

Variaciones genéticas del gen supresor de tumores *TP53*: relevancia y estrategias de análisis

Angélica Rangel-López,* Patricia Piña-Sánchez,* Mauricio Salcedo*

* Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas.
Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.

**Genetic variations of the tumor suppressor *TP53*:
Outstanding and strategies of analysis**

ABSTRACT

*In the modern society, cancer remains an important cause of death. Cancer development is a very complex process that involves alterations in genes regulating cellular growth. Among these alterations or variations, are included point mutations, genetic susceptibility by single nucleotide polymorphisms or "SNP" and alteration or loss in tumor suppressor genes functions. The tumor suppressor *TP53* is one of the most important and studied genes on cancer genetics. Therefore, it has been demonstrated that *TP53* present mutations in more than 50% of all types of human cancer and encodes a multifunctional protein whose absence contributes to genomic instability, the accumulation of mutations and increased tumor development. The identification of such alterations in cancerous cells at level of single nucleotide is very important, because its implication in the loss or alteration in the function of this gene, its clinical relevance and finally, its association with response to therapy and prognosis. Due to the large interesting issue, in this work we are focused only in two of the most common genetic variations present in this gene: the point mutations and SNP remarking some outstanding molecular characteristics needed for design its analysis.*

Key words. DHPLC. DNA microarrays. Point mutation. SNP. Tumor suppressor gene.

INTRODUCCIÓN

En la sociedad moderna, el cáncer continúa siendo una de las enfermedades más frecuentes y devastadoras. De acuerdo con las estadísticas mundiales en el año 2002 hubo 10.9 millones de nuevos casos de cáncer, 6.7 millones de muertes y 24.6 millones de personas diagnosticadas en los últimos cinco años.¹

RESUMEN

El cáncer continúa siendo una importante causa de muerte en la sociedad moderna. Los procesos en el desarrollo del cáncer son muy complejos e involucran alteraciones en genes implicados en la proliferación celular. Entre estas alteraciones o variaciones genéticas se incluyen las mutaciones puntuales, la susceptibilidad genética por polimorfismos de un solo nucleótido o "SNP", así como la pérdida o alteración en la función de genes supresores de tumores. El gen supresor de tumores *TP53* es uno de los genes más importantes y estudiados en la genética del cáncer, ya que se encuentra mutado en más del 50% de todos los tipos de cáncer humano y codifica para una proteína multifuncional cuya deficiencia contribuye a la inestabilidad genómica que conduce a la acumulación de mutaciones y a la aceleración en el desarrollo del tumor. Es importante el estudio de dichas alteraciones genéticas presentes en las células cancerosas que puedan ser detectadas a nivel de un solo nucleótido, por su implicación en la pérdida o alteración en la función del gen *TP53*, así como por la relevancia clínica que ellas puedan tener al ser asociadas a la respuesta de una terapia particular o al pronóstico. Debido a la extensión de este trabajo solamente revisaremos dos de las variaciones genéticas importantes en este gen: las mutaciones puntuales y los SNP, haciendo énfasis en algunas características moleculares que son relevantes en el diseño de estrategias de análisis para su detección.

Palabras clave. DHPLC. Gen supresor de tumores. Microarreglos de DNA. Mutación puntual. SNP.

La Organización Mundial de la Salud predijo que la incidencia de cáncer puede incrementarse en 50% en el año 2020, por lo que hoy en día se ha convertido en una prioridad encontrar herramientas efectivas para diagnosticar, tratar y curar esta enfermedad.² El cáncer es resultado de la acumulación de múltiples alteraciones en genes que regulan el crecimiento celular.³ Debido a que muchas de estas alteraciones

se consideran críticas para modificar progresivamente el fenotipo de las células no cancerosas a malignas, se considera de gran importancia la identificación de tales alteraciones.⁴ Entre estas alteraciones o variaciones genéticas se incluyen: las mutaciones puntuales, alteraciones epigenéticas, rearrreglos en oncogenes, la pérdida o alteración en la función de genes supresores de tumores, la susceptibilidad genética por polimorfismos de un solo nucleótido o “SNP”, así como las deleciones e inserciones.⁵ Resulta de especial interés el estudio de las alteraciones genéticas presentes en las células cancerosas detectadas a nivel de un solo nucleótido, como ocurre con las mutaciones puntuales y los SNP, asociados a la pérdida o alteración en la función del gen supresor de tumores *TP53*.^{6,7}

MUTACIONES EN EL GEN *TP53*

El gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), contiene 11 exones ubicados en un dominio cromosómico de 20 Kb (Figura 1). Es el gen más comúnmente mutado en el cáncer humano.⁸ A diferencia de otros genes de la misma familia, *TP53* participa en diversas funciones fisiológicas de la célula para mantener la integridad y estabilidad genómica, referido así como un gen maestro⁹ y uno de los centros clave de la célula normal y cancerosa.¹⁰ Desde su descubrimiento en 1979,¹¹ este gen y

su proteína se han convertido en el centro de intensos estudios; un hallazgo importante es que más de 50% de las neoplasias humanas presentan mutaciones somáticas en *TP53*, las cuales se han reunido en dos principales bases de datos.^{12, 13} La mayor recopilación se encuentra en la Agencia Internacional del Cáncer (IARC), cuya base de datos contiene 21,512 mutaciones somáticas y 283 mutaciones en línea germinal. Entre ellas, 97% de las mutaciones se agrupan en el dominio central de p53 y más de 80% son mutaciones de sentido erróneo también llamadas *missense* (ocurre un cambio en el aminoácido codificado). A la fecha, se han documentado aproximadamente 1,135 sustituciones de aminoácidos provocadas por este tipo de mutaciones [www.iarc.fr/p53. Base de datos de *TP53*, versión R10, julio 2005]. El daño y la inactivación del gen juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer, este daño puede ser: a nivel de genes que están involucrados en su regulación; en respuesta a diversas situaciones de estrés en donde no pueda ser activado o que su nivel de expresión esté incrementado, pero que no se puedan iniciar ciertos mecanismos intracelulares.¹⁴ Las mutaciones *missense* inactivan al producto proteico del gen al no permitir su unión al DNA y consecuentemente lo hacen incapaz de activar a sus genes blanco.¹⁵ Es importante mencionar que la distribución de las mutaciones *missense* no es al azar, ya que existen puntos calientes (*hots pots*) asociados con dife-

