

Análisis de la implicación de los genes de supresión tumoral TP53, p16^{INK4}, p21^{WAF1}, RB1 y de las enzimas metabolizadoras de drogas en el desarrollo de tumores óseos en niños

Analysis of the involvement of the tumour suppressor genes TP53, p16^{INK4}, p21^{WAF1}, RB1 and the drugs metabolizing enzymes in the development of bone tumours in children

A. Patiño, E. Sotillo, R. López de Mesa, L. Sierrasesúmaga

RESUMEN

Fundamento. Los genes de supresión tumoral p16^{INK4}, TP53, RB1 y p21^{WAF1} son algunos de los componentes de la compleja red de regulación del ciclo celular y ejercen un control negativo de la proliferación o positivo de la diferenciación en respuesta al daño en el ADN. Se ha investigado la presencia de mutaciones en estos genes y variaciones en la secuencia codificante de las enzimas metabolizadoras de drogas que pudieran estar asociadas con el desarrollo de tumores óseos pediátricos o con el pronóstico de los mismos.

Material y métodos. Mediante técnicas de biología molecular basadas en PCR se han analizado las variaciones en la secuencia de los genes p16^{INK4}, TP53, RB1 y p21^{WAF1} y de las enzimas metabolizadoras de drogas en un grupo de 82 osteosarcomas y 47 sarcomas de Ewing así como en una población control de 115 niños sanos.

Resultados. Se detectaron mutaciones del gen TP53 en, aproximadamente, 25% de las muestras, en asociación con tumores de mal pronóstico y supervivencia reducida. El gen p16^{INK4} estaba deletado en 18% de los tumores, asociado igualmente a mal pronóstico y a subtipos histológicos desfavorables, y el gen RB1 presentaba alteraciones en 21% de los osteosarcomas. No parece existir relación entre la presencia de polimorfismos en las enzimas metabolizadoras de drogas y mutaciones del gen p21^{WAF1} y el desarrollo de los tumores óseos pediátricos.

Conclusiones. La alteración de los genes p16^{INK4}, TP53 y RB1 está implicada en el desarrollo del osteosarcoma y sarcomas de Ewing, y parece constituir un factor de mal pronóstico en este tipo de tumores pediátricos.

Palabras clave: Tumor óseo. Niños. Genes de supresión tumoral. Ciclo celular. Mutación.

ABSTRACT

Background. Several tumor suppressor genes such as p16^{INK4}, TP53, RB1 and p21^{WAF1} are involved in cell cycle regulation in response to DNA damage and belong to the complex pathway that regulates cell proliferation and/or differentiation. We have investigated the presence of mutations in those genes and polymorphisms of Drug Metabolizing Enzymes that could be involved in the development of pediatric bone tumors or in their outcome.

Materials and methods. By means of PCR-based techniques, we have analyzed the presence of variations in the coding sequence of p16^{INK4}, TP53, RB1 and p21^{WAF1} and of the Drug Metabolizing Enzymes in a group of 82 osteosarcomas and 47 Ewing's sarcomas as well as in a control group of 115 healthy children.

Results. We detected mutations of the TP53 gene in about 25% of the samples analyzed, most frequently in association with tumors of poor prognosis or reduced survival. The p16^{INK4} gene was homozygously deleted in 18% of the osteosarcomas, also associated with poor prognosis and unfavourable histologic subtypes; RB1 was altered in 21% of the osteosarcomas. We did not detect relevant associations between polymorphisms of the Drug Metabolizing Enzymes or mutation of the p21^{WAF1} and development of pediatric bone tumors.

Conclusions. Alteration of TP53, p16^{INK4} and p21^{WAF1} seems to be involved in the development of pediatric bone tumors and to be an unfavourable prognostic factor in this type of tumors.

Key words: Bone tumors. Children. Tumor suppressor genes. Cell-cycle. Mutation.

ANALES Sis San Navarra 2000; 23 (1): 25-34.

Laboratorio de Pediatría. Departamento de Pediatría. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de Navarra a través de la beca 2258/96.

Aceptado para su publicación el 16 de noviembre de 1999.

Correspondencia

Ana Patiño García
Laboratorio de Pediatría
Edificio C.I.F.A.
Universidad de Navarra
E31080 Pamplona
Tfno. 948 425653
Fax 948 425652
E-mail: apatigarr@unav.es

INTRODUCCIÓN

Una de las características más interesantes que diferencian a las células tumorales de sus homólogas normales es la capacidad de exhibir una capacidad proliferativa aparentemente ilimitada debida a la alteración del programa genético que controla el crecimiento y diferenciación. Esta "inmortalidad" se debe tanto a la pérdida de función de los genes de supresión tumoral como a la alteración de las copias normales de los oncogenes.

Los denominados genes de supresión tumoral o antioncogenes ejercen un estricto control negativo de la proliferación que se expresa como una señal que conduce a la célula a ralentizar su crecimiento e incrementar su nivel de diferenciación. Si tiene lugar la pérdida de dichos genes, la célula no puede escapar a los ciclos de división y se ve empujada a una proliferación incontrolada.

