

p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. Revisión.

Lilian Chuaire-Noack, Magda Carolina Sánchez-Corredor y Sandra Ramírez-Clavijo.

Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá DC, Colombia.

Palabras clave: Señalización celular, histogénesis, ciclo celular, apoptosis, patogénesis, quimioterapia, cáncer ovárico epitelial

Resumen. El epitelio superficial del ovario (ESO), tejido formado por una sola capa de células, está sujeto a una elevada tasa de renovación en el sitio de la ruptura provocada por la ovulación, lo que ha sido asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer como consecuencia de la transformación maligna de sus células. El hallazgo de un 90% de tumores ováricos derivados del epitelio superficial, así como de mutaciones del gen p53 en la gran mayoría de ellos, constituyen la justificación para revisar la estructura y la histogénesis de dicho tejido con referencia a p53. Igualmente se consideran algunos aspectos relacionados con la estabilización de la proteína, su regulación, su participación en eventos claves como detención del ciclo celular, inducción de apoptosis, la etiología y patogénesis del cáncer ovárico epitelial y por último, algunos de los más recientes avances farmacogenéticos que utilizan a p53 como blanco terapéutico contra el cáncer.

p53 and its role in the ovarian surface epithelium. A review.

Invest Clin 2008; 49(4): 561 - 593

Key words: Cell signaling, histogenesis, cell cycle, apoptosis, pathogenesis, chemotherapy, epithelial ovarian cancer

Abstract. The ovarian surface epithelium (OSE) is a single layer of cells subject to a high rate of turnover at the site of follicular rupture at ovulation and this results in a higher risk of malignant cell transformation. Findings like cancer derived from OSE, that accounts for approximately 90% of all human ovarian malignancies and the frequent mutations of the p53 gen in most of them, are the basis for reviewing OSE structure and histogenesis related to p53, as well as some aspects associated with p53 stabilization and regulation,

its involvement in key events like cell cycle arrest, induction of apoptosis, etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Finally, this review takes into account recent pharmacogenetics advances in order to use p53 as a target in the therapy against cancer.

Recibido: 12-11-2007. Aceptado: 24-04-2008.

INTRODUCCIÓN

p53 es quizás el gen más estudiado en las últimas décadas, desde cuando en 1979 fue identificado y descrito en células transformadas por el virus SV40, donde se encontró que su proteína formaba un complejo con el antígeno T oncogénico producido por el virus (1). Con el advenimiento de la era de la biología molecular, quedó demostrado su papel como inhibidor de la proliferación y como promotor de la muerte celular bajo condiciones de estrés (2, 3).

Las mutaciones de p53 constituyen el cambio genético más frecuente en el cáncer, lo que hace que la alteración de sus funciones como regulador del ciclo celular y de la apoptosis favorezca el crecimiento descontrolado de las células tumorales (4). Las mutaciones están presentes en la mitad de las neoplasias humanas (5) y, en particular, en 40-80% de los tumores malignos de origen epitelial ovárico (6-8). Si se tiene en cuenta que en un 90-95%, éstos se originan a partir del epitelio superficial del ovario y son además responsables de cerca de la mitad de las muertes asociadas con neoplasias ginecológicas (9-11), p53 emerge con un papel protagónico dentro del contexto normalidad-malignidad del tejido. Este hecho, sumado a la pobre comprensión de la biología del epitelio superficial del ovario, así como de la etiología y los eventos moleculares tempranos de la progresión tumoral, ha determinado en gran parte el curso tomado en tal sentido por la investigación en el campo de la oncogénesis ovárica en los últimos años.

El objetivo de la presente revisión está por tanto centrado en la recolección, análisis y discusión de algunos de los principales hallazgos relacionados con la participación de p53 en procesos como la proliferación y diferenciación del epitelio superficial del ovario, su transformación hacia la malignidad y los sistemas de señalización que intervienen en todos ellos.

HISTOGÉNESIS DEL EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO Y p53

El epitelio superficial del ovario surge en una etapa temprana del desarrollo embrionario, a partir del epitelio de origen mesodérmico que recubre a la futura gónada. Allí prolifera, se diferencia y, conjuntamente con el mesénquima subyacente, hacia la séptima semana de desarrollo da origen al blastema ovárico (12).

Hasta el quinto mes de la vida prenatal, su estructura es la de un epitelio simple plano o cúbico. A partir de ese instante, cambia a uno estratificado hasta el momento del nacimiento, cuando es reemplazado por un epitelio simple (10, 12). Este proceso parece depender de estímulos intragonadales hormonales de tipo esteroide, pues ocurre en forma simultánea con la diferenciación esteroidea de las células del estroma ovárico (10). De manera semejante a lo que ocurre con otros tejidos, la expresión de p53 en la histogénesis de ESO está correlacionada en forma inversa con el grado de diferenciación alcanzado (13, 14), de modo que, si bien se expresa en las primeras semanas del primer trimestre de desa-

rollo gonadal, hacia las semanas 6 a 12 su expresión disminuye en forma considerable, en simultaneidad con un aumento en la expresión de la proteína Bcl-2 antiapoptótica. Este hecho posiblemente contribuye a una rápida proliferación de las células epiteliales, las que al rodear a las oogonias constituyen un entorno apropiado para el desarrollo ulterior de los folículos (15, 16).

Con una participación crucial de la vía de señalización en la que interviene la molécula Wnt-4, aparece en el embrión el epitelio superficial del ovario, originado a su vez a partir del epitelio celómico que reviste también a los conductos de Müller, precursores de oviducto, endometrio y endocérvix (17). Así, ESO no sólo comparte idéntico origen embrionario con el resto del mesotelio extraovárico, sino que está expuesto al mismo medio ambiente pélvico, lo que puede explicar la asociación de ambos tejidos con el carcinoma epitelial ovárico (10). De hecho, las neoplasias derivadas de ESO contienen células de tipo mülleriano, como por ejemplo células serosas, mucinosas, endometrioides y claras, lo que aporta evidencia a la hipótesis de un origen embrionario común (18). No obstante, los dos tejidos difieren en algunas características, como la expresión de ciertos marcadores de diferenciación en el peritoneo mülleriano, ausentes en el epitelio superficial normal del ovario. Esto ha llevado a pensar que ESO retiene la capacidad del reborde epitelial mesodérmico, lo que le permite diferenciarse bajo ciertas condiciones patológicas, y determina además que en el carcinoma derivado de este tejido se expresen marcadores de diferenciación epitelial propios de neoplasias tanto ováricas, como derivadas del conducto de Müller. Es el caso de la glicoproteína CA125, característica de la superficie de las células de todas las serosas y de las células epiteliales de oviducto, endometrio y endocérvix, pero no de ESO normal, en donde no se ha identificado, ya sea

porque su expresión es un evento muy temprano en el desarrollo o simplemente no se expresa (19-22). Al respecto, se ha detectado la expresión de CA125 en cultivos de células epiteliales ováricas con daño del ADN y expresión deficiente de p53 (23). Otro marcador de diferenciación raramente expresado en ESO normal, pero común en el epitelio mülleriano y en los carcinomas primarios derivados de ESO, es la E-cadherina, proteína transmembranal dependiente de calcio que actúa como inductora del fenotipo epitelial, durante la histogénesis y la estabilización de los tejidos (24, 25). Gracias a la unión entre sus dominios extracelulares homólogos, la E-cadherina promueve la adhesión de células adyacentes, mientras que a través de su dominio intracelular se acopla con las cateninas α , β y γ , proteínas de adhesión que también se unen a la F-actina, para formar uniones intercelulares adherentes en la membrana plasmática lateral (24).

A medida que transcurre la diferenciación de ESO, disminuye la expresión de la E-cadherina, al parecer debido a la regulación hormonal ejercida por estrógenos y progesterona (26), hasta su inhibición total en el ovario postnatal. La disminución se inicia por la acción de señales de tipo morfogénico que no sólo promueven la translocación de la β -catenina al núcleo sino que también inducen la transición mesénquima-epitelio, necesaria para que ocurran la migración y la reorganización tisular propia de la embriogénesis. En presencia de mutaciones de p53 en ESO, se ha demostrado que la β -catenina se acumula en el núcleo, y esto se asocia no sólo con la expresión aberrante de la E-cadherina y la aparición de un fenotipo mesenquimático, sino también con una mayor capacidad de invasión del carcinoma primario (27-29), eventos que también pueden ocurrir cuando existen mutaciones en los genes que codifican para E-cadherina o β -catenina (24). Por este mo-

tivo, se encuentran niveles elevados de E-cadherina en ESO metaplásico y en carcinomas primarios derivados de ESO, pero no en ESO normal ni en carcinomas metastásicos, donde su expresión es indetectable (29, 30).

Las células del epitelio superficial del ovario tienen forma aplanada o cúbica y se disponen en un solo estrato que descansa sobre una lámina basal. Esta a su vez, separa al epitelio de la túnica albugínea, gruesa capa de tejido conectivo denso colágeno (12). En forma paralela con el envejecimiento, el ovario tiende a adoptar un contorno irregular que determina que en la corteza del órgano aparezcan invaginaciones y quistes de inclusión de origen epitelial. Estos eventos están acompañados por cambios metaplásicos, como la sustitución del epitelio cúbico por uno cilíndrico (31). En las células epiteliales de los quistes de inclusión se han identificado formas mutantes de p53, así como inhibición de la expresión de BRCA1, usualmente debida a metilación del promotor (32). Por estos hallazgos se ha postulado que los quistes de inclusión están asociados con metaplasias y

neoplasias, en consideración a que se presentan en mujeres con historia familiar de cáncer ovárico, y a que por otra parte, las células epiteliales involucradas expresan CA125 y E-cadherina, marcadores propios del epitelio mülleriano (33).

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA p53

La proteína humana p53 está involucrada en un amplio espectro de eventos celulares que van desde la regulación de glicólisis y autofagia, reparación del daño del ADN, supervivencia celular y regulación del estrés oxidativo, angiogénesis, diferenciación, proliferación, muerte y senescencia celular, hasta la remodelación ósea (34-42). Para ello, interactúa directamente con el ADN (como factor de transcripción) y con una panoplia de proteínas, además de ser el blanco de variadas vías de señalización, a través de las cuales se regula su actividad.

La proteína p53 tiene cinco dominios (Fig. 1):

- Dominio de transactivación, entre los aminoácidos 1 y 42 del extremo ami-

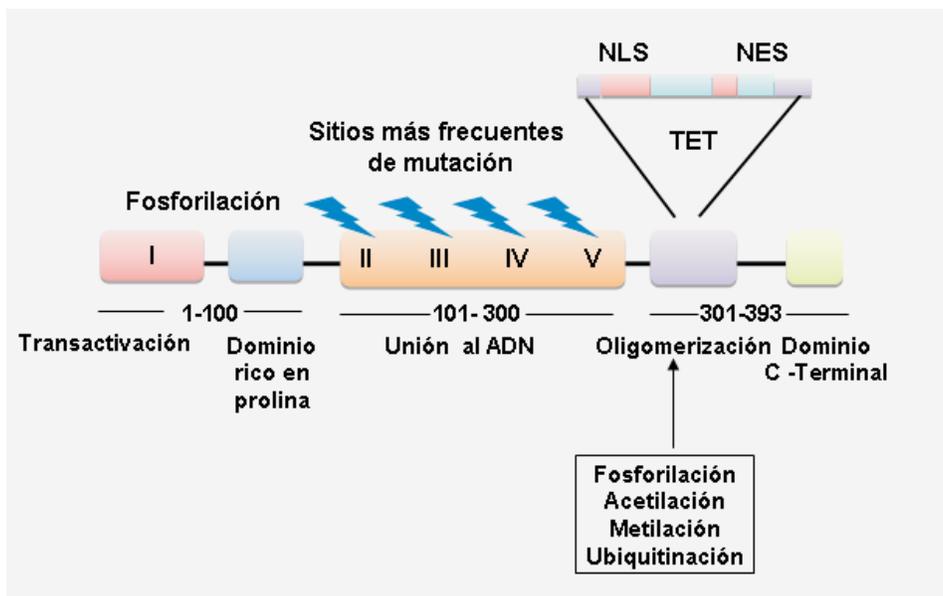


Fig. 1. Estructura de p53.

no-terminal, a través del cual interactúa con la proteína mdm2. Contiene una región de alta conservación evolutiva HCIDI.

- Dominio rico en prolina, conservado en la mayoría de las especies. Localizado entre los aminoácidos 40 y 92, contiene a su vez un segundo dominio de transactivación.
- Dominio de unión al ADN, entre los aminoácidos 101 y 306. Comprende las regiones de alta conservación evolutiva (HCD) II, III, IV y V, lo que explica similitud de funciones entre especies. Es el sitio de ocurrencia del 90% de las mutaciones halladas en los tumores cancerosos humanos.
- Dominio de oligomerización, entre los aminoácidos 307 y 355. Contiene una región llamada TET, con secuencias aminoácidos señalizadoras de la localización nuclear (NLS) o citosólica (NES) de la proteína. Su estructura secundaria corresponde a una lámina β , seguido por una α -hélice, necesaria para la dimerización de p53.
- Dominio carboxi-terminal, extendido entre los aminoácidos 356 y 393. Con tres señales NLS y un dominio que reconoce sitios de daño del ADN, este dominio también está implicado en la actividad de regulación negativa del dominio de unión con el ADN localizado entre los aminoácidos 101 y 306.

La regulación negativa efectuada por p53 en respuesta al daño del ADN, consiste en detener el ciclo celular tanto en seres humanos como en otros mamíferos, para dar paso a los procesos de reparación. De esta manera se protege al organismo de la proliferación de células con el ADN dañado o bien, se activa el proceso de muerte programada o apoptosis en la célula afectada cuando la reparación no ha sido posible. Se honra así la designación de p53 como "guardián del genoma" y supresor tumoral (43).