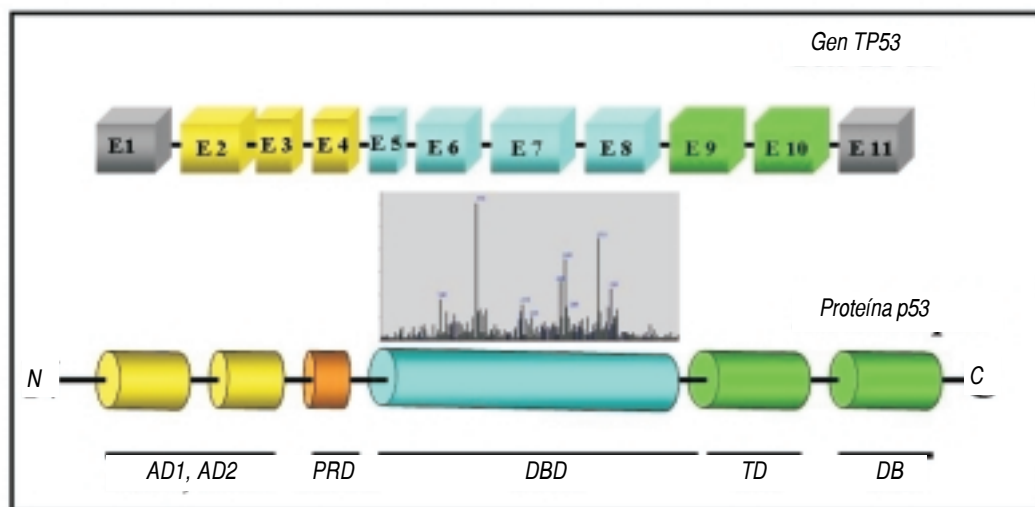


Figura 1. El gen *TP53*, la proteína p53 y sus dominios. Representación esquemática del gen *TP53* con sus 11 exones (E1-E11) de los cuales el 1 y el 11 no codifican. *TP53* codifica una proteína de 393 aminoácidos, la cual tiene cinco dominios: AD1, AD2: dominio de activación de la transcripción

(aminoácidos: 1-42; 43-63); PRD: Dominio rico en prolina (aminoácidos: 64-91); DBD: Dominio de unión a secuencia específica del DNA (aminoácidos: 100-300); TD: Dominio de tetramerización (aminoácidos: 334-356) y DB: dominio básico o alcalino (aminoácidos: 364-393). Arriba del dominio DBD, que es el más grande y donde se ha registrado el mayor número de mutaciones se localiza un gráfico, que muestra la frecuencia de hotspots en este dominio [tomada de www.iarc.fr/p53].

rentes tipos de cánceres humanos.¹⁶ Estos puntos calientes pueden resultar debido a la mutabilidad de un codón particular hacia un carcinógeno específico y/o por la ventaja selectiva de crecimiento y expansión clonal de las células mutadas.¹⁷ Un ejemplo de ello es la exposición a aflatoxina B1 y su relación con mutaciones en el codón 249 en carcinoma hepatocelular,¹⁸ la exposición a luz ultravioleta y las mutaciones en tándem C:C→T:T en cáncer de piel,¹⁹ o el humo de cigarrillo y la prevalencia de transversiones G→T en cáncer de pulmón.²⁰ En general, podemos observar que las mutaciones ocurren frecuentemente en dinucleótidos CpG por mecanismos endógenos, tales como la desaminación de los residuos de 5-metil-citosina en dinucleótidos.²¹ Cabe mencionar que las alteraciones en *TP53* ocurren no sólo como mutaciones somáticas (adquiridas durante el desarrollo y presentes sólo en células que presentan expansión clonal), también ocurren en línea germinal (las cuales se heredan de la madre o del padre y, por lo tanto, están presentes en todas las células del cuerpo) y se encuentran en síndromes de predisposición al cáncer familiar como el de Li-Fraumeni,²² el cual es una rara situación autosómica dominante que predispone a un cierto número de cánceres diferentes, incluidos el cáncer de mama, tumores cerebrales y carcinomas adrenocorticales [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIM-Li-Fraumeni-Syndrome. Acceso #151623].

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE p53

Este gen codifica para una fosfoproteína nuclear multifuncional de 53 kD (p53). Esta proteína incrementa su nivel en la célula a través de numerosas señales de estrés celular, principalmente por la estabilización a nivel molecular y también por su transformación a un estado funcionalmente activo. p53 funciona como un factor de transcripción, formando un complejo tetramérico que reconoce una secuencia específica de DNA y estimula la transcripción de diversos genes,²³ se considera una de las barreras mejor conocidas contra la transformación maligna, ya que es el componente central de un sistema que destruye rápidamente células que ya están dañadas, y que son peligrosas para el organismo.²⁴ Estas células dañadas son detenidas temporalmente en el ciclo celular, en la transición de G₁-S para ser reparadas o eliminadas a través de la apoptosis (muerte celular programada) o por medio de la senescencia celular y muerte necrótica.^{16, 25}

La molécula de p53 consiste de 393 aminoácidos y varios dominios que juegan un papel importante en

la regulación, estas subunidades se han clasificado desde la I a la V (Figura 1) y son I: dominio de activación 1 (AD1) y dominio de activación 2 (AD2); II: el dominio rico en prolina (PRD); III: el dominio de unión secuencia específica al DNA (DBD); IV: el dominio de tetramerización (TD) y V: el dominio alcalino (DB). Los dominios AD1 y AD2 están involucrados en la activación de la transcripción de genes blanco,²⁶ el dominio PRD es necesario para la completa actividad supresora de p53 y se ha visto que participa en la inducción de la apoptosis,²⁷ DBD participa directamente en el reconocimiento y unión con secuencias específicas de DNA.²⁸ Las mutaciones dentro de este dominio rompen la función propia de p53, particularmente cuando ocurren dentro de puntos calientes críticos necesarios para la proteína, como son: para el contacto con el DNA (codones 248 y 273) o para la estabilidad de la proteína (codones 175, 249 y 282).²⁹ En estos sitios se presentan aproximadamente 25% de las mutaciones asociadas a cáncer.³⁰ El dominio TD es responsable de la oligomerización de las moléculas de p53, esta región tiene una estructura alfa-hélice; si existe daño en este dominio se produce la pérdida de la habilidad de p53 para oligomerizar, lo que ocasiona una inactivación funcional.³¹ Las moléculas de p53 con mutaciones inactivantes en el dominio de enlace al DNA pueden formar complejos híbridos (proteína silvestre y mutada) en virtud de su dominio alfa-hélice; sin embargo, los complejos híbridos formados son inactivos (esto explica el carácter dominante-negativo de p53 debido a la presencia de las mutaciones *missense*),³² el último dominio es el DB, éste es un dominio alcalino esencial para la regulación de la actividad de p53. La modificación de este dominio por diversas enzimas (quinasas, acetilasas, glicosilasas) y la unión con otras proteínas provoca una transformación que afecta su unión con el DNA y su habilidad de transactivación.³³ Es importante enfatizar que la pérdida de la función normal de la proteína p53 se puede producir por dos mecanismos: ya sea por una mutación que afecte al gen *TP53* (lo más frecuente) o mediante una inactivación funcional de la propia proteína p53 por interacción con proteínas virales o celulares (comportándose en forma equivalente a una mutación del gen). Ambas formas llevan a un aumento en la inestabilidad genética y cromosómica, caracterizada por un incremento en la frecuencia de amplificaciones génicas, rearrreglos cromosómicos o mutaciones.²⁵