En la actualidad, las alteraciones genéticas que conducen al desarrollo de los tumores óseos de los niños no han sido

completamente caracterizadas y, aunque se ha demostrado la implicación de los genes de supresión tumoral TP53 y RB1^{1,2}, otros aspectos moleculares críticos para la tumorigénesis no están bien definidos.

Las mutaciones que alteran el gen de supresión tumoral TP53 pasan por ser las alteraciones genéticas más frecuentes en tumores esporádicos humanos³. La proteína codificada por este gen es un importante regulador del ciclo celular normal y posee un papel clave en la supresión de la proliferación celular anormal y promoción de la apoptosis en respuesta al daño en el ADN⁴.

Se ha demostrado recientemente que la delección de p16^{INK4} y de p21^{WAF1} son alteraciones comunes en diversas líneas celulares y tumores humanos^{5,6}, y las proteínas codificadas por ellos han sido identificadas como productos reguladores del ciclo celular. Su función está mediada por la inhibición de los complejos ciclina-CDK (*Cyclin Dependent Kinase*), impidiendo así la fosforilación de proteínas reguladoras que bloquean el paso a la fase S (fase de

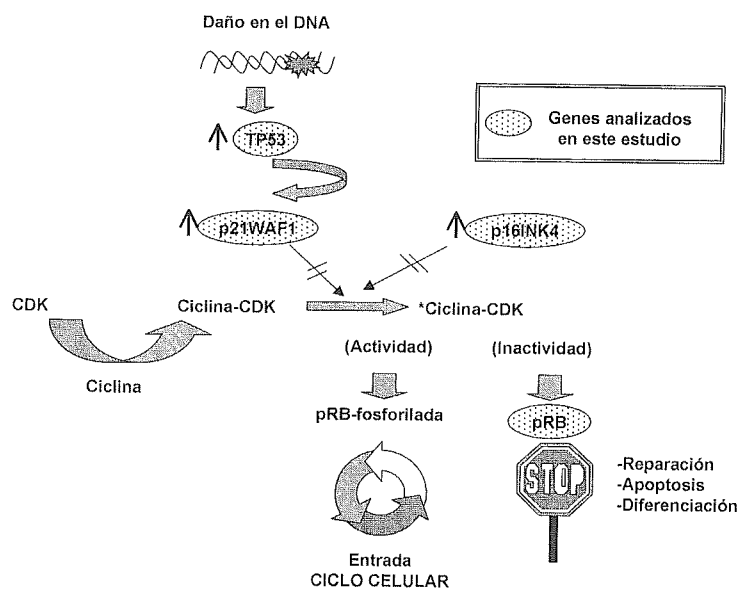


Figura 1. Representación esquemática de las diferentes moléculas y genes implicados en la regulación del ciclo celular y la implicación de los genes analizados en este estudio.

replicación) y el crecimiento celular⁷. El más interesante de estos reguladores es la proteína codificada por el gen RB1, que es el que, en última instancia, toma la decisión de que la célula se replique o se detenga antes de fase S.

Todos los genes anteriormente citados (TP53, RB1, p16^{INK4} y p21^{WAF1}) están implicados en la misma compleja vía de regulación y detención del ciclo celular en respuesta a un daño no reparable en el ADN (Fig. 1) y el objetivo de este estudio ha sido estudiar su implicación en la génesis de los tumores óseos más frecuentes en los niños, el osteosarcoma y Sarcoma de Ewing (SE).

La mayoría de los metabolitos carcinogénicos requieren para su detoxificación de la actuación de las Enzimas Metabolizadoras de Drogas (DMEs o *Drug Metabolizing Enzymes*). Estas enzimas intervienen en diferentes puntos del metabolismo de los agentes tóxicos y en función de ello son clasificadas como enzimas de fase I (citocromos P450) o de fase II (Transferasas de Glutatión, GST o *Glutathione S-Transferase*)⁸. Hoy en día se sabe que la variabilidad genética en las enzimas de estas superfamilias está implicada en la

susceptibilidad individual a sufrir diferentes tipos de tumores^{9,10}.

Con el fin de lograr una mejor caracterización de los tumores óseos infantiles, un último objetivo del estudio ha sido investigar la posible influencia de los polimorfismos genéticos de los genes CYP1A1 (Fase I) y GSTM (Fase II) en la susceptibilidad a desarrollar tumores óseos malignos y su posible relación con las características moleculares y clínicas de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han obtenido muestras de tumor, sangre periférica o ambas de pacientes pediátricos con tumores óseos (82 osteosarcomas y 47 SE) así como de una población control de 115 niños sanos, de las que se ha obtenido ADN mediante protocolos convencionales.

La metodología utilizada para la búsqueda y caracterización de alteraciones en los genes de supresión tumoral TP53, p16^{INK4}, p21^{WAF1} y RB1, así como de los polimorfismos de las DMEs se ha resumido en la tabla 1¹¹⁻¹⁹.