Bajo condiciones normales, la proteína p53 está presente en muy baja cantidad en las células, debido a que su alta tasa de recambio le confiere una vida media de unos pocos minutos, lo que significa que el nivel de degradación es mayor que el de formación de la proteína. La degradación depende de la interacción con las enzimas ubiquitina E3 ligasas hdm-2 (homólogo humano de murine double minute 2 o mdm2), pirh2 (proteína inducida por p53, con un dominio dedos de zinc llamado RING-H2), COP1 (foto-morfogénico 1 constitutivo) y ARF-BP17HectH9 con las que forma complejos estables, lo que bloquea su acción como factor de transcripción, pues impide su unión con las secuencias blanco de ADN y además favorece su ubiquitinación y posterior proteólisis (44-46).

Mdm2 es una proteína de 90 kD codificada por un oncogén cuya sobreexpresión inhibe la activación de genes de la vía supresora tumoral asociada a p53. Cuando gracias a la actividad kinasa de ATM, ATR, ChK1, ChK2 o ADN-PK, la proteína p53 es fosforilada en las serinas 15 y 20 y en la treonina 18 del extremo N-terminal, cambia su conformación espacial, lo que hace que pierda afinidad por la proteína mdm2 y se disocie de ella (47, 48). La peptidilprolilisomerasa PIN1 también facilita la disociación de mdm2 cuando p53 es fosforilada en las serinas 33 y 315 y en la treonina 81 (49, 50). Numerosas proteínas con función inhibidora o activadora pueden actuar sobre mdm2 para modificar su afinidad por p53 y llevar por tanto a su degradación o bien, a su estabilización (51) (Fig. 2).

ESTABILIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE p53

Diversos agentes físicos como la radiación ionizante (rayos γ , X y ultravioleta), químicos como hipoxia, aumento de la concentración de radicales libres, cambios metabólicos o en el pH, producen daño en el

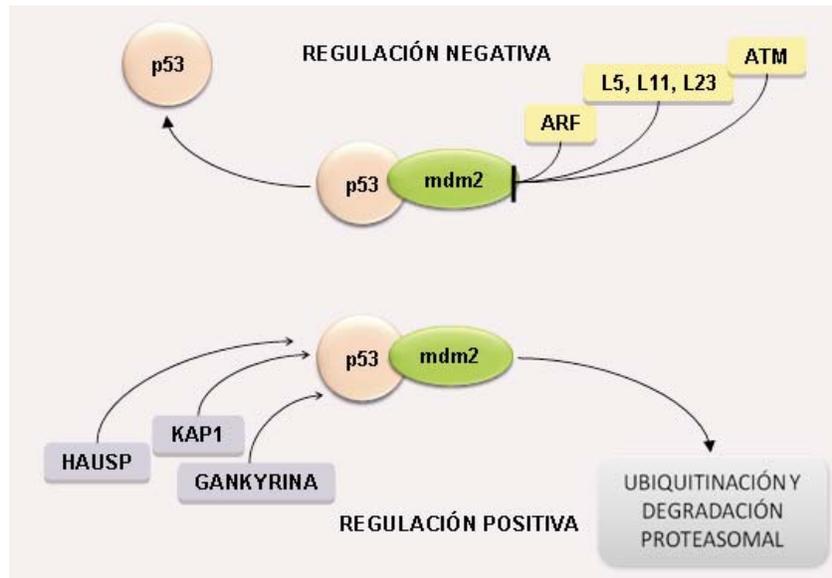


Fig. 2. Reguladores de la interacción p53-mdm2. ARF y las proteínas ribosomales L5, L11 y L23 actúan como inhibidoras de la actividad ubiquitin E3 ligasa de mdm2 (hdm2 en humanos) y por tanto promueven la estabilización de p53. La oncoproteína gankyrina, la proteasa específica asociada al herpes virus (HAUSP) y la proteína asociada a queratina KAP1 por su parte, potencian la ubiquitinación y subsiguiente degradación de p53.

ADN (52-54) que se manifiesta como formación de dímeros de timidina, pérdida o ganancia de nucleótidos, cambios en la secuencia de nucleótidos, entre otros. A estas alteraciones la célula responde generando señales de estrés que conducen al aumento en la cantidad de la proteína p53 de manera directamente proporcional a la extensión del daño, como resultado de su estabilización y activación a través de diferentes vías de señalización. Así, cuando la señal inicial se origina por causa de una ruptura de la doble cadena del ADN, se activan proteínas sensoras de daño entre las que se encuentran ATM, ATR o ADN-PK (Fig. 3).

ATM-ChK2-p53

Esta vía se activa en respuesta no sólo al daño del ADN, sino también en presencia de errores durante la replicación del ADN en el ciclo celular (55). El producto de ATM (gen mutado en la ataxia-telangiectasia) miembro de la familia de las PI3 kinasas (PI3K), actúa fosforilando directamente a la

proteína p53 en la serina 15 y de manera indirecta, en las serinas 15 y 37, mediante la fosforilación de la proteína quinasa ChK2 (checkpoint kinase 2) (56-58). La fosforilación cambia la conformación estructural de p53, lo que disminuye su afinidad por mdm2 y facilita la disociación del complejo. Mdm2 puede entonces manifestar su potencial de transactivación, antes inhibido por p53. Si como consecuencia del daño del ADN, la fosforilación se efectúa en la serina 20, también se estabiliza p53. En este caso, p53 pierde su afinidad por mdm2, se inhibe la formación del complejo y por consiguiente disminuye su tasa de degradación (47, 48).

La vía ATM-ChK2-p53 puede también ser activada en respuesta a estrés genotóxico asociado con la deficiencia de BRCA-1, gen de susceptibilidad al cáncer de mama que participa en procesos de reparación del ADN. Los resultados obtenidos por Cao y col. en 2006 (59) demuestran que en ausencia de BRCA-1, hay una importante for-

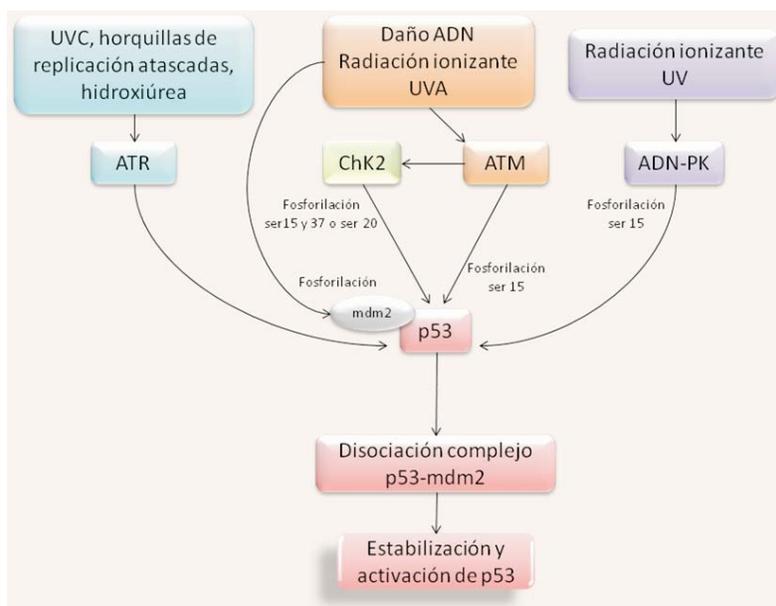


Fig. 3. Estabilización de p53 a través de las vías de señalización ATM, ATR y ADN-PK, activadas como consecuencia del daño al ADN.

mación de focos γ H2AX (variante de la histona H2A) que constituyen evidencia de la acumulación de ADN dañado y no reparado. Los focos γ H2AX serían entonces los responsables de la activación de la señalización ATM-ChK2-p53. Mientras en la vida embrionaria dicha vía constituye un mecanismo de selección natural que elimina las mutaciones presentes, en la vida adulta previene la transformación tumoral. No obstante, su hiperactivación causa envejecimiento prematuro, y compromete por tanto la supervivencia del individuo (59).

ATR-ChK1-p53

Cuando el ADN sufre un daño, la proteína ATR (gen mutado en la ataxia-telangiectasia, relacionado con Rad 3) lo reconoce e interactúa con él. Como resultado, su actividad de kinasa aumenta, lo que en conjunto con ATM favorece la formación de un complejo de mayor peso molecular con proteínas presentes en el núcleo, como BRCA-1, H2AX y MDC1 (proteína 1 mediadora del punto de control de daño del ADN), entre otras (60).

ADN-PK-p53

Al igual que ATM y ATR, ADN-PK es una kinasa nuclear de serina-treonina, constituida por dos subunidades, una catalítica y otra de unión con el ADN, llamada también Ku70/80. Participa en la reparación de la ruptura de la doble cadena del ADN, mediante la unión de los extremos homólogos (HR) o no homólogos (NHEJ) (60). p53 establece una estrecha relación con la ADN-PK, bien sea formando un complejo sensor para detectar la interrupción de la replicación del ADN cuando se han incorporado análogos de nucleósidos (61) o bien, actuando como regulador corriente arriba en la vía de apoptosis mediada por p53, en cuyo caso es fosforilado en la serina 15 (62).

ARF

p14^{ARF} (p19^{ARF} en ratón) es un gen al que se le atribuyen diversas funciones tales como biogénesis ribosomal, regulación de la transcripción, respuesta al daño del ADN, apoptosis, autofagia, supresión tumoral e inducción de senescencia (63, 64). En los

seres humanos, la proteína ARF es el producto de un transcrito alternativo del gen *Ink4a*, donde p14^{ARF} comparte dos exones con el transcrito p16^{Ink4a}, también supresor tumoral (58). La expresión de p14^{ARF} está regulada por factores de transcripción, como los miembros de la familia E2F (65).

ARF-mdm2-p53. Bajo situaciones de estrés o senescencia, ARF estabiliza y aumenta la actividad transcripcional de p53, mediante el “secuestro” de mdm2. Este regulador negativo es una de las ubiquitin E3 ligasas que marca a la proteína para su posterior degradación en el proteasoma (63, 66) (Fig. 4).

Aunque hasta el momento se consideraba que la función supresora tumoral ejercida por ARF dependía de p53, existe evidencia de que la protección brindada por dicho gen contra el desarrollo tumoral es absolutamente dependiente de ARF (67). En tal sentido Christophorou y col. en 2006 (37), demostraron en un modelo de ratón en el que el estado de p53 podía intercambiarse *in vivo* entre funcional e inactivo, que la respuesta patológica mediada por p53 a un carcinógeno genotóxico como la radiación, era incapaz de evitar la aparición de linfomas inducidos por la misma radia-

ción. Por el contrario, se concluyó que era la activación de p14^{ARF} en las células prelinfoma, que ocurría en respuesta a mutaciones oncogénicas inducidas por la radiación, la que en realidad confería protección contra el desarrollo tumoral (37).

A través de ARF, p53 puede actuar para detener el ciclo celular o para conducir a la célula a un estado senescente. Sin embargo, ni la regulación transcripcional del locus *Ink4a* ni las vías de señalización asociadas están comprendidas a cabalidad. Entre otras cosas, porque no es claro qué es lo que determina que la célula, en respuesta al daño del ADN, escoja entre la senescencia o la muerte, ni tampoco cuál es la participación de ARF en dicha escogencia. Sobre este punto, se ha sugerido que la decisión acerca del destino de la célula depende de factores tales como el tipo de modificación postraduccional experimentado por p53 en respuesta a diferentes estímulos que modulan la afinidad por las diversas proteínas con las que interactúa, así como el grupo de genes sobre los que ejerce regulación transcripcional. Parece existir una preferencia de las células normales hacia la senescencia, en comparación con lo que ocurre en las células transformadas, decisión posi-

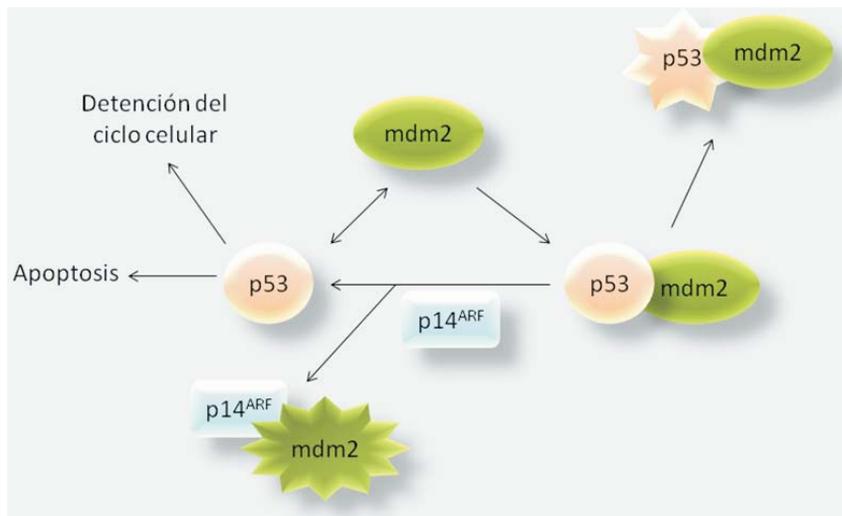


Fig. 4. Estabilización y activación de p53 a través de la vía ARF-mdm2 (mdm2 en humanos), en situaciones de estrés o senescencia.

blemente relacionada con la extensión del daño del ADN (66, 68, 69).

