⁶ células de la línea T24 en cajas de cultivo Petri (Costar cat: 3003) a una confluencia del 50%. Para transfectar cada plásmido (pCMV-β-gal, pCMV-p53^{mut}, pCMV-p53^{wt} y pCMV^{NEO}) se realizó una mezcla con 300μl de solución de transfección (Dosper, Bohering Manheim, cat: 1811169) y 15 μg de plásmido la cual permaneció por 20 min. a temperatura ambiente antes de ser agregada a las células. Una vez hecha la mezcla, se retiró el

medio con suero fetal de las células, se lavó un par de veces el plato con PBS y se colocaron 5 ml de medio de cultivo sin suero fetal junto con (300 μ l) la mezcla de transfección. Después de 6 h. de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio y se colocó medio nuevo (McCoy 5^a-SFB al 10%). Las células fueron analizadas a las 12 y 24 h pos-transfección, según se indica en las figuras.

Ensayo de actividad de β -galactosidasa

Para realizar este ensayo se eliminó el medio de cultivo a las 12 y 24 h post-transfección y se adicionaron 5 ml de paraformaldehído 4% durante 15 min. a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se retiró el fijador y se lavó con 5 ml de PBS pH7.0, dos veces. Después se adicionaron 5ml de la solución de tinción de X-gal (VER ANEXO).

Los platos fueron cubiertos de la luz e incubados a 37°C y observaron a intervalos de entre 12, 24 y 36 h posteriores de haber realizado el ensayo. A esos tiempos se contaron el número de células teñidas verde-azulosas y se calculó un porcentaje de células transfectadas.

Ensayos de irradiación.

Los ensayos de irradiación-y se realizaron en la unidad de radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología, apoyados por el departamento de Física Médica. Para este fin se utilizaron el Theratlon-1000 (fuente de cobalto-60) y placas de seis (Costar cat: 3506) o de 96 pozos (Falcon cat: 3072) para el cultivo celular, según las necesidades. Las células fueron irradiadas a diferentes dosis : 2, 4 y 6 Gy y analizadas posteriormente a diferentes tiempos: 2, 4, 6 y 24 h con el fin de seleccionar una dosis a la que se observaran cambios relevantes en los ensayos planeados para este estudio. El tiempo de irradiación siempre fue ajustado al decaimiento de la fuente radioactiva por los físicos.

Inmunohistoquímica

Las células fueron cultivadas en portaobjetos estériles. Al tiempo requerido las placas fueron lavadas con PBS y a cada muestra se le trató con 100 μ l de tritón al 0.1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS y se bloqueó con peroxidasa endógena 100 μ l, durante 5 min. a temperatura ambiente.

Las laminillas fueron enjuagadas con agua destilada y se bloquearon con solución amortiguadora de Coulter-SFB a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se decanto el exceso de la solución anterior y se colocó el anticuerpo primario p53 (Calbiochem cat. OP09) preparado en solución amortiguadora de Coulter-SFB. (1 µg/ml) por 17 h a 4°C. Al término se dejan reposar las laminillas 1 h a temperatura ambiente.

Después, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo 2° en una concentración de 0.5 µg/ml. A 37°C durante 1 h media hora antes de que terminara la incubación con el 2° se preparó el complejo ABC. Las laminillas se lavaron dos veces con PBS y se colocaron 80 µl de complejo ABC para cada muestra. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 1 h y se lavaron las laminillas con PBS dos veces.

Finalmente se reveló con 100 µl de solución de trabajo. (VER ANEXO) durante 30-60 segundos y se lavó con PBS. La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris durante 30 segundos, posteriormente se lavó con agua. Después todas las laminillas se deshidrataron con alcoholes (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 1:1 alcohol-xilol, xilol 100%) cada 2 minutos y se montaron con resina.

Ciclo celular

Para poder analizar el ciclo celular se utilizó la técnica basada en detergente y enzima proteolítica que consiste en aislar y teñir núcleos (ADN) con yoduro de propidio, esta técnica fue descrita por Vindelov en 1994. Para ello se cultivaron 2×10^5 células en placas de seis pozos y después de 6 h post-RI, las células son cosechadas con una solución de verseno y recuperadas por centrifugación a 1750 RPM. Posteriormente se determina la cantidad de ADN nuclear de las diferentes células transfectadas con los diferentes plásmidos donde las células fueron lavadas con PBS y se les adicionaron 100 µl de solución "A" (VER ANEXO) incubándose a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 100 µl de solución "B" (VER ANEXO) se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se adicionaron 200 µl de solución "C" (VER ANEXO) en hielo y oscuridad por 10 minutos. El contenido de ADN nuclear fue analizado en un Facsorter (Becton Dickinson) con el programa CellQuest®. *Para cada condición deben tenerse duplicados.

Detección de proteína. (citometría de flujo)

En placas de seis pozos se cultivaron 5×10^5 células T24 (control) T24-p53^{wt}, T24^{NEO} aproximadamente 2×10^5 cels/pozo se irradiaron y posteriormente a las 2, 4 y 6 h post-irradiación se prepararon como en el protocolo siguiente:

Se cosecharon las células con solución de verseno (Gibco cat: 15040-066) y recuperadas por centrifugación a 1750 RPM se lavaron con 5 ml de PBS.

Las células se colocaron en tubos para citómetro (Falcon cat: 2054) fueron resuspendidas en 100 μ l de PBS-SFB 2%, se les adicionaron 100 μ l de solución "M" y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se adicionaron 80 μ l de solución "N" durante 10 minutos a temperatura ambiente Se centrifugaron las células 2000 rpm y se hicieron 3 lavados con 200 μ l de PBS-SFB 2%.

Se agregaron 100 μ l del anticuerpo monoclonal contra p53 (Ab 1801, Oncogene) en concentración final de 1 ng/ml. Se incubó durante 1 h a 4°C. Se centrifugaron las células 2000 rpm y se hicieron 3 lavados con 200 μ l de PBS-SFB 2%. Se colocaron 10 μ l de anticuerpo secundario marcado con FITC (concentración de 0.5 μ g/ml) y se agregaron 90 μ l de PBS-SFB 2%.

Se dejó incubar a 4°C durante una hora en ausencia de luz, se centrifugaron a 2000 rpm y se lavaron con 200 μ l de PBS-SFB 2%, tres veces.

El botón celular se resuspendió en 150 μ l de PBS-SFB 2%. Finalmente, se adicionaron 80 μ l de la solución "Ñ" y se incubó en hielo y oscuridad por 10 min. Se analizó por citometría de flujo con el programa CellQuest®

*Para cada condición deben tenerse duplicados.

*Dos tubos para control negativo con células sin anticuerpos (autofluorescencia).

*Dos tubos para control del anticuerpo secundario (eliminar inespecificidad).

Inmunoensayo tipo "Western Blot"

Se cultivaron 3×10^5 células en cajas de 6 pozos se irradiaron a 6 Gy, en la Unidad de Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología.

Las células fueron cosechadas con raspado de la caja de cultivo recuperadas en 1 ml de PBS en tubos ependorff, el botón celular fue recuperado por centrifugación a 1800 rpm, se eliminó el PBS y

se adicionaron 200 μ l de amortiguador de homogenización (VER ANEXO) enriquecido con 10 μ l de inhibidor de proteasas (sigma P-8340) a cada muestra, se sonico en un 60 sonic dismembrator (Fisher Scientific), en condiciones frías, el homogeneizado final se centrifugo a 11,000 rpm 15 minutos el sobrenadante se recupero y se guardo a -70°C .

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, 60 μ g de proteínas totales fueron desnaturalizadas con amortiguador de muestra (VER ANEXO) y separadas en un geles de SDS-12% de poliacrilamida en amortiguador de corrida (VER ANEXO) a 200 volts 45 minutos, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana PVDF (Amersham, LIFE Science) con amortiguador de transferencia (VER ANEXO) a 350 volts durante 30 minutos posteriormente la membrana se lavó 3 veces 20 minutos c/u con TBS 1x (VER ANEXO) se dejó la membrana durante 1 h con solución de bloqueo (VER ANEXO), y se lavó 3 veces con TBS, posteriormente se prepararon los anticuerpos primarios p53, 14-3-3 σ (Sta Cruz; sc-7682) y medio condicionado de un hibridoma anti-actina, donado por el Dr. Manuel Hdz, Cinvestav IPN) en solución de bloqueo se incubaron los anticuerpos durante toda la noche a 4°C , la membrana se lavó con TBS-tween 3 veces 15 minutos cada lavado, se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h y se lavó con TBS-twenn 3 veces 15 minutos c/u, finalmente se reveló con el método de quimioluminiscencia según las instrucciones del kit ECL (Amersham-Pharmacia).

Ensayo de viabilidad celular.

En placas de 96 pozos se cultivaron 1×10^4 céls/pozo: T24 (control), T24-p53^{wt}, T24-p53^{mut} y T24^{NEO}. Se irradiaron (6 Gy) y posteriormente a las 48 h se analizó la viabilidad con 10 μ l del reactivo WST-1 (Bohering Mannheim, cat:1644807), se dejo incubar por dos horas y se cuantificó en lector de ELISA (Labsystems Company, Finland) a 450nm. El WST-1 es una sal de tetrazolio que es un sustrato del sistema succinato-tetrazolio reductasa de la cadena respiratoria de la mitocondria transformando el WST-1 a una sal de formazan que puede ser detectada por ELISA.

8. RESULTADOS

El objetivo principal de este trabajo, es determinar el papel que puede desempeñar p53^{wt} sobre la línea celular de vejiga T24, que se sabe es radioresistente asociada al fenotipo p53^{mut} (Hinata, 2003). Así que determino la radioresistencia, ciclo celular, viabilidad de esta línea antes y de después de ser transfectada con p53^{wt}.

Así que como primer paso se obtuvieron los diferentes plásmidos obtenidos en condiciones antes descritas (Fig. 12).

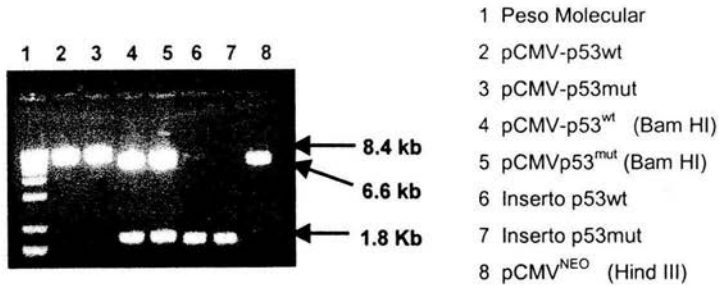


Figura 12. Gel de agarosa al 3% mostrando los diferentes plásmidos utilizados en este trabajo.