Tabla 1. Metodología utilizada para el análisis de las alteraciones de los genes de supresión tumoral TP53, p16^{INK4}, p21^{WAF1} y RB1, así como de los polimorfismos de las Enzimas Metabolizadoras de Drogas (DMEs).

GEN	Región estudiada	Alteración	Técnica	Referencia
TP53	Exones 5 a 8	Mutación	¹ DGGE, secuenciación	Hamelin y col, 1993 ¹¹ Borresen y col, 1991 ¹²
p16 ^{INK4}	Exones 1 y 2	Mutación	² SSCP, ³ RFLPs	Sun y col, 1995 ¹³
	Exón 2	Delección	Multiplex ⁴ PCR	Patiño y col, 1997 ¹⁴
p21 ^{WAF1}	Exón 2	Mutación	DGGE, secuenciación	Li y col, 1995 ¹⁵
RB1	Intrón 20	Delección	Análisis de ⁵ VNTR	Yandell y col, 1989 ¹⁶
DME: CYP1A1	Pol T6235C (m1)	Polimorfismo	RFLPs	Hayashi y col, 1991a ¹⁷
	Pol A4889G (m2)	Polimorfismo	⁶ ASO-PCR	Hayashi y col, 1991b ¹⁸
DME: GSTM1	Exones 4-5	Delección	Multiplex PCR	Comstok y col, 1990 ¹⁹

¹DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en Geles Desnaturalizantes en Gradiente), ²SSCP, Single Strand Conformation Polymorphisms (Polimorfismos en la conformación de las hebras monocatenarias), ³RFLPs, Restriction Fragment Length Polymorphisms (Polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción), ⁴PCR, Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ⁵VNTR, Variable Number of Tandem Repeats (Número Variable de Repeticiones en Tandem), ⁶ASO, Allele Specific Oligonucleotides (PCR con cebadores específicos de alelo).

RESULTADOS

Análisis de mutaciones en TP53

Se analizaron los exones 5 a 8 del gen de TP53 porque en esta región se localizan aproximadamente el 95% de las mutaciones presentes en los tumores esporádicos humanos. Se detectaron y caracterizaron alteraciones del gen TP53 tanto en muestras de tejido tumoral como en la línea germinal (Tablas 2 y 3).

De los cambios genéticos detectados en esta serie, más del 90% están representados por mutaciones en que el cambio de una base a nivel del ADN origina un cambio en el aminoácido codificado en la proteína o la aparición de un codón de terminación (Figs. 2A, 2B), y sólo un paciente era portador de una compleja mutación por delección en el

exón 7 del gen²⁰. En algunas de las muestras (99, 2, 339, Tabla 3) en que se disponía únicamente de tejido tumoral incluido en parafina, no fue posible obtener ADN de suficiente calidad para obtener una secuenciación eficiente, por lo que se carece de evidencia de que dicha alteración contribuya al desarrollo del tumor. Sin embargo, en muestras de sangre de los mismos pacientes no se detectó la alteración en la movilidad electroforética en DGGE, por lo que se puede descartar que dicha alteración suponga un polimorfismo en la secuencia codificante que, en este caso estaría igualmente presente en las células de sangre.

Los tumores portadores de alteraciones en la secuencia de TP53 parecen comportarse de manera más agresiva e implicar peor pronóstico, aunque la relación

Tabla 2. Frecuencia y tipo de alteraciones detectadas en los genes de supresión tumoral RB1, TP53, p16^{INK4} y p21^{WAF1} en la serie de osteosarcomas y sarcomas de Ewing analizados.

Gen	Osteosarcomas			Sarcomas de Ewing		
	Normales	Alterados	Polimórficos	Normales	Alterados	Polimórficos
TP53	75,5%	24,5%	0%	73,4%	20%	6,6%
RB1	78,9%	21,1%	n.d.	n=6 (i) ²	n=1 (i)	n.d.
P16 ^{INK4}	82%	18%	0%	83%	0%	17%
P21 ^{WAF1}	80%	6%	14%	91%	0%	9%

¹ Polimorfismo R213R, exón 6, gen TP53, ² i, estudio incompleto, ³ Polimorfismo A148T, exón 2, gen p16^{INK4}, ⁴ Polimorfismos A64T y S31R, gen p21^{WAF1}, n.d., no determinado por el tipo de análisis utilizado.

Tabla 3. Localización y naturaleza de las alteraciones detectadas en la secuencia codificante del gen TP53 en las muestras analizadas.