ARF-ATR-p53. Además de actuar sobre *mdm2*, ARF también puede activar la vía ATR/ChK1, evento que parece constituir un requisito fundamental para la efectividad de su función como supresor tumoral (Fig. 5). Con posterioridad al daño del ADN, ARF “compromete” a ATR a través de dos mecanismos diferentes: en el nucleoplasma, ATR activa a ChK1 y ésta a su vez fosforila a NF- κ B en la treonina 505 de la subunidad RelA. Esta fosforilación bloquea el poder transactivador ejercido por RelA sobre *Bcl-x1* antiapoptótico, para reprimir su expresión y por consiguiente sensibilizar la célula a la apoptosis. En consistencia con estos hallazgos, NF- κ B ha sido relacionado con la estabilización de p53(70). Por otra parte, ARF puede actuar sobre ATR, tanto en el nucleoplasma como en el nucleolo (71, 72), para inducir la formación de un complejo entre ATR y BRCA1. Mediante fosforilación en la serina 15, dicho complejo contribuye a la activación y estabilización de p53 (73). Esto explica que las mutaciones en genes supresores tumorales como BRCA1 estén implicadas en la carcinogénesis del epitelio su-

perficial del ovario, evento en el que BRCA1 se caracteriza por inhibir la proliferación inducida por estrógenos (74).

DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR

Con la estabilización de p53, su vida media aumenta, lo que se refleja en una mayor concentración celular de la proteína, suficiente para activar la transcripción de genes que participan en los puntos de control G₁/S o G₂/M del ciclo celular, como p21^{WAF-1}, GADD45 α , 14-3-3 σ y B99 entre otros (51, 75). Al respecto es interesante anotar que la desregulación del punto de control G₂ es una de las características de la transformación maligna, pues constituye la última barrera antes de que las células con el ADN mutado puedan adquirir inmortalidad.

p21^{WAF-1}

Cuando p53 induce la expresión de p21^{WAF-1}, cuyo producto es una enzima inhibidora universal de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (76), se detiene el ciclo en el punto de control G₁. Esto se debe a que la enzima se asocia con ciclinas y con

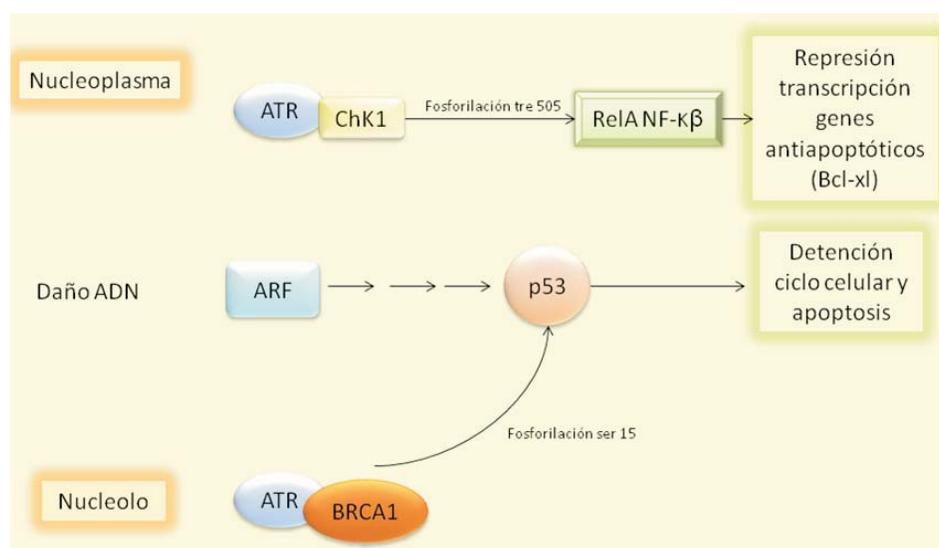


Fig. 5. Estabilización y activación de p53 a través de la vía ATR/ChK1 mediada por ARF, bajo condiciones de daño del ADN.

CDKs, así como con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para formar complejos cuaternarios que impiden la progresión del ciclo y detienen la propagación de mutaciones oncogénicas (Fig. 6). La actividad kinasa está inhibida cuando dos moléculas de la proteína p21^{WAF-1} se acoplan con los complejos ciclina D-CDK4/6, ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2, necesarios para que la célula avance desde la fase G₁ hasta la S del ciclo, o con los complejos ciclina A-CDK2 y ciclina B-CDK2, que permiten pasar de S/G₂ y G₂/M respectivamente (77, 78). Cuando las CDKs están inhibidas, la célula no puede avanzar a lo largo del ciclo, pero a cambio dispone del tiempo necesario para reparar el ADN dañado. Se ha demostrado que niveles aumentados de p21^{WAF-1} y de p53 fosforilado están relacionados con el ingreso de la célula a un estado senescente (79). Por otra parte, se comprende mejor la importancia de p21^{WAF-1} cuando se tiene en cuenta que su deficiencia o su inhibición permite a las células escapar de la senes-

encia y extender por tanto su existencia, hasta un estado en el que aparece una segunda barrera proliferativa y se detiene la división celular. En esta etapa, llamada también crisis, las células mueren en forma masiva, debido a la inestabilidad cromosómica generada (80).

GADD45 α

El producto de este gen, llamado “gen 45 α de detención del crecimiento e inducible por daño del ADN” actúa en los puntos de control G₁ y G₂. En G₁ detiene el ciclo mediante su interacción con PCNA, mientras que en G₂ inhibe al complejo ciclina B1-cdc2, también llamado factor promotor de la mitosis MPF, lo que impide la transición a la fase M. GADD45 α contribuye además a la estabilidad genómica, en razón de que participa en el mecanismo de reparación por excisión del ADN. En adición, GADD45 α toma parte en los procesos de apoptosis, supervivencia celular e inmunidad innata (81, 82).

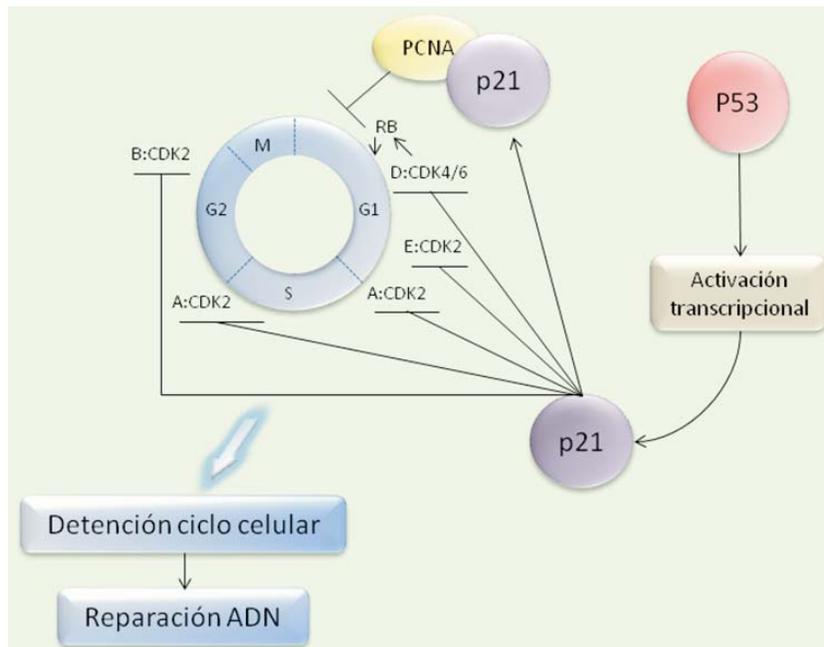


Fig. 6. Papel inhibidor de p21^{WAF-1} sobre los complejos ciclina-CDK en los puntos de control del ciclo celular. Cuando p21^{WAF-1} se une al antígeno de proliferación celular (PCNA) también detiene el ciclo en G₁ para permitir la reparación del ADN.

14-3-3 σ

En la fase G₂ del ciclo celular actúa también el producto proteico del gen 14-3-3 σ , cuando es inducido por p53 en respuesta al daño del ADN. Una vez la proteína expresada interactúa con kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), puede regular el ciclo en forma negativa, pues “secuestra” complejos Cdc2/CDK1-ciclina B y los transporta desde el núcleo hasta el citoplasma. Además, las proteínas 14-3-3 σ ejecutan una retroalimentación positiva sobre p53, lo que aumenta su estabilidad y su actividad transcripcional. Esto se debe a la regulación negativa que 14-3-3 σ ejerce sobre mdm2, lo que potencia la actividad de p53. Es explicable entonces su papel en el control de la transformación tumoral, sobre el que existen reportes que muestran una disminución en la expresión de 14-3-3 σ en varios tipos de cáncer (83, 84), como el carcinoma del epitelio superficial del ovario (85). La disminución obedece más a silenciamiento epigenético por metilación en islas CpG que a alteraciones genéticas (86) y está asociada con un aumento en los niveles de mdm2 y con la inhibición de la actividad de p53 (51).

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

El impacto de p53 en el suicidio celular queda en evidencia cuando se considera que hasta la fecha, el número descrito de genes mediadores de apoptosis sobre los que actúa es mayor que el de los que participan en el ciclo celular bajo su influencia reguladora. Sin embargo, en su carácter de inductor de la apoptosis, p53 no sólo participa como factor de transcripción, sino también a través de mecanismos independientes de la transcripción que involucren a la vía intrínseca mitocondrial. En ambos casos, se produce permeabilización de la membrana externa de la mitocondria a través de la activación

de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, como BAX y BAK (87).

MECANISMOS TRANSCRIPCIONALES

Genes blanco

Como factor de transcripción, p53 actúa sobre el promotor de genes como PUMA, NOXA, bcl-2, BAX, Apaf-1, p53A1P1, IGF-BP3, DR5/KILLER, Fas/Apo-1, PIG, PAG608, PERP, PIDD, DRAL y Scotin (88), aunque se cree que tal acción no es absolutamente indispensable para promover la muerte celular programada (44).

NOXA y PUMA

Los miembros NOXA y PUMA de la subfamilia de genes Bcl-2 sólo BH-3, codifican las proteínas proapoptóticas del mismo nombre. Cuando estas son translocadas a la mitocondria, se unen a las proteínas de supervivencia Bcl-2 y Bcl-xl respectivamente, también miembros del grupo Bcl-2. Este hecho no sólo causa la inhibición de Bcl-2 y Bcl-xl, sino que además hace que BAX y BAK puedan ejercer su efecto proapoptótico (38) (Fig. 7). BAX y BAK a su vez, se unen en 2-10 focos a lo largo de la membrana mitocondrial externa, los cuales funcionan como poros que permiten la liberación de proteínas al citosol (89). Los eventos antes enunciados desencadenan por una parte, la caída del potencial transmembranal y por otra, la liberación del citocromo c (38), efectos que han sido también relacionados con la activación funcional de BAX y p53A1P1 (90). Es interesante que los focos BAX/BAK estén localizados conjuntamente con sitios de fisión mitocondrial, así como con Drp1 y Mfn2, GTPasas relacionadas con la fragmentación de la mitocondria. La escisión mitocondrial ocurre antes de la activación de las caspasas, en estrecha asociación con la translocación de BAX y la liberación de citocromo c (89, 91).

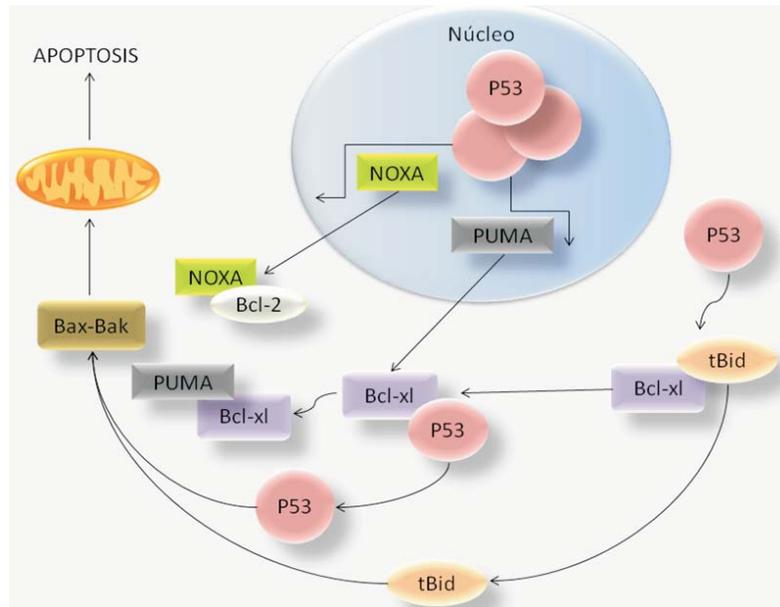


Fig. 7. Participación de p53 en la vía intrínseca de la apoptosis. Como transactivador, p53 induce la expresión de PUMA, NOXA, BAX y Bid entre otros. Como transrepressor, altera la expresión de Bcl-xl y Bcl-2, con el que también puede también formar complejos.

Bcl-2 y BAX

p53 puede además regular en forma directa la transcripción de bcl-2 antiapoptótico, mediante la unión con un elemento silenciador localizado en la región promotora del gen bcl-2 (92, 93). Con relación a BAX, cuando p53 interactúa con el gen, la proteína generada promueve la liberación del citocromo c, desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol, lo que constituye el paso previo a la activación de la cascada proapoptótica de las caspasas. No obstante, cuando p53 está sobreexpresado, la apoptosis ocurre sin el concurso de BAX (94).