Hallazgos experimentales de las últimas dos décadas han demostrado el papel crucial de la proteína silvestre p53 (p53-WT) en la supresión intrínseca del

tumor.^{34,35} Por lo que con fundamento en el conocimiento de las mutaciones presentes en p53 y de la forma en que afectan su función se están diseñando nuevos fármacos para restablecer su función como una estrategia terapéutica alternativa a las existentes.³⁶

La proteína p53 pertenece a una superfamilia de factores de transcripción que incluye a sus homólogos: p63 y p73, los cuales a pesar de compartir más de 60% de identidad en la secuencia de aminoácidos en el dominio de unión a secuencia específica del DNA de la proteína p53, presentan diferente función. Entre las funciones que se han descrito para estos homólogos está su participación en la morfogénesis ectodérmica y en la neurogénesis, así como en el control de la homeostasis celular de tejidos específicos. Es importante mencionar que aunque al igual que p53, podrían inducir la detención del ciclo celular y la activación de la apoptosis (lo cual sugeriría una función como supresoras tumorales) aún no están considerados como genes supresores de tumores.³⁷

ESTUDIOS DE LOS SNP

Con el Proyecto Genoma Humano^{38,39} se obtuvo la secuencia completa de los 3,200 millones de nucleótidos que lo componen, el mapa ubica aproximadamente 30,000 genes que ahí se albergan y el análisis de cerca de 1,400 genes causantes de enfermedades genéticas. Además, los seres humanos compartimos 99.9% de esta secuencia. El restante 0.1% varía entre cada individuo, siendo las variaciones más comunes aquellas en que cambia un solo nucleótido, conocidas como SNP⁵ concentrándolos uno en cada 1,250 nucleótidos. Se piensa que los SNP son diferentes de las mutaciones que provocan enfermedad, porque éstos producen un fenotipo no discernible. Sin embargo, éstos pueden afectar la función del gen y pueden predisponer a la enfermedad aun sin alteración aparente de la estructura de la proteína codificada por dicho gen. Estas variaciones se organizan en grupos vecinos, llamados haplotipos, que generalmente se heredan como bloques intactos de información. De ahí que uno de los nuevos proyectos genómicos desarrollados recientemente por el Consorcio Internacional del Genoma Humano es el *HapMap*, del inglés *haplotype map* (mapa de haplotipos). El *HapMap* ofrece una nueva y poderosa plataforma para explorar el origen de las enfermedades, entre ellas el cáncer. El *HapMap* se generó a partir de datos de DNA de muestras de sangre colectadas de voluntarios de diversas regiones geográficas. Específicamente, las

muestras se tomaron de Yoruba en Ibadan, Nigeria, japoneses de Tokio, chinos Han de Beijing y residentes de Utah descendientes del norte y occidente de Europa. Recientemente, al finalizar la Fase I del *HapMap*, se informó sobre el avance de proyectos complementarios en poblaciones adicionales, destacando el caso de la población mexicana, en su mayoría residente en Estados Unidos [www.hapmap.org].

POLIMORFISMOS DEL GEN *TP53*

Se estima que en nuestro genoma es posible encontrar cerca de 10 millones de SNP responsables de la heterogeneidad fenotípica del ser humano⁴⁰ menos de la mitad de SNP ya han sido identificados⁴¹ y se encuentran disponibles en diversas bases de datos [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index; www.celeradiscovery-system.com/glance/home.cfm].

En la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (*NCBI-SNP*) se reportan tres polimorfismos en la región codificante de *TP53*: Leu110Arg, Gln248Arg y Gln331Gln. En el exón 4 se han detectado polimorfismos en los codones 34, 36, 47 y 72 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>], ésta es una región altamente polimórfica asociada con el dominio de transactivación, por lo cual se sugieren variaciones en los mecanismos de regulación. De manera particular, la base de datos de la IARC (Versión R10) reporta 21 polimorfismos en *TP53*; seis de ellos se localizan en la región codificante, de los cuales sólo dos generan cambio de aminoácido: Pro47Ser y Arg72Pro. Los quince polimorfismos restantes se encuentran en regiones no codificantes (promotor del gen e intrones). A la fecha, no son claras las consecuencias funcionales de los polimorfismos en estas regiones.⁴² La variante Ser47 es un polimorfismo raro que afecta un codón conservado en la evolución. Un reporte reciente sugiere que este polimorfismo es funcionalmente significativo y muestra una disminución en la capacidad de la proteína para inducir apoptosis.⁴³ El residuo 72, aunque no es conservado, se localiza dentro de la región rica en prolina y puede afectar la estructura del dominio de enlace SH3. El polimorfismo Leu110Arg, se trata de un sitio CpG y se asocia principalmente a cáncer de mama y pulmón. También, en la base de datos de la IARC se tienen registradas un total de 1,307 mutaciones somáticas que involucran al codón 248, de las cuales 659 presentan el cambio CCG/CAG que codifica a los aminoácidos glicina y arginina y se trata del mismo cambio reportado en esa misma base de datos sobre polimorfismos (IARC, versión R10). Respecto a los polimorfismos de la re-

gión codificante, se ha hecho énfasis en el estudio del polimorfismo del codón 72. Son muchos los trabajos donde abordan la asociación de este polimorfismo (Arg/Pro) con la susceptibilidad a distintos tipos de cáncer, especialmente de tipo epitelial en colon, laringe, cérvix y pulmón.⁴⁴⁻⁴⁶ De particular interés ha sido la asociación del alelo 72Arg/Arg con cáncer del cérvix uterino,⁴⁷ aunque dichos hallazgos no han sido confirmados en todos los estudios, ya que resultan ser contradictorios.⁴⁸ Es importante señalar que existen diferencias en cuanto a la frecuencia con la que se presenta este polimorfismo en población normal dependiendo del área geográfica. Por ejemplo, en el hemisferio Norte, el alelo Pro/Pro muestra una proporción Norte-Sur, de 17% en Suecia a 63% en Nigeria⁴⁹ y probablemente estas discrepancias se deban más a razones geográficas y de población; es decir, la asociación de este polimorfismo con dicha patología puede ser importante en una población, pero no necesariamente en otra, debido a que los factores genéticos y ambientales a los cuales están expuestas estas poblaciones son diferentes. Se ha demostrado que la oncoproteína viral E6 del virus de papiloma humano tipo 16 se une y degrada con mayor eficiencia a la proteína p53 homocigota para arginina en el codón 72 que la proteína p53 homocigota para prolina en el codón 72.⁵⁰ De este modo, la asociación del alelo Arg/Arg 72 con el cáncer cervical uterino puede verse reflejada en un riesgo genético para el desarrollo de esta neoplasia.⁴⁷

ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS PARA LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS

Actualmente, las tecnologías disponibles para la detección de variaciones genéticas son diversas. Para que una tecnología dada sea efectiva, ésta necesita ser compatible con las características físicas y moleculares de la enfermedad misma. Como se ha mencionado anteriormente, el cáncer puede surgir de la acumulación de variaciones genéticas (por ejemplo: SNP o mutaciones) en genes que participan en el ciclo celular, en la reparación del DNA y en los mecanismos de proliferación celular, como es el caso de *TP53*. Por tal motivo, es imperativo que las técnicas de análisis tengan la capacidad de detectar y describir estos cambios con precisión. También es importante considerar las características físicas de la muestra y entonces mostrar cómo éstas pueden ser utilizadas. Por ejemplo, en muestras de tumores sólidos se presenta una mezcla de células tumorales y del estroma (células no tumorales), una mutación

somática presente en esta muestra tumoral puede representar sólo una pequeña fracción (aproximadamente 15%) del total de DNA, por lo cual la búsqueda de mutaciones somáticas en este tipo de muestras requiere de una estrategia de detección con una alta sensibilidad. En contraste, si la mutación es de línea germinal, al menos la mitad de la muestra puede contener la variación y en este caso la sensibilidad del método a emplear puede ser menor. Por lo tanto, diferentes aplicaciones pueden tener diversos requerimientos de sensibilidad.⁷ Existe una gran cantidad de tecnologías disponibles para la detección de mutaciones y polimorfismos, cada una con ventajas y limitaciones propias, por lo cual su utilidad depende de los objetivos experimentales, de la pregunta de investigación y de su factibilidad. De forma general estas tecnologías se pueden dividir en dos categorías: métodos de tamizaje o escaneo y métodos específicos. Los métodos de escaneo se utilizan para investigar mutaciones desconocidas en segmentos de DNA, las cuales, cuando se requiere, pueden ser confirmadas por secuenciación. En esta clase se incluyen: técnicas como la electroforesis con gradiente desnaturante (DGGE), el polimorfismo conformacional de una sola cadena (SSCP), la ruptura química o enzimática de bases mal apareadas (CCM, EMC), el análisis de heterodúplex (HA), la cromatografía líquida de alta resolución en condiciones desnaturantes (DHPLC), entre otros. En tanto que los métodos específicos se usan para averiguar si una mutación caracterizada previamente está presente en una muestra de DNA problema. Estos métodos incluyen hibridación de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO), microarreglos o microhilas de DNA, amplificación alelo-específica, amplificación refractaria a un sistema de mutación (ARMS), oligonucleótido iniciador competitivo (COP), ensayo de ligación de un oligonucleótido (OLA), o extensión del iniciador base-específico (*primera extensión*). Para mutaciones que alteran los sitios de restricción, los métodos adicionales disponibles incluyen a los fragmentos de restricción de longitud variable (RFLP), y dentro de este grupo se encuentra el estándar de oro que es la secuenciación automatizada [www.MolecularCloning.com]. En nuestro grupo abordamos el estudio de SNP y mutaciones del gen *TP53* por medio de las tecnologías de DHPLC y microarreglos de DNA, respectivamente. Por un lado, la tecnología de DHPLC de alto rendimiento la utilizamos para determinar nuevos y conocidos polimorfismos de *TP53*, confirmando los por secuenciación automatizada. Por otro lado, basados en la tecnología de microarreglos de DNA y a partir de la base de datos de la IARC, se diseñó y se validó un

microarreglo específicamente para determinar los *hotspots* de mayor frecuencia presentes en *TP53*. Brevemente comentaremos lo más relevante de las dos aplicaciones.

La tecnología de DHPLC es un método de tamizaje muy utilizado debido a su bajo costo, alta sensibilidad y eficiencia. Se basa en una separación por cromatografía líquida en fase reversa de las cadenas de DNA en una muestra biológica, en donde se realiza la desnaturalización parcial por calor. Para ello se hace PCR de dos muestras (una que corresponde a un control de secuencia silvestre, previamente conocida, y otra de una muestra problema). La mezcla de los productos de PCR de ambas muestras, se somete a un cambio de temperatura, facilitando la renaturalización de las cadenas de DNA. Posteriormente, esta mezcla se inyecta en el cromatógrafo en donde las moléculas de DNA son eluidas y su detección se realiza a través de un detector ultravioleta, el cual permite que los fragmentos de DNA sean registrados. Por lo cual, un patrón cromatográfico con un solo pico de elusión significa que la muestra problema es 100% complementaria a la muestra control y más de un pico de elusión significa que existe al menos un cambio de nucleótido de la muestra problema respecto a la muestra control. Las principales ventajas de este método son: simplicidad, bajo costo en el total del experimento, alta tasa de detección (95-100%).⁴¹ Además, es posible hacer la detección en fragmentos que van desde 200 nucleótidos hasta más de una kilobase.⁵¹ Finalmente, sólo las muestras con patrones cromatográficos alterados son secuenciadas para determinar los cambios presentes respecto al normal, evitando la secuenciación de todas las muestras estudiadas. En la figura 2 se muestra un ejemplo de un análisis de *TP53* por DHPLC, en donde se pueden observar los patrones cromatográficos de un caso homocigoto con secuencia silvestre y un caso polimórfico en estado heterocigoto, dichos casos fueron confirmados por secuenciación. Con la metodología de DHPLC estamos realizando un estudio de los polimorfismos de *TP53* en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCu), en colaboración con el INCAN, SS. Hasta el momento hemos detectado que 57% de los controles y 38% de mujeres afectadas por CaCu presentan una secuencia homóloga en 100% a la secuencia silvestre de referencia del exón 4 (tamaño del fragmento: 363 pb) de *TP53* (# de acceso: U94788). A la fecha, se han analizado más de 23,000 nucleótidos para determinar todos aquellos polimorfismos presentes en el exón 4 de este gen.