Muestra	Exón	Codón	Cambio del ADN	Cambio de la proteína
#45, osteosarcoma	8	273	CGT/CAT	Arg/His
#43, osteosarcoma	8	268	AAC/AGC	Asn/Ser
#259, osteosarcoma	8	282	CGG/TGG	Arg/Trp
#19, osteosarcoma	7	250	Del C	Desfase
	7	250	CCT/TTC	Pro/Phe
#46, osteosarcoma	6	196	CGA/TGA	Arg/Stop
#319, osteosarcoma	6	213	CGA/TGA	Arg/Stop
#15, osteosarcoma	5	175	CGC/CAC	Arg/His
#99, #2, #339, osteosarcoma	5	¿?	¿?	¿?
#80, sarcoma de Ewing	8	273	CGT/CAT	Arg/His
#330, sarcoma de Ewing	8	268	AAC/AGC	Asn/Ser

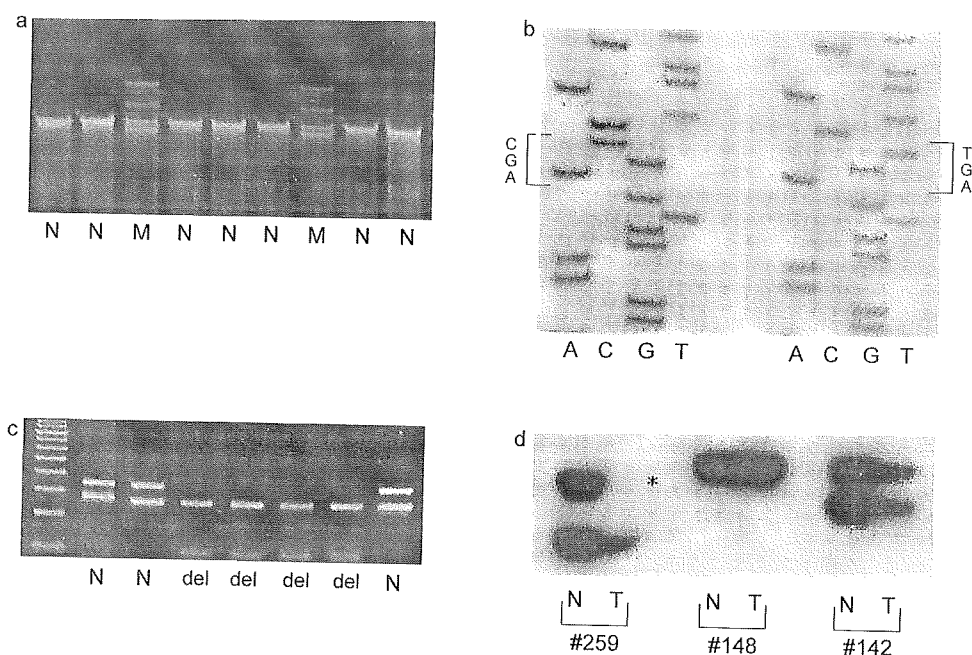


Figura 2. Ejemplos de las técnicas y resultados del análisis de mutación en los diferentes genes. A) DGGE del gen TP53 que muestra alteraciones en la movilidad electroforética de las muestras M (mutantes) respecto a las N (normales), B) Ejemplo de secuenciación del exón 6 del gen TP53 en que se demuestra la presencia de un cambio de citosina a timina, C) Coamplificación del exón 2 del gen p16^{INK4} con una banda control que demuestra la delección del gen (muestras "del") por ausencia de la banda superior, D) Autorradiografía en que se muestra la delección del alelo superior de RB1 en la muestra 259 (N, normal; T, tumor).

detectada no era estadísticamente significativa (Fig. 3). Sí se detectó relación significativa entre el diagnóstico y la supervivencia, de manera que los osteosarcomas de subtipo histológico condroblástico y los SE presentaban supervivencias reducidas respecto a otros subtipos histológicos de osteosarcoma (fibroblástico, telangiectásico, y osteoblástico) ($p=0,003$).

Análisis de mutación y delección en el gen p16^{INK4}

Se detectó delección homocigota del gen p16^{INK4} exclusivamente en pacientes con osteosarcomas (Tabla 2) (Fig. 2C). Todos los pacientes portadores de delecciones en este gen resultaron ser osteosarcomas de subtipo histológico condroblástico y que presentaban una supervivencia muy reducida.

La frecuencia del polimorfismo A148T (Alanina/Treonina en el codón 148 de la proteína) del exón 2 del gen es de 17% en nuestro grupo de SE; dicho valor es significativamente mayor al descrito para la población general caucásica.

No se detectaron mutaciones que alterasen la secuencia codificante de los exones 1 ó 2 del gen p16^{INK4} y que pudieran, por tanto, participar en la carcinogénesis de estos tumores en muestras de tumor ni de sangre periférica.