Cuando la extensión del daño del ADN no alcanza una magnitud apreciable, y se está en presencia de Bcl-2, es factible la reparación antes de que p53 pueda dar inicio al programa de suicidio celular. Por tanto, Bcl-2 no sólo inhibe el transporte subcelular de p53 sino también a las moléculas adaptadoras corriente abajo que se necesitan para activar la vía apoptótica de las caspasas. Es explicable entonces que una eleva-

da expresión de bcl-2 haya sido relacionada tanto con el tejido epitelial normal como con patologías benignas y con tumores de tipo "borderline" ováricos (95), con base en el supuesto de la asociación del gen con una conducta maligna menos agresiva en algunos tipos de cáncer. Esto permite pensar en la expresión de bcl-2 como potencial predictor del control de la apoptosis.

En un estudio efectuado por De La Torre y col. (96) en 2007, se reportó una baja expresión de bcl-2 en la mayoría de carcinomas ováricos epiteliales analizados, en contraste con los elevados niveles de expresión de p53, y con un alto índice apoptótico (definido como número total de eventos apoptóticos en un área determinada de observación al microscopio). Sus resultados indicaron que tanto la acumulación nuclear de p53 como el índice apoptótico podían ser considerados como predictores independientes de recurrencia de la enfermedad y de menor supervivencia. Resultados similares ya habían sido obtenidos para otros tipos de tumores (97), donde se demostró no sólo el

papel relevante de la apoptosis en la eliminación de las células malignas, sino también la inducción de muerte celular programada mediante la aplicación de quimioterapia sobre células cancerosas ováricas (98). En su estudio, De La Torre y col. determinaron un mayor índice apoptótico para los tumores de mayor agresividad, como son los de alto grado y los de tipo seroso, donde no por azar se expresó la proteína p53 con mayor intensidad (96).

Scotin

Otro blanco transcripcional de p53 es scotin, gen que produce una proteína localizada en la membrana del núcleo y del retículo endoplásmico. En forma dependiente del retículo endoplásmico, se ha demostrado que actúa como mediadora de la apoptosis inducida por p53 (44, 99).

Liberación del citocromo c y formación del apoptosoma

Por otra parte y como resultado de la liberación del citocromo c, mediada a su vez por la activación de BAX, NOXA, PUMA o p53AIP1, se forma el apoptosoma. En presencia del citocromo c, Apaf-1 sufre un cambio conformacional que permite el reclutamiento de la caspasa 9 (100). Esta puede activar entonces directamente a las caspasas 3 y 7 para dar inicio, en una forma ordenada, al clivaje de sustratos intracelulares y a la generación de un fenotipo apoptótico (101, 103). En una etapa temprana de la apoptosis, uno de los sustratos clivados bajo la acción de la caspasa 3 es la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP-1), enzima que en condiciones de supervivencia participa en la reparación del ADN dañado. Ello explica que, en presencia de alteraciones de p53, PARP-1 se acumule en el núcleo neoplásico de las células del carcinoma ovárico seroso (104).

Transcripción y trimerización de Fas y DR5-Killer

En la vía extrínseca de inducción de la apoptosis, p53 activa tanto la transcripción como el agrupamiento del receptor Fas y DR5-KILLER, receptores de muerte localizados en la membrana plasmática (105) (Fig. 8). El antígeno Fas (Apo-1/CD95) acoplado a su receptor Fas-L-miembro de la familia de los receptores TNF (factor de necrosis tumoral) de la superficie celular forman un complejo que actúa como potente inductor de la apoptosis. El antígeno Fas se expresa en el epitelio superficial del ovario, donde se ha demostrado la muerte apoptótica subsiguiente a su unión con FasL (106). Por su parte, FasL es una proteína transmembranal de los linfocitos T citotóxicos que se caracteriza porque interactúa con Fas, bien sea unido a la membrana o bien, en una forma clivada soluble. La ocupación de los receptores Fas y DR5-KILLER por sus respectivos ligandos resulta en su agrupamiento y trimerización (44). A continuación, el reclutamiento de las caspasas iniciadoras 2, 8 ó 10 provoca el clivaje y consiguiente activación de las procaspasas efectoras 3, 6 ó 9 o bien, la amplificación de la cascada proapoptótica (101).

MECANISMOS NO TRANSCRIPCIONALES

Mediante mecanismos independientes de la activación transcripcional, p53 puede ser translocado a la membrana mitocondrial (Fig. 8), donde interactúa con la proteína BAK, lo que implica la ruptura del complejo formado por BAK y una proteína antiapoptótica del grupo Bel-2, llamada Mcl1 (107). BAK, libre de la inhibición impuesta por Mcl1, puede entonces ejercer su efecto inductor de la muerte programada.

En la membrana mitocondrial, la proteína p53 provoca además la liberación rá-

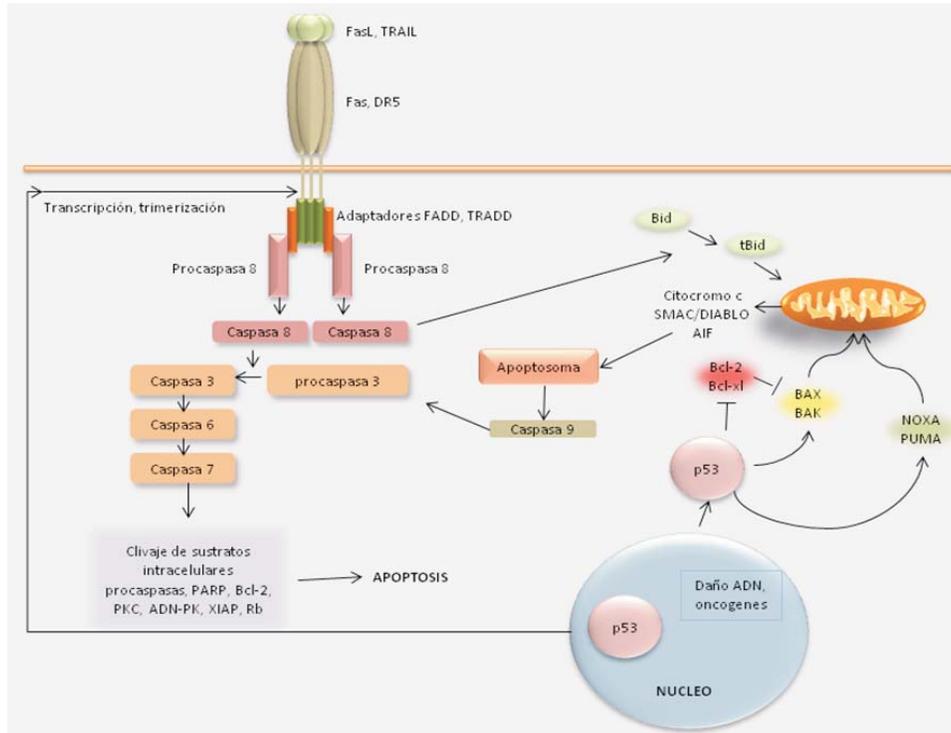


Fig. 8. p53 participa tanto en la vía extrínseca como en la vía intrínseca de inducción de la apoptosis: activa la transcripción y la trimerización de los receptores Fas/DR5, mientras que en la mitocondria permite la liberación de citocromo c.

vida de citocromo c y se une por medio de su dominio central con regiones específicas de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xl antiapoptóticas. Esto explica por qué las mutaciones del gen en esa región alteran la unión con Bcl-xl, aunque la translocación a la mitocondria permanece intacta (108). Se ha demostrado que la localización mitocondrial de p53 depende de la abundancia de la forma pleiotrópica p53Arg72, que actúa como fuerte inductora de la apoptosis (44). Dicha forma se relaciona con el polimorfismo del codón 72 de la proteína, que consiste en la presencia de una citocina o una guanina en el nucleótido 347 del gen, para generar tripletas CCC o CGC. La secuencia CCC se traduce en el aminoácido prolina y CGC en arginina. Estas variaciones pueden afectar la función de la proteína. El caso de p53 es interesante, debido a la gran cantidad de proteínas con las que interactúa y los múltiples procesos celulares en los que intervie-

ne. Se sabe que la presencia de arginina hace que p53 tenga no solo mayor afinidad por mdm2, sino una mayor eficiencia para inducir la apoptosis. Además, los tumores son más oncogénicos con relación a lo que ocurre cuando la prolina está presente. Estudios de asociación de este polimorfismo con el desarrollo de cáncer ovárico epitelial han mostrado una tendencia hacia el aumento en su incidencia en mujeres portadoras del alelo Arg, en poblaciones caucásicas y surafricanas negras, para las cuales se ha observado aparición de la enfermedad a una menor edad en comparación con las portadoras del alelo Pro (109-111). Los resultados de estos estudios coinciden con los hallazgos reportados para otros tipos de cáncer. Así por ejemplo se demostró que la forma Arg/Arg aumentó en casi dos veces más el riesgo de desarrollar cáncer de mama en una población colombiana (112).

Dentro del grupo de genes inducidos por p53 se han identificado algunos cuyos productos generan o responden al estrés oxidativo. Tal es el caso de los genes que codifican enzimas reguladoras del estado redox de la célula, como los PIGs y la ferredoxin-reductasa. Los primeros expresan especies reactivas de oxígeno (ROS), que alteran la integridad de la mitocondria y dan inicio al programa de muerte, mientras que los segundos sensibilizan a las células a la apoptosis inducida por ROS (44). Aunque el estrés oxidativo es el prelude clásico de la activación de p53, éste puede regular la producción de ROS. A su vez, la actividad del gen es controlada por los cambios en el estado redox de la célula (113). POX, gen inducido por p53, codifica la enzima mitocondrial que oxida a la prolina (prolinoxidasas) y genera especies reactivas de oxígeno. En el carcinoma ovárico, p53 induce a la prolina oxidasa, lo que sumado a la generación de ROS, favorece la activación de la calcineurina. La calcineurina a su vez, se encuentra asociada con la calmodulina en un complejo con importantes funciones reguladoras sobre el proceso apoptótico. Cuando ocurre la activación de POX por p53, no sólo aumenta la producción de ROS sino también se produce un flujo de calcio hacia el citosol, tanto desde el medio extracelular, como a partir de las reservas intracelulares. La movilización de calcio activa al complejo calmodulina/calcineurina y permite que la calcineurina actúe mediante defosforilación para modular la actividad de diferentes fosfoproteínas involucradas en el proceso de muerte por apoptosis, como Bcl-2 y Bad (113).

ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DEL CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

Etiología

Se han postulado dos hipótesis con el fin de explicar la transformación maligna

de las células epiteliales ováricas: la primera, llamada "*teoría de la ovulación incesante*" (114), considera que la repetida degradación y reparación del epitelio durante cada ovulación (aproximadamente 400 veces en la vida de la mujer) son factores que favorecen la mutagénesis y la malignidad de ESO. Es entonces factible considerar a la ovulación como un evento inflamatorio agudo, provocado por la proteólisis de la superficie ovárica, seguida por un proceso de reparación tisular susceptible de sufrir desregulación (115). En el momento de la ovulación, el folículo dominante establece contacto con la superficie gonadal para formar el estigma, es decir el sitio donde la ruptura del epitelio permite la expulsión del oocito secundario. El propio epitelio ejerce un efecto inductor sobre la ruptura, pues participa en la proteólisis de la lámina basal y de la túnica albugínea que lo sustentan (11). Por su parte, los leucocitos que han infiltrado al folículo generan la gran mayoría de radicales libres liberados durante la ovulación (116), los que conjuntamente con el flujo isquemia-reperfusión, acompañan a la remodelación tisular periovulatoria (117). Las células epiteliales más próximas, en razón de su elevado grado de exposición a la acción de los mediadores inflamatorios y de las especies reactivas de oxígeno, sufren apoptosis. Cuanto más alejadas se encuentren las células epiteliales del radio de acción de las sustancias oxidantes, la probabilidad de que mueran es menor, lo que no significa que puedan escapar de la influencia de concentraciones subletales de dichas sustancias (118). Como resultado de esta influencia, el epitelio puede ser vulnerable al daño del ADN no reparado, situación explicable si se tiene en cuenta que no ha estado sometido a una elevada presión evolutiva, lo que le permitiría responder en forma exitosa a ovulaciones repetidas. Las células que no sufrieron apoptosis pero estuvieron expuestas a sustancias oxidantes son

las que, con posterioridad a la ovulación, deben proliferar y restaurar el epitelio ovárico, en por lo menos 2/3 partes. Se ha demostrado que la reparación del 1/3 restante está relacionada con el crecimiento folicular previo a la ovulación. En caso de que haya ocurrido daño oxidativo del ADN, p53 puede detener el ciclo ovulatorio durante su fase lútea o bien, según la extensión del daño, reparar la lesión mediante el mecanismo de excisión de bases mediado por la ADN polimerasa β (119). En presencia de mutaciones de supresores tumorales como p53, o de defectos en las vías de reparación del ADN, se podría suponer que las células epiteliales con daño oxidativo del ADN no reparado que participan en el proceso de regeneración son las responsables de la carcinogénesis del epitelio superficial del ovario (120).

La segunda hipótesis, llamada “*estimulación hormonal*”, propone a las gonadotropinas como el principal factor que favorece la transformación maligna de ESO, con base en la demostración de la presencia de receptores específicos en las células epiteliales (121, 122). *In vivo*, la estimulación hormonal produce proliferación de dichas células, mientras que *in vitro* los reportes son variables: algunos muestran que aumentan la actividad mitogénica (123-125) y otros que no la afectan en absoluto (126). Tal diferencia podría explicarse si se tiene en cuenta la posible regulación ejercida por factores promotores de crecimiento liberados localmente. Así, se ha establecido que el tratamiento con gonadotropinas (FSH, LH, hCG) induce apoptosis en ESO normal, debido a que reduce la cantidad de N-cadherina y activa la señalización β -catenina/TCF. Esto sugiere que dicha vía, una vez estimulada por las gonadotropinas, puede regular el comportamiento proliferativo de las células normales de ESO (126).