La otra plataforma de alto rendimiento y que ahora ya es accesible a nuestro medio, es la tecnología

de los microarreglos de DNA. Ésta es una tecnología específica útil para identificar y analizar muestras de DNA conocidas o desconocidas la cual se basa en reacciones de hibridación. Las principales aplicaciones de los microarreglos incluyen perfiles de expresión de genes⁵² y el análisis de la variabilidad génica, destacando la detección de polimorfismos y la detección de mutaciones de importancia clínica.⁵³ Básicamente, un microarreglo de DNA consiste en un gran número de fragmentos de DNA inmovilizados sobre un soporte sólido (generalmente vidrio) de manera que formen una matriz de secuencias de dos dimensiones. Estos fragmentos de material genético (de una sola cadena) pueden ser: secuencias cortas llamadas oligonucleótidos o de mayor tamaño (DNAc) o bien productos de PCR, los cuales se hacen reaccionar con fragmentos de DNA de una muestra problema, permitiendo la hibridación de secuencias homólogas. A los fragmentos en el soporte se les denomina a menudo sondas o *probes* y a los ácidos nucleicos de las muestras a analizar, con frecuencia se les denomina DNA blanco o *target* [www.gene-chips.com]. La detección de la hibridación entre las sondas de DNA inmovilizadas en el soporte y los fragmentos de material genético de la muestra, requiere de un marcaje previo de estas últimas. Este marcaje puede ser de diversos tipos (químico o enzimático, con isótopos radiactivos o con fluorocromos). Durante la hibridación, las muestras de material genético marcadas se unirán a sus complementarias inmovilizadas en el soporte del microarreglo, quedando fijas ahí. Después del apareamiento de las cadenas complementarias, el microarreglo se lava y se procede a hacer una medición relativa de la cantidad de DNA blanco que ha quedado fijo en cada sonda de captura unida al soporte, esto se realiza detectando la señal obtenida dependiendo del tipo de marcaje (a través de conjugados enzimáticos, tras una detección cromogénica, excitación láser o mediante autorradiografía). Generalmente, para esto se utiliza un escáner con el que se pueden obtener diversas imágenes, las cuales se pueden analizar posteriormente con diversas herramientas bioinformáticas. Actualmente, en el mercado existe una gran cantidad de sistemas comerciales de microarreglos que varían dependiendo de la tecnología empleada para su fabricación: *GeneChip* (Affymetrix), *GEM arrays* (Incyte), *Spectrochip*, *Bioelectrochip*, *Bio-CD* y los *lab-on-a-chips*, entre otros. De forma general se han establecido dos tipos de microarreglos de DNA: El primer tipo resulta de la aplicación mecánica, usando un brazo robótico, de pequeñas gotas de una solución de DNAc, con secuencias de genes expresa-

dos conocidos (10,000 clones de DNAC, por duplicación) [http://cmgm.stanford.edu/pbrown]. El segundo tipo es el de los microarreglos de oligonucleótidos sintéticos de alta densidad que se basa en la síntesis química sobre un cristal de silicio, de una secuencia de 25 a 30 pares de bases de DNA que corresponde a algún gen conocido. Stephen Fodor et al. [http://affymetrix.com], adaptaron las técnicas fotolitográficas utilizadas en la fabricación de semiconductores, para realizar esta síntesis química y poder crear secuencias específicas en puntos definidos del microarreglo. Fabricaron arreglos hasta con 500,000 distintos oligonucleótidos, cada uno en su propia superficie de 20 μm^2 . Existen diversos estudios en donde la tecnología de microarreglos se utiliza para identificar mutaciones en *TP53*, siendo el *GeneChip TP53* (de Affymetrix) el más poderoso, ya que analiza todas las mutaciones presentes a lo largo del gen *TP53*.⁵⁴ Este microarreglo es de alta densidad y está fabricado mediante fotolitografía, contiene sondas sintéticas con una longitud aproximada de 25 a 30 nucleótidos, correspondientes a todos los exones del gen *TP53*, inmovilizadas sobre un cristal de silicio de 2 X 2 cm. Esta plataforma es costosa y no es accesible a muchos laboratorios. Para evitar gastos de estas magnitudes, nuestro grupo, en colaboración con la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, ha desarrollado y validado un microarreglo de baja densidad muy específico y útil para analizar los puntos calientes más frecuentes localizados en la región central del gen *TP53* (exones 5, 7 y 8), al cual se ha denominado *TP53-genesensor*

array. Este microarreglo contiene 19 secuencias específicas (tomadas de la base de datos de la IARC) que representan: los 14 *hotspots* más frecuentes asociados a cáncer de pulmón, así como cinco secuencias silvestres presentes en los codones 5, 7 y 8 del gen. Este microarreglo utiliza una variante de la hibridación tradicional, denominada hibridación en tándem, descrita y patentada anteriormente por Maldonado y Beattie.⁵⁵ Su principal ventaja es el aumento en la estabilidad de la fuerza de la unión de la sonda cuando ésta se encuentra perfectamente apareada al DNA blanco. La validación experimental se realizó con un grupo de 24 diferentes muestras biológicas que albergaban secuencias silvestre y mutante de *TP53*: 6 plásmidos; 10 líneas celulares (siete de ellas comerciales obtenidas de ATCC y tres derivadas de pacientes afectados de cáncer de pulmón [CaPu]); seis sangres periféricas de pacientes afectados de CaPu y dos sangres periféricas obtenidas de sujetos sanos. De estas muestras se aislaron productos de PCR de 90-130 pares de bases de los exones 5, 7 y 8 del gen *TP53*, respectivamente. Estos exones contenían los codones de interés (exón 5: codones 157 y 158; exón 7: codones 248 y 249; y exón 8: codón 273). A una alícuota de los productos de DNA de cadena sencilla (DNAss) obtenidos se le realizó secuenciación automatizada. Una segunda alícuota de los productos de DNAss se hibridó en el microarreglo. Las amplificaciones e hibridaciones se realizaron en formato múltiple, lo cual permite analizar los tres exones y cinco codones (de cada muestra) en un solo ensayo. El análisis densitométrico de las muestras control y y