Análisis de mutación en el gen p21^{WAF1}

En el análisis del gen p21^{WAF1} no se detectaron mutaciones que alteraran la secuencia codificante normal, por el con-

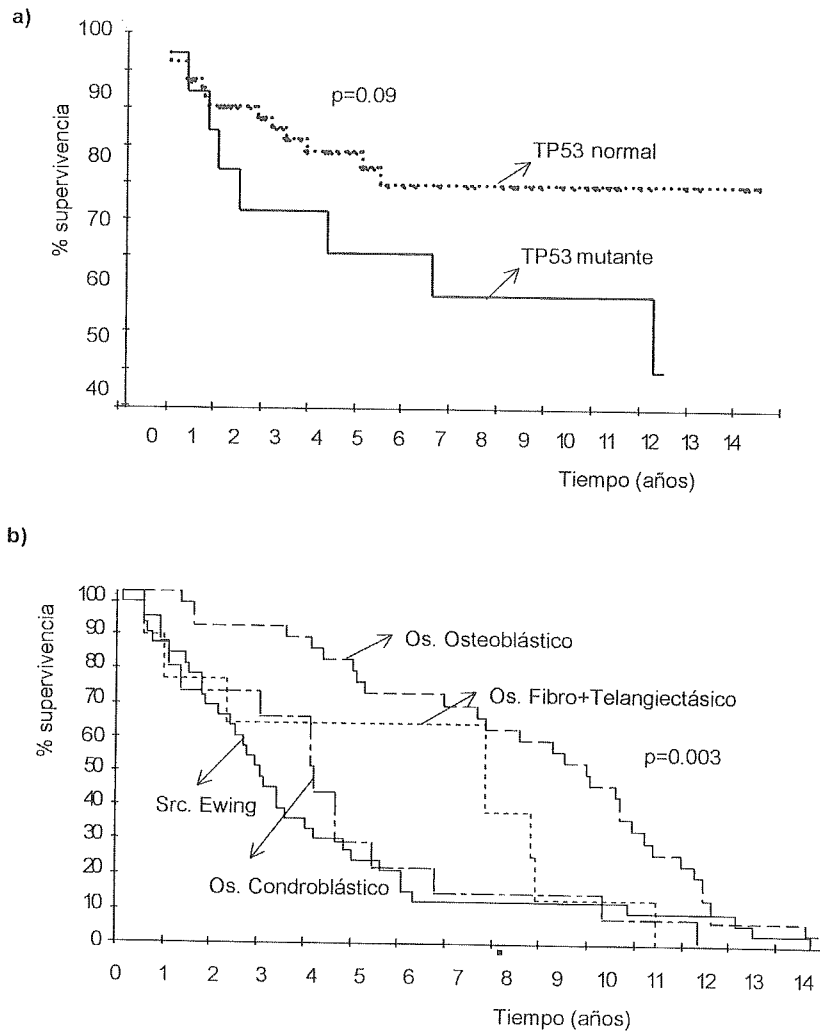


Figura 3. Curva actuarial de supervivencia en pacientes con tumores óseos (osteosarcomas y ES) en relación con a) la presencia de mutaciones en el gen TP53 y b) con el diagnóstico o subtipo histológico.

trario, sí se han descrito variaciones nucleotídicas polimórficas que han sido previamente descritas, tanto en tumores de diferentes orígenes como en la población normal (Tabla 2).

Análisis de delección en el gen RB1

Con el fin de analizar la pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*) o delección en el gen RB1 se amplificó un mar-

cador polimórfico localizado en el intrón 20 del gen que consiste en la repetición en tandem de las unidades CTTT o CTTTT un número variable de veces. El número de muestras heterocigotas o informativas rinde un porcentaje de heterocigosidad de 72% para este marcador en nuestra serie.

Mientras que la alteración más frecuente del gen RB1 en osteosarcomas era la delección (LOH) (Fig. 2D), en uno de los SE

se comprobó que una de las bandas presentes en el tumor era diferente a las del tejido normal, lo que refleja un evento de inestabilidad en el tumor y que ha sido relacionado, así como la delección, con la carcinogénesis (Tabla 2).

Genotipos para las Enzimas Metabolizadoras de Drogas (DMEs)

Entre las variaciones genéticas descritas en el gen CYP1A1, existe un polimorfismo para la endonucleasa MspI que se denomina T6235C o m1 que ha sido asociado con diferentes tipos de tumores en diferentes poblaciones⁹. En el alelo más frecuente (wt o *wild type*) no existe diana para MspI, sin embargo, en el mutante (m1) existe un cambio T por C que origina la diana para MspI. Las frecuencias observadas para estos alelos fueron de 0,87 para wt y 0,13 para m1 (considerando una población normal de 115 niños sanos).

El segundo de los polimorfismos analizados en el gen CYP1A1 (A4889G o m2) consiste en un cambio nucleotídico que origina una sustitución de isoleucina por valina. La frecuencia observada para los alelos de este polimorfismo fueron 0,96 para el alelo normal y 0,04 para el mutante o m2 en la población pediátrica normal.

No se detectaron diferencias estadísticas en la distribución de los genotipos de nuestros pacientes con tumores óseos, ni considerando cada uno de estos marcadores independientemente, ni en conjunto. Es destacable el hecho de que el genotipo CYP1A1*1/*2A se encuentra en una frecuencia estadísticamente menor en ES que en osteosarcomas ($p=0,0284$) (Tabla 4a).