La FSH ejerce un efecto dual, tanto en favor como en contra de la apoptosis de las

células de ESO. Así, en respuesta a los picos preovulatorios de FSH y LH, las adhesiones intercelulares mediadas por N-cadherina sufren ruptura, mientras que las células epiteliales circundantes mueren por apoptosis. Sin embargo, en otras fases del ciclo como la postovulatoria, con niveles menores de FSH, ocurre proliferación, con el fin de facilitar la reparación tisular. Si en las células epiteliales sobrevivientes se acumularon mutaciones, la posibilidad de que se forme un tumor es muy alta (125). En este orden de ideas, es posible inferir que a mayor número de eventos ovulatorios o con la caída perimenopáusica de la FSH, aumenta el riesgo de cáncer ovárico (10). Se debe tener en cuenta además que las gonadotropinas pueden provocar pérdida de la membrana basal epitelial (127), de manera semejante a lo que ocurre durante la ovulación, lo que genera alteraciones, tanto en la arquitectura tisular, como en las vías de señalización asociadas al contacto intercelular. De alguna manera, la pérdida de la membrana basal favorece los mecanismos de supervivencia celular, lo que conduce a que se seleccionen células que son resistentes a la apoptosis. Así, en ausencia o pérdida de la membrana basal, la estimulación gonadotrópica repetitiva incrementa la probabilidad de que una subpoblación de células epiteliales con mutaciones acumuladas, no solo sobreviva sino también pueda progresar hacia la transformación tumoral (128).

Aunque las dos hipótesis, ovulación incesante y estimulación hormonal, han sido consideradas en forma independiente, existe evidencia de que no son mutuamente excluyentes (129).

Las gonadotropinas no son las únicas hormonas con efecto demostrable sobre las células epiteliales. También los esteroides actúan sobre ellas, de modo que, cuando los estrógenos se unen a los receptores ER α o β desencadenan una señalización que ha sido asociada en algunos casos con apop-

tos (130) y en otros con antiapoptosis (131). Debido a la afinidad que existe entre el complejo estrógenos-ER β y ciertos elementos de reconocimiento de la región promotora de FasL, aumenta la cantidad de proteína FasL y se activa por tanto la vía extrínseca de muerte. Tanto los niveles de expresión de FasL como de ER β cambian a lo largo del ciclo ovárico y esto determina la aparición de variaciones en el patrón de apoptosis inducida por estrógenos. En carcinomas metastásicos ováricos se ha reportado reducción o supresión de la expresión de los receptores ER β , lo que ha llevado a proponerlos como reguladores claves en la transformación metastásica y tumoral de ESO (132).

Las células epiteliales ováricas poseen también receptores para progesterona y para andrógenos. La presencia de los primeros explica los efectos antiproliferativo y antiinflamatorio de los progestágenos, así como el papel protector que éstos ejercen en la gestación y la contracepción oral contra la transformación maligna (115, 123, 133), mientras que los segundos -en razón de su efecto antiapoptótico y a favor de la proliferación- apoyan la asociación entre los andrógenos y la etiología del cáncer ovárico (134).

Estudios con cultivos celulares de ESO de ovejas han demostrado que, con posterioridad a la administración de progesterona, no sólo disminuyen las tasas de proliferación celular -tanto la basal como la estimulada por 17 β -estradiol- sino además aumenta la expresión de p53 (123). Por otra parte, se ha reportado en líneas celulares derivadas de cáncer ovárico epitelial, que la progesterona induce apoptosis y estimula la expresión de p53, lo que indica que el esteroide puede trascender a la transformación maligna para ejercer su acción inhibitoria del crecimiento celular (135, 136).

En todo caso, la actividad mitogénica aumentada de las células epiteliales, indis-

pensable para la reparación de la “herida” de la superficie ovárica, es la responsable de la formación de quistes de inclusión, cuya presencia ha sido relacionada con metaplasias y neoplasias, debido no sólo a que aparecen en mujeres con riesgo hereditario de cáncer ovárico, sino también a que en sus células se han hallado los marcadores müllerianos CA125 y E-cadherina (33) y formas mutantes de p53, así como disfunción de BRCA1. A este respecto, existen reportes que asocian a los marcadores de metaplasia mülleriana con un status de premalignidad del epitelio superficial del ovario (137), mientras que la deficiencia de BRCA1 se conoce que se debe a la metilación de la región promotora (32).

Patogénesis

Los circuitos reguladores de la proliferación y la homeostasis celular están alterados en las células cancerosas. Según Hanahan y Weinberg (34), el catálogo de los cambios celulares y bioquímicos involucrados debe incluir eventos tales como autosuficiencia en las señales promotoras de crecimiento, disminución o ausencia en la respuesta a señales capaces de inhibirlo, evasión de la muerte celular programada, así como un potencial replicativo ilimitado y una capacidad sostenida de angiogénesis y de invasión tisular y metástasis (34). En forma reciente fueron añadidas a este listado las alteraciones metabólicas y lo que podría ser traducido al español como “troncalidad” (stem cell-ness), o sea la característica que presentan algunos tumores que los hace semejantes a células madre y que se encuentra asociada con un mal pronóstico (138, 139).

En el cáncer humano, las mutaciones de p53 juegan un papel central, en especial las missense o sin sentido. Con una frecuencia de 90%, éstas se presentan entre los exones 4 y 10 del gen, en el dominio de unión al ADN y son las responsables de ge-

nerar consecuencias biológicas más acentuadas si se las compara con las mutaciones debidas a la introducción de codones de parada en las secuencias codificantes, o con las mutaciones en dominios diferentes al de unión con el ADN (140). En la transformación y progresión del cáncer del epitelio superficial del ovario, las mutaciones o el silenciamiento de p53 han sido relacionados en forma específica con la disminución o ausencia en la respuesta a las señales inhibitoras del crecimiento (109), a semejanza de lo que ocurre con otros genes como BRCA1, BRCA2 (141), p21, p27 (142, 143), PTEN (144), ARHI (145) y caveolina-1 (146) en sus formas mutadas o silenciadas.

Modelo de Kurman y Shih

Con base en estudios previos de índole clínica, patológica y de genética molecular, Kurman y Shih (147) propusieron en 2008 un modelo para explicar la patogénesis del cáncer ovárico, según el cual los tumores de este órgano se pueden agrupar en dos tipos. Los tipo I son usualmente estables y de crecimiento lento. Se forman a partir de lesiones precursoras bien definidas conocidas como tumores “borderline” y presentan mutaciones en genes como KRAS, BRAF, PTEN y β -catenina. Los tipo II por su parte, son los que exhiben mayor agresividad e inestabilidad genética e incluyen los carcinomas indiferenciados, los serosos de alto grado y los carcinosarcomas (MMMTs). Los tipo II, en forma característica, presentan mutaciones de p53. De aparición muy temprana en la transformación maligna, se cree que dichas mutaciones se han conservado a lo largo de la “evolución” del cáncer, lo que explicaría su presencia en los tumores ováricos, tanto primarios como recurrentes.

Las implicaciones del modelo, que según sus autores no pretende reemplazar a la clasificación histopatológica tradicional, trascienden hacia un nuevo enfoque en la detección temprana y en el tratamiento de

la enfermedad. Ellos argumentaron que las técnicas utilizadas en la actualidad, *vgr.* CA125 sérico y ultrasonido vaginal, no son efectivas en la identificación temprana de los tumores tipo II, que muchas veces se originan en sitios extraováricos y cuando lo hacen en el propio ovario, se diseminan con rapidez fuera de él. Por tal motivo, dichas técnicas sólo serían efectivas en el estadio I de la progresión maligna, cuando la enfermedad se encuentra confinada al ovario, característica que corresponde a los tumores tipo I. Como estrategias válidas para la detección temprana de los tumores tipo II, propusieron en consecuencia, identificar ADN con p53 mutante y/o péptidos provenientes del tumor en los fluidos corporales, o bien, evaluar el volumen tumoral, con posterioridad a la cirugía citorreductiva. La importancia del modelo propuesto radica en el tipo de tratamiento aplicado, mediante la utilización de drogas que en forma selectiva podrían marcar las vías afectadas por las mutaciones (147).

STATUS DE p53 EN EL CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL. RELACIÓN CON PRONÓSTICO, SOBREVIDA Y RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA

En los tumores ováricos malignos de origen epitelial, las mutaciones de p53 constituyen el cambio genético más frecuente (93, 148). Las alteraciones son mayores que las reportadas en ovarios normales o en tumores benignos y están correlacionadas con la inactivación del gen (148-150), lo que hace suponer que, bajo tales circunstancias, el tumor dispone de una ventaja selectiva de crecimiento, con un mayor potencial de proliferación y malignidad (93). Las alteraciones de p53 aparecen hasta en un 80% de carcinomas ováricos, así como en quistes de inclusión (en presencia y en ausencia de atipia), en endometriosis adyacente a tumores ováricos y en

ovarios removidos profilácticamente en mujeres con historia familiar de cáncer (95, 151). El cambio más frecuente en el carcinoma ovárico epitelial, las mutaciones sin sentido simples (152), se localizan en los dominios con mayor grado de conservación evolutiva (II, III, IV y V) (Fig. 1) y están acompañadas por la pérdida del alelo normal remanente (153). Estos cambios han sido asociados con una mayor agresividad y rapidez de la progresión tumoral, así como con una menor esperanza de vida, lo que se explica si se tiene en cuenta la inhibición resultante en la actividad transactivadora transcripcional de p53 sobre sus genes blanco. Así, la prevalencia de las mutaciones de p53 es mayor en los estadios III y IV (40-70%) de la enfermedad, en comparación con la reportada en los estadios I y II (alrededor de 30%) (154), lo que ha llevado a pensar por una parte, que la alteración de p53 puede corresponder a un evento tardío en la progresión tumoral o bien, que la pérdida de p53 es la responsable de la mayor y más agresiva proliferación de las células transformadas (109).

Ante la apoptosis, las mutaciones sin sentido adoptan una conducta particular: determinan una reducción de la tasa de muerte inducida por ciertos fármacos, lo que confiere a las células portadoras una ganancia selectiva de función y disminuye la eficacia de la quimioterapia. Como resultado del cambio mutacional de p53, su proteína anormal se acumula en el núcleo, evento que ha sido demostrado en los tumores de alto grado, así como en estadios avanzados del cáncer y en caso de quimiorresistencia, en especial a la terapia basada en la administración de platino (cis y carboplatino). En contraste, se ha determinado que los tumores ováricos epiteliales con p53 mutado son sensibles a la terapia combinada platino-taxanes, lo que se explica en razón de la capacidad de los taxanes para inducir apoptosis a través de mecanismos

independientes de p53, como es la generación de alteraciones en la función de los microtúbulos (109, 155, 156). Al parecer, el aumento en la sensibilidad a los taxanes resulta de la acumulación de la proteína de p53 mutante en la fase G2/M del ciclo celular (157).

Existe consenso sobre la relación entre las alteraciones de p53 y la sobrevida de las pacientes con cáncer ovárico epitelial. Sin embargo, no hay aún consistencia entre los resultados de los diferentes estudios que han intentado establecer un valor pronóstico para cada mutación en particular sobre la supervivencia global. Con relación a la prognosis del cáncer epitelial ovárico, algunas investigaciones han otorgado valor al status de p53 como indicador pronóstico independiente (158-160), mientras que en otras no se ha podido establecer asociación entre el status del gen y un mal pronóstico (161, 162). En este sentido, Hashiguchi y col. evaluaron en 2004 la correlación entre las alteraciones en los componentes de las vías reguladoras del ciclo celular p14ARF-mdm2-p53 (vía p53), p16-ciclinaD1/CDK4-pRB (vía RB) y ATM-chk2-CDC25-ciclinaB1/CDK1-RB (vía G2) y el pronóstico del cáncer epitelial ovárico humano. Según su estudio, las vías RB y G2 pueden considerarse como factores pronósticos independientes, en contraste con la vía p14ARF-mdm2-p53 a la que no fue posible asignar un valor predictor significativo (162). Según Canevari y col. (109), tal discrepancia podría atribuirse a varias causas, entre las que se encuentran un tamaño de muestra y/o un diseño experimental subóptimos, la carencia de estudios prospectivos, o al hecho probable de que en forma subyacente a la acumulación de p53 existan alteraciones de otros genes reguladores de p53 que podrían provocar confusión en la interpretación de los resultados. Para Hashiguchi y col. (162), también es factible que dichos resultados obedezcan a que la relación en-

tre la prognosis del cáncer ovárico epitelial y el status de p53 está afectada por el tipo histológico de cáncer.

Otros estudios han evaluado en forma simultánea los niveles de expresión de p53 y del también supresor tumoral p21, con la finalidad de establecer un adecuado pronóstico del carcinoma derivado de ESO (151). De acuerdo con sus resultados, cuando la expresión de p21 está aumentada, es mejor el pronóstico, mientras que una baja expresión es indicio de pobre sobrevivencia. Si coexisten niveles bajos de p21 con una elevada expresión de p53, la esperanza de vida disminuye. Si por el contrario, la expresión de p21 está aumentada y la de p53 disminuida, ambos factores tomados en conjunto constituyen un mejor indicador de buena prognosis y sobrevivencia de las pacientes afectadas (151). Por otra parte, con relación a p53 y las proteínas de la familia Bcl-2 en células tumorales de ESO, existe evidencia de asociación entre la disminución de Bcl-2 antiapoptótica y niveles elevados de p53, lo que se explicaría con base en el efecto inhibitorio que éste ejerce sobre Bcl-2 (149). Sin embargo, las pacientes con carcinoma ovárico Bcl-2 positivo tienen un mejor pronóstico que aquellas con tumores p53 positivos-bel-2 negativos (163).