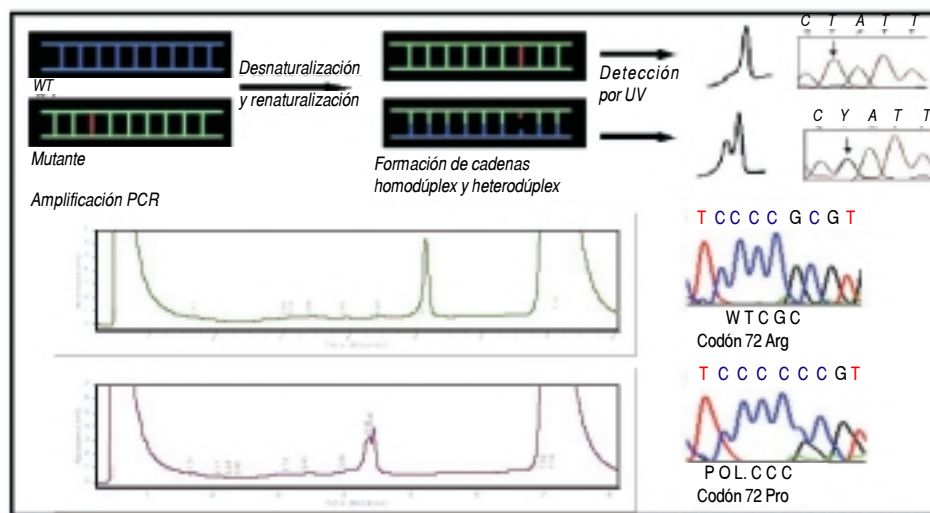


Figura 2. Detección de polimorfismos del gen *TP53* por DHPLC. (A) se obtienen amplificados por PCR de la muestra control y de una muestra problema, se mezclan, se desnaturalizan y renaturalizan parcialmente a fin de formar moléculas heterodúplex. La muestra se corre en el cromatógrafo y es detectada por UV y graficada. (B) se muestra un ejemplo de dos cromatogramas, el de arriba es de una

muestra control sin polimorfismos y el de abajo es de una muestra de CaCu que presenta patrón polimórfico heterodúplex. A la derecha se muestran los electroferogramas obtenidos de la secuenciación de las muestras en donde se confirman los polimorfismos detectados.

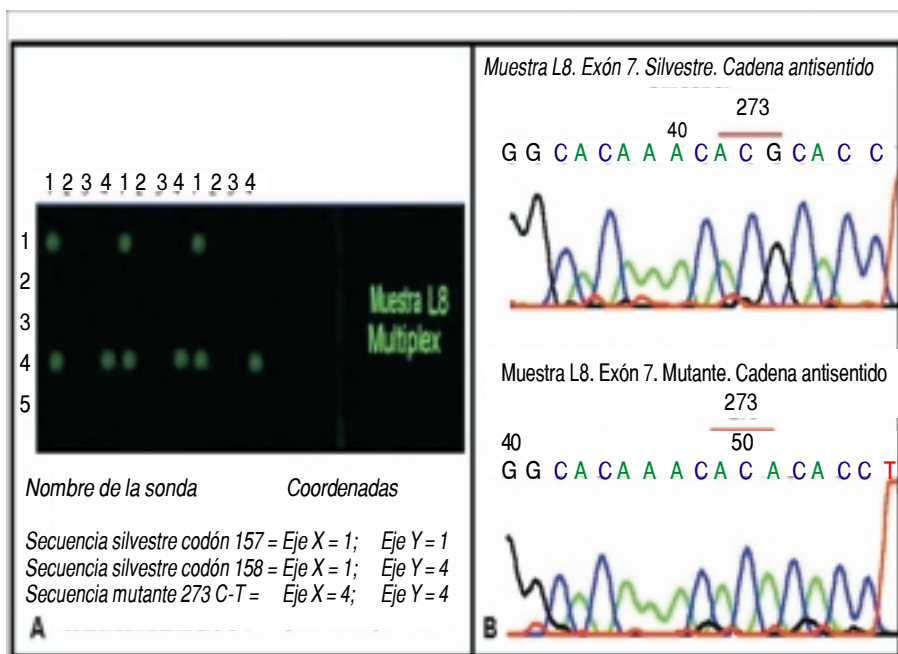


Figura 3. Detección de mutaciones en el gen *TP53* por medio de microarreglos de DNA. (A) Se muestra un ejemplo de la imagen obtenida en un formato multiplex (amplificación e hibridación, en un solo ensayo, de los cinco codones de interés: 157, 158, 248, 249 y 273) de una línea celular derivada de cáncer de colon (SW480) que presenta dos secuencias silvestres del exón 5 (codones 157 y 158) y una secuencia mutada en el exón 7 (codón 273 el cambio de nucleótido es C→T). Las sondas se colocaron por triplicado (columnas de la 1-4 y filas de la 1-5), por lo que se dan las coordenadas (eje X y eje Y) para localizar las señales obtenidas. (B) Se muestran los electroferogramas obtenidos tanto de la secuencia silvestre (arriba) como de la secuencia mutante (abajo) de la misma muestra del panel (A). La línea horizontal señala el cambio de nucleótido en el codón 273 (ACG→ACA). La especificidad del sistema está dada por el tamaño de las sondas y la preparación del DNA problema.

cuencia mutada en el exón 7 (codón 273 el cambio de nucleótido es C→T). Las sondas se colocaron por triplicado (columnas de la 1-4 y filas de la 1-5), por lo que se dan las coordenadas (eje X y eje Y) para localizar las señales obtenidas. (B) Se muestran los electroferogramas obtenidos tanto de la secuencia silvestre (arriba) como de la secuencia mutante (abajo) de la misma muestra del panel (A). La línea horizontal señala el cambio de nucleótido en el codón 273 (ACG→ACA). La especificidad del sistema está dada por el tamaño de las sondas y la preparación del DNA problema.

problema se realizó con el software *ScanAnalyse®*. Con este sistema logramos identificar específicamente las secuencias de interés, tanto silvestres como mutantes, presentes en las muestras problema, las cuales fueron confirmadas por secuenciación automatizada. Un punto importante de mencionar es que al comparar los datos obtenidos con la base de datos de la IARC, observamos que el codón encontrado más frecuentemente en nuestras muestras fue el 273 en seis de los 24 casos tanto en líneas celulares (dos casos: Arg→Cys; un caso Arg→His), plásmidos (un caso: Arg→Prol), como en sangre periférica (dos casos: Arg→Leu).⁵⁶ En la figura 3 se muestra un ejemplo de una imagen obtenida de la hibridación múltiple de una muestra problema utilizada en este microarreglo. En general en la literatura existen datos sobre el valor clínico que representan la identificación tanto de mutaciones como de polimorfismos en *TP53*, algunos ejemplos se incluyen en el cuadro 1.

DISCUSIÓN

Actualmente, existe una gran cantidad de información que muestra la gran trascendencia que tiene el gen *TP53* en el desarrollo del cáncer. El conocimiento de diversos aspectos moleculares y funcionales en re-

lación con este gen y su proteína son parte integral de la medicina individualizada. El estudio del gen *TP53* en Oncología es de gran importancia debido a:

1. El amplio espectro de mutaciones somáticas reportadas en distintos tipos de cáncer.
2. A que las mutaciones germinales son heredadas en familias con predisposición a desarrollar cáncer, como en el síndrome de Li-Fraumeni.
3. Porque además se han identificado mutaciones específicas en tumores.
4. A que la presencia de mutaciones puede ser predictiva de la respuesta del tumor al tratamiento.