Las frecuencias para los alelos GSTM1*0 (ausencia de gen GSTM1) GSTM1*1 (presencia del gen GSTM1) en la población normal y los pacientes con tumores no difieren estadísticamente (Tabla 4b).

Cuatro de los osteosarcomas incluidos en el análisis desarrollaron diferentes tipos de leucemias, pero el desarrollo de estos tumores secundarios no parece estar relacionado con el genotipo para las DMEs, dado que los pacientes eran CYP1A1*1/*1-GSTM1*1 en dos casos y CYP1A1*1/*1-GSTM1*0 y CYP1A1*1/*2A-GSTM1*0 en cada uno de los otros pacientes.

No se detectó ninguna relación entre los genotipos para las DMEs y datos clínicos (pronóstico, sexo o subtipo histológico) o moleculares (mutación en TP53, p16^{INK4} o p21^{WAF1}).

Tabla 4a. Distribución de los genotipos para los polimorfismos del gen CYP1A1 detectados en individuos normales y pacientes pediátricos con tumores óseos.

¹ Genotipo CYP1A1	Controles	Osteosarcomas	SE
CYP1A1*1/*1	74,78%	72,9%	88,1%
CYP1A1*1/*2A	17,4%	20,3%	4,8%
CYP1A1*1/*2B	6,9%	5,1%	7,1%
CYP1A1*2A/*2A	0,87%	1,7%	0

¹En la nomenclatura estándar, el alelo normal para ambos marcadores es CYP1A1*1, los alelos con el polimorfismo en T6235C y alelo normal en A4889G son CYP1A1*2A, y finalmente, la asociación de ambas formas polimórficas, m1 y m2, se denomina CYP1A1*2B.

Tabla 4b. Distribución de los genotipos para el gen GSTM1 en individuos normales y en los grupos de pacientes analizados.

	Genotipo GSTM	
	¹ GSTM1*1	² GSTM1*0
Controles	58,3%	41,7%
Osteosarcomas	55,9%	44,1%
SE	50%	50%

¹GSTM1*1, presencia del gen GSTM; ²GSTM1*0, delección homocigota del gen GSTM.

DISCUSIÓN

Análisis de los genes de supresión tumoral TP53, p16^{INK4}, p21^{WAF1}, RB1

Los valores de alteración de los genes p16^{INK4} y TP53 en nuestra serie coinciden con los publicados por otros autores^{21,22} y apoyan la hipótesis de que el principal mecanismo de inactivación del gen p16^{INK4} es la delección (junto con otros mecanismos epigenéticos como la metilación), y también que las alteraciones de TP53 están implicadas en la génesis del osteosarcoma, tanto en adultos como en niños. Es importante considerar que pueden existir alteraciones en otros genes implicados en la vía reguladora del gen TP53 (p.e. el MDM2, *murine double minute-2*, amplificado en 15 a 30% de los tumores óseos) que pueden suponer un mecanismo alternativo a la inactivación de TP53.

Las mutaciones de "cambio de sentido" (cambio del aminoácido debido a alteración del triplete codificante) en los codones conservados del gen TP53 suponen la alteración más frecuente en los tumores esporádicos humanos, que ha sido igualmente el tipo de mutación predominante en nuestra serie.

Se ha detectado una cierta asociación, no significativa, entre la presencia de alteraciones para el gen TP53 y las características clínicas del tumor, de modo que los pacientes con osteosarcoma que poseían un gen TP53 de tipo normal presentaban una supervivencia media de 73% (a 14 años), mientras que en aquéllos con el gen alterado la supervivencia se reducía hasta 51%. Así mismo, se ha encontrado relación entre el pronóstico y el diagnóstico, de modo que los tumores con supervivencias más reducidas eran los osteosarcomas condroblásticos y los SE (Fig. 3).

La ausencia de mutaciones en el gen p16^{INK4} en tumores óseos de niños coincide con la baja frecuencia de este tipo de alteraciones detectadas en osteosarcomas de adultos^{21,22}. Respecto a los cambios nucleotídicos, es destacable que la frecuencia del polimorfismo A148T en los SE, 17%, es superior a la descrita para la raza Caucásica¹⁰ y podría atribuirse, bien a una diferencia poblacional, como se ha descrito que

existe en la población de Alaska, o bien tener algún valor en la génesis de este tipo de tumor pediátrico.

Todos los pacientes con delecciones de p16^{INK4} fueron diagnosticados como osteosarcomas condroblásticos, desarrollaron metástasis pulmonares y fallecieron en un periodo entre 16 y 34 meses. Este hecho parece sugerir que la delección del gen de supresión tumoral p16^{INK4} puede ser un valioso factor pronóstico asociado a tumores de comportamiento muy agresivo, aunque consideramos que esta serie es demasiado reducida para extraer conclusiones definitivas.