Investigaciones recientes efectuadas en modelos de cáncer ovárico dan cuenta de aproximaciones proteómicas que han permitido generar análisis proteicos diferenciales, así como las primeras representaciones sistemáticas de la enfermedad, lo que tendrá necesaria repercusión en cuanto a pronóstico, sobrevida y respuesta a la quimioterapia del cáncer ovárico epitelial (164-166). Desde Hashiguchi y col. (148), pioneros en el análisis simultáneo de los componentes de la vía p14ARF-mdm2-p53 que opera en el checkpoint G1/S del ciclo celular, hasta Gagné y col. (167) quienes en 2007 evaluaron en forma cuantitativa los perfiles de expresión de proteínas involucra-

das en actividad transcripcional, metabolismo celular, adhesión o motilidad y organización del citoesqueleto, en dos líneas celulares de cáncer epitelial ovárico -de alta y de baja malignidad- cada día es más claro que es el análisis de expresión génica diferencial el que ofrece mejores perspectivas en la comprensión de los cambios bioquímicos y moleculares asociados con la progresión tumoral, no sólo del epitelio superficial del ovario, sino de cualquier otro tipo de tejido.

De acuerdo con las anteriores consideraciones, con el objetivo de predecir la probable respuesta terapéutica a drogas efectivas, es pertinente no sólo establecer el status de p53, sino también tomar en cuenta los niveles de expresión de otros genes relacionados.

p53 COMO BLANCO TERAPÉUTICO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

El estudio molecular de las células cancerosas ha permitido avanzar en el conocimiento de la complejidad de las redes de señalización que hacen posible su proliferación descontrolada y que, paradójicamente, constituyen su talón de Aquiles. Aunque debido a la pérdida de función de genes asociados con la supresión tumoral, la conexión entre ésta y la proliferación se encuentra interrumpida, se trata de células potencialmente vulnerables a las terapias contra la enfermedad, pues los programas de senescencia y apoptosis permanecen intactos y susceptibles por tanto de ser intervenidos por el hombre.

En este orden de ideas y en razón de que muchos tipos de tumores han perdido la función de p53, nuevas y diversas estrategias han estado orientadas a su utilización como blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer, entre ellos el ovárico de origen epitelial.

Restauración de la función normal de p53 mutante

La búsqueda de moléculas capaces de reactivar a p53 mutado está fundamentada en la evidencia de que ellas pueden provocar un plegamiento en la proteína alterada, para recuperar la estructura espacial requerida para interactuar con sus pares funcionales, lo que no solo restablece la función normal wild-type (WT), sino que además aumenta la actividad transactivadora del gen, con la ventaja de no generar una respuesta inmune (138, 152). Esto hace posible la apoptosis masiva, aunque las células normales que tienen baja expresión de p53 permanecen inalteradas. Dentro de este grupo de drogas se encuentran moléculas como *PRIMA-1*, *PRIMA-1^{Met}*, *Cp-31398*, *CDB-3*, *MIRA-1*, *WR1675*, *elipticina* y *proteína adaptadora quimérica*, entre otros.

- *PRIMA-1* (reactivador de p53 e inductor de apoptosis masiva), mediante mecanismos aún no completamente aclarados, induce apoptosis en células cancerosas humanas con diferentes mutaciones de p53, sin afectar a las portadoras de la forma WT. Esto lo hace único entre todos los agentes quimioterapéuticos utilizados en la clínica, y en especial de la cisplatina y el 5'-fluorouracilo que poseen mayor eficacia contra los tumores con p53WT(168). *PRIMA-1* activa además la transcripción de p21, mdm2 y PUMA, genes blanco que actúan como supresores tumorales (152, 153).
- *PRIMA-1^{Met}* por su parte, ha demostrado ser más efectiva que *PRIMA-1*. Se ha usado con éxito en terapia conjunta con cisplatina con el fin de inducir apoptosis en los tumores con formas mutadas de p53, usualmente quimiorresistentes (169). Su efecto, aún no totalmente dilucidado, parece estar relacionado con la inducción de la acumulación de p53 mutado en el nucleolo.

- *Cp-31398* es una estirilquinazolina que restaura la función normal de las formas mutantes de p53 (en los nucleótidos 173, 241 y 249) y permite recuperar la capacidad de transactivación transcripcional de p53 sobre p21/CDKN1 y BAX. Activa además las vías extrínseca e intrínseca de inducción de la apoptosis (170) e inhibe la ubiquitinación de p53 y la estabiliza. En adición, *Cp-31398* actúa sobre p53WT, de modo que aumenta tanto su expresión como su actividad. Al igual que *PRIMA-1*, *Cp-31398* no tiene efectos tóxicos demostrables (153).
- *CDB-3* es un péptido de nueve aminoácidos que presenta selectividad por las células tumorales con p53 mutado, sobre las que actúa mediante diversos mecanismos. Promueve la estabilización de p53, corrige las proteínas mutadas, induce la transcripción de los genes blanco mdm2, GADD45α y p21 y activa el programa de apoptosis (152, 171).
- *MIRA-1* rescata la conformación espacial de la molécula y la función de las formas mutantes de p53 Gln-248, Tyr-176/Trp-248, His-175 y Trp-282 (153), a través de la modificación covalente de los residuos de cisteína. Con los grupos tiol y amino las proteínas se unen por medio del grupo maleimida, lo que evita la formación de puentes disulfuro que puedan interferir con el plegamiento correcto y originar por tanto agregados proteicos inactivos. Como inductor de la apoptosis, *MIRA-1* actúa en un tiempo cuatro veces menor que *PRIMA-1* con una mayor potencia (172).
- *WR1065* es un derivado de la amifostina, agente quimio y radioprotector utilizado en el tratamiento contra el cáncer. Actúa tanto en tumores p53WT mediante mecanismos redox-depen-

dientes, así como en células con la mutación p53Met272, en las que restaura la función WT y activa la transcripción de genes blanco (172-174).

- La *elipticina* pertenece a una familia de compuestos de tipo alcaloide derivados de la planta australiana *Ochrosia elliptica*, con actividad centrada en el rescate y restauración de la función WT de las proteínas mutantes His-175, Trp-248, Ser-249 e His-273. El mecanismo de acción posiblemente obedece a la alteración de la fosforilación de p53 y a la inhibición de enzimas celulares como CDK, topoisomerasa 2 y caseína quinasa II. Por otra parte induce la transcripción de p21 y mdm2. No obstante, su utilización ha sido restringida debido a que produce efectos colaterales indeseables (171,175).
- *Proteína adaptadora quimérica*. A partir de los dominios de tetramerización y unión a ADN de p73 (miembro de la familia de proteínas relacionadas con p53) y de oligomerización de p53 se construyó una proteína adaptadora que hace las veces de puente entre el gen p53 mutado y sus secuencias blanco de ADN. Como resultado, activa la transcripción de los genes blanco de p53, en presencia de la forma mutada de dicho gen (176).

Terapia génica

Reconstitución de p53 WT. En años recientes se han llevado a cabo investigaciones con el objetivo de lograr una función óptima de p53 en células tumorales con el gen mutado. Así, se han desarrollado técnicas basadas en la introducción de p53 exógeno a través de vectores como retro y adenovirus, así como de derivados de vacunas (152). Los ensayos en diversos tipos de carcinomas (próstata, cabeza y cuello o pulmonar de células-no-pequeñas), con vectores adenovirales (tanto competentes como defi-

cientes en cuanto a replicación) que reconstituyen la función de p53, parecen promisorios (177-180). Sin embargo, en pacientes con cáncer ovárico, distan de ser alentadores. A un grupo de éstas, con tumores estadio III con p53 mutado, se les administró vía intraperitoneal un vector adenoviral p53 WT (con deficiencia replicativa), en forma simultánea con la quimioterapia estándar carboplatina y paclitaxel. Según Zeimet y Marth (128), no se obtuvieron resultados exitosos por varias razones, entre otras por la baja eficacia del sistema vector adenoviral para unirse a los receptores CAR (del inglés coxsackie-adenovirus vector) y a las integrinas clase $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$, la inmunidad celular innata antiadenoviral, la incapacidad de la proteína producida para restaurar por sí sola toda la vía de señalización deshabilitada, la inactivación de las vías en las que participa el gen a través de su posible desregulación epigenética, así como también debido al efecto dominante negativo de la forma mutada, que impide la tetramerización de la proteína normal introducida, afectando la función transactivadora (128).

Marcaje con adenovirus E1B deficientes. También se ha utilizado el marcaje de las células cancerosas con ONYX-015. Este adenovirus carece de E1B55kD, proteína que inactiva p53 e inhibe por tanto la apoptosis de las células normales infectadas. Por tanto, cuando las células con p53 mutado son infectadas con ONYX-015, éste puede replicarse libremente y provocar la muerte celular (171). La administración de ONYX-015 ha demostrado ser más eficaz cuando se utiliza en combinación con quimioterapia (181), y en especial aplicado directamente sobre ciertos tipos de tumores (182, 183). En pacientes con cáncer ovárico recurrente por el contrario, aún no existe evidencia concluyente acerca de la efectividad de ONYX-015 como agente terapéutico de primera línea (184).

Activación de p53WT. Esta estrategia reviste especial utilidad en el caso de células tumorales que si bien no presentan mutaciones en p53, tienen alteraciones que se traducen en una pobre estabilización y activación del gen. Sin embargo, es posible lograr la acumulación de p53 y la posterior activación de sus genes blanco mediante moléculas inhibitoras de la interacción p53-mdm2 (el análogo humano de mdm2) (185-187), como la nutlina 3 y RITA, que pueden ser utilizados solos o en combinación con radiación o con quimioterapia (188).

La nutlina 3, un análogo *cis*-imidazol, mimetiza a los residuos de p53 que interactúan con mdm2, a saber Phe-19, Trp-23 y Leu-26 (153). El resultado es la disminución de la afinidad de p53 por mdm2, con la consiguiente estabilización de la proteína p53 e inhibición de la ubiquitinación y la degradación proteasomal (189). Aún no se sabe con exactitud que tan precisa es la nutlina 3 en cuanto a su selectividad por las células tumorales, lo que representa un obstáculo para su utilización, si se tiene en cuenta que probablemente también activa a p53 en células normales (39, 152). RITA por su parte, es un derivado furano que se une al extremo N-terminal de p53, de modo que evita su interacción con mdm2, tanto *in vitro* como *in vivo* (190). Esto hace que p53 se acumule, con la consiguiente activación de sus genes blanco. En adición, la inducción de la apoptosis mediada por RITA depende de la presencia de p53WT en células tumorales, con poco efecto sobre las células normales, como ha sido demostrado en estudios realizados en ratones (153). La interacción p53-mdm2 también es utilizada en la actualidad como blanco para la acción de péptidos pequeños, entre los que se encuentran un péptido mimético basado en triptófano (190), así como péptidos sintéticos correspondientes a ciertos fragmentos de la secuencia de p53 (170) que no sólo

estabilizan a p53 con una gran eficiencia o restauran su forma mutante, sino además inducen la consecuente vía apoptótica.

La actividad mdm2 puede ser también objeto de marcaje, con el fin de disminuir la afinidad de p53 por dicha proteína. Para esto se han utilizado los compuestos HLI98, que inhiben la actividad E3 ligasa de mdm2. Como consecuencia, p53 se acumula, induce la expresión de sus genes blanco y activa el proceso de apoptosis (187).

Inhibición de la activación de p53WT. Aunque el buen sentido indica que restaurar la función normal de p53 es beneficioso pues debería aumentar la eficacia de la quimioterapia, evidencias en sentido opuesto, obtenidas en estudios con células epiteliales ováricas cancerosas, demuestran que las consecuencias inmediatas de dicha acción, como la detención del ciclo y posterior reparación del ADN, constituyen un impedimento para lograr el objetivo de la quimioterapia en cuanto a la generación del daño del ADN (191). Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la inhibición de p53 protegería a las células normales de los efectos colaterales asociados a la quimioterapia, lo que justifica el interés cada vez mayor en investigar acerca de las consecuencias de inactivar dicho gen (38, 192).

PERSPECTIVAS

Debido a la aparición de quimiorresistencia, sólo un 30% de las pacientes con cáncer derivado del epitelio superficial del ovario logran sobrevivir más de 18 meses, después de la aplicación de quimioterapia de primera línea, sin importar que antes del tratamiento existiese susceptibilidad a las drogas utilizadas. En razón del papel relevante que juega p53 en eventos tales como histogénesis, mutagénesis y oncogénesis de ESO, el conocimiento de las vías de señalización en las que está implicado, tanto en células normales como cancerosas de este

tejido, provee las herramientas necesarias para prevenir y detener tanto la transformación maligna como la resistencia a los fármacos anticancerosos.

A pesar de que en los últimos años se han obtenido moléculas pequeñas que permiten restablecer algunas de las funciones de p53, se requieren mayores esfuerzos en la investigación que incluyan análisis fundamentados en farmacogenética, proteómica y metabolómica, que hagan posible la identificación del andamiaje molecular sobre el que se apoya el gen en los tumores humanos. Esto facilitará el hallazgo de compuestos más potentes, no sólo con un efecto antitumoral significativo, sino además con baja citotoxicidad y con un perfil farmacodinámico apropiado, que permitan una mejor aproximación terapéutica para el tratamiento del cáncer derivado del epitelio superficial del ovario.