Por otra parte, la caracterización de polimorfismos tiene gran relevancia para identificar a la población con predisposición o riesgo asociada a enfermedades como el cáncer. Es importante resaltar que más de 70% de los estudios moleculares se han enfocado en la región central del gen *TP53*, específicamente en los exones 5-8, los cuales codifican para el dominio de enlace al DNA.¹⁵ Por lo tanto, es esencial que las pruebas clínicas estén dirigidas específicamente a establecer el efecto de las mutaciones en *TP53* y su asociación con el tipo de cáncer.^{30,34,37} La técnica de DHPLC ofrece varias ventajas: gran rendimiento, bajo costo, alta sensibilidad, detección de muestras con di-

Cuadro 1. Ejemplos de mutaciones y polimorfismos en el gen *TP53* detectados y asociados a diversas patologías.

ID	Exón	Codón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tumor	Técnica	Referencia
M	8	273	CGT/CAT	Arg→His	Colorrectal	¹ DGGE Secuenciación	Hamelin y col. <i>Oncogene</i> 1993; 8 : 2213-20.
M	3	31	AAC/AGC	Asn→Ser	Carcinoma nasofaríngeo	² SSCP, ³ RFLPs	Sun y col. <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev</i> 1995; 4 : 261-7.
M	8	282	CGG/TGG	Arg→Trp	Osteosarcoma	⁴ PCR Multiplex	Patiño y col. <i>Oncogene</i> 1997; 14 : 2213-20.
P	4	72	CGC/CGC	Arg/Arg	Cabeza y cuello Falla apoptosis	PCR, SSCP secuenciación	Schneider y col. <i>Am J Pathol</i> 2004; 164 : 1233-41
P	4	72	CGC/ CCC	Arg/Pro	Cáncer de piel Susceptibilidad a quemaduras y cáncer.	Secuenciación	McGregor JM y col. <i>J Invest Dermatol</i> 2002, 119 : 84-90.
P	4	72	CGC/ CGC	Arg/Arg	Cáncer de cabeza y cuello Mejor respuesta clínica a Tx con cisplatino	Secuenciación	Bergamaschi D y col. <i>Cancer Cell</i> 2003, 3 : 387-402.
P	4	72	CGC/ CGC	Arg/Arg	Riesgo de adenocarcinoma	Metanálisis	Jee SH. <i>Intl J Gynecol and Obstetrics</i> 2004; 85 : 510-15.
M	5	155	ACC/CCC	Thr→Pro	Carcinoma de células pequeñas	Secuenciación	Kanashiro y col. <i>PNAS</i> 2003; 100 : 619-23.
M M	5, 6	167, 183	CAG/CAT TCA/TGA	Gln→His Ser→Stop	Carcinoma papilar de tiroides	Secuenciación	Pisarchik y col. <i>Thyroid</i> 2000; 10 : 25-30.
M M	7 8	248 273	CGG/CAG CGT/CAT	Arg→Gln Arg→His	Adenocarcinoma gástrico	SSCP	Shibata y col. <i>Carcinogenesis</i> 2002; 23 : 419-24.
M M M M	5 10 8 6	135 342 286 216	TGC/TTC CGA/CTA GAA/AAA GTG/TTG	Cys→Phe Arg→Leu Glu→Lys Val→Leu	Líneas celulares de neuroblastoma	GeneChip	Keshelava y col. <i>Cancer Res</i> 2001; 61 : 6185-9.
M P	5 Intrón 7	161	GCC/GGC C > T, T > G	Ala→Gly	Carcinoma gástrico	DHPLC	Lu y col. <i>World J Gastroenterol</i> 2003; 9 : 2662-5.
M M M	5 7 8	158 248 273	CGC/CAC CGG/CAG CGT/CAT	Arg→His Arg→Gln Arg→ His	Cáncer oral asociado a VPH tipo 16	DHPLC	Dai y col. <i>Cancer Res</i> 2004; 64 : 468-71.
M	5	155	ACC/ATC	Thr→Ile	Cáncer de mama	SSCP/IHC	Ryu y col. <i>J Korean Med Sci</i> 2000; 15 : 73-7.
M M M M M	5 6 7 7 7	134 218 226 242 258	TTT/CTT GTG/GAG GGC/GAC TGC/CGC GAA/AAA	Phe→Leu Val→Glu Gly→Asp Cys→Arg Glu→Lys	Linfoma	DHPLC	Quintanilla-Martínez y col. <i>Am J Pathol</i> 2001; 159 : 2095-2105.
M	8	282	CGG/TGG	Arg→ Trp	Tumor de Wilms	SSCP	Beniers y col. <i>Int J Oncol</i> 2001; 18 : 133-9.

Polimorfismo: P. Mutación: M. ¹DGGE: electroforesis con gradiente desnaturizante. ²SSCP: polimorfismo conformacional de una sola cadena. ³RFLP: fragmentos de restricción de longitud variable. ⁴PCR Multiplex: PCR múltiple.

versas variaciones genéticas previamente conocidas o desconocidas, por lo cual es una poderosa herramienta que puede aplicarse a gran escala y la cual es accesible en nuestro medio. En relación con los microarreglos de DNA, la aproximación más importante es el “p53 GeneChip de Affymetrix” utilizado para identificar mutaciones en este gen.^{54,57,58} Sin embargo, por el costo y la poca disponibilidad para muchos investigadores, resulta necesario desarrollar métodos de detección accesibles, específicos, reproducibles y de bajo costo para la detección de variaciones genéticas, como las que se han presentado aquí. Una de las ventajas de la estrategia utilizada fue el diseño del tamaño de las sondas (siete nucleótidos) que pueden discriminar variaciones genéticas, debido al efecto desestabilizante de los nucleótidos mal apareados en la sonda blanco, con respecto a las sondas (de 25 a 30 nucleótidos) utilizadas en la mayoría de los arreglos comerciales.⁵⁹ En resumen, con estas dos tecnologías se pueden estudiar las variaciones genéticas en este gen con una alta sensibilidad y especificidad de las mismas. El uso de estas herramientas puede ser aplicado al estudio de mutaciones o polimorfismos en una patología en particular.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. R Maldonado, al Dr. K Beattie y al Dr. A Méndez por el apoyo logístico para el uso de la hibridación en tándem y el análisis bioinformático. Al Dr. A Dueñas y a la Dra. L Taja, del INCAN, las facilidades otorgadas para el uso del equipo de DHPLC. Los proyectos involucrados en la realización de este trabajo fueron parcialmente soportados por fondos, FOFOI-IMSS y CGPI-20020638 (IPN). AR obtuvo beca como trabajador IMSS y PP es becaria de CONACyT.

REFERENCIAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
2. Blagosklonny MV. How cancer could be cured by 2015. *Cell Cycle* 2005; 4: e89-e98.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
4. Frank SA, Nowak MA. Cell biology: Developmental predisposition to cancer. *Nature* 2003; 422: 94.
5. Chung CH, Bernard PS, Perou CHM. Molecular portraits and the family tree of cancer. *Nature Gen Suppl* 2002; 32: 533-40.
6. Cetin-Atalay R, Ozturk M. p53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure Appl Chem* 2000; 72: 995-9.
7. Kirk Brian, Feinsod M, Favis R, Kliman R, Barany F. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3295-3311.
8. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53. Tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and Molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
9. Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
10. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-10.
11. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54 Kdalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52.
12. Soussi T, Dehouche K, Beround C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology *Hum Mutat* 2000; 15: 105-13.
13. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 Database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19: 607-14.
14. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. TP53 is a tumor supresor gene. *Cell* 2004; (Suppl.116): S67-S69.
15. Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ* 2004; 157: 247-70.
16. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert lectures: the role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis *Br J Cancer* 1994; 69: 409-16.
17. Hollstein M, Hergenhahn, Yang Qin, Bartsch H, Wang Z-Q, Hainaut P. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutat Res* 1999; 431: 199-209.
18. Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-to-T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1993; 90: 8586-90.
19. Dumaz N, Drougard C, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc Nat Acad Sci* 1993; 90: 10529-33.
20. Gao WM, Mady HH, Yu GY, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF, Keohavong P. Comparison of p53 mutations between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: unique spectra involving G to A transitions and G to T transversions in both histologic types. *Lung Cancer* 2003; 40: 141-50.
21. Pfeifer GP. P53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat Res* 2000; 450: 155-66.
22. Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 2003; 21: 313-20.
23. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999; 18: 7621-36.
24. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 86-91.
25. Chumakov PM. Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochim* 2000; 65: 28-40.
26. Lin JJ, Chen B, Elenbaas B, and Levine AJ. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5E1B 55-kD protein. *Genes Dev* 1994; 8: 1235-46.
27. Venot CM, Maratrat C, Dureuil E, Conseiller L, Debussche L. 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* 1998; 17: 4668-79.
28. Pavietich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 1993; 7: 2556-64.
29. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265: 346-55.

30. Martin ACR, Facchiano AM, Cuff AL, Hernandez-Boussard T, Olivier M, Hainaut P, Thornton JM. Integrating mutation data and structural Analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum Mutat* 2002; 19: 149-64.
31. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 2002; 1: 289-98.
32. De Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CTM, Sage J, Jacks T. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Nat Acad. Sci* 2002; 99: 2948-53.
33. Brooks CI, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 164-71.
34. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. P53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 177-81.
35. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour supresión. *Nature* 2004; 432: 307-15.
36. Seemann S, Maurici D, Olivier M, de Fromentel CC, Hainaut P. The tumor suppressor gene TP53: implications for cancer management and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 551-83.
37. Moll UM, Slade N. p63 and p73: Roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 371-86.
38. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
39. Venter, JC, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
40. International HapMap Consortium. Integrating ethics and science in the International HapMap Project. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 467-75.
41. Shi M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 164-72.
42. Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell DA. Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 207: 84-90.
43. Li X, Dumont P, Della-Pietra A, Shefler C, Murphy ME. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J Biol Chem* 2005; 280: 24245-51.
44. Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, Boltze C, Peters B, Hartig R, Buhtz P, et al. Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *Am J Pathol* 2004a; 164(4).
45. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. TP53 polymorphism and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Mutagenesis* 2003; 18: 377-85.
46. Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Szibor R, Landt O, Meyer F, Roessner A. Selective loss of codon 72 proline p53 and frequent mutational inactivation of the retained arginine allele in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2004b; 6: 529-35.
47. Storey A, Thomas M, Kalita A, H Gardwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-34.
48. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park SJ, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis *Int J Gynecol Obstet* 2004; 85: 301-8.
49. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*. 1994; 44: 266-70.
50. Thomas M, Pim D, Banks L. The rol of the e6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999; 18: 7690-7700.
51. Lilleberg SL. In-depth mutation and SNP discovery using DHPLC gene scanning *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003; 6: 237-52.
52. Lee CH, Macgregor PF. Using microarrays to predict resistance to chemotherapy in cancer patients. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 611-25.
53. Wen WH, Bernstein L, Lescallett J, Beazer-Barclay Y, Sullivan-Halley J, Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res* 2000; 60: 2716-22.
54. Takahashi Y, Ishii Y, Nagata T, Ikarashi M, Ishikawa K, Asai S. Clinical application of oligonucleotide probe array for full-length gene sequencing of TP53 in colon cancer. *Oncology* 2003; 64: 54-60.
55. Maldonado-Rodríguez R, Beattie KL. Analysis of nucleic acids by tandem hybridization on oligonucleotide microarrays. *Meth Mol Biol* 2001; 170: 157-71.
56. Rangel-López A, Maldonado-Rodríguez R, Salcedo-Vargas M, Espinosa-Lara JM, Méndez-Tenorio A, Beattie KL. Low density microarray for the detection of most frequent TP53 missense point mutations. *BMC Biotechnology* 2005; 5: 8.
57. Wikman FP, Lu ML, Thykjaer T, Olesen SH, Andersen LD, Cardon-Cardo C, Ørntoft TF. Evaluation of the performance of a p53 sequencing microarray chip using 140 previously sequenced bladder tumor samples. *Clin Chem* 2000; 46: 1555-61.
58. Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, McDermott MP, Benoit N, Yang SC, et al. p53 Mutations and survival in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a Prospective Study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 961-70.
59. Relógio A, Schwager C, Richter A, Ansoerge W, Valcárcel J. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e51.

Reimpresos:

Dra. Angélica Rangel-López
 Unidad de Investigación Médica
 en Enfermedades Oncológicas,
 Hospital de Oncología, Centro Médico
 Nacional Siglo XXI-IMSS,
 Av. Cuauhtémoc 330,
 Col. Doctores,
 06720, México, D. F.
 Tel.: 56276900 Ext.: 22705 y 22706.
 Fax: 56276900 Ext. 21371
 Correo electrónico:
 ragn62@prodigy.net.mx

Recibido el 4 de abril de 2005.
 Aceptado el 19 de enero de 2006.