Se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la presencia de la proteína p16^{INK4} y la codificada por el gen RB1 (p110^{RB}), que pertenecen a la misma vía de tumorigénesis, de manera que la pérdida o alteración de p16^{INK4} alteraría las funciones de p110^{RB}. Esta relación adquiere un significado especial en los osteosarcomas, en que se ha demostrado que las mutaciones de RB1 ocurren de forma no aleatoria. De hecho, aunque el número de muestras en que se ha analizado la pérdida de RB1 en este estudio es reducido, nunca se dan en la misma muestra alteración de los genes RB1 y p16^{INK4} conjuntamente.

La ausencia de mutaciones en el gen p21^{WAF1} en nuestra serie de tumores óseos puede responder a diferentes explicaciones. En primer lugar, el gen TP53, perteneciente a la misma vía de actuación, ha resultado ser mutante en, aproximadamente, 25% de nuestras muestras. Además, dado que p21^{WAF1} bloquea la entrada en fase S del ciclo celular inhibiendo la actividad de las CDKs que fosforilan p110^{RB}, esta vía requeriría la presencia de un gen RB1 intacto² y, sin embargo, se han detectado delecciones de RB1 en, aproximadamente, 21,1% de nuestros osteosarcomas, además de que ya se ha mencionado que RB1 puede estar alterado por la vía de la mutación en un número importante de osteosarcomas. Otra posible explicación para la baja frecuencia de inactivación de p21^{WAF1} en tumores humanos se basa en el papel "protector" que ejerce este gen sobre la apoptosis mediada por TP53²³ y, como sugieren otros autores, la abolición completa de

las funciones del gen podría ser incompatible con la vida de la célula, por lo que las mutaciones de p21^{WAF1} serían un hallazgo poco frecuente en tumores humanos. Sin embargo, investigaciones recientes, basadas en estudios con ratones *knock-out* para p21^{WAF1}, sugieren que este gen puede carecer de un papel importante en el desarrollo o progresión de la mayoría de tumores humanos. Esta afirmación se basa tanto en la ausencia de mutaciones en la secuencia codificante del gen en los tumores estudiados como en que los ratones p21^{WAF1} *knock-out* no presentaban un incremento en la incidencia de tumores²⁴.

Aunque la mayoría de las alteraciones detectadas en p21^{WAF1} no son cambios "silenciosos", ya que modifican el aminoácido codificado, el hecho de que se detecten igualmente en la población normal apoya la hipótesis de que no contribuyen en realidad al desarrollo de este tipo de tumores pediátricos. Además es importante considerar que aunque se ha analizado el 87% de la región codificante del gen p21^{WAF1}, no se puede excluir la presencia de alteraciones en otras regiones del gen o en secuencias que regulan su expresión.

Otros autores han descrito mutaciones que alteren la función de la proteína p21^{WAF1} únicamente en un carcinoma de mama invasivo y en un caso de cáncer de próstata^{25,26}, lo que sugiere que la alteración de este gen es un hecho infrecuente en la mayoría de los tumores pediátricos y de adultos.

Genotipos para las enzimas metabolizadoras de drogas (DMEs)

Un gran número de estudios recientes sugieren que los polimorfismos en las DMEs pueden estar implicados en la susceptibilidad genética individual a padecer cáncer^{9,10}. En nuestra serie no hemos detectado ninguna correlación destacable, lo que, de cualquier manera, coincide con la naturaleza y origen de este tipo de tumores pediátricos, que no se encuentran entre los tumores típicamente inducidos por agentes químicos. De hecho, en la actualidad se desconoce un porcentaje importante de los efectos causantes tanto del osteosarcoma como del SE. En el caso del osteosarcoma se ha sugerido un origen viral y el único

agente medioambiental relacionado es la radiación ionizante, que está en el origen de, aproximadamente, 3% de los osteosarcomas. Sí está bien documentado el papel que poseen en su origen los genes TP53 y RB1, así como otros, aún no caracterizados, localizados en 3q y 18q²⁷.

En el caso del SE, la alteración mejor caracterizada es la translocación t(11:22)(q24;q12), que está presente en aproximadamente 95% de estos tumores y que origina una proteína quimérica y transformante a través de la fusión de los genes EWS y FLI1²⁸.

En este grupo de pacientes no parece existir relación entre la presencia de un determinado genotipo para las DMEs y mutación en TP53, RB1 o cualquiera de los genes analizados, ni tampoco en el desarrollo de segundos tumores.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Richard Hamelin, Dr. Andreas von Deimling, Dr. X. Zhou y Dr. S. Zhang su colaboración cediendo muestras mutantes utilizadas como controles. Los programas de DGGE SQHTX y Melt87 fueron amablemente cedidos por el Dr. L. Lerman.