Para poder saber el tiempo máximo en el que p53 era expresada se realizó una lipotransfección con el gen de β -galactosidasa, los mejores resultados se obtuvieron a las 24 h post-irradiación, aproximadamente el 30% de las células fueron positivas para la tinción (Fig. 13); en base a estos resultados se procedió a la lipofección de los plásmidos p53^{mut}, pCMV-p53^{wt} y pCMV^{NEO} realizando todos los análisis a las 24 h post-irradiación.

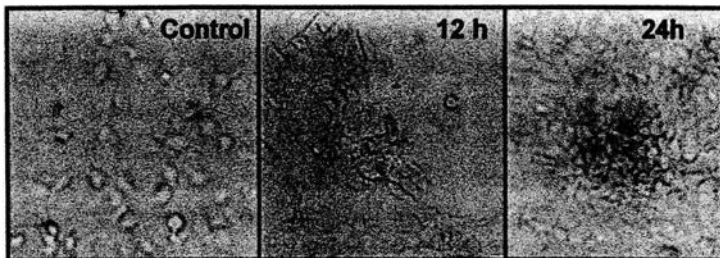


Figura 13. Expresión de β -galactosidasa en la línea T24.

Después de evaluar el tiempo de expresión, se llevo a cabo el análisis de ciclo celular de la línea T24 parental a diferentes dosis y tiempos post-RI (Fig. 14).

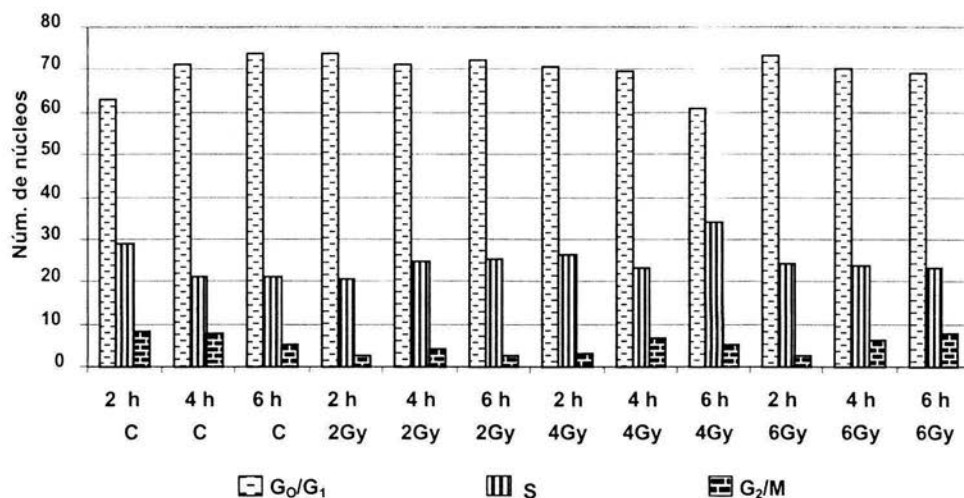


Figura 14. Análisis de ciclo celular de la línea T24 parental a diferentes tiempos y dosis de RI.

En los resultados obtenidos las diferentes dosis de irradiación no afectaron el ciclo de la línea T24, tampoco se observaron diferencias en relación al los tiempos post-RI, estos resultados concuerdan con lo reportado para esta línea y para otros tipos de cáncer en los que p53 esta inactivado (Hinata, 2003, Mendoza, 2001) .

El siguiente paso fue analizar el ciclo celular de la línea T24 tranfectada con el plásmido p53^{wt}, en las mismas condiciones que el experimento anterior, estos experimentos se realizaron con el fin de obtener una dosis en la cual el ciclo celular se mostrara afectado a una dosis conocida de RI.

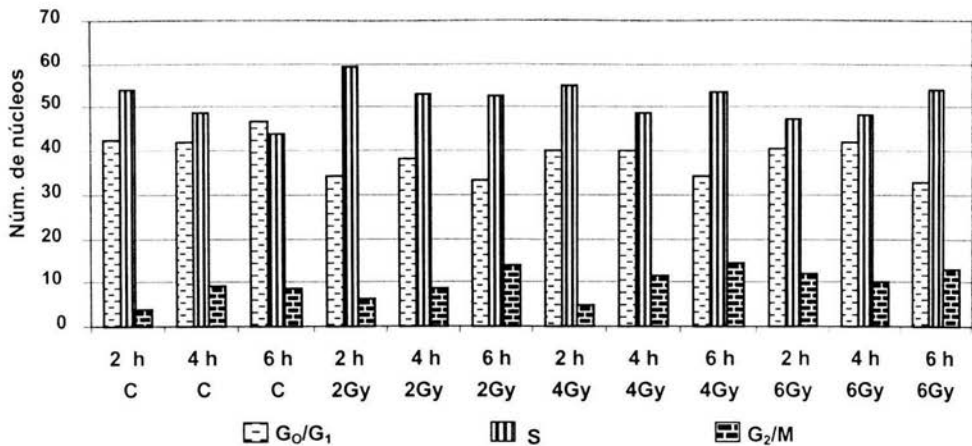


Figura 15. Efecto de p53^{wt} sobre el ciclo celular de las línea T24 trasfectada a diferentes tiempos y dosis de radiación.

En los resultados obtenidos se observó que el ciclo celular de la línea T24 a diferentes dosis y tiempos de irradiación no era afectado (Fig. 14). En contraste, la sola expresión de la proteína p53^{wt} en la línea T24 indujo un aumento de células en fase S desde las primeras horas post-irradiación (Fig. 15), este resultado se observó en las diferentes dosis y tiempos de irradiación, por lo tanto se mantuvieron para los posteriores experimentos la dosis de 6Gy.

Se realizó un ensayo de inmunohistoquímica para poder evaluar la localización de p53 en la línea celular T24 antes y después de la RI (Fig. 16), Se observó que la línea parental presenta una baja expresión de la proteína p53, además de que esta expresión es solamente en citosol. Por el contrario, las células T24 transfectedas con p53^{wt} aumentan su expresión en citosol y núcleo; al ser expuestas a irradiación p53 se localiza principalmente en núcleo lo que concuerda con varios autores que han investigado el papel de p53 en el caso de inducción de daño a ADN.

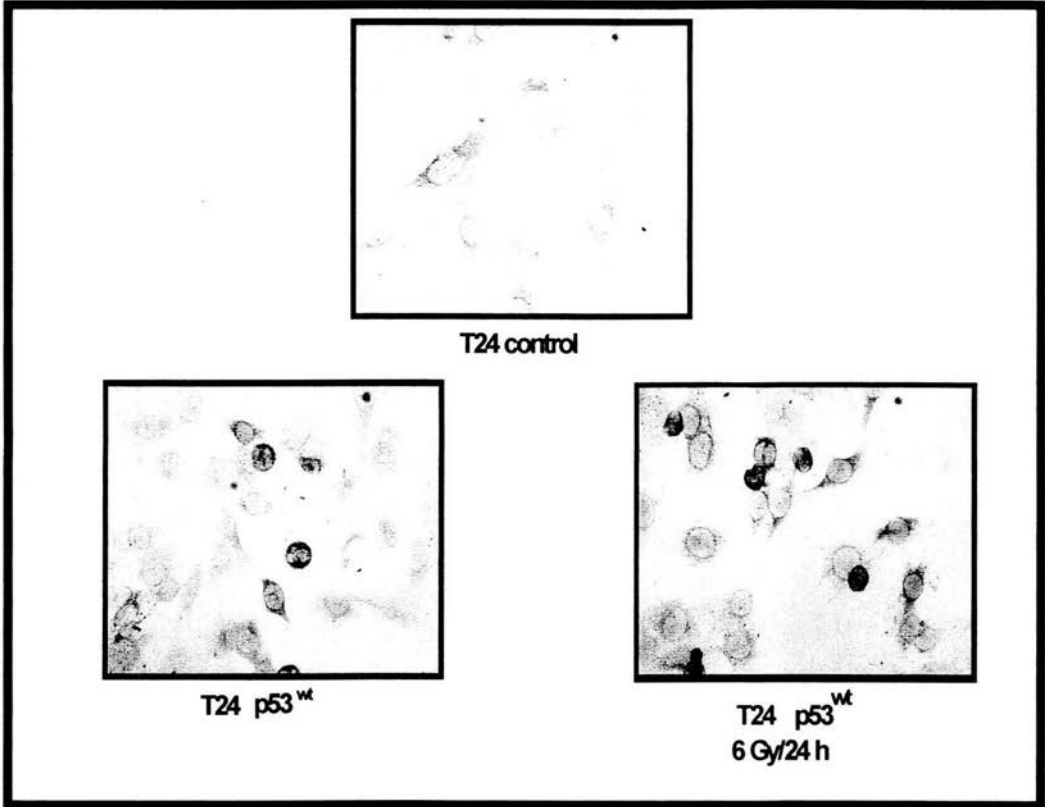


Figura 16. Inmunohistoquímica de p53 en la línea celular T24.

Para poder determinar si p53^{wt} tenía un efecto sobre el ciclo celular de la línea T24 se realizó un seguimiento del ciclo celular a 24 h post-RI, para poder tener un seguimiento de la fase de síntesis en donde se mostro un aumento de la población.

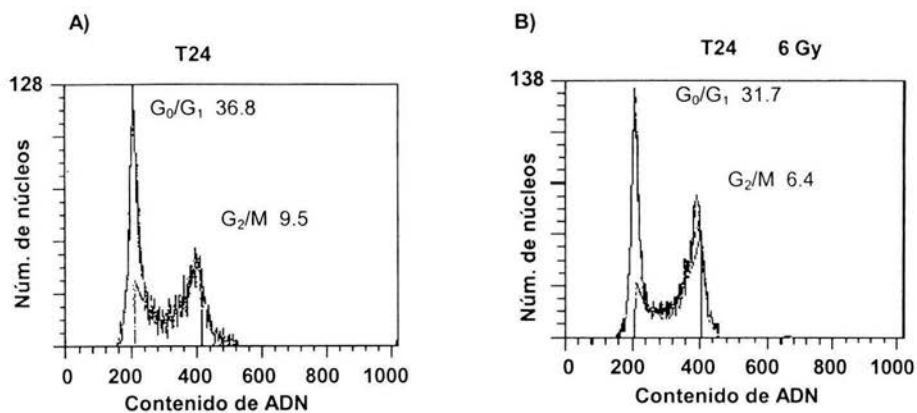


Figura 17. Análisis de ciclo celular de la línea celular T24 parental. A) Control B) 6 Gy.