REFERENCIAS

1. De Leo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:2420-2424.
2. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187:112-187.
3. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10: 431-442.
4. Greenblatt M, Harris C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:855-878.
5. Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:233-240.
6. Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Okada S, Matsuura S, Hirohashi S. High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with nuclear accumulation of p53 protein and tumor DNA aneuploidy. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 978-984.
7. Kappes S, Milde-Langosch K, Kressin P, Passlack B, Dockhorn-Dworniczak B, Röhlk P, Löning T. p53 mutations in ovarian tumors, detected by temperature-gradient gel electrophoresis, direct sequencing and immunohistochemistry. *Int J Cancer* 1995; 64:52-59.
8. Wen HW, Reles A, Runnebaum IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, Felix JC, Kreienberg R, el-Naggar A, Press MF. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18:29-41.
9. Bast Jr RC, Jacobs I, Berchuck A. Malignant transformation of ovarian epithelium. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:556-558.
10. Auersperg N, Wong AST, Choi KC, Kang SK, Leung PCK. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev* 2001; 22:255-288.
11. Murdoch WJ, McDonnell AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction* 2002; 123:43-750.
12. Satoh M. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 1991; 177: 85-107.
13. Gottlieb E, Haffner R, King A, Asher G, Gruss P, Lonai P, Oren M. Transgenic mouse model for studying the transcriptional activity of the p53 protein: age- and tissue-dependent changes in radiation-induced activation during embryogenesis. *EMBO J* 1997; 16: 1381-1390.
14. Almog N, Rotter V. Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333:1-27.
15. Quenby SM, Gazvani MR, Brazeau C, Neilson J, Lewis-Jones DI, Vince G. Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester of human fetal gonadal development. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:737-741.
16. Abir R, Orvieto R, Dicker D, Zukerman Z, Barnett M, Fisch B. Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. *Fertil Steril* 2002; 78:259-264.
17. Vainio S, Heikkila, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397:405-409.

18. **Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder R, Xu X, Hamilton TC.** Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell* 2004; 5:19-24.
19. **Jacobs I, Bast Jr RC.** The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989; 4:1-12.
20. **Bast RC, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB.** CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers* 1998; 13:179-187.
21. **Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Schmandt R, Whitaker R, Gershenson DM, Mills GB, Bast RC Jr.** Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3291-3300.
22. **Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF, Liotta LA.** Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer* 2004; 40:2604-2612.
23. **Murdoch WJ.** Metaplastic potential of p53 down-regulation in ovarian surface epithelial cells affected by ovulation. *Cancer Lett* 2003; 191:75-81.
24. **Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, Roskelley CD.** E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6249-6254.
25. **Auersperg N, Ota T, Mitchell GW.** Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 691-703.
26. **MacCalman CD, Farooki R, Blaschuk OW.** Estradiol and progesterone regulate E-cadherin mRNA levels in the mouse uterus. *Endocrine* 1994; 2:485-490.
27. **Cağatay T, Ozturk M.** p53 mutation as a source of aberrant b-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene* 2002; 21:7971-7980.
28. **Merle P, De La Monte S, Kim M, Herrmann M, Tanaka S, Von Dem Bussche A, Kew MC, Trepo C, Wands JR.** Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127:1110-1122.
29. **Gregoire L, Rabah R, Schmelz EM, Munkarah A, Roberts PC, Lancaster WD.** Spontaneous malignant transformation of human ovarian surface epithelial cells *in vitro*. *Clin Cancer Res* 2001; 7:4280-4287.
30. **Cvetkovic D.** Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:68.
31. **Okamura H, Katabuchi H, Ohba T.** What we have learned from isolated cells from human ovary? *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202:37-45.
32. **Hennessy BT, Mills GB.** Ovarian cancer: Homeobox genes, autocrine/paracrine growth, and kinase signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:1450-1456.
33. **Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, Ragupathi G, Livingston PO.** Selection of tumor antigens as targets or immune attack using immunohistochemistry: protein antigens. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2669-2676.
34. **Hanahan D, Weinberg RA.** The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
35. **Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM.** p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006; 312:1650-1653.
36. **Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM.** DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; 126, 121-134.
37. **Christophorou MA, Ringhausen I, Finch AJ, Brown Swigart L, Evan GI.** The pathological p53-mediated response to DNA damage is distinct from p53 mediated tumor suppression. *Nature* 2006; 443:214-217.
38. **Vousden KH, Lane D.** p53 in health and disease. *Mol Cell Biol* 2007; 8: 275-283.
39. **Lassus P, Ferlin M, Piette J, Hibner U.** Antiapoptotic activity of low levels of wild type p53. *EMBO J* 1996; 15:4566-4573.
40. **Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM.** The antioxidant function of the p53

- tumor suppressor. *Nat Med* 2005; 11: 1306-1313.
41. **Kortleverm RM, Higgins PJ, Bernards R.** Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 2006; 8:877-884.
 42. **Bensaad K, Vousden KH.** p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol* 2007;17(6): 286-291
 43. **Slee EA, O'Connor DJ, Lu X.** To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 2004; 23:2809-2818.
 44. **Lane DP.** p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.
 45. **Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Cheng S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S.** Pirh2, a p53-induced ubiquitin protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 2003; 112:779-791.
 46. **Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM.** The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 2004; 429:86-92.
 47. **Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 79-85.
 48. **Lou Z, Chen J.** Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res* 2006; 312:2641-2646.
 49. **Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, Salvagno C, Avolio F, Volinia S, Ronai Z, Blandino G, Schneider C, Del Sal G.** The prolyl isomerase PIN1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* 2002; 419: 853-857.
 50. **Berger M, Stahl N, El Sal G, Haupt Y.** Mutations in proline 82 of p53 impair its activation by PIN1 and ChK2 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5380-5388.
 51. **Lee MH, Lozano G.** Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 σ and other proteins. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 225-234.
 52. **Levine AJ.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:23-331.
 53. **Linke S, Clarkin K, DiLeonardo A, Tsou A, Wahl G.** A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* 1996; 10:934-937.
 54. **Lowe SW, Cepero E, Evan G.** Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432:307-315.
 55. **Deng CX.** BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:416-1426.
 56. **Apella E, Anderson CW.** Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 2001; 268:2764-2772.
 57. **Kastan MB, Bartek J.** Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004, 432:316-323.
 58. **Artandi SE, Attardi LD.** Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:881-890.
 59. **Cao L, Kim S, Xiao C, Wang RH, Coumoul X, Wang X, Li WM, Xu XL, De Soto JA, Takai H, Mai S, Elledge SJ, Motoyama N, Deng CX.** ATM-ChK2-p53 activation prevents tumorigenesis at an expense of organ homeostasis upon BRCA1 deficiency. *EMBO J* 2006; 25:2167-2177.
 60. **Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ.** ATM, ATR, and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 2003; 24:1571-1580.
 61. **Achanta G, Pelicano H, Feng L, Plunkett W, Huang P.** Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer Res* 2001; 61: 8723-8729.
 62. **Woo RA, Jack MT, Xu Y, Burma S, Chen DJ, Lee PW.** DNA damage-induced apoptosis requires the DNA-dependent protein kinase and is mediated by the latent population of p53. *EMBO J* 2002; 21:3000-3008.
 63. **Sherr CJ.** Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:663-673

64. **McCarthy N.** Tumour suppressors: End of the old guard? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 745.
65. **Lowe SW, Sherr CJ.** Tumor suppression by Ink4a-Arf: Progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13:77-83.
66. **Ben-Porath I, Weinberg RA.** The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 961-976.
67. **Efeyan A, Serrano M.** p53: Guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007; 6:1006-1010.
68. **Wahl GM, Carr AM.** The evolution of diverse biological responses to DNA damage: Insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 2001; 3:E277-E286.
69. **Webley K, Bond JA, Jones CJ, Blaydes JP, Craig A, Hupp T, Wynford-Thomas D.** Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 2000; 20:2803-2808.
70. **Fujioka S, Schmidt C, Selabas GM, Li ZK, Pelicano H, Peng B, Yao A, Niu J, Zhang W, Evans DB, Abbruzzese JL, Huang P, Chiao PJ.** Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-KB. *J Biol Chem* 2004; 279: 27549-27559.
71. **Llanos S, Clark PA, Rowe J, Peters G.** Stabilization of p53 by p14(ARF) without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2001; 3:445-452.
72. **Rodway H, Llanos S, Rowe J, Peters G.** Stability of nucleolar vs non nucleolar forms of human p14(ARF). *Oncogene* 2004; 23:6186-6192.
73. **Rocha S, Garret MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND.** Regulation of NF-KB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *EMBO J* 2005; 24:1157-1169.
74. **Fan S, Wang JA, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auburn KJ, Goldberg ID, Rosen EM.** BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 1999; 284: 1354-1356.
75. **Utrera R, Collavin L, Lazarevic D, Delia D, Schneider C.** A novel p53-inducible gene coding for a microtubule-localized protein with G2-phase-specific expression. *EMBO J* 1998 17:5015-5025.
76. **Roninson LB.** Oncogenic functions of tumour supresor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 2002; 179: 1-14.
77. **Zhang H, Hannon G, Beach D.** p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Gene Dev* 1994; 8: 1750-1758.
78. **Waldmann T, Kinzler KW, Vogelstein B.** p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55:5187-5190.
79. **McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G.** Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 1998; 8:351-354.
80. **Herbig U, Sedivy JM.** Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev* 2006; 127:16-24.
81. **Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Udo Kontny H, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace AJ Jr, Harris CC.** GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:3706-3711.
82. **Zhang Y, Bhatia D, Xia H, Castranova V, Shi X, Chen F.** Nucleolin links to arsenic-induced stabilization of GADD45a mRNA. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:485-495.
83. **Lodygin D, Diebold J, Hermeking H.** Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3 sigma expression. *Oncogene* 2004; 23: 9034-9041.
84. **Uchida D, Begur NM, Almofti A, Kawamata H, Yoshida H, Sato M.** Frequent downregulation of 14-3-3 sigma protein and hypermethylation of 14-3-3 sigma gene in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 91:1131-1138.
85. **Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N.** Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced

- disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2687-2693.
86. **Lodygin D, Hermeking H.** The role of epigenetic inactivation of 14-3-3 sigma in human cancer. *Cell Res* 2005; 15: 237-246.
 87. **Moll UT, Wolff S, Speidel D, Deppert W.** Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17:631-636.
 88. **Vousden KH, Lu X.** Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 594-604.
 89. **Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ.** Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1 and Mf2 during apoptosis. *J Cell Biol* 2002; 159:931-938.
 90. **Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, Nakamura K, Nakamura Y, Arakawa H.** p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res* 2002; 62: 2883-2889.
 91. **Antignani A, Youle RJ.** How do bax and bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18 685-689.
 92. **Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krayeswki S, Reed JC.** Immediate early upregulation of Bax expression by p53 but not TGF beta: A paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 1994; 9:1791-1798.
 93. **Preethi TR, Chacko P, Lakshmi Kesari A, Praseeda I, Chellam VG, Radhakrishna Pillai M.** Apoptosis in epithelial ovarian tumors. *Pathol Res Pract* 2002; 198:273-280.
 94. **Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS.** Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 1998; 18:1363-1373.
 95. **Nnene IO, Nieto JJ, Crow JC, Sundaresan M, MacLean AB, Perret CW.** Cell cycle and apoptotic proteins in relation to ovarian epithelial morphology. *Gynecol Oncol* 2004; 92:247-251.
 96. **De La Torre FJ, García A, Gil-Moreno A, Planaguma J, Reventos J, Ramón y Cajal S, Xercavins J.** Apoptosis in epithelial ovarian tumours. Prognostic significance of clinical and histopathological factors and its association with the immunohistochemical expression of apoptotic regulatory proteins (p53, bel-2 and bax). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 130: 121-128.
 97. **Langlois NE, Lamb J, Eremin O, Heis SD.** Apoptosis in colorectal carcinoma occurring in patients aged 45 years and under: relationship to prognosis, mitosis and immunohistochemical demonstrations of p53, c-myc and bel-2 protein products. *J Pathol* 1997; 182:392-397.
 98. **Wyllie AH.** Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* 1997; 73:189-197.
 99. **Bourdon JC, Renzing J, Robertson PL, Fernandes KN, Lane DP.** Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane *J Cell Biol* 2002; 158:235-246.
 100. **Jiang X, Wang X.** Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000; 275:31199-31203.
 101. **Ashe PC, Berry MD.** Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 199-214.
 102. **Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C.** Bel-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome C. *Nature* 1998; 391: 496-499.
 103. **Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR.** Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; 303:1010-1014.
 104. **Brustmann H.** Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression in serous ovarian carcinoma: correlation with p53, MIB-1 and outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26:147-153.
 105. **Takimoto R, El-Deiry WS.** Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific

- DNA-binding site. *Oncogene* 2000; 19: 1735-1743.
106. **Quirk SM, Cowan RG, Huber SH.** Fas antigen-mediated apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology* 1997; 138:4558-4566.
 107. **Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL.** Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6:443-450.
 108. **Haupt Y, Robles AI, Prives C, Rotter V.** Deconstruction of p53 functions and regulation. *Oncogene* 2002; 21:8223-8231.
 109. **Canevari S, Gariboldi M, Reid JF, Bongarzone I, Pierotii MA.** Molecular predictors of response and outcome in ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 60:19-37.
 110. **Wang Y, Kringen P, Kristensen GB, Holm R, Baekelandt MM, Olivier M, Skomedal H, Hainaut P, Trope CG, Abeler VM, Nesland JM, Borresen-Dale AL, Helland Å.** Effect of the codon 72 polymorphisms (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma. *Hum Mut* 2004; 24:21-34.
 111. **Pegoraro RJ, Moodley M, Rom I, Chetty R, Moodley J.** p53 codon polymorphism and BRCA 1 and 2 mutations in ovarian epithelial malignancies in black south africans. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 444-449.
 112. **Pinto Y, Ibáñez M, Ramírez S, Sánchez W, Vanegas D.** Polimorfismos del gen p53 en cáncer mamario familiar en una población colombiana. *Rev Col Cirugía* 2007; 22:17-26.
 113. **Rivera A, Mavilla A, Bayless KJ, Davis GE, Maxwell SA.** Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest and mitotic catastrophe in renal, ovarian and lung carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:1425-1439.
 114. **Fathalla MF.** Incessant ovulation -a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2:163.
 115. **Rae MT, Hillier SG.** Steroid signaling in the ovarian surface epithelium. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16:327-333.
 116. **Behrman, HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S.** Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynec Invest* 2001; 8:S40- S42.
 117. **Murdoch WJ.** Carcinogenic potential of ovulatory genotoxicity. *Biol Reprod* 2005; 73: 586-590.
 118. **Murdoch WJ, Martinechick JF.** Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and chemoprevention. *Exp Biol Med* 2004; 229:546-552.
 119. **Murdoch WJ, Townsend RS, McDonnell AC.** Ovulation-induced DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ewes: Prospective regulatory mechanisms of repair/survival and apoptosis. *Biol Reprod* 2001; 65:1417-1424.
 120. **Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ.** Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol* 2000; 16:567-576.
 121. **Ji Q, Liu PI, Chen PK, Aoyama C.** Follicle stimulating hormone-induced growth promotion and gene expression profiles on ovarian surface epithelial cells. *Int J Cancer* 2004; 12:803-814.
 122. **Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Tsuruta Y, Kusakari T, Kariya M, Fujii S.** Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and hCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor 1. *Int J Cancer* 2001; 91: 309-315.
 123. **Murdoch WJ, Van Kirk EA.** Steroid hormonal regulation of proliferative p53 tumor suppressor and apoptotic responses of sheep ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186::61-67.
 124. **Stewart SL, Querec TD, Gruver BN, O'Hare B, Babb JS, Patriotis C.** Gonadotropin and steroids hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium. *J Cell Physiol* 2004; 198: 119-124.
 125. **Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC.** Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev* 2007; 28:440-461.
 126. **Pon YL, Wong AST.** Gonadotropin-induced apoptosis in human ovarian surface epithelial cells is associated with cyclo-

- oxygenase-2 up-regulation via the β -catenin/t-cell factor signaling pathway. *Mol Endocrinol* 2006; 20:3336-3350.
127. Roland IH, Yang WL, Yang DH, Daly MB, Ozols RF, Hamilton TC, Lynch HT, Godwin AK, Xu XX. Loss of surface and cyst epithelial basement membranes and pre-neoplastic morphological changes in prophylactic oophorectomies. *Cancer* 2003; 98:2607-2623,
128. Zeimet AG, Marth C. Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol* 2003; 4:415-422.
129. Gaytán M, Sánchez MA, Morales M, Bellido C, Millán Y, Martín de las Mulas J, Sánchez-Criado JE, Gaytán F. Cyclic changes of the ovarian surface epithelium in the rat. *Reproduction* 2005; 129: 311-321.
130. Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, Lazennec G. Involvement of estrogen receptor β in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64:5861-5869.
131. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology* 2001; 142:2351-2360.
132. Sapi E, Brown WD, Aschkenazi S, Lim C, Munoz A, Kacinski BM, Rutherford T, Mor G. Regulation of Fas ligand expression by estrogen in normal ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2002; 9:243-250.
133. Berchuck A, Schildkraut JM, Wenham RM, Calingaert B, Ali S, Henriott A, Halabi S, Rodriguez GC, Gertig D, Purdie DM, Kelemen L, Spurdle AB, Marks J, Chenevix-Trench G. Progesterone receptor promoter +331a polymorphism is associated with a reduced risk of endometrioid and clear cell ovarian cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 2141-2147.
134. Lukanov A, Kaaks R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 98-107.
135. Bu SZ, Yin DL, Ren XH, Jiang LZ, Wu ZJ, Gao QR, Pei G. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer* 1997; 79:1944-1950
136. Fleming JS, Beaugi CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 247:4-21
137. Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 2001; 38:87-85.
138. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432:324-331.
139. Lahad JP, Mills GB, Coombes KR. Stem cell-ness: "a magic marker" for cancer. *J Clin Invest* 2005; 115:1463-1467.
140. Beroud C, Soussi T. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:200-204.
141. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, Jack E, Vesprini DJ, Kuperstein G, Abrahamson JL, Fan I, Wong B, Narod SA. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Genet* 2001; 68:700-710.
142. Plisiecka-Halasa J, Karpinska G, Szymanska T, Ziolkowska I, Madry R, Timorek A, Debniak J, Ulanska M, Jedryka M, Chudecka-Glaz A, Klimek M, Rembiszewska A, Kraszewska E, Dybowski B, Markowska J, Emerich J, Pluzanska A, Goluda M, Rzepka-Gorska I, Urbanski K, Zielinski J, Stelmachow J, Chrabowska M, Kupryjanczyk J. P21WAF1, P27KIP1, TP53, and C-MYC analysis in 204 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimens. *Ann Oncol* 2003; 14:1078-1085.
143. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, Yu Y, Lu KH, Diamandis EP, Hellstromf I, Mokg SC, Liua J, Bast RC Jr. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 99:267-277.
144. Shih I-M, Kurgan RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164:1511-1518.

145. **Rosen DG, Wang L, Jain AN, Lu KH, Luo RZ, Yu Y, Liu J, Bast RC Jr.** Expression of the tumor suppressor gene ARHI in epithelial ovarian cancer is associated with increased expression of p21WAF1/CIP1 and prolonged progression-free survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6559-6566.
146. **Bagnoli M, Tomassetti A, Figini M, Flati S, Dolo V, Canevari S, Miotti S.** Downmodulation of caveolin-1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to a-folate receptor overexpression. *Oncogene* 2000; 19:4754-4763.
147. **Kurman RJ, Shih I-M.** Pathogenesis of ovarian cancer: Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27:151-160.
148. **Hashiguchi Y, Tsuda H, Yamamoto K, Inoue T, Ishiko O, Ogita S.** Combined analysis of p53 and Rb pathways in epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol* 2001; 32:988-996.
149. **Chan W, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC.** Bel-2 and p53 protein expression, apoptosis and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000; 156:409-417.
150. **Hauptman S, Dintel M.** Serous tumors of low malignant potential of the ovary-molecular pathology-part 2. *Virchows Arch* 2001; 438:539-551.
151. **D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A.** Cell cycle genes in ovarian cancer: Steps toward earlier diagnosis and novel therapies. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8132-8141.
152. **Stoklosa T, Golab J.** Prospects for p53-based cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 2005; 52:321-328.
153. **Wiman KG.** Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ* 2006; 13:921-926.
154. **Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, Wiseman R, Boyd J, Bast RC Jr.** The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:246-252.
155. **Reles A, Wen WH, Schmider A, Gee C, Runnebaum IB, Kilian U, Jones A, El-Naggar A, Minguillon C, Schonborn I, Reich O, Kreienberg R, Lichtenegger W, Press MF.** Correlation of p53 mutation with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2984-2997.
156. **Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M, Gatti L, Perego P, Bresciani G, Pierotti MA, Scambia G, Ferrandina G, Fagotti A, Mangioni C, Lucchini V, Vecchione F, Bolis G, Scarfone G, Zunino F.** P53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18:3936-3945.
157. **Wahl AF, Donaldson KL, Fairechild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW, Galloway DA.** Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med* 1996; 2:72-79.
158. **Concin N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E, Ulmer H, Daxenbichler G, Zeimet A, Zeillinger R, Marth C, Moll UM.** Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* 2004; 64:2449-2460.
159. **Shahin MS, Hughes JH, Sood AK, Buller RE.** The prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 2006-2017.
160. **Geisler HE, Geisler JP, Miller GA, Geisler MJ, Wiemann MC, Zhou Z, Crabtree W.** P21 and p53 in ovarian cancer. Their combined staining is more valuable than either alone. *Cancer* 2001; 92:781-786.
161. **Fallows S, Price J, Atkinson RJ, Johnston PG, Hickey I, Russell SE.** P53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. *J Pathol* 2001; 194:68-75.
162. **Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, Nishimura S, Suzuki T, Kawamura N.** Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian patients. *Hum Pathol* 2004; 35:165-175.
163. **Basu A, Haldar S.** The relationship between Bel2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1099-1109.

164. Lancaster JM, Dressman HK, Clarke JP, Sayer RA, Martino MA, Cragun JM, Henriott AH, Gray J, Sutphen R, Elahi A, Whitaker RS, West M, Marks JR, Nevins JR, Berchuck A. Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1733-1745.
165. Lee BC, Cha K, Avraham S, Avraham H. Microarray analysis of differentially expressed genes associated with human ovarian cancer. *Int J Oncol* 2004; 24: 847-851.
166. Gagné JP, Gagné P, Hunter JM, Bonicalzi ME, Lemay JF, Kelly I, Le Page C, Provencher D, Mes-Masson AM, Droit A, Bourgeois D, Poirier GG. Proteome profiling of human epithelial ovarian cancer cell line TOV-112D. *Mol Cell Biochem* 2005; 275: 25-55
167. Gagné JP, Éthier C, Gagné P, Mercier G, Bonicalzi ME, Mes-Masson AM, Droit A, Winstall E, Isabelle M, Poirier GG. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer. *Proteome Sci* 2007; 5:16 doi:10.1186/1477-5956-5-16
168. Bykov VJN, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 2002; 23:2011-2018.
169. Bykov VJN, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG. PRIMA-1^{MET} synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 2005; 24:3484-3491.
170. Wang W, El-Deiry WS. Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 90-96.
171. Haupt S, Haupt Y. Manipulation of the tumor suppressor p53 for potentiating cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:244-252.
172. Bykov VJN, Issaeva N, Zache N, Shilov A, Hultcrantz M, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J Biol Chem* 2005; 280:30384-30391.
173. North S, Pluquet O, Maurici D, El Ghissassi F, Hainaut P. Restoration of wild-type conformation and activity of a temperature-sensitive mutant of p53 (p53^{V272M}) by the cytoprotective aminothiols WR1065 in the esophageal cancer. *Mol Carcinog* 2002; 33:181-188.
174. Pluquet O, North S, Richard MJ, Hainaut P. Activation of p53 by the cytoprotective aminothiols WR1065: DNA-damage-independent pathway and redox-dependent modulation of p53 DNA-binding activity. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1129-1137.
175. Peng Y, Li C, Chen L, Sebt S, Chen J. Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene* 2003; 22: 4478-4487.
176. Roth J, Lenz-Bauer C, Contente A, Lohr K, Koch P, Bernard S, Dobbstein M. Reactivation of mutant p53 by a one-hybrid adaptor protein. *Cancer Res* 2003; 63: 3904-3908
177. Schumacher G, Bruckheimer EM, Beham AW, Honda T, Brisbay S, Roth JA, Logothetis C, McDonnell TJ. Molecular determinants of cell death induction following adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 91:159-166.
178. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996; 2:985-991.
179. Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 55-61
180. Fujiwara T, Tanaka N, Kanazawa S, Ohtani S, Saijo Y, Nukiwa T, Yoshimura K, Sato T, Eto Y, Chada S, Nakamura H, Kato H. Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:1689-1699.
181. Levedeba IV, Su ZZ, Zarkar D, Fisher PB. Restoring apoptosis as a strategy for can-

- cer gene therapy: focus on p53 and mda-7. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:169-178.
182. Galanis E, Okuno SH, Nascimento AG, Lewis BD, Lee RA, Oliveira AM, Sloan JA, Atherton P, Edmonson JH, Erlichman C, Randlev B, Wang Q, Freeman S, Rubin J.. Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Gene Therapy* 2005; 12:437-445.
183. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000; 6:879-885.
184. Vasey PA, Shulman LN, Campos S, Davis J, Gore M, Johnston S, Kirn DH, O'Neill V, Siddiqui N, Seiden MV, Kaye SB. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:1562-1569.
185. Parks DJ, LaFrance LV, Calvo RR, Milkiewicz KL, Marugán JJ, Raboisson P, Schubert C, Koblisch HK, Zhao S, Franks CF, Lattanze J, Carver TE, Cummings MD, Maguire D, Grasberger BL, Maroney AC, Lu T. Enhanced pharmacokinetic properties of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione antagonists of the HDM2-p53 protein-protein interaction through structure-based drug design. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16:3310-3314.
186. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303:844-848.
187. Yang Y, Ludwig RL, Jensen JP, Pierre SA, Medaglia MV, Davydov IV, Safiran YJ, Oberoi P, Kenten JH, Phillips AC, Weissman AM, Vousden KH. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell* 2005; 7:547-559.
188. Spurgers KB, Chari NS, Bohnenstiehl NL, McDonnell TJ. Molecular mediators of cell death in multistep carcinogenesis: a path to targeted therapy. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1360-1370.
189. Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2007; 13:23-31.
190. Fischer U, Janssen K, Schulze-Osthoff K. Cutting-Edge Apoptosis-Based Therapeutics. A Panacea for Cancer? *Biodrugs* 2007; 21:273-297
191. Moreno CS, Matyunina L, Dickerson EB, Schubert N, Bowen NJ, Logani S, Benigno BB, McDonald JF. Evidence that p53-Mediated cell-cycle-arrest inhibits chemotherapeutic treatment of ovarian carcinomas. *PLoS ONE* 2007; 2: e441. doi:10.1371/journal.pone.0000441.
192. Gudkov AV, Komarova EA. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Com* 2005; 331:726-736.