BIBLIOGRAFÍA

1. TOGUCHIDA J, YAMAGUCHI T, RITCHIE B, BEAUCHAMP RL, DAYTON SH, HERRERA GE et al. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1992; 52: 6194-6199.
2. WADAYAMA B, TOGUCHIDA J, SHIMIZU T, ISHIZAKI K, SASAKI MS, KOTOURA Y, YAMAMURO T. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res* 1994; 54: 3042-3048.
3. NIGRO JM, BAKER SJ, PREISINGER AC, JESSUP JM, HOSTETTER R, CLEARY K et al. Mutations in the p53 occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-708.
4. KASTAN MB, ONYKWERE O, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, CRAIG RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-6311.
5. KAMB A, GRUIS NA, WEAVER-FELDHAUS J, LIU Q, HARSHMAN K, TAVTIGIAN SV et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440.

6. VOGELSTEIN B, FEARON ER, KERN SE, HAMILTON SR, PREISINGER AC, NAKAMURA Y, WHITE R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-211.
7. LIU Q, NEUHAUSEN S, MCCLURE M, FRYE C, WEAVER-FELDHAUS J, GRUIS NA *et al*. CDKN2 (MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines. *Oncogene* 1995; 10: 1061-1067.
8. NEBERT DN. Polymorphisms in Drug-Metabolizing Enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 265-271.
9. HAYASHI S, WATANABE J, KAWAJIRI K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P4501A1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 866-870.
10. ZHONG S., WYLLIE AH, WOLF CR *et al*. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1821-1824.
11. HAMELIN R, JEGO N, LAURENT-PUIG R, VIDAUD M, THOMAS G. Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis in colorectal tumors. *Oncogene* 1993; 8: 2213-2220.
12. BORRESEN A-L, HOVIG E, SMITH-SORENSEN B, MALKIN D, LYSTAD S, ANDERSEN TI *et al*. Constant denaturing gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8405-8409.
13. SUN Y, HILDESHEIM A, LANIER AEP, CAO Y, YAO KT, RAAB-TRAUB N, YANG CS. No point mutation but decreased expression of the p16/MTS1 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinomas. *Oncogene* 1995; 10: 785-788.
14. PATIÑO-GARCÍA A, SIERRASESÚMAGA L. Analysis of the p16INK4 and TP53 tumor suppressor genes in bone sarcoma pediatric patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 98: 50-55.
15. LI YJ, LAURENT-PUIG P, SALMON RJ, THOMAS G, HAMELIN R. Polymorphisms and probable lack of mutation in the WAF1-CIP1 gene in colorectal cancer. *Oncogene* 1995; 10: 599-601.
16. YANDELL DW, DRYJA TP. Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic coamplification and direct genomic sequencing. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 547-555.
17. HAYASHI S, WATANABE J, NAKACHI K, KAWAJIRI K. Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the Heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem* 1991; 110: 407-411.
18. HAYASHI S, WATANABE J, NAKACHI K, KAWAJIRI K. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. *Nucleic Acids Res* 1991b; 19: 4797.
19. COMSTOCK KE, SANDERSON BJS, CLAFLIN G, HENNER WD. GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3670.
20. PANIZO C, PATIÑO A, CALASANZ MJ, RIFÓN J, SIERRASESÚMAGA L, ROCHA E. Emergence of secondary acute leukemia in a patient treated for osteosarcoma: implications of germline TP53 mutations. *Med Ped Oncol* 1998; 30: 165-169.
21. WEI G, LONARDO F, UEDA T, KIM T, HUVOS AG, HEALEY JH *et al*. CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons. *Int J Cancer* 1999; 80: 199-204.
22. MILLER CW, ASLO A, CAMPBELL MJ, KAWAMATA N, LAMPKIN BC, KOEFFLER HP. Alterations of the p15, p16 and p18 genes in osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 86:136-142.
23. POLYAK K, WALDMAN T, HE TC, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 1996; 10: 1945-1952.
24. SHIOHARA M, KOIKE K, KOMIYAMA A, KOEFFLER HP. P21WAF1 mutations and human malignancies. *Leuk Lymphoma* 1997; 26: 35-41.
25. BALBIN M, HANNON GJ, PENDAS AM, FERRANDO AA, VIZOSO F, FUEYO A, LOPEZ-OTIN C. Functional analysis of a p21WAF1, CIP1, SDI1 mutant (Arg94 → Trp) identified in a human breast carcinoma. Evidence that the mutation impairs the ability of p21 to inhibit cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 1996; 271: 15782-15786.
26. GAO X, CHEN YQ, WU N, GRIGNON DJ, SAKR W, PORTER AT, HONN KV. Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. *Oncogene* 1995; 11: 1395-1398.
27. YAMAGUCHI T, TOGUCHIDA J, YAMAMURO T, KOTOURA Y, TAKADA N, KAWAGUCHI N *et al*. Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent loss on 3q, 13q, 17p and 18q. *Cancer Res* 1992; 52: 2419-2423.
28. HOROWITZ ME, MALAWER MM, WOO SY. Ewing's Sarcoma Family of Tumors: Ewing's Sarcoma of Bone and Soft Tissue and the Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumors. En: Pizzo PA, Poplack DG editores. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997: 831-863.