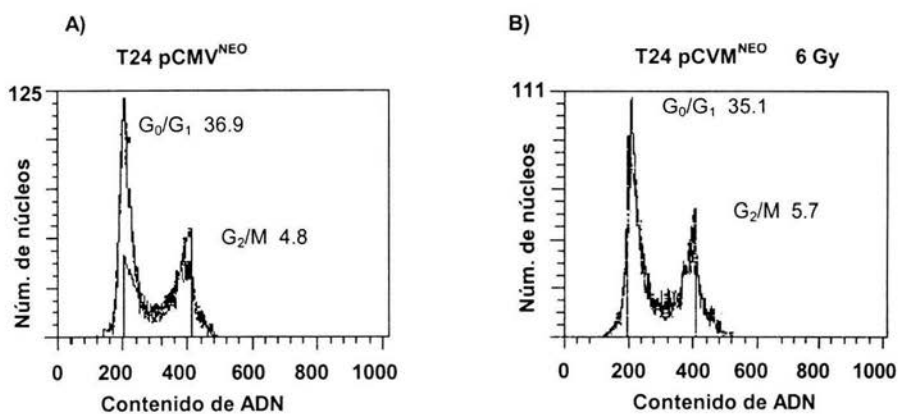


Figura 18. Análisis de ciclo celular de la línea celular T24 a las 24 h. post-irradiación transfECTada con el plásmido control. A) Control B) 6 Gy.

En los histogramas de ciclo celular obtenidos a las 24 h post-irradiación, se encontraron diferencias significativas en el ciclo celular de línea T24 que tenía el p53^{wt} exógeno, en comparación con el ciclo celular presentado por los diferentes controles, T24, T24-pCMV^{NEO} y T24-p53^{mut}.

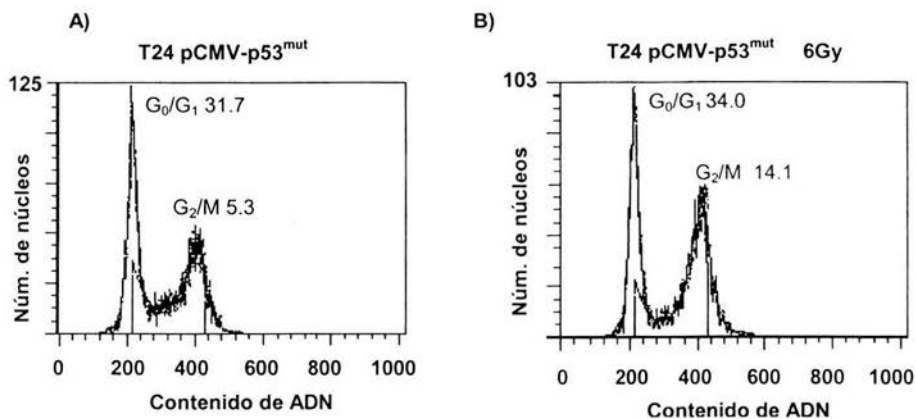


Figura 19. Análisis de ciclo celular de la línea celular T24, transfectada con el plásmido p53^{mut}. A) Control. B) 6 Gy.

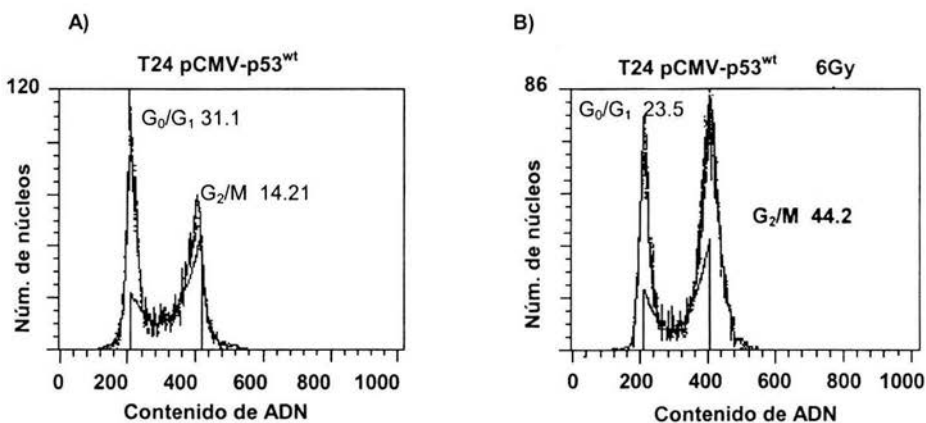


Figura 20. Análisis de ciclo celular de la línea celular T24 transfectada con el plásmido p53^{wt}. A) Control. B) 6 Gy.

En estos experimentos se muestra, que la línea parental y T24-pCMV^{NEO} no mostraron un arresto en el ciclo celular a las 24 h después de las irradiación, en contraste las células T24-p53^{wt} mostraron un incremento de la población celular arrestada en la fase G₂/M antes (9.5% en T24 parental vs. 14.1% en T24-p53^{wt}) y después de la irradiación (6.4% vs. 44.2%, respectivamente).

También se observó un ligero aumento de la población en la fase G2/M de las células T24-p53^{mut}, pero este no fue significativo comparando con los efectos de T24-p53^{wt}.

Con base en nuestros resultados se muestra que la sola sobreexpresión de p53^{wt} es capaz de provocar un arresto del ciclo celular en la fase G2/M de la línea T24, por lo tanto es posible que los eventos inducidos por la radiación cascada arriba y cascada debajo de p53, podrían estar intactos en nuestro modelo.

	Horas post-RI →		
	2	4	6
CONTROL	2.32	5.64	5.16
pCMV-P53 ^{WT}	7.72	11.56	9.57

* Porcentajes de expresión de la proteína p53 en 10,000 células.

Figura 21. Análisis de la proteína p53 en la línea celular T24 por citometría de flujo. En las primeras horas post-RI

En este análisis se encontró que la línea T24 parental no tuvo un aumento significativo en la expresión de la proteína p53 en comparación con la línea T24-p53^{wt} la cual mostró un aumento, esto concuerda con lo reportado sobre la estabilización y aumento de vida media cuando se induce un estrés celular.

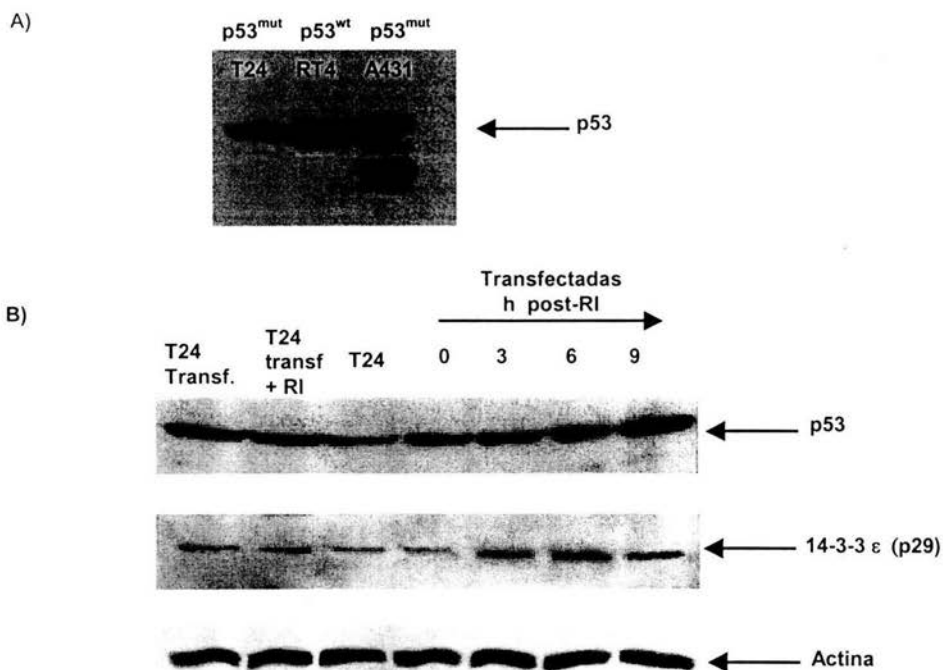


Figura 22. Western Blot. A) Expresión de p53 en diferentes líneas de cáncer. B) Expresión de la proteína p53 y 14-3-3 ϵ en curso temporal a 6 Gy post-irradiación- γ en la línea T24 control y transfectada con p53^{wt}

La expresión de la proteína p53 la línea T24 presento niveles bajos en comparación con las líneas que tienen p53^{wt} (Fig 22 A), lo cual concuerda con lo reportado, en donde la vida media de p53 es menor en casos de presentarse mutaciones en la proteína, esto concuerda con nuestros datos de inmunohistoquímica.

En el análisis temporal los resultados obtenidos mostraron que la RI aumento la expresión de p53 en comparación con la línea parental y que este aumento fue dado en las primeras horas post-RI, (Fig 22 B) lo que concuerda con lo encontrado en los análisis de detección de la proteína por citometria de flujo. Tratando de elucidar la vía mediante la cual pudiera llevarse acabo el arresto se realizó inmunoblot contra la proteína 14-3-3 σ la cual se tiene reportado puede estar involucrada en

el arresto en la fase G₂/M. El anticuerpo utilizado reconoció otras isoformas y solo la que mostró una expresión dependiente de p53 fue la isoforma ϵ ; aquí se observó que la sola expresión de p53^{wt} no provocó aumento de la expresión de 14-3-3 ϵ , sino que únicamente cuando se combinaba la irradiación y con la expresión de p53^{wt} se indujo la expresión de 14-3-3 dependiente de p53^{wt}.

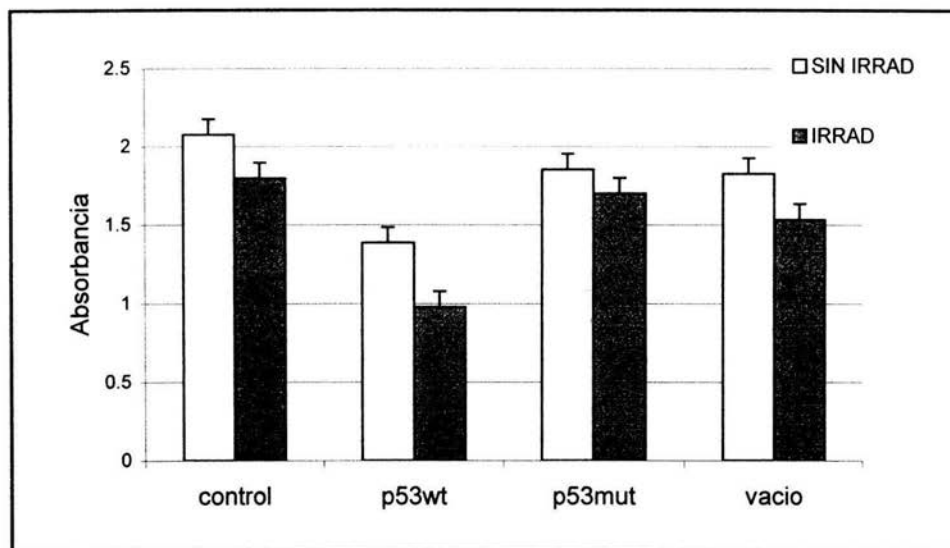


Figura 23. Efecto de la proteína p53^{wt} sobre la viabilidad de la línea T24 a las 48 h post-RI (6 Gy).

Los ensayos de viabilidad celular mostraron que la línea T24 parental no tuvo cambio significativo en su viabilidad aún con la radiación. Por otro lado se observó que las células transfectadas con los plásmidos p53^{mut} y pCMV^{NEO} no tuvieron efecto sobre la viabilidad ($p \geq 0.05$) a un después de irradiadas y comparadas con la línea parental. Pero la sola transfección del plásmido p53^{wt} si mostró una disminución significativa de la viabilidad ($p \leq 0.05$) con respecto al control y a los otros plásmidos, esta observación fue más notoria al irradiar estas células (Fig. 23).

También al comparar los resultados obtenidos de la línea transfectada con p53^{wt} contra los otros plásmidos se obtuvieron datos significativos ($p \leq 0.05$) demostrándose que la sola reexpresión de p53^{wt} es capaz de inducir una muerte celular y esto se potencializa con la irradiación.

9. DISCUSIÓN

La historia de p53 a través de los años desde su descubrimiento ha dado perspectivas de tratamiento en varias enfermedades entre ellas el cáncer en donde se ha propuesto la terapia génica en la cual se trata de hacer un reemplazamiento del gen de p53. La progresión del cáncer es conducida por las mutaciones de oncogenes y genes supresores, los cuales dentro de las condiciones de selección dan lugar al desarrollo y sobrevivencia de células alteradas bioquímicamente con un potencial tumorigénico y metastásico. Los cánceres humanos son biológica y patológicamente distintos entre sí, pero en la mayoría de ellos (60 %) se ha encontrado un evento en común, que es la perturbación del gen o proteína p53.

El papel central de p53 como una proteína supresora de tumores ha sido de interés y se han identificado algunos mecanismos de función y regulación para poder y determinar como su inactivación puede facilitar la progresión del cáncer.

p53 regula el arresto en la fase G₁ en respuesta a determinado stress celular, y así poder prevenir la síntesis de ADN con algún daño. Una variedad de estímulos disparan la respuesta celular dependiente de p53 y aumentan la habilidad de p53 de unirse a ADN e inducir la acumulación de la proteína, atribuible en gran parte a un incremento de su estabilidad.

Estudios sobre el papel de p53 en procesos de inducción de muerte celular inducida por agentes anticancerosos da esperanzas en la investigación básica en el entendimiento de las bases moleculares del cancer y una posibilidad real de tener como coadyuvante en las terapias anticancer a la proteína p53.

Entre las diferentes terapias anticáncer se encuentra la radiación ionizante (RI) que es comunmente aceptada como una terapia efectiva que se aplica en una gran variedad de tumores de diferente origen y estadio. En este trabajo se aborda el papel que puede tener p53^{wt} (normal, silvestre) en la respuesta a RI en células tumorales de cáncer de vejiga, encontrando que p53^{wt} puede inducir un arresto en la fase G₂.

Cuando tranfectamos la línea T24 con el gen reportero pCMV-β-gal se encontró la mayor actividad a las 24 h post-transfección, en un 60% de las células T24, en comparación a las 12

horas post-transfección, (Fig. 13). Estos resultados nos dan información sobre el tiempo en el que se expresa al máximo nuestra proteína, ya que ambos plásmidos comparten el mismo promotor. Con base en estas condiciones se transfectó la línea T24 con los plásmidos que contenían el gen de p53^{wt}, utilizándose las dosis de irradiación- γ que han sido reportadas para este tipo de ensayos 2, 4 y 6 Gy (Kemp, 1994; Velasco-Miguel, 1999; Barnetson, 1999; Matsui, 2001) y evaluar el efecto de la RI en el ciclo celular a diferentes horas post-irradiación.

En el ciclo celular de la línea celular T24 control no se observaron cambios significativos con respecto a las diferentes dosis de irradiación, ni a las diferentes horas post-irradiación- γ en ninguna de las diferentes fases celulares (Fig. 14). Esto concuerda con lo observado por otros grupos de investigación en diferentes líneas de cáncer, que tienen infuncional a p53; en donde no se afecta ninguna fase de ciclo celular cuando las células se someten a dosis diferentes de irradiación- γ (Dahlberg, 1999) en comparación con líneas celulares de cáncer que tiene p53^{wt} al sometida a un esquema similar de RI estas presentan un arresto en la fase G₁, (Ribeiro, 1997).

Estos resultados refuerzan la idea de que algunas mutaciones de p53 alteran su función y esto conlleva a una radioresistencia de algunas líneas celulares y tumores, (Dahm-Daphi, 2000)

También se ha observado que hay una respuesta muy heterogénea con respecto a la irradiación en otras líneas celulares de vejiga, esto es muy importante ya que se ha visto *in vitro* que después de la irradiación- γ surgen clones radioresistentes y esto podría explicar las variaciones de las respuestas clínicas observadas en el tratamiento con irradiación- γ en cáncer de vejiga invasivo (Shu, 1998; Lee, 1993 Barnetson, 1999).

Estos datos también concuerdan con la presencia de un alelo p53^{mut} en la línea T24, ya que se ha visto que la presencia de un alelo mutado puede inhibir la actividad supresora de tumores del alelo p53^{wt}, sin embargo, los mecanismos aún no son muy claros (Roemer, 1999). Como se sabe p53^{wt} tiene un rol en la reparación de daño al ADN y como primera instancia arresta el ciclo celular en la fase G1 después del daño con irradiación- γ o luz UV y por lo tanto la expresión de formas mutantes de p53 pueden de alguna forma alterar la resistencia a irradiación- γ .

Por otro lado, los resultados de ciclo celular obtenidos en la línea T24 transfectada con el plásmido pCMV-p53^{wt}, (Fig. 15) fueron muy diferentes con respecto al experimento anterior, se

observó que el número de células en G₁ disminuyó y se encontró un incremento significativo en el número de células en la fase S, tanto en las células sin irradiar (control) como irradiadas, encontrándose el pico mayor de fase S a las 6 h con 6 Gy .

Estos resultados nos dan una idea del importante papel que esta jugando p53^{wt}, con respecto al daño causado al ADN por irradiación- γ . Recientemente se ha propuesto que la radiosensibilidad y la respuesta clínica puede correlacionarse con el status de p53, y es generalmente se acepta que las células que expresan alguna forma mutante de p53 son más radioresistentes que las células que expresan p53^{wt} (Siles, 1996, Yang, 1996).

Como un análisis complementario se realizó un análisis de inmunohistoquímica, para poder evaluar la expresión de p53 y la ubicación subcelular de la proteína p53, en la línea T24 irradiada a 6 Gy. Los resultados obtenidos en este ensayo son muy significativos ya que la línea parental muestra una leve expresión de la proteína en el citosol, y por el contrario la línea T24 transfectada con p53^{wt} mostró un incremento en la señal para la proteína misma que se presentó con localización nuclear; esta sobreexpresión y localización nuclear se acentuó más a las 24 h post-irradiación, (Fig.16).

Estos datos son muy interesantes ya que el hecho de que la línea parental muestre la expresión de p53 aún después de irradiar en el citosol nos puede dar información sobre que la proteína p53 o su sistema de transporte hacia el núcleo está siendo inhibido por mecanismos que aún no están definidos.

Entre las vías de desregulación postranscripcional de p53 están: la hidrólisis inducida por una proteína viral conocida como E6 que toma el papel de una ligasa de ubiquitinación que proviene del *Papilloma Virus Humano* (HPV) (Miranda, 1999), otra vía conocida que causa la retención de p53 en el citosol es la presencia de mutaciones en su secuencia señal de transporte nuclear (Liang, 1998).

Con las observaciones sobre el ciclo celular en las primeras horas post-irradiación se evaluó el efecto y funcionalidad de p53 sobre el ciclo celular después de un periodo post-irradiación de 24 h en la línea T24 transfectada con los diferentes plásmidos (p53^{wt}, p53^{mut},

plásmido control) para poder hacer un seguimiento de lo que ocurre con el aumento en la fase S de la línea T24 transflectada con p53^{wt}.

Se observó que la línea parental no mostró ningún cambio en su ciclo celular (Fig. 17) aún después de irradiar; esto concuerda con lo observado en otras líneas de cáncer de vejiga, (Shu, 1998; Lee, 1993; Barnetson, 1999), también la respuesta refractaria a la irradiación se ha reportado en líneas celulares de otros tipos de tumor y cultivos primarios de cáncer, (Dahlberg, 1999; Shu, 1998). La línea parental sin irradiar e irradiada no mostró cambio alguno. Con respecto a la línea T24 transflectada con los plásmidos control y p53^{mut}, se observó un comportamiento igual al experimento anterior, no mostraron alteración alguno en su ciclo celular (Figs. 18 y 19).

Al analizar las células que fueron transflectadas con el plásmido de p53^{wt}, éstas mostraron un arresto en la fase G₂ aún sin irradiar, esto nos da pauta para pensar que p53^{wt} está provocando un arresto en la línea T24. Este comportamiento podría estar relacionado con lo que se le ha atribuido a p53^{wt}, con respecto a que cuando p53 no se encuentra inducido por un estrés celular, las formas latentes existentes están involucradas en un papel de chegador y reparador de la integridad genómica (Albrechtsen, 1999).

Las células transflectadas con p53^{wt} e irradiadas y analizadas a las 24 h mostraron un progreso a través de la fase S y aproximadamente el 50% de la población fue arrestada en la fase G₂ con un contenido de ADN 4N, sugiriendo un efecto radiosensibilizador de p53^{wt} en esta línea celular. Estos resultados concuerdan con lo observado en los análisis de ciclo celular a las primeras 6 h post-RI en donde se observó que las células que se transflectaron con p53^{wt} mostraron un aumento de la fase S y un aumento mínimo de la fase G₂.

Estos datos son muy interesantes ya que se esperaba que p53 pudiera tener un efecto sobre la fase G₁, se ha reportado que al restaurar la expresión de p53^{wt} este provoca arresto en la fase G₁ de células de cáncer de colon, (Yang, 1996). También se tiene reportes sobre la capacidad de p53^{wt} de arrestar células de ovario en la fase G₂, pero sin todavía poder entender los mecanismos de ese arresto (Vikhanskaya, 1994) . En este experimento se demuestra que la progresión a través del ciclo celular después de la exposición a irradiación- γ es diferente dependiendo del status de p53 en la línea T24 (Fig.20).

Los datos de arresto en G₂ de la línea T24 son muy importantes, ya que se ha reportado que hay otras líneas tumorales que no presentan sensibilidad a la RI ó cambio alguno al restaurarles p53^{wt} junto con radioterapia (Del Sal, 1996; Strobel, 1997). Nuestros resultados confirman junto a otros grupos de trabajo que p53^{wt} puede arrestar en G₂ después de un daño al ADN (Stewart, 1995).

En años recientes se ha prestado atención al papel que p53 desempeña en el arresto de la fase G₂ y es un mecanismo que apenas está siendo explicado. Por otro lado también se están elucidando vías en las que la proteína p21 puede regular arresto en la fase G₂ (Hwang, 1998,).

Otro resultado interesante fue al observar que la expresión de p53 endógeno en la línea T24 (p53^{mut}) es menor con respecto a la línea RT4 (p53^{wt}) endógeno (Fig. 22A), esta diferencia puede estar dada por que la vida media de la proteína p53 en la línea T24 esta disminuida, esto concuerda con lo reportado por otros autores en los cuales las líneas que presentan mutaciones en la proteína p53 tienen una vida media menor en comparación a una línea con p53^{wt}. (Cooper, 1994).

La expresión de la proteína p53 se dá en las primeras horas post-RI, como se confirmo por citometría de flujo e inmunoanálisis tipo "western blot" (Figs. 21 y 22B), esto concuerda con lo reportado por otros grupos de trabajo en los que se observa que la respuesta a daño en el ADN provoca una estabilización y acumulación temprana de la proteína (Passaralis, 1999). Lo que se observa en este curso temporal en cuanto a la proteína p53^{wt} es que es sobreexpresada aún sin irradiar, y que conforme pasa el tiempo post-irradiación su expresión aumenta hasta las 9 h. (Fig.22B). Esto concuerda con lo reportado en los modelos de irradiación *in vitro*, en diferentes tipos celulares, en los cuales en las primeras horas post-daño a ADN se expresan altos niveles de p53^{wt} en y las células entran en arresto en la fase G₁, (Diller, 1990); o apoptosis (Tonish-Rouach, 1994).

El arresto en la fase G₂ uqe nosotros observamos nos llevó a buscar si la proteína 14-3-3 σ estaba involucrada, ya que se sabe que esta proteína en una potente inhibidor de cdk's en la fase G₂; 14-3-3 σ previene la entrada al núcleo del complejo cdc2-ciclinaB1 (Chan, 1999; Lopez-Girona, 1999), (Fig. 22B).

Las proteínas de la familia 14-3-3 son proteínas expresadas en respuesta a una gran variedad de señales, incluyendo diferenciación epitelial y daño a ADN (Leffers, 1993; Fu, 2000). También se sabe que las proteínas de la familia 14-3-3 son reguladas por p53, en nuestro resultado de inmunoanálisis tipo "western blot" se observa que nuestro anticuerpo reconoció a la isoforma σ y a otras isoformas de la familia de 14-3-3.

La expresión de la isoforma 14-3-3 σ no tuvo cambio alguno, pero la banda que pertenece al peso de la isoforma epsilon (ϵ), aumentó concordando con la expresión de p53, teniendo un máximo de expresión entre las 3 y 6 horas (Fig.22B). Se sabe que algunas formas diferentes a la isoforma σ , pueden estar involucradas en el arresto en G₂, secuestrando en el núcleo o citoplasma a la fosfatasa Cdc25c (Chan, 1999), en la literatura pocos reportes involucran *in vitro* a la proteína 14-3-3 ϵ , en donde secuestra y exporta del núcleo a la fosfatasa Cdc25 (Kumagai, 1999, Konishi, 2001). Nosotros observamos *in vitro* una clara relación en la expresión de la isoforma ϵ con la expresión de p53 y quizá halla una interacción entre 14-3-3 ϵ y p53^{wt} en nuestro modelo.

Se ha reportado que las isoformas γ , ϵ y τ de 14-3-3 se asocian a p53^{wt} en arresto inducido por radiación ionizante, sin modificación en la expresión de 14-3-3 σ (Stavridi, 2001) y que esta interacción no afecta la unión de p53 a ADN.

Después de observar en nuestros experimentos de arresto del ciclo celular y la expresión de p53 y de 14-3-3 ϵ , se trató de complementar con ensayos de viabilidad celular en los cuales se observó que las células T24-p53^{wt} que habían sido arrestadas a las 24 h mostraron una muerte de aproximadamente el 50% de la población (Fig. 23). Estos resultados refuerzan la idea de que un arresto en G₂ debe ser considerado importante en los tumores resistentes a daño y con mutaciones en p53; ya que se ha observado que la habilidad de varias líneas tumorales para acumular daño después de un daño en G₂ es proporcional a su clonogenicidad y a la resistencia a múltiples drogas anticáncer (Erenpreisa, 2001). En nuestros resultados al introducir un gen de p53^{wt}, reestablecimos la función de sensor el daño al ADN, de arrestar en la fase G₂ e inducir muerte celular y todo esto dependiente de p53^{wt} y de la proteína 14-3-3 ϵ .

Hoy día se conoce la principal vía mediante la cual 14-3-3 σ actúa en el arresto de G₂, pero aún no se tiene reportes de cómo la proteína 14-3-3 ϵ actúe en el arresto en la fase G₂. Si bien se ha reportado que otra isoforma distinta a σ está involucrada en el arresto en G₂ (Chan, 1999), aún no se sabe cual de ellas; nuestros resultados sugieren que puede tratarse de la isoforma ϵ . Otra teoría propuesta para el papel que posiblemente desempeñe 14-3-3 ϵ está relacionado con su participación en células vegetales en donde las proteínas 14-3-3 sugieren facilitan la interacción de la unión de factores de transcripción ADN-secuencia específica con la maquinaria basal de transcripción (Stavridi, 2001).

Estos resultados en conjunto nos indican que p53 puede ser un buen agente co-terapéutico en el tratamiento del cáncer, así como dar la pauta para el entendimiento de los modificadores y cooperadores en la célula y en el tejido específico en los que p53 está involucrada en lo que concierne a la radiosensibilidad y radioresistencia.

p53 activa la expresión de varios genes con efecto que puede ser sumatorios y determinar la respuesta de células neoplásicas a la RI.

Nuestros resultados muestran que la iniciación del arresto en la fase G₂ en respuesta a daño de ADN es dependiente del status de p53 en la línea de cáncer de vejiga T24 y que en este arresto se involucra la proteína 14-3-3 ϵ .

En este trabajo se obtiene resultados que nos puede reflejar de lo que posiblemente pase *in vivo* con respecto a la mala respuesta que se obtiene en el tratamiento de cáncer de vejiga con radioterapia. En conclusión nuestros resultados sugieren la posibilidad de utilizar un a p53^{wt} como un eficiente coadyuvante asociado a la radioterapia convencional.

En este trabajo nosotros colocamos dos estrategias básicas: reemplazar el gene de p53^{mut} por un p53^{wt} y restaurar la función de p53.

10. CONCLUSIONES.

A sido reportado en varios estudios que la ausencia de p53 funcional en líneas de cáncer de vejiga incrementa la radioresistencia de estas células. En este trabajo se investigo la relación que hay entre el estatus de p53 y la respuesta a RI.

□ En el reestablecimiento de la proteína p53^{wt} en la línea T24 se observó que el ciclo celular cambiaba en las primeras horas post-RI dando un aumento en la fase de síntesis; y que también la localización de la proteína p53 cambiaba en las primeras horas post-RI translocandose a núcleo.

□ Se observó que aproximadamente el 45% de las células transfectadas con p53^{wt} mostrarón arresto del ciclo celular en la fase G₂ a las 24 h post-RI, este arresto fue acompañado de un aumento en la muerte celular a las 48 h post-RI en comparación con los controles.

□ Se demostró que proteína p53 incrementa su expresión en las primeras horas post-RI en las células transfectadas con p53^{wt} y que este incremento esta acompañado por la expresión de la proteína 14-3-3ε, la cual no se tenia reportada en la literatura para estar involucrada en el arresto en la fase G₂ y muerte celular.

Con estos resultados se demuestra que la RI induce muerte celular dependiente de p53^{wt} en la línea de cáncer de vejiga T24 y se da la pauta para dar una propuesta a futuro dirigida al tratamiento de cáncer de vejiga refractario a RI y que presente mutaciones en p53.

11. REFERENCIAS

- Albrechtsen N., Dornreiter I., Grosse F., Kim E., Wiesmüller L., Deppert W. 1999. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, 18: 7706-7717.
- Anderson HJ Roberge M. 1992. DNA topoisomerase II: a review of its involvement in chromosome structure, DNA replication, transcription and mitosis *Cell Biol Int Rep*, 16:8 717-24.
- Avantaggiati ML., Ogryzko V., Gardner K., Giordano A., Levine AS., and Kelly K. 1997. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*, 89: 1175-1184.
- Bache M., Dunst J., Wurl P., Frode D., Meye A., Schmidt H., Rath FW. and Taubert H. 1999. G2/M checkpoint is p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. *Anticancer Res*. 19: 1827-1832.
- Baker SJ., Fearon ER., Nigro JM., Hamilton SR., Preisinger AC., Jessup JM., van Tuinen P., Ledbetter DH, Baker DF., and Nakamura Y. 1989. *Science*. 244: 912-915.
- Banin S., Moyal L., Shield SY., Taya Y., Anderson CW., Chessa L., Smorodinski NI., Prives C., Reiss Y., Shiloh Y., and Ziv Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281: 1674-1677.
- Bargonetti J. Manfredi JJ. Chen X. Marshak DR. and Prives C. 1993. A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev*. 7: 2565-2574.
- Barneston AR., Banasiak D., Fisher RJ., Mameghan H., Ribeiro JC., Brown K., Brown JL., O'Mara SM., and Russell PJ. 1999. Heterogeneity of in vitro radiosensitivity in human bladder cancer cells. *Radiat Oncol Investig.*, 7: 66-76.
- Benda Rk, Porter., AT. 1996. The current role of radiotherapy in the treatment of invasive bladder cancer. *Crit Rev Oncog*, 7: 457-464.
- Bennett M., Macdonald K., Chan SW., Luzio JP., Simari R., Weisber P. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53. *Science*, 282: 290-293.

- Berggren P., Steineck G., Adolfsson J., Hansson J., Jansson O., Larsson P., Sandstedt B., Wijkstrom H. and Hemminki K. 2001. p53 mutations in urinary bladder cancer. *Br J Cancer* . 84:1505-11
- Blangy A., Lane HA., d'Herin P., Harper M., Kress M. and Nigg EA. 1995. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell*, 83:1159-69.
- Borek C. 1987. Radiation and chemically induced transformation: free radicals, antioxidantes and cancer. *Br J. Cancer suppl.* 8: 74-86
- Boyd SD., Tsai KY., Jacks T. 2000. An intact HDM2 ring-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat. Cell Biol.* 2: 563-568.
- Braun K, Holz G, Pusch O, Hengstschlager M. 1998. Deregulated expression of CDK2- or CDK3-associated kinase activities enhances c-Myc-induced apoptosis. *Cell Biol.* 7: 789-98.
- Clarke PR. 1995. Cyclin-dependent Kinase. CAK-handed Kinase activation. *Curr Biol.* 5: 40-42.
- Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Walkman T., Zhou S., Brown JP., Sedivy JM., Kinzler KW and Vogelstein B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282: 1497-1501.
- Carnero A, Hannon GJ.1998. The INK4 family of CDK inhibitors . *Curr Top Microbiol Immunol.* 227: 43-55.
- Carnero A. 2000. Cell cycle and cancer. *Rev. Oncologia*, 2: 12-22.
- Caron de Fromentel C and Soussi T. 1992. TP53 tumor supresor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 4:1-15.
- Clore GM., Omichinski JG., Sakaguchi K., Zambrano N., Sakamoto H., Appella E. and Gronenborn AM. 1994. High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science*, 265: 386-391.
- Coleman TR., Tang Z., Dunphy WG.1993. Negative regulation of the wee1 protein kinase by direct action of the nim/cdr1 mitotic inducer. *Cell.* 72:919-929.
- Cooper JM., Haluschack JJ., Johnson D., Schwartz S., Morrison LJ., Lippa M., Hatzivassiliou G. and Tan J. 1994. p53 Mutations in bladder Carcinoma Cell Lines. *Oncol. Research*, 6: 569-579.

- Cordon-Cardo C. And Reuter VE. 1997. Alterations of Tumor Genes in Bladder Cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 14:123-132
- Cote RJ., Esrig D., Groshen S., Jones PA, Skinner DG. 1997. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature*, 385: 123-125.
- Chan TA., Hermeking H., Lengauer C., Kinzler KW and Bert Vogelstein.1999. 14-3-3s is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 401: 616-620.
- Chang C., SimmonsDT., Martin MA., and Mora PT. 1979. Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J. Virol.* Aug 31: 463-471.
- Chao C., Saito S., Kang J., Anderson CW., Appella E, Xu Y. 2000. p53 transcriptional activity is essential for p53- dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J.* 19: 4967-4975.
- Chehab NH., Malikzay A., Appel M., Halazonetis TD. 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14: 278-288.
- Chen PL., Chen YM., Bookstein R. and Lee WH. 1990. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science.* 250: 1576-1580.
- Chernov MV., Ramana CV., Adler VV ., Stark GR. 1998. Stabilization and activation of p53 are regulated independently by different phosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* 95: 2284-2289.
- Chikayama S., Sugano T., Takahashi Y., Ikeda M., Kimura S., Kobayashi Y. and Kondo M. 2000. Nuclear accumulation of p53 protein and apoptosis induced by various anticancer agents, u.v.-irradiation and heat shock in primary normal human skin fibroblasts. *Int J Oncol.* , 16: 1117-24
- Cho YJ., Gorina S., Jeffrey PD and Pavletich NP. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355.
- Dahlberg WK., Azzam EI., Yu Y., Little JB. 1999. Response of human tumor cells of varying radiosensitivity and radiocurability to fractionated irradiation. *Cancer research*, 59: 5365-5369.
- Dahm-Daphi. 2000. p53: biology and role for cellular radiosensitivity. *Strahlenther Onkol.*, 176 (6): 278-285.
- Dang CV., and Lee WM. 1989. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.* 264:18019-18023.

S., Maya R., Oren M., Lozano G. 2000. The loss of mdm2 induces p53 mediated apoptosis. *Oncogene*, 19: 1691-1697.

de Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, Sage J, Jacks T. 2002. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 2948-53

Decraene D., Agostinis P., Pupe A., de Haes P. and Garmyn M. 2001 Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein. *J Photochem Photobiol B.*, 63: 78-83.

Del Sal G, Murphy M, Ruaro E, Lazarevic D, Levine AJ, Schneider C .1996. Cyclin D1 and p21/waf1 are both involved in p53 growth suppression. *Oncogene*, 12: 177-185.

Deleo AB., Jay G., Apella E., Dubois GC., Law LW., and Old LJ. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 2420-2424.

Desai D. Wessling, HC. Fisher RP. Morgan DO. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol*. 1995, 15: 345-50

Diller L., Kassel L., Nelson CE., Gryka MA., Litwak M., Gebherdt M., Bressac B., Ozturk M., Baker SJ., Vogelstein B., Fien SH. 1990. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol*. 10:5772-5782.

Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky AK., Moore AM., Finlay C and Levine AJ. 1993. Gain of function mutations in p53. *Nat. Genet.* 4: 42-46

Ducommun B., Brambilla P., Felix MA., Franza Br Jr., Karsenti E., Draetta G. Cdc2 phosphorylation is required for its interaction with Cyclin. *EMBO J*. 10: 3311-3319.

Dutta A., Rupert JM., Aster JC., and Winchester E. 1993. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature*, 365: 79-82.

El-Deiry WS., Kern SE., Pietenpol JA., Kinzler KW and Vogelstein B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1: 45-49.

Erenpreisa J. and Cragg MS. 2001. mitotic death a mechanism of survival? A review. *Cancer Cell International*. 1:1-7.

- Esrig D., Elmajian D., Groshen S., Freeman LA., Stein JP., Chen SC., Nichols PW., Skinner DG., Jonnes PA., Cote RJ. 1994. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N. Engl. J. Med.*, 331: 1259-1264.
- Fritsche M., Haessler C and Brandner G. 1993. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*, 8: 307-318.
- Fu H., subramanian RR and Masters SC. 2000. 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 617-647.
- Galaktionov K., Beach D. 1991. Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell*. 67: 1181-1194.
- Gannon JV., Greaves R., Iggo R. and Lane DP. 1990. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 9: 1595-1602.
- Garcia RC., Colell A., Mari M., Morales A., Fernandez Ch JC. 1997. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.*, 272: 11369-11377.
- Geyer RK., Yu ZK., Maki CG. 2000. The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat. Cell Biol.* 2: 569-573
- Giannakakou P., Sackett DL., Ward Y., Webster KR., Blagosklonny MV., Fojo T. 2000. p53 is associated with cellular microtubules and uses dynein-dependent transport for nuclear accumulation. *Nat Cell Biol.* 2: 709-717.
- Gorina S and Pavletich NP. 1996. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*, 274: 1001-1005.
- Grana X and Reddy EP. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, 11:211-219.
- Gu W., Roeder RG. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90: 595-606.

Hainaut P and Milner J. 1993. structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Res.* 53:1739-1742

Hall EJ. And Kereiakes. Chapter: Effects of Ionizing Radiations on Cells. In: Cell Physiology Sourcebook: A molecular Approach; Second Edition, Ed. Academic Press. 1998.

Hallahan D.E. 1996. Radiation-Mediated Gene Expression in the Pathogenesis of the clinical Radiation Response.. *Seminars in Radiation Oncology*, Vol. 6 No 4: 250-267.

Hansen R.; Oren Moshe.1997. p53; from inductive signal to cellular effect. *Curr. Opin. In Genetics and Development.* 7 :1 pp 46-51.

Hartwell LH. and Weinert TA. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246 (4930):629-34.

He Z., Brinton BT., Greenblat J., Hassell JA., and Ingles CJ. 1993. The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A. *Cell*, 73: 1223-1232.

Hengst L., Reed SI. 1998. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol.* 227:225-41

Hinata N, Shirakawa T, Zhang Z, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Gotoh A. 2003 Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wild-type- p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells. *Urol Res.* Sep 4 (in press).

Hofmann F, Livingston DM. 1996. Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit. *Genes Dev.* 10: 851-61.

Horikoshi N;Usheva A; Chen JD. Levine AJ; Weinmann R and Shenk T. 1995. Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 15: 227-234.

Hwang A., Muschek R.J., 1998. Radiation and the G2 phase of the cell cycle. *Radiat Res*, 150: 882-889.

Jenkins JR., Chumakov P. Addison C. and Sturzbecher HW, Wade-Evans A. 1988. Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 62: 3903-3906.

Jimenez GS., Khan SH., Stommel JM., and Wahl GM. 1999. p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene*, 18: 7656-7665.

Jimenez GS., Nister M., Stommel JM., Beeche M., Barcase EA., Zhang XQ, O'Gorman S., Wahl GM. 2000. A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat. Genet.*, 26: 37-43.

Jin S., Antinore MJ., Lkung FD., Dong X., Zhao H., Fan F., Colchagie AB., Blanck P., Roller PP., Fornace Jr AJ., and Zhan Q. 2000. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J. Biol. Chem.* 275: 16602-16608.

Jung I., Messing E. 2000. Molecular Mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. *Cancer control* , 7:325-334.

Kamb A. 1995. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet.* 11: 136-140.

Kastan MB., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B and Craig RW. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51:6304-6311.

Kaufmann WK. And Paules RS. 1996. DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.* 10: 238-247.

Kemp CJ., Wheldon T., and Balmain A. 1994. p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. *Nature Genetics*, 8: 66-69.

Ko LJ., and Prives C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, 10: 1054-1072.

konishi H., Nakagawa T., Harano T., mizuno K., Saito h., Masuda A., Matsuda H., Osada H and Takahashi T. 2002. *Cancer Research* 62: 271-276.

Kraiss S., Quaisier A., Oren M. and Montenarh M. 1988. Oligomerization of oncoprotein p53. *J. Virol.* 62: 4737-4744.

Kress M., May E. Cassingena R. and May P. 1979. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol.* 31: 472-483.

Kumagai A. and Dunphy WG. 1999. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes & development*, 13: 1067-1072.

Kurose A., Sasaki K., Ishida Y., Shibata Y., Yanagisawa S., Kanno C., Uesugi N., Wada T., Miura Y. 1995. Flow cytometric analysis of p53 expression during the cell cycle. *Oncology*, 52:123-7.

Lane D. And Crawford LV. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 278: 261-263.

Lee JM. and Bernstein A. 1993. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:5742-5746.

Lee S. Elenbaas B., Levine A., Griffith J. 1995. p53 and its 14 kDa C-Terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/delección mismatches. *Cell*, 81: 1013-1020.

Lees EM; Harlow E. 1993. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol*. 13:1194-1201.

Leffers H., Madsen H., Rasmussen H., Honore B., Andersen AH., Walbmun E., Vandekerckhove J. and Celia JE. 1993. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive apithelial marker stratafin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signalling pathay. *J. Mol. Biol*. 231: 982-998.

Levine AJ; Momand J; Finlay CA. 1991. The p53 Tumor Suppresor Gene. *Nature*. 351:453-456.

Li L., Story M., Legerski RJ. 2001. Cellular response to ionizing radiation damage. *Int. J Radiation Oncology Biol. Phys*. 49: 1157-1162.

Li X and Coffino P. 1996. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*. 70: 4509-4516.

Liang S., Hong D., Clarke MF. 1998. Cooperation of a single lysie and a c- terminal domain in the cytoplasmic sequestration of the p53 protein. *J Biol Chem*. 23: 19817-19821.

Lin JY., Chen JD., Elenbaas Band Levine AJ. 1994. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev*. 8: 1235-1246.

Linzer DIH and Levine AJ. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 17: 43-52.

Liu L., Scolnick DM., Trievel RC., Zhang HB, Marmorstein R., Halazonetis TD., Berger SL. 1999. p53 sites acetylated *in vitro* by PCAF and p300 are acetylated *in vivo* response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 19: 1202-1209.

Lohrum M and Scheidtmann KH. 1996. Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes. *Oncogene*, 13: 2527-2539.

Lopez-Girona A; Furnari B; Mondesert O., and Russell M. 1999. nuclear localizacion of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*, 397: 172-175.

Lowe SW., Ruler HE., Jacks T. 1993. p53- dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967.

Lowndes NF, Murguia JR. 2000. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.*, 10:1 17-25

Maltzman M. and Czyzyk L. 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4:1689-1694.

Marchenko ND., Zaika A., Moll., UM. Death signal-induced localization of p53 protein to the mitochondria. *J. Biol Chem.*, 275: 16202-16212.

Martínez F., Chávez AD., González D., Gutiérrez AA. Chapter: Regulation of cell División in Higher Eukaryotes. In: *Cell Physiology Sourcebook: A molecular Approach; Third Edition*, Ed. Academic Press. 2001.

Matsui Y, Tsuchida Y, Keng PC. 2001. Effects of p53 Mutations on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation. *Am J Clin Oncol.*, 24: 486-490.

Matsuoka M., Matsuura Y., Samba K., Nishimoto I. 2000.,Molecular cloning of a cyclin-like protein associated with cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3) in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 273: 2442-2447.

May P and May E. 1998. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, 18: 7621-7636

Mayr GA., Reed M., Wang P., Wang Y., Schwedes JF., and Tegtmeier P. 1995. Serine phosphorylation in the NH2 terminus of p53 facilitates transactivation. *Cancer Res.* 55: 2410-2417.

Mendoza CA., Cerbon MA. 2001. El gen supresor de tumores p53 en la proliferación y muerte celular. *Rev Inves Clin*; 53: 266-273.

- Meraldi P., Lukas J., Fry AM., Bartek J., Nigg EA. 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol.* 1:2 88-93.
- Milner J., Medcalf EA. and Cook AC. 1991. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell. Biol.* 11. 12-19.
- Miller SJ., Suthiphongchai T., Zambetti GP., Ewen ME. 2000. p53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for transforming growth factor β and p53-mediated translation inhibition of cdk4. *Nat. Cell Biol.* 20: 8420-8431.
- Miranda T., Pim D., Banks L. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18: 7690-7700.
- Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, Iannone R, Inga A, Abbondandolo A, Resnick MA, Fronza G. 2002. Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene*, 11: 1641-8
- Mora PT., Chandrasekaran K. and McFarland VW. 1980. An embryo protein induced by SV40 virus transformation of mouse cells. *Nature.* 299: 722-724.
- Murphy M., Ahn J., Walker KK., Hoffman WH., Evans RM., Levine AJ., George DL. 1999. Transcriptional repression by wild type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* 13: 2490-2501.
- Nigg EA. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 17:471-80.
- Nuber U., Schwarz S., Scheffner M. 1998. The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur. J. Biochem.*, 254: 643-649.
- Oliner JD., Pieterpol JA., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler KW and Vogelstein B. 1993. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature.* 362: 857-860.
- Oren M., Reich NC., Levine AJ. 1982. Regulation of the cellular p53 tumor antigen in teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. *Mol. Cell. Biol.* 15:3032-3040.
- Osen I., Fossa SD., Mjak B., Rotterud R., Berner A. 1998. Prognostic factors in muscle-invasive bladder cancer treated with radiotherapy : an immunohistochemical study. *Br. J. Urol.* 81: 862-869.

- Pardee AB. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation 3. *Science*, 246: 603-608.
- Park M., Chae HD., Yun J., Jung M., Kim YS., Kim SH., Han MH and Shin DY. 2000. Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest.
- Passalaris MT-, Benanti JA., Gewin L., Kiyono T. and Galloway DA. 1999. The G2 checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol. cell. Biol.*, 9: 5872-5881.
- Pavletich NP., Chambers KA., and Pabo CO. 1993. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* 7: 2556-2564.
- Pedraza V., cueto J., Castillo I., Gonzalo C., Romero MJ. and Zuluaga A. 1999. Critical vision in the treatment of invasive vesical cancer with ionizing radiation. *Arch Esp Urol.* 52: 662-674.
- Peng CY. , Graves PR., Thomas RS., Wu Z., Shaw AS., Piwnica-Worms H. 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 277:1501-1505.
- Perez-Lozada J., Balmain A. 2003. Stem-cell hierarchy in skin cancer *Nature Reviews Cancer* 3: 434-443.
- Pietenpol JA., Tokino T., Thiagalingam S., Eldeiry WS., Kinzler KW and Vogelstein B. 1994. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1988-2002.
- Pines J. 1999. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 1: E73-E79.
- Pines J., Hunter T. 1991. Human cyclins A and B are differentially located in the cell and undergo cell cycle dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* 115:1-17.
- Poon RY., Yamashita K., Adameczewski JP. Hunt T, Shuttlesworth J. 1993. The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO J.* 12: 3123-3132.
- Puck TT., Johnson R. and Rasumussen. 1997. A system for mutation measurement in mammalian cells: Applications to γ -irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 1218-1223.
- Raycroft L., Schmidt JR., Yoas K., Hao MM., and Lozano G. 1991. Analysis of p53 mutants for transcriptional activity. *Mol Cell. Biol.* 11: 6067-6074.

Reed M., Woelker B., Wang P., Wang Y., Anderson ME., Tegtmeier P. 1995. The C-terminal domain of p53 recognize ADN damaged by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9455-9459.

Ribero JCC., Barnetson AR., Fisher RJ., Mameghan H., and Russell PJ. 1997. Relations between radiation response and p53 status in human bladder cancer cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 11-20.

Rodel C., Dunst J., Grabenbauer GG., Kuhu R., Papadopoulos T., Schrott KM., Sauer R R. 2001. Radiotherapy is an effective treatment for high-risk T1-bladder cancer. *Strahlenther Onkol.* 177: 82-88.

Roemer K. 1999. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem.* 380:7-8 879-87

Rogel A. Poplinter M., Webb CG and Oren M. 1985. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol cell Biol.* 5: 2851-2855.

Rosen EM., Fan S., Goldberg ID., Rockwell S. 2000. Biological basis of radiation sensitivity. Part 1: Factors governing radiation tolerance. *Oncology*, 4: 543-550.

Rosen EM., Fan S., Rockwell S., Goldberg ID. 1999. The molecular and cellular basis of radioresitivity: implications for understanding how normal tissues and tumor respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest*, 17: 1: 56-72.

Roulblevskaia IN, Polevoda BV, Lublow JW. Haake AR. 2000. Induced G2/M arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma cell lines by semisynthetic drug Ukrain. *Anticancer Res.* 20:3163-7.

Rudoltz MS., Kao G., Blank KR., Muschel RJ., McKenna WG. 1996. Molecular Biology of the cell Cycle: potential for Therapeutic Applications in Radiation Oncology. *Seminar in Oncology*, Vol 6, No 4:284-294.

Ruppert JM. and Stillman B. 1993. Analysis of a protein-binding domain of p53. *Mol Cell Biol.* 13:3811-38-29.

Sakaguchi K., Herrera JE., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson CW, Paella E. 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, 12: 2831-2841.

Sakamuro D., Sabbatini P., White E. And Prendergast GC. 1997. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, 15: 887-898.

Sarkar S., Jülicher KP., Burger MS., Valle VD., Larsen CJ., Yeager TR., Grossman TB., Nickells RW., Protzel C., Jarrard DF. And Reznikoff CA. 2000. Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancer. *Cancer Research*, 60: 3862-3871.

Sarnow, P., Ho YS., Williams J and Levine AJ. 1982. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* . 28: 387-394.

Scolnick DM., Chehab NH., Stavridi ES., Lien MC., Caruso L., Moran E., Berge SL. and Halazonetis TD. 1997. CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 57:3693-3696.

Scheffner M., Werness BA., Huibregtse JM., Levine AJ., and Howley PM., 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63: 1129-1136.

Schmitt EM., Smith SW., Osborne BA., and Jacks T. 1993. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362: 847-849.

Shaulsky G. Goldfinger N., Ben Ze'ev A. and 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.

Shieh S-Y., Ahn J., Tamai K., Taya Y., Prives C. 2000. The homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage- inducible sites. *Genes Dev.* 14: 389-300.

Shu H-K G., Kim MM., Chen P., Furman F., Julin CM., and Israel MA. 1998. The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21^{BAX} expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 14453-14458.

Siles E., Vilalobos M., Valenzuela MT. 1996. Relationship between of p53 status and radiosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 59: 2781-2786.

Sinclair WK. And Morton RA. 1966. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat. Res.* 29: 450-474.

Sionov RV. And Haupt Y. 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, 18: 6145- 6157.

Speir E., Modali R., Huang ES., Leon MB., Shawl F., Finkel T., and Epstein SE. 1994. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 265: 391- 394.

Stavridi ES.,Chenab NH., Malikzay S and Halazonetis. 2001. Substitution that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the p53 to induce cell cycle arrest. *Cancer Research*, 61: 7030-7033.

Stephen N and Lane DP. 1992. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *J Mol. Biol.* 225: 577-583.

Stewart N., Hicks G., Paraskevas F. and Mowat M. 1995. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*. 10: 109-115.

Stommel JM., Martchenko ND., Jimenez GS., Moll UM., Hope TJ., Wahl GM. 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18: 1660-1672.

Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, Cannistra SA. 1997. Radiation-induced apoptosis is not enhanced by expression of either p53 or BAX in SW626 ovarian cancer cells. *Oncogene*, 14:2753-8

Szekely L. Selivanova G., Magnusson KP. Klein G and Wiman KG. 1993. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 5455-5459.

Takai, H et al. 2002. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.* 21.6195-5205)

Taylor WR., DePrimo SE., Agarwal A., Agarwal ML., Achonthal AH., Katula KS., and Stark GR. 1999. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol. Cell.* 10:3607-3622.

Toktas G., Türkeri LN., Ünler E., Caliskan M., Aksoy B. and Akdas. 1999. Clinical significance of nuclear p53 protein accumulation in bladder cancer. *Inter. Urol. and Nephro.*, 31: 327-334.

- Tonish-Rouach E., Bordé J., Gotteland M., Mishal Z., Viron A and May E. 1994. *Cell Death Differ.* 1: 39-47.
- Trosko JE., and Chang CC. 2001. Role of stem cells and gap junctional intracellular communication in human carcinogenesis. *Radiat Res.* 155: 175-180
- Unger T., Nau MM., Segal S., and Minna JD. 1992. p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J.* 11: 1383-1390.
- Velasco-Miguel S., Buckbinder L., Jean p., Gelbert L., Talbott R., Laidlaw J., Seizinger B., and Kley Nikolai. 1999. PA26 a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage Growth arrest inducible genes. *Oncogene*: 18: 127.137.
- Venot C., Maratrat M., Dureuil C., Conseiller E., Bracco L and Debussche L. 1998. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J.* 17: 4668-4679.
- Vikhanskaya F., Erba E., D'Incalci M., and Brogginini M. 1994. Introduction of wild-type p53 in a human ovarian cancer cell line not expressing endogenous p53. *Nucleic Acids Res.* 22: 1012-1017.
- Vindelov LL., Chri Martínez stensen. J.J. 1994. Detergent and proteolytic enzyme-based techniques for nuclear isolation and DNA content analysis. *Methods in Cell Biol.* 41: 219-229.
- Vousden KH., Vande Woude GF. 2000. The ins and out of p53. *Nat Cell Biol.* 2:E178-E180
- Wahl, GM. and Carr, AM. 2001. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nature Cell Biol.* 3:E277-E286.
- Walker KK. and Levine AJ. 1996. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 15335-15340.
- Wang XW ., Forrester K. Yeh H., Feitelson MA., Gu JR and Harris CC. 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2230-2234.
- Wang XW, Vermeulen W., CoursenJD., Gibson M., Lupold SE., Forrester K., Xu., Elmore L., Yeh H., Hoeijmerkers JH and Harris CC. 1996. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev.* 10:1219-1232.

- Wang Y. and Prives C. 1995. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature*, 376:88-91.
- Winters ZE., Ongkeko WM., Harris AL., and Norbury CJ.1998. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene*, 17:673-684.
- Woods DB., Vousden KH. 2001. Regulation of p53 function. *Exp Cell Res*. 264: 56-66.
- Wu CS., Pollack A., Czerniak B., Stephens LC., Zagars GK., Terry NH., Meyn RE. 1996. Prognostic value of p53 in muscle-invasive bladder cancer treated with preoperative radiotherapy. *Urology*, 47: 305-310.
- Yang B., Stambrook PJ., Markowitz SD. 1996. Wild-Type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth arrest. *Clin Cancer Research*, 2: 1639-1647.
- Yang Q., Manicone A., Coursen JD., Linke SP., Nagashima M., Forgues M. and Wang XW. 2000 . Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint. *Biol Chem.*, 275: 36892-36898.
- Yew PR., Berk AJ., 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, 357: 82-85.
- Zakut-Houri R., Biernz-Tadmor., Givol D. and Oren M. 1985. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J*. 4: 1251-1255.
- Zhang Pumin. 1999. The cellular and development: redundant of cell cycle regulators. *Curr.Opin. Cell Biol*, 11: 655-662.

ANEXO

• Medio LB (Luria Bertani) 500ml

NaCl	5gr
Peptona de caseína	5gr
Extracto de levadura	2.5gr

• Solución de tinción para X-gal

5mM de $K_3Fe(CN)_6$ (ferricianuro de potasio)

5mM de $K_4Fe(CN)_6$ (ferrocianuro de potasio)

2mM MgCl₂,

0.02% NP-40

1mg/ml de X-gal (5-bromo, 4 cloro, 3 indolil, β-D-galactósido, preparado en dimetil sulfoxido);

• Inmunohistoquímica

Peroxidasa endógena: 1 ml de H₂O₂ al 3% + 4 ml de alcohol metílico, preparar al instante y mantenerla a 4°C.*

Solución amortiguadora de Coulter: 0.847 NaCl

0.373 K₂HPO₄

0.115 KH₂PO₄

Ajustar pH 7.2 y aforar a 100 ml

Complejo ABC: para 1 ml de Buffer coulter-PBS tomar 10 μl de avidina + 10 μl de biotina. Incubar durante 30 minutos a 4°C

Solución de bloqueo: 4 ml de solución de coulter + 1 ml de SFB.

Amortiguador para DAB: 0.192 Na₂HPO₄

0.092 NaH₂PO₄.H₂O

0.590 NaCl

Ajustar pH 7.0 y aforar a 100 ml

-PARA MANIPULAR LA DAB MANTENER MÁXIMAS PRECAUCIÓN UTILIZAR GUANTES Y CUBREBOCA, PRODUCTO ALTAMENTE CANCERIGENO.

*Disolver una pastilla de 10 mg de DAB en 10 ml de PBS para DAB. Guardar en alícuotas de 2 ml cubierto de la luz y a -70°C.

Solución de Trabajo: 2 ml de DAB + 15 µl de peróxido al 3%, preparase al instante, mantenerla a 4°C y evitar la luz.

• **Ciclo celular**

Solución concentrada 500ml :

Citrato de sodio	3.4 mM
Nonidet P40	500 µl
Tetracluro de Espermina	1.5mM
Tris	0.5mM

Solución A:

Agregar a 100 ml de la Solución concentrada

Tripsina 30mg

Ajustar pH 7.6

Solución B:

Agregar a 100ml de la Solución concentrada

Inhibidor de Tripsina 50 mg

Ribonucleasa A (Sigma R-5152) 10 mg

Ajustar pH 7.6

Solución C:

Agregar a 100ml de la Solución concentrada

Yoduro de propidio 41.6mg

• **Detección de proteína (citometría de flujo)**

Solución M: tripsina al 0.003% preparada en PBS.

Solución N: 0.05% de inhibidor de tripsina (Sigma, T-9253) en PBS.

Solución Ñ: 0.0416% de Yoduro de Propidio en PBS.

• **"Western Blot"**

Amortiguador de Homogenización:

Tris	10mM
NaCl	50mM

Amortiguador de Muestra (Amortiguador reductor SDS) 100 μ l 4x :

Tris pH 6.8 0.5M	12 μ l
Glicerol	40 μ l
SDS 10%	32 μ l
2- β -mercaptoetanol	20 μ l
Azul de bromofenol 1%	4

Amortiguador de corrida 600 ml 5x:

Tris base	9 g
Glicina	43.2 g
SDS	3 g

60 ml diluir en 240 ml de H₂O bd

TBS 10x:

Tris base 24.2 g

NaCl 8 g

Disilver en 1 Lt de H₂O bd

Amortiguador de electrotransferencia:

Tris base 3.03 g

Glicina 14.0 g

En 1 Lt de H₂O bd

Agregar 200 ml de metanol y enfriar a 4°C

Solución de Bloqueo 1:

Leche en polvo (sin calcio) 1.25 g

Azida de sodio 2.5% 250 μ l

Aforar a 25 ml de PBS pH 7.2