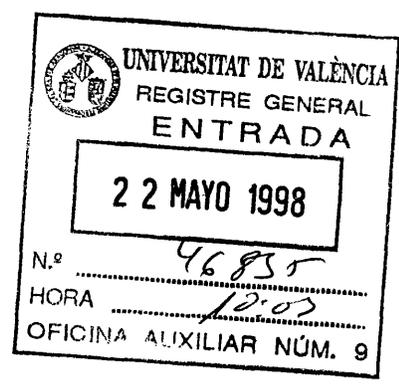


7.1240

BID. T 4750

**UNIVERSITAT DE VALENCIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA**



**FIBROHISTIOCITOMA MALIGNO:  
COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO EN  
XENOTRANSPLANTES.  
UN ESTUDIO DE 27 CASOS**

Memoria presentada por la licenciada en  
Medicina y Cirugía **Pilar Molina Aguilar**  
para optar al grado de Doctor.

UMI Number: U607484

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607484

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

D. 1241829  
L. 1241837

R. 61025

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA DE VALÈNCIA

En el día de hoy se ha procedido a la lectura de la tesis titulada:

Fibrohistiocitoma maligno. Comportamiento biológico en xenotransplantes. Un estudio de 27 casos

de D. Pilar Molina Aguilar que ha obtenido la calificación de Sobresaliente Cum Laude

Firmado El Presidente del Tribunal, Dr. D. Amando Peydró-Olaya

El Secretario, Dr. D. Samuel Navarro Foj

El Vocal Dr. D. Ildefonso Fernández Fernández

El Vocal Dr. D. Francisco Martínez Tello

El Vocal Dr. D. Emilio Álvarez Fernández

Valencia 10 de JULIO de 1998

El Secretario del Tribunal

El Vocal

El Vocal

El Presidente

El Vocal

Firma del Alumno

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con las siguientes ayudas al Departamento de Patología.:

- Beca de Investigación concedida por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), nº 95/0934
- Beca de Investigación concedida por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), nº 98/0600
- Beca de Investigación de la Institución Valenciana de Estudios e Investigación (IVEI), nº 02-079

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a todos mis compañeros del Departamento de Patología y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico por la creación de un clima de trabajo y amistad inmejorable, que he tenido la suerte de conocer.

Al Prof. Antonio Llombart-Bosch por su confianza, consejos y apoyo que me ha ofrecido siempre a lo largo de mi residencia, que le agradezco sinceramente y al que le debo mi iniciación en el apasionante campo de la investigación. Al Prof. Amando Peydró-Olaya por su constante apoyo e interés.

Al Prof. Antonio Pellín por su inestimable ayuda en la codirección del presente trabajo y del que he aprendido su rigurosidad e integridad en el campo de la investigación. Al Prof. Javier Boix por su constante apoyo en el desarrollo de esta tesis.

A la Prof. Carmen Carda por su importante aportación en este trabajo con el mantenimiento de líneas tumorales xenotransplantadas en ratones atímicos y por su incondicional disponibilidad.

A los Profesores Samuel Navarro, Rosa Noguera y Carlos Monteagudo, con quienes siempre estaré en deuda, por su constante apoyo y amistad. A Alejo Sempere, Estela Pons, Elisa Alonso, Eva Juan y Carmen Mejía por sus consejos y colaboración desinteresada en el capítulo técnico de este trabajo.

Al Prof. Enrique Sanchez por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados. A Carlos Molina por su colaboración informática indispensable.

A Pilar Torquemada por su “paciencia” y amistad.

A todos mis compañeros de la Unidad Docente de Medicina Legal por su espontánea colaboración en el desarrollo final de esta tesis.

Y por último, a mi familia, por todo.

**A Xano, Clara y Rasta**

## **ABREVIATURAS**

**aa:** aminoácido  
**Ag:** antígeno  
**Asp:** asparragina  
**cDNA:** DNA complementario a un RNA  
**CDK:** kinasa dependiente de ciclina  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico  
**DNTPs:** dinucleotidotrifosfato  
**dPCR:** reacción en cadena de la polimerasa diferencial  
**E:** exón  
**FHM:** fibrohistiocitoma maligno  
**g:** gramo  
**G:** guanina  
**His:** histidina  
**Kb:** kilobases  
**Kd:** kilodaltons  
**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero  
**µg:** microgramo  
**mg:** miligramo  
**µl:** microlitro  
**ml:** mililitro  
**ng:** nanogramo  
**Nu – n°:** muestra procedente de tumor producido en ratón atómico mediante xenotransplante  
**pb:** pares de bases  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PVDF:** polivinilidenodifluorido  
**RNA:** ácido ribonucleico  
**RT:** transcriptasa reversa  
**SSCP:** polimorfismos conformacionales de cadena simple  
**T:** timina  
**UV:** ultravioleta

# ÍNDICE

ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>1.- FIBROHISTIOCITOMA MALIGNO .....</b>	<b>5</b>
1.1- Concepto .....	5
1.2- Epidemiología, Factores etiológicos.....	6
1.3- Clínica.....	6
1.4- Clasificación.....	7
1.5- Factores clínico-pronóstico.....	9
1.6- Caracterización biológica.....	9
•Inmunohistoquímica.....	9
• Citogenética.....	11
• Xenotransplantes en ratones atímicos.....	11
• Biología molecular.....	12
<b>2.- ONCOGENES .....</b>	<b>14</b>
<b>3.- GEN TP53.....</b>	<b>16</b>
3.1- Introducción.....	16
3.2- Identificación.....	16
3.3- Estructura génica.....	18
3.4- Estructura de la proteína p53.....	20
3.5- Función de la proteína p53.....	21
3.6- Alteraciones del gen P53.....	24
•Tumores humanos.....	24
•Fibrohistiocitoma Maligno.....	26
<b>4.- GEN MDM2 .....</b>	<b>27</b>
4.1- Identificación.....	27
4.2- Estructura génica.....	28
4.3- Estructura y función de la proteína mdm2.....	29
4.4- Alteración del gen y de la proteína mdm2 en FHM.....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>1.- MATERIAL.....</b>	<b>34</b>
<b>2.- XENOTRANSPLANTES EN RATONES NUDE .....</b>	<b>34</b>
<b>3.- ESTUDIO HISTOLÓGICO .....</b>	<b>34</b>
<b>4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO .....</b>	<b>35</b>
<b>5.- TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO</b>	
<b>DE LOS GENES P53 Y MDM2.....</b>	<b>35</b>
5.1- Estudio del ADN.....	35
• Aislamiento del ADN.....	35
• Cuantificación del ADN.....	36
• Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	36
• Electroforesis del ADN en geles de agarosa.....	37
• Transferencia del ADN a membrana de nylon.....	37
5.2- Preparación de la sonda MDM2.....	38
5.3- Hibridación de las membranas con la sonda marcada.....	39

5.4- Estudio de la amplificación del gen MDM2.....	40
5.5- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
• Amplificación de los exones 5, 6, 7, 8 y 9 del gen P53 .....	40
5.6- Polimorfismo conformacional del ADN de cadena simple (SSCP).....	43
5.7- Secuenciación automática.....	44
<b>6.- TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LAS PROTEINAS</b>	
<b>P53 Y MDM2</b> .....	45
6.1- Aislamiento de proteínas.....	45
6.2- Cuantificación de proteínas.....	45
6.3- Transferencia de las proteínas a membranas PVDF (Western-blot) .....	46
6.4- Detección de las proteínas p53 y mdm2 .....	47
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
1.- ESTUDIO HISTOLÓGICO .....	55
2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO .....	63
3.- ESTUDIO DEL GEN P53 .....	65
4.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA P53 .....	87
5.- ESTUDIO DEL GEN MDM2 .....	95
6.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA MDM2.....	99
7.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES DE LOS GENES P53 Y MDM2 Y DE LA EXPRESIÓN DE AMBAS PROTEÍNAS EN LOS FHM.....	103
8.- DATOS CLINICOS .....	105
9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	106
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
1.- TP53 .....	112
2.- MDM2 .....	117
3.- P53 y MDM2.....	118
• Valoración conjunta de los resultados obtenidos en el estudio de p53 y mdm2 en Fibrohistiocitomas Malignos.....	119
• Implicaciones clínico-patológicas .....	122
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>124</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>127</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

---

El Fibrohistiocitoma Maligno (FHM) es el sarcoma de partes blandas más frecuente de la edad adulta (25-40%). En general, es un tumor biológicamente muy agresivo, con una alta incidencia de recurrencias locales y/o metástasis y una tasa de supervivencia a los cinco años que varía según las series entre un 50% y un 70% (Rooser, 1991; Pezzi, 1992; Pritchard, 1993; Shinjo, 1994; Le Doussal, 1996; Zagars, 1996).

Los factores pronósticos determinantes principales son un tamaño tumoral mayor de 10 cm. y la localización profunda de la lesión. Aunque el grado histológico es el factor pronóstico más importante en los sarcomas de la edad adulta, en el caso de los FHM y fundamentalmente en su variante histológica más frecuente (estoriforme-pleomórfica), es difícil valorarlo como una variable independiente ya que la mayoría de los FHM diagnosticados presentan grados II ó III de diferenciación (Enzinger, 1995).

La introducción de nuevas técnicas diagnósticas, que nos permiten actuar sobre la estructura molecular de los genes y comprender su comportamiento en los procesos vitales normales y alterados del organismo, ha contribuido al intento de caracterizar biológicamente este tipo tumoral y de proporcionar nuevos factores pronósticos aplicables en un laboratorio de Anatomía Patológica. Una de las aplicaciones que más interés ha despertado en éste sentido es la búsqueda de lesiones genéticas, que junto con los datos clínicos y anatomopatológicos puedan ser útiles como marcadores. Numerosas investigaciones apoyan la noción de que la alteración de ciertos genes celulares causa el desarrollo tumoral. El cáncer humano aparece como el resultado de un accidente genético sufrido por la célula. Se han identificado unos cien genes relacionados con el cáncer que ocupan un papel central en los procesos normales de captación y transducción de señales desde el exterior al interior de la célula y en la respuesta de ésta para diferenciarse y dividirse.

El cambio genético más común en el cáncer es la mutación del gen **TP53** (Vogelstein, 1990). El producto de este gen juega un papel importante en la transcripción del DNA, en el crecimiento y proliferación celular y en diversos procesos metabólicos. Cuando la proteína p53 sufre una mutación puntual, substituyéndose un aminoácido por otro, pierde su capacidad de bloquear el crecimiento celular anormal, e incluso se han descrito determinadas mutaciones que pueden estimular el crecimiento celular y por consiguiente el desarrollo tumoral. Más del 50% de los distintos tipos de cáncer humano presentan mutaciones en el gen TP53, agravando su pronóstico.

Para el estudio de las mutaciones del gen TP53 se utiliza actualmente la técnica de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple, SSCP (single strand conformational polymorphism) tras amplificación de las regiones del DNA que interesan mediante PCR. Esta técnica detecta de forma rápida y sensible, cualquier cambio (un sólo nucleótido) en la secuencia del gen. Basándonos en que la frecuencia de mutaciones del gen TP53, publicadas hasta la fecha, se concentra en los exones 5, 6, 7, 8 y 9, elegimos estos mismos para nuestro análisis. Posteriormente, se secuencian los casos que presentan SSCP positiva.

Uno de los muchos genes diana que se conocen cuya transcripción es activada por el gen TP53 es el gen **MDM2**. Este gen se ha estudiado detalladamente en sarcomas humanos, por estar localizado en una región frecuentemente alterada en fibrohistiocitomas (12q13-14) y por su interacción con el gen TP53, que permitiría a estos tumores escapar del control del crecimiento celular mediado por p53. Por todo ello, muchos trabajos realizados sobre sarcomas, incluyendo FHM, analizan simultáneamente las alteraciones en ambos genes.

La mayoría de los trabajos no encuentran alteración de ambos genes en el mismo tumor, apoyando la existencia de mecanismos alternativos de inactivación de la misma vía de supresión del crecimiento celular (Leach, 1993; Reinfenberger, 1993; Kovar, 1993; Florenes, 1994; Miller, 1996; Reid, 1996). Sin embargo, en estos mismos trabajos, sí que se describen tumores con sobreexpresión simultánea de ambas proteínas. Este hecho es concebible por la existencia de un *feed-back* entre ambas proteínas y por la estabilización de la proteína mdm2 por p53 (Keleti, 1996).

El análisis inmunohistoquímico de la proteína p53 es un método excepcionalmente útil, ya que la función de ésta proteína es especialmente sensible a cualquier mínimo cambio en su secuencia. La proteína mutada tiene típicamente una vida media más larga que la forma no mutada. La inmunohistoquímica nos puede facilitar la búsqueda de mutaciones puntuales erróneas (*missense*), que son las más frecuentemente encontradas en este gen supresor, ya que las proteínas ausentes, truncadas ó inestables causadas por mutaciones sin sentido (*nonsense*) y por cambio de pauta de lectura (*frameshift*) son generalmente indetectables (Harris, 1993). De este modo, aunque la concordancia entre las mutaciones del gen TP53 y la acumulación celular de la proteína p53 no es perfecta, el estudio inmunohistoquímico es una buena aproximación diagnóstica de mutaciones del gen TP53.

Hay ejemplos de detección inmunohistoquímica de niveles altos de proteína p53 no mutada. Esto es debido a mecanismos de estabilización de esta proteína por una serie de proteínas celulares conocidas (virales, mdm2...) ó por un aumento de su síntesis en respuesta a la lesión del DNA por agentes tóxicos físicos ó químicos. La mayoría de los anticuerpos monoclonales capaces de detectar la proteína p53 en tejidos fijados en parafina detecta ambas formas: la normal y la mutada. Sin embargo, en los trabajos publicados que estudian tanto el gen como la proteína, los casos que muestran sobreexpresión proteica sin alteración genética se relacionan también con un peor pronóstico, por lo que resulta útil la detección inmunohistoquímica en estos casos.

El estudio conjunto de ambos genes (TP53 y MDM2) y sus proteínas en los fibrohistiocitomas malignos puede ayudar a intentar esclarecer la interacción entre ambos, su implicación en los mecanismos de progresión tumoral y facilitar nuevos determinantes pronósticos en estos tumores. En este sentido, la aplicación de las técnicas de Biología Celular y Molecular en el campo de la Patología puede contribuir a ampliar el conocimiento sobre el comportamiento clínico y biológico de este tipo tumoral.

El planteamiento de nuestro trabajo se ha realizado basándose en los siguientes objetivos:

1.- Estudiar la presencia de mutaciones en los exones 5,6,7,8 y 8 del **gen P53** en Fibrohistiocitomas Malignos mediante la técnica de Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple (SSCP) del DNA tras amplificación de estas regiones mediante PCR. Asimismo realizaremos la caracterización precisa de las alteraciones halladas mediante técnicas de secuenciación y el análisis comparativo de la expresión de la **proteína p53** en FHM mediante las técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot.

2.- Estudiar la amplificación del **gen MDM2** en FHM mediante la técnica de Southern-blot y la sobreexpresión de su producto génico, la **proteína mdm2**, mediante las técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot.

3.- Determinar la relación existente en las alteraciones detectadas con las distintas técnicas en ambos genes y ambas proteínas, con el fin de establecer la **fiabilidad** de dichas técnicas.

4.- Correlacionar los datos obtenidos con las características clinico-patológicas del FHM de cara a su **aplicación diagnóstica-pronóstica** en un Laboratorio de Anatomía Patológica.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1.- FIBROHISTIOCITOMA MALIGNO.

---

### 1.1- CONCEPTO

---

El término de Fibrohistiocitoma Maligno (FHM) fue propuesto inicialmente por Ozzello y col. (1963) y posteriormente por O'Brien y Stout (1964) para designar un grupo de tumores de partes blandas que tenían como principal característica un patrón de crecimiento estoriforme. Este concepto diagnóstico fue ampliamente difundido tras el empleo del término fibroxantomasarcoma por Kempson y Kyriakos (1972) publicándose largas series de esta nueva entidad (Soule, 1974; Weiss, 1978; Enjoji, 1980; Kearney, 1980).

Desde el punto de vista nosológico e histogenético es una entidad controvertida. Al estudiar cultivos tumorales, se observó que las células inicialmente adoptaban aspecto de histiocitos, con movimiento ameboide y capacidad de fagocitosis, y más tarde adquirían caracteres morfológicos y funcionales propios de fibroblastos (fibroblastos facultativos). La versatilidad del histiocito explicaría la población bimodal frecuentemente encontrada en estos tumores (O'Brien, 1964)

Los estudios ultraestructurales y las técnicas inmunohistoquímicas han contribuido a elucidar algunas cuestiones referentes al origen histiocítico de los FHM. Existen tres grandes teorías:

1.- El FHM es un tipo de tumor derivado de histiocitos que actúan como fibroblastos facultativos (Ozzello, 1963; Soule, 1974; Shirasuna, 1985; Strauchen, 1986; Soini, 1990; Yamate, 1991; Binder, 1992)

2.- El origen del FHM está en las células mesenquimales primitivas con diferenciación bidireccional hacia fibroblastos e histiocitos (Fu, 1975; Alguacil-Garcia, 1978; Enjoji, 1980; Iwasaki, 1987; Hashimoto, 1990)

3.- El FHM es un tumor de estirpe fibroblástica con histiocitos no neoplásicos entremezclados (Hoffman, 1983; Genberg, 1989; Kato, 1990; Takeya, 1991; Tsuchiya, 1993; Takeya, 1995).

Actualmente persiste el debate sobre si el FHM representa una verdadera neoplasia de origen histiocitario. La mayoría de los estudios se inclinan por asignar a las células tumorales un fenotipo cercano al fibroblasto, no siendo capaces de confirmar la diferenciación monocítica-macrofágica. Recientemente se ha sugerido también un posible origen miofibroblástico apoyándose en la presencia de marcadores musculares por inmunohistoquímica y detección de miofibroblastos a nivel ultraestructural (Brooks, 1994).

El tema principal es si el FHM representa una entidad homogénea ó una colección de diversos tipos de sarcomas con diferenciaciones divergentes. Esta última hipótesis fue originalmente expuesta en los trabajos de Snover y col (1982), Brooks y col (1986) y Dehner y col (1988), basándose en la existencia de áreas desdiferenciadas "FHM-like" en otros tipos de sarcomas bien diferenciados. A éste respecto, Meister propone que la presencia de estos cambios focales "FHM-like" en diversos tumores con algún tipo de diferenciación específica se entenderían mejor como compartimentos neoplásicos primitivos, todavía no diferenciados, más que como evidencia de desdiferenciación en neoplasias previamente bien diferenciadas (Meister, 1996).

Un reciente y amplio estudio retrospectivo de tumores diagnosticados como sarcomas pleomórficos indica que aproximadamente una cuarta parte cumplen los criterios diagnósticos actuales del FHM (Fletcher, 1992) apoyando el concepto de FHM como una manifestación morfológica común de tumores pobremente diferenciados, particularmente sarcomas (Vera-Sempere, 1989; Roholl, 1990; Gaffney, 1993; Perez-Bacete, 1994). Akerman en una reciente revisión sobre el concepto de FHM llega a la conclusión de que probablemente el FHM dejará de ser el sarcoma más frecuente aunque actualmente no es posible decidir si no existe como entidad (Akerman, 1997).

Aunque, indudablemente, una serie de diversos tipos de sarcomas pleomórficos desdiferenciados se incluirán dentro de la categoría de FHM, resulta actualmente una clasificación útil. El término FHM, incluso pensando que es taxonómicamente inexacto, está bien aceptado en la literatura clínica e implica un sarcoma pleomórfico de alto grado, de la edad adulta, sin signos microscópicos específicos de diferenciación excepto la producción de colágeno (Enzinger, 1995).

## 1.2- EPIDEMIOLOGÍA. FACTORES ETIOLÓGICOS.

---

Los sarcomas de partes blandas representan el 1% del total de las neoplasias humanas. En Estados Unidos se diagnostican aproximadamente al año 6.000 sarcomas en adultos y 1.300 en niños, y es causa de 3.100 fallecimientos.

El FHM es el sarcoma de partes blandas más frecuente de la edad adulta, con una máxima incidencia en la sexta y séptima décadas de la vida. Ocurren excepcionalmente antes de los 20 años. Aproximadamente dos tercios de los FHM aparecen en hombres. Su localización más frecuente es la extremidad inferior (muslo) seguida de la extremidad superior y retroperitoneo. Una notable excepción es el FHM inflamatorio, cuya localización más frecuente es el retroperitoneo. Aunque el FHM ha sido definido clásicamente como un sarcoma de partes blandas, puede aparecer en hueso ó en distintos órganos (Enzinger, 1995).

Respecto a los factores etiológicos, hay evidencia del desarrollo de FHM post-irradiación (Gonzalez-Vitale, 1976; Weiss, 1978), desarrollándose tras un mínimo de siete años en el área irradiada. Aproximadamente el 10% de los pacientes afectos de FHM padecen una segunda neoplasia, sin ser este dato estadísticamente significativo debido a la elevada edad de los pacientes. No se ha establecido una relación causal directa pero se ha descrito en pacientes expuestos a fenoxiácidos (Eriksson, 1981). Experimentalmente se ha inducido en animales con extracto de té (Kapadia, 1976) y con macrófagos transformados por el virus SV40 (Yumoto, 1980). En el caso de FHM óseos, se han descrito en antiguos infartos óseos (Michael, 1976; Mirra, 1977).

## 1.3- CLINICA

---

Clínicamente suelen manifestarse por la aparición de una masa tumoral, de crecimiento progresivo, con poca sintomatología local. Al igual que otros sarcomas, se ha observado aceleración del crecimiento durante el embarazo. Se ha descrito la existencia de síntomas y signos generales como fiebre y neutrofilia, que remitieron tras la extirpación del tumor, astenia, anorexia y adelgazamiento en tumores de localización abdominal preferentemente. Raramente se presenta como tumor metastásico sin evidencia clínica de lesión primaria (Weiss, 1978) ó como enfermedad metastásica y primaria sincrónicamente (Rooser, 1991)

## 1.4- CLASIFICACIÓN

La última clasificación de tumores de partes blandas de la Organización Mundial de la Salud en 1994 define el FHM como un *sarcoma de células fusiformes pleomórficas que se desarrolla en adultos y no exhibe ninguna línea de diferenciación distintiva. Típicamente contiene una mezcla de células fusocelulares pleomórficas, gigantocelulares, xantomatosas e inflamatorias dispuestas aleatoriamente. Se puede observar un patrón estoriforme ó en rueda de carro, generalmente focal, y no en todos los casos.*

Se distinguen cuatro subtipos histológicos (Enzinger, 1995; Hollowood, 1995):

### 1.- PLEOMÓRFICO-ESTORIFORME

- **Clínica:** es el subtipo histológico más frecuente. Se presenta habitualmente como una masa tumoral profunda e indolora en extremidad preferentemente inferior. Más frecuente en el sexo masculino. Índice de recurrencia del 40-50%, metástasis en el 40% de los casos y una tasa de supervivencia a los cinco años del 30-40%.
- **Características microscópicas:** se caracteriza por una mezcla de células fusiformes semejantes a los fibroblastos dispuestas, al menos focalmente, con un patrón de crecimiento estoriforme alrededor de hendiduras vasculares, junto a celularidad histiocitaria, gigantocelular e inflamatoria crónica. Son frecuentes el pleomorfismo celular y el alto índice mitótico. Es típica la presencia de un gran número de células gigantes con múltiples núcleos irregulares e hipercromáticos y un citoplasma eosinófilo. El componente estromal consiste en finas fibras de colágena que rodean individualmente a las células ó bien de forma ocasional marcada colagenización separándolas ampliamente. La vascularización intratumoral puede aparecer dilatada simulando el patrón hemangiopericítico. La celularidad inflamatoria suele ser linfocitaria y plasmocelular con predilección por las áreas periféricas y perivasculares. Las lesiones metastásicas suelen presentar un patrón nodular con histología similar al tumor original.
- **Inmunohistoquímica:** el estudio inmunohistoquímico de estos tumores se realiza fundamentalmente con el propósito de excluir otras posibilidades diagnósticas como carcinomas anaplásicos ó sarcomas pleomórficos que morfológicamente simulan FHM. La inmunohistoquímica, a pesar de la limitación diagnóstica, ha proporcionado claras evidencias del origen no histiocitario de estos tumores.
- **Ultraestructura:** no hay descritas características específicas de éste tipo tumoral. Clásicamente los hallazgos más consistentes eran la presencia de células de apariencia fibroblástica que poseían abundante retículo endoplásmico rugoso, células de hábito histiocitario con numerosos lisosomas y evidencia de fagocitosis, y células mesenquimales indiferenciadas. Similares características se pueden observar en otros tipos tumorales. Por todo ello, la utilidad de la microscopía electrónica, al igual que la inmunohistoquímica, se basa en establecer la ausencia de ciertos orgánulos que indicarían algún tipo de diferenciación.
- **Diagnóstico diferencial:** fundamentalmente se realiza con todos aquellos tumores que exhiben el mismo grado de pleomorfismo celular como el liposarcoma pleomórfico, rabdosarcoma pleomórfico, carcinoma anaplásico y más raramente con la enfermedad de Hodgkin.

## 2.- MIXOIDE

- **Clínica:** La mayoría de estos tumores se presenta en las extremidades (más frecuente en pierna) de pacientes entre 50-80 años como una masa subcutánea indolora y de crecimiento lento. Aproximadamente dos tercios recurren localmente de forma independiente al grado tumoral, mientras que la aparición de metástasis (25%) sí que mantiene relación con el grado de la lesión. Tiene mejor pronóstico que la variante pleomórfica y se suele diagnosticar en estadios menos avanzados.

- **Características microscópicas:** esta forma se caracteriza por la presencia de áreas mixoides asociadas a áreas celulares indistinguibles del patrón típico del FHM. Aunque la proporción entre dichas áreas puede variar, al menos la mitad del tumor debe presentar carácter mixoide. El 25% de los casos aproximadamente son de bajo grado y presentan una prominente matriz mixoide con escasa celularidad no cohesiva de morfología fusiforme, redondeada ó estrellada. El componente vascular aparece más prominente y adopta formas arqueadas con mayor condensación celular tumoral e inflamatoria alrededor de ellos. Las lesiones de alto grado (50% de los casos) también contienen focos mixoides, pero las áreas celulares muestran mayor pleomorfismo y áreas necróticas confluentes.

- **Ultraestructura:** aparecen células con características fibroblásticas embebidas en una matriz filamentosa electron-densa. Puede verse vacuolización celular por dilatación del retículo endoplásmico.

- **Diagnóstico diferencial:** el aspecto más importante es la distinción con lesiones benignas como fascitis nodular y mixoma.

## 3.- GIGANTOCELULAR

- **Clínica:** muestra características similares a la variante pleomórfica con una localización más superficial, aunque las lesiones situadas en planos profundos tienen una mayor frecuencia de recurrencias locales y metástasis que el tipo pleomórfico.

- **Características microscópicas:** el prototipo de FHM gigantocelular es un tumor infiltrativo constituido por nódulos separados por densas bandas de tejido fibroso con frecuentes áreas hemorrágicas y necróticas. La celularidad fibroblástica e histiocítica es similar al resto de los subtipos con frecuente fagocitosis de material lipídico ó de hemosiderina. El rasgo distintivo es la presencia de células gigantes de tipo osteoclástico no asociadas a osteoide, sino en íntima relación con las células histiocitarias de las que podrían originarse por fusión ó división amitótica. Dichas células presentan amplios citoplasmas eosinófilos y numerosos núcleos pequeños y uniformes.

- **Ultraestructura:** características celulares similares al FHM pleomórfico.

- **Diagnóstico diferencial:** debido a sus rasgos típicos no suelen dar problemas diagnósticos. Si tienen una localización profunda, puede plantearse el diagnóstico de tumor de células gigantes de hueso afectando partes blandas.

## 4.- INFLAMATORIO

- **Clínica:** presenta un grupo de edad similar al resto de FHM y su localización más frecuente es el retroperitoneo. Se asocia con sintomatología sistémica y tiene un comportamiento local más agresivo con baja incidencia de metástasis.

- **Características microscópicas:** este subtipo histológico suele presentarse como masas retroperitoneales infiltrativas constituidas por una población celular pleomórfica xantomatosa e inflamatoria entre un estroma de material amorfo hialino con poca colágena. Se puede observar focalmente áreas típicas del FHM pleomórfico.
- **Diagnóstico diferencial:** con los procesos xantomatosos no neoplásicos y más raramente con linfomas.

## 1.5 - FACTORES CLÍNICO-PRONÓSTICOS

A pesar de ser el FHM el sarcoma más frecuente de la edad adulta, existen relativamente pocos trabajos dedicados a el análisis de factores pronósticos relacionados con la recurrencia local, la aparición de metástasis y la supervivencia. Las series más amplias corresponden a Rooser y col (1991) con 137 casos, Pezzi y col (1992) que estudian 227 casos, Pritchard y col (1993) con 408 casos, Shinjo (1994) con 107 casos, Zagars y col (1996) con 271 casos y Le Doussal y col (1996) con 216 casos. Hay que destacar también el trabajo de Corpron y col que estudian 44 casos de FHM en niños (Corpron, 1996).

Todos ellos coinciden en señalar como factores determinantes principales el tamaño tumoral mayor de 10 cm. y la localización profunda de la lesión. Son también factores de mal pronóstico la localización en tronco, cabeza y cuello, la localización proximal en las extremidades, el tipo histológico no mixoide, el grado histológico, la presencia de necrosis, el estadio tumoral, la edad mayor de 50-60 años y la resección quirúrgica incompleta.

La supervivencia a los cinco años varía en las distintas series con un rango entre 50-70%. La incidencia de metástasis ocurre en un 30-34% y la recidiva local en un 16-45% según series.

El tratamiento de elección es la cirugía conservadora y radioterapia en los tumores localizados, ya que no hay evidencia de mayor supervivencia con tratamientos más radicales como amputación de la extremidad afecta. Pacientes con tumores mayores de 8-10 cm. no mixoides y con un alto grado histológico podrían beneficiarse con tratamientos quimioterápicos coadyuvantes.

## 1.6- CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Desde la descripción inicial del FHM a principios de los años sesenta hasta ahora, se han ido proponiendo de forma gradual, diversas teorías respecto a su entidad histológica, origen y diferenciación. La introducción de nuevas técnicas en biología celular y molecular han contribuido al intento de caracterizar biológicamente este tipo tumoral. Actualmente se le reconoce un fenotipo heterogéneo basándose en la capacidad diferenciativa multipotente y la plasticidad fenotípica de las células mesenquimales primitivas que originan el FHM. Estas técnicas complementarias han aportado los siguientes datos:

### • INMUNOHISTOQUÍMICA

El origen histiocítico del FHM sugerido en múltiples trabajos se basa en la inmunorreactividad de las células tumorales frente a  $\alpha_1$ -antitripsina y  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina (Kindblom, 1982; Meister, 1980; Nemes, 1988). Sin embargo, estos enzimas están presentes en diversos tipos de sarcomas y carcinomas (Leader, 1987), posiblemente como resultado de endocitosis plasmática (Roholl, 1985).

En estos tumores no se ha identificado ninguno de los marcadores considerados como más específicos de la estirpe histiocitaria, como el CD68 (Kp-1), Leu-3 y Leu-M3 (Wood, 1986), excepto en un trabajo donde encuentran positividad en el 72% (18/25) de los FHM estudiados (Binder, 1992). Tampoco hay expresión del Antígeno Leucocitario Común (CD45-T200) (Wood, 1986).

Iwasaki y col realizan un estudio inmunohistoquímico con un panel de 12 anticuerpos en 33 FHM demostrando positividad de los histiocitos reactivos frente a los anticuerpos CD68, Mac 387, y Ham-56, mientras que ninguna de las células tumorales del FHM los expresan. Sin embargo, éstas células tumorales sí que expresan marcadores mesenquimales (FU-3 y vimentina) indicando, según el autor, un origen mesenquimal con una apariencia superficial histiocitaria (Iwasaki, 1992). En relación con el anticuerpo FU-3 propuesto como marcador específico de FHM, un amplio estudio realizado sobre 51 tumores malignos de hueso y partes blandas descarta la expresión exclusiva en FHM (Perez-Bacete, 1994).

Numerosos trabajos sobre tumores diagnosticados microscópicamente como FHM expresan focalmente filamentos intermedios y neurofilamentos (Hirose, 1989; Miettinen, 1989; Roholl, 1991; Rosenberg, 1993). La expresión de citoqueratinas por las células tumorales queda ampliamente demostrada en diversos trabajos descartándose a nivel ultraestructural la posibilidad diagnóstica de carcinomas indiferenciados (Weiss, 1988; Roholl, 1991; Fletcher, 1992). El hallazgo de inmunopositividad frente a citoqueratinas y desmina en un FHM típico no altera el diagnóstico, pudiendo considerarse diferenciaciones focales dentro del tumor. Sin embargo, el diagnóstico debería replantearse frente a positivities intensas y extensas (Enzinger, 1995). Rosenberg en 1993 realiza un amplio estudio con 67 casos de FHM en los que encuentra un 25% de positividad frente a queratinas, un 20% frente al antígeno epitelial de membrana (EMA) aunque en menor proporción de células y un 16.9% frente a desmina. La mayoría de los casos presentan inmunorreacción frente a vimentina,  $\alpha_1$ -antitripsina y  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina al contrario que la proteína S-100 que es negativa. Esta inmunonegatividad frente a S-100 es un dato importante en el diagnóstico diferencial con el melanoma, que puede adoptar un patrón similar a las variantes pleomórfica y mixoide del FHM (Brooks, 1994).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) ha aportado información sobre el componente celular proliferativo del FHM (Iwasaki, 1992) al mismo tiempo que se muestra como un indicador pronóstico (Dreinhofer, 1994; Sugiura, 1995). El trabajo de Iwasaki analiza de forma individual la positividad de las diferentes células que componen el FHM frente a PCNA con interesantes resultados. El 70% de la celularidad son PCNA-positivas. Las células gigantes de formas bizarras que representan un estadio final de la anaplasia celular, al contrario de como cabría esperar, presentan intensa inmunorreactividad. Las células gigantocelulares de tipo osteoclastico y de Touton son claramente negativas asignándoseles, por tanto, un carácter no neoplásico. El tipo histológico mixoide contiene menor número de células PCNA-positivas que el tipo pleomórfico, correlacionándose con su comportamiento menos agresivo.

Se ha descrito como factor pronóstico en los FHM la presencia de la proteína HSP-27 (heat-shock protein) de 27 Kd de función desconocida. En un estudio con 43 FHM, se indica que 25 de ellos (58%) presentan positividad a este marcador y se relacionan con un mejor pronóstico (Tetu, 1992). Por otro lado, Brink encuentra que el porcentaje de células que expresan la oncoproteína c-myc y el Ag Ki-67 muestra correlación con el grado tumoral, el índice mitótico y la supervivencia (Brink, 1995).

## • CITOGENÉTICA

Citogenéticamente no se han identificado anormalidades cromosómicas específicas apoyando el concepto de FHM como un grupo heterogéneo de sarcomas pobremente diferenciados (Walter, 1997). Los FHM presentan cariotipos complejos con multitud de aberraciones estructurales y numéricas tales como cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos y asociaciones teloméricas.

Las alteraciones más frecuentemente encontradas son reordenaciones de 1q11-12 en un 40%, aberraciones de 19p13 en un 25% y reordenaciones de las bandas 1p36, 1q21, 11p11, 17p11 y 19q13 (Mandahl, 1989; Örndal, 1994).

Un tercio de los FHM muestran cromosomas en anillo que contienen material genético del cromosoma 12 (Nilbert, 1994). La presencia de estos cromosomas en anillo se asocia con menor tendencia a las recidivas (Choong, 1996; Mandahl, 1996).

Un análisis de 69 FHM realizado por Choong y col (1996) revela 19 tumores con 19p+ y 24 tumores con cromosomas en anillo. Este estudio confirma que la duplicación del brazo corto del cromosoma 19 es un hallazgo relativamente frecuente en los FHM y se relaciona con una mayor incidencia de metástasis y recidivas locales. La falta de correlación de 19p+ con el grado tumoral, subtipo histológico y tamaño tumoral sugiere la posibilidad de que el valor pronóstico de 19p+ sea independiente del tamaño, grado e histología.

Estudios sobre recidivas de FHM indican que la adquisición de cromosomas en anillo es un evento temprano en el proceso de tumorigénesis mientras que las reordenaciones de 19p ocurren posteriormente, durante la progresión tumoral (Örndal, 1994).

Mediante la técnica de *Hibridación Genómica Comparativa (CGH)* se ha descrito recientemente un posible marcador pronóstico nuevo en FHM. En un estudio de 58 FHM, Larramendy y col (1997) observan una relación estadísticamente significativa entre la ganancia de 7q32 y la supervivencia, la aparición de metástasis, el grado y el tamaño tumoral.

## • XENOTRANSPLANTES EN RATONES ATÍMICOS

El trasplante de tumores humanos en ratones atímicos *nude* se ha convertido en un modelo establecido en la investigación experimental del cáncer (Sharkey, 1984; Carda, 1988). Estos tumores xenotransplantados en ratones *nude*, no solo conservan las características histológicas y citológicas del tumor, sino que también mantienen las características citogenéticas, incluso tras largo tiempo y numerosos pases, sin hibridación interespecífica ó cambios biológicos aparentes (Povlsen, 1975; Bauer, 1986).

El FHM presenta un buen índice de prendimiento en ratones *nude* con establecimiento de líneas tumorales que permiten investigar el comportamiento biológico de estos tumores ó evaluar diferentes agentes terapéuticos (Shirasuna, 1985; Llombart-Bosch, 1988; Broström, 1996).

En relación con el comportamiento biológico, son interesantes los resultados obtenidos por Llombart-Bosch y col (Llombart-Bosch, 1988). El estudio histológico de los xenotransplantes de FHM demostró un aumento del componente histiocitario mientras que el componente fibrosarcomatoso desapareció tras el primer pase. Paralelamente se perdió la

inmunorreactividad frente a  $\alpha_1$ -antitripsina y  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina, presentes generalmente en los FHM. Ambos antígenos fueron detectados en el tumor original y no se encontraron en los sucesivos pasajes, incluso con las células de apariencia histiocitaria como único componente tumoral. Este hallazgo apoya el origen mesenquimal-fibroblástico del FHM y la existencia de un doble patrón fenotípico.

## • BIOLOGÍA MOLECULAR

La patogenia del cáncer es uno de los problemas más complejos en biología. Aunque falta por elucidar muchos de los aspectos del proceso de transformación maligna de las células normales, la moderna biología celular y molecular está teniendo un profundo impacto en la comprensión de la carcinogénesis. Se ha sospechado durante décadas que los tumores se originan por un proceso de múltiples pasos relacionados con alteraciones genéticas sucesivas desde una célula progenitora normal (Nowell, 1976). Actualmente es posible asignar alteraciones genéticas específicas a algunos de estos pasos implicados en la carcinogénesis. Es, por tanto, razonable esperar que el avance de la genética molecular en el cáncer permita diagnósticos clínicos más completos, nuevos marcadores pronósticos y nuevas actuaciones terapéuticas.

Los estudios citogenéticos son una primera aproximación morfológica para detectar lesiones genéticas en las células tumorales, que luego pueden ser verificadas mediante estudios moleculares. En este sentido, el estudio citogenético de los FHM demuestra la presencia de signos de amplificación génica como dobles minutos (dmin) y regiones homogéneamente teñidas (hsr) (Turc-Carel, 1986; Mandahl, 1989). Estos hallazgos han orientado la posterior búsqueda de alteraciones moleculares específicas de este tipo tumoral.

En el brazo largo del cromosoma 12 se ha identificado una secuencia amplificada (12q13-14) en varios tipos de sarcomas, incluidos los FHM, que varían en tamaño y abarcan a varios genes potencialmente relacionados con el crecimiento celular:

## • SAS

La primera contribución al respecto la aportan Meltzer y col en 1991 al identificar y clonar parcialmente una secuencia amplificada del DNA en FHM mediante renaturalización en gel derivada de la región 12q13-14, frecuentemente alterada en sarcomas de partes blandas (Turc-Carel, 1986; Mandahl, 1989). Esta región contiene al menos un gen, que designan *SAS* (*sarcoma amplified sequence*). Previamente se había identificado al gen *GLI* en 12q13-14 a través de su amplificación en tumores cerebrales y en sarcomas en niños (Roberts, 1989).

Posteriormente, éste mismo grupo de investigadores (Smith, 1992) examina una serie de 22 FHM y 3 liposarcomas para determinar la frecuencia de la amplificación del gen *SAS*, encontrándolo amplificado en 7 FHM (32%) y en los tres liposarcomas. Curiosamente, todos los tumores que muestran amplificación de *SAS* se localizan a nivel abdominal ó retroperitoneal. Una explicación que dan a este hecho es el diagnóstico tardío de estas lesiones por su localización profunda, que facilitaría la adquisición de alteraciones genéticas adicionales, como la amplificación del gen *SAS*. Por otro lado, también apuntan la relación de ésta alteración genética con la desdiferenciación descrita en los liposarcomas de bajo grado, particularmente de retroperitoneo, histológicamente indistinguible del FHM, que aparece con el tiempo de evolución del tumor (Weiss, 1991). Jankowski y col (1994) demuestran que *SAS* es un nuevo miembro de la familia de las proteínas transmembrana (TM4SF) relacionadas con

el proceso de crecimiento celular y caracterizan la estructura genómica del gen *SAS* constituida por seis exones con una longitud de aproximadamente 3.2 Kb (Jankowski, 1995).

### • MDM2

Paralelamente, Oliner y col en 1992 (1992) clonaron el gen MDM2, identificado en una línea celular murina transformada y posible candidato como regulador del gen supresor TP53, utilizándolo para localizar al gen humano en el cromosoma 12 (12q13-14). Debido a la ya conocida amplificación de ésta región en sarcomas humanos, se estudió mediante Southern blot su amplificación en una serie de 47 sarcomas de hueso y partes blandas, 5 lipomas y 74 carcinomas colo-rectales y gástricos. Se obtuvo amplificación en un tercio de los sarcomas: 7 de 22 FHM, 7 de 13 liposarcomas, 3 de 11 osteosarcomas y 0 de 1 rabdomiosarcoma. El resto de las muestras no presentó amplificación. Estos resultados apoyaban la hipótesis de la posible inhibición de TP53 por MDM2 y de la amplificación de MDM2 como posible mecanismo de escape de los sarcomas al control del ciclo celular mediado por p53. Tras éste hallazgo, se publicaron numerosos trabajos estudiando la relación de TP53 y MDM2 en sarcomas de hueso y partes blandas (las características de ambos genes se estudian con más detalle en los apartados 3 y 4 de este capítulo).

### • CHOP-GADD153

Al estudiar la respuesta molecular de la célula frente a la lesión del DNA, el grupo de Holbrook (Luethy, 1990) logra aislar en células de hamster un nuevo gen implicado en dicha respuesta: *GADD153* (*growth arrest and DNA-damage-inducible gene*). Posteriormente identifican la estructura del gen *GADD153* humano, lo localizan en la región 12q13.1-q13.2, analizan la secuencia de nucleótidos de su mRNA y de 900-pb de la región promotora (Park, 1992). Ron y Habener (1992) identifican el producto génico del gen *GADD153* que consiste en una proteína nuclear con función inhibidora de los factores de transcripción C/EBP y LAP. A dicha proteína se le denominó *CHOP* (*C/EBP-homologous protein*) aunque también se le llama *gadd153* ó *ddit3*. El gen *CHOP* (*GADD153*) se ha visto relacionado con el punto de ruptura de la translocación t(12;16) (q13;p11) en liposarcomas mixoides (Aman, 1992). Se ha descrito amplificado en 4 de 98 sarcomas (Forus, 1994) mientras que en un estudio de 41 FHM con "áreas liposarcoma-like" no se encuentra ninguna alteración (Nilbert, 1994).

### • CDK4

En 1993, Khatib y col (1993) localizan el gen *CDK4* en la región 12q13-14 y observan su amplificación, junto con la de los genes *MDM2* y *GLI* en líneas celulares derivadas de sarcomas. Este trabajo proporciona la primera evidencia de amplificación de genes que codifican proteinquinasas relacionadas con el ciclo celular y su posible participación en la oncogénesis. Posteriormente, Demetrick y col (1994) corroboran dicha localización.

Ninguno de los genes mencionados está constantemente amplificado en todos los tumores que tienen amplificación de 12q13-14 variando la frecuencia y asociaciones entre ellos (Forus, 1993; Pedetour, 1994; Nilbert, 1995; Berner, 1996; Elkahoun, 1996). Esto sugiere la implicación de varios de ellos en estos tumores, ó alternativamente, la falta de identificación del gen diana supuestamente amplificado en todos los casos (Enzinger, 1995).

### • RAS

Otros oncogenes distintos a los integrantes del amplicón 12q13-14 han sido estudiados en FHM. Uno de ellos ha sido el oncogén *RAS*. Bos (1989) realiza una amplia revisión del oncogén *RAS* en tumores humanos, encontrando 9 mutaciones en 10 FHM. Wilke y col

(1993) encuentran 2 mutaciones puntuales en el codón 12 del oncogén *RAS* de 6 FHM, sin especificar subtipos. Bohle y col (1996), en un reciente trabajo, estudian la familia de oncogenes *RAS* (*H-ras-1*, *K-ras-2* y *N-ras*) en 32 FHM y demuestran 9 (28%) mutaciones puntuales, con máxima incidencia en la variante mixoide (4 de 9). El tipo de mutación puntual encontrada fue común en todos los casos, consistiendo en el cambio GGC→GTC en el codón 12 del gen *H-ras-1*. La presencia de esta mutación podría ayudar a distinguir las formas mixoides de sarcomas, a nivel molecular.

### • MDR1

El gen de la resistencia a múltiples drogas (*MDR-1*) y su producto proteico, la glicoproteína-p, también ha sido estudiado en FHM. En un estudio de este gen y su proteína en 29 sarcomas de hueso y 32 de partes blandas mediante northern blot, slot blot e inmunohistoquímica, encuentran sobreexpresión en 3 de 9 FHM de partes blandas y 1 de 4 FHM de hueso. Estadísticamente no encuentran relación del aumento de expresión con la resistencia a la quimioterapia (Stein, 1993). Estos resultados son similares a los publicados por Vergier y col (Vergier, 1993) en un estudio de los niveles de mRNA por northern blot, dot blot e hibridación in situ y de la expresión de la proteína con tres anticuerpos monoclonales (C219, JSB1 y MRK16) en 22 sarcomas quimio-resistentes. La conclusión de este estudio es que aunque la sobreexpresión de *MDR1* ocurre en sarcomas humanos, no es el mecanismo principal de la resistencia a drogas, y que hay que ser cautos a la hora de interpretar los resultados, ya que la positividad con un anticuerpo no implica necesariamente la presencia de glicoproteína-p ni se relaciona con los niveles de mRNA. Contrariamente a lo expuesto, existen trabajos que relacionan la sobreexpresión de *MDR1* y glicoproteína-p con el curso clínico (Chan, 1991; Baldini, 1995).

## 2.- ONCOGENES

El descubrimiento de los denominados oncogenes (genes relacionados con la transformación neoplásica) fue el gran hallazgo que relacionó el cáncer con la genética y la biología molecular. Los primeros oncogenes se identificaron en el genoma de ciertos virus (Tooze, 1980), pero pronto se descubrió que muchos de ellos eran, en realidad, versiones modificadas de genes celulares normales (proto-oncogenes) (Stehelin, 1976; Shih, 1979).

Nuevas observaciones sugirieron que éstos no eran los únicos genes que participaban en el control de las neoplasias y que existían otro tipo de genes cuya función normal era prevenir ó suprimir la transformación neoplásica, siendo su inactivación un importante condicionamiento oncogénico (Weinberg, 1989). Dichos genes controladores del crecimiento y la transformación tumoral fueron llamados inicialmente anti-oncogenes (por su actividad opuesta a los oncogenes), aunque en la actualidad es de uso más generalizado y correcto el término de genes supresores tumorales.

Los oncogenes son genes que causan cáncer. Las investigaciones actuales indican que la interacción entre los productos de los oncogenes es crucial para el desarrollo de muchas, si no todas, las células cancerosas. Los oncogenes celulares pueden ser definidos como aquellos genes que en determinadas condiciones son capaces de inducir la transformación neoplásica de las células. Generalmente surgen por modificación de un gen normal, llamado proto-oncogén, por medio de mutaciones ó cambios en el control normal del mismo.

En la actualidad se conocen unos 100 oncogenes que, en ciertas condiciones, pueden hacer que las células pierdan el control normal del crecimiento, mortalidad y localización y causar la transformación neoplásica. Algunos autores sugieren la posibilidad de que se hayan identificado ya la mayoría de los genes que tienen potencial oncogénico, lo cual significa que aproximadamente 100 proto-oncogenes, entre los 50.000 genes humanos funcionales que probablemente existen, marcan el número máximo de puntos en los que las rutas bioquímicas que controlan el crecimiento celular normal pueden ser atacadas por proteínas oncogénicas.

El número de mecanismos generales puede ser mucho menor, por cuanto que las proteínas se pueden agrupar en conjuntos de actividad similar (quinasas de tirosina, nucleótidos que se unen a guanina, etc), cada uno de los cuales actúa presumiblemente en el mismo punto de ruta. En la mayor parte de los casos, la activación oncogénica es el resultado de acontecimientos somáticos, más que debido a causas hereditarias. Es decir, es una consecuencia de la evolución (mutación y selección) de las células del cuerpo (Nowell, 1976).

En células normales, la alteración de proto-oncogenes puede ocurrir por mutación, amplificación ó reordenaciones en su DNA. Las radiaciones ó los agentes químicos pueden producir mutaciones puntuales (Pulciani, 1982). La amplificación génica ocurre generalmente en fases tardías del cáncer e implica frecuentemente a los proto-oncogenes. El ejemplo mejor conocido es la amplificación de *N-myc* en neuroblastomas (Schwab, 1983). Este proceso aumenta la cantidad de copias del gen y en consecuencia se produce un aumento excesivo del mensaje y producto génico.

Las translocaciones cromosómicas producen intercambios de material genético entre cromosomas homólogos y no homólogos y a veces conllevan pérdida de material de uno ó los dos cromosomas implicados. También son frecuentes la inversión de segmentos en un cromosoma ó las deleciones intersticiales. Cada vez son más numerosas las alteraciones cromosómicas, principalmente translocaciones, en las que se conoce la alteración de algún gen implicado en la regulación normal del crecimiento y proliferación (Rabbitts, 1994).

Los resultados epidemiológicos sobre el cáncer sugieren que la adquisición del fenotipo canceroso es un proceso secuencial que requiere la acumulación de varias lesiones genéticas. Los estudios *in vitro* sugieren que la transformación celular maligna requiere al menos dos pasos. Sería necesario un oncogén para producir la inmortalización y otro para completar la transformación.

Las alteraciones de los proto-oncogenes dan como resultado la aparición de formas mutadas (oncogenes) en las cuales ha habido una ganancia de función: se convierten en señales positivas para la proliferación celular. Los genes supresores de tumor, por algún tipo de mutación, experimentarían una pérdida de función que se traduce en un aumento de la proliferación celular al desaparecer ese efecto supresor. Es decir, en el control de la proliferación celular existirían señales positivas y negativas (Weinberg, 1989).

Los proto-oncogenes estarían en una situación recesiva ante sus alelos mutados oncogénicos, mientras que los genes supresores actúan de manera dominante y la oncogénesis solo se produce cuando se inactivan los dos alelos normales.

---

### 3.- GEN TP53.

---

### 3.1- INTRODUCCIÓN

Entre Enero de 1993 Julio de 1996 se han publicado más de 4300 artículos con el término de p53 en el título. Este masivo interés por una única proteína no tiene precedentes y refleja el papel fundamental que juega dicha proteína en la regulación del crecimiento celular y la frecuencia de alteraciones en los tumores humanos. P53 ha sido denominada **molécula del año** por el editor de la revista Science (Koshlan 1993), y **“guardián del genoma”** por numerosos investigadores (Hall, 1996).

Esta proteína juega un papel principal en la transcripción del DNA (Kern, 1991; Hupp, 1992), en el crecimiento y proliferación celular (Diller, 1990; Livinstone, 1992) y en diversos procesos metabólicos. Debido a su actuación como supresor de la proliferación celular anormal, representa un mecanismo importante en la protección contra el cáncer. También esta relacionada en el proceso de muerte celular programada ó apoptosis (Yonish-Rovach, 1991; Lane, 1992).

Cuando p53 sufre una mutación puntual, substituyéndose un aminoácido por otro, pierde su capacidad de bloquear el crecimiento celular anormal, lo cual puede estimular el crecimiento celular y por consiguiente el desarrollo tumoral (Lane, 1990).

Más del 50% de los distintos tipos de cáncer humano presentan mutaciones en p53 (mama, cervix, colon, pulmón, hígado, próstata, vejiga, piel...), agravando su pronóstico (Vogelstein, 1990; Hollstein, 1991; Harris, 1993).

### 3.2- IDENTIFICACIÓN

La proteína p53 fue descubierta en 1979 por Lane y Crawford como una proteína de 53 Kd localizada en el núcleo, con capacidad de unirse al antígeno T grande del virus DNA SV40 y relacionada con la transformación celular (Lane, 1979, Linzer, 1979). Posteriormente se demostró su presencia en células infectadas por virus de Epstein-Barr (Luka, 1980) y adenovirus (Sarnow, 1982), así como en células transformadas por medios fisicoquímicos (DeLeo, 1979) y en células tumorales (Crawford, 1981; Dippold, 1981). Aunque con niveles más bajos, p53 también se encontró en células normales no transformadas como timocitos (Rotter, 1980) y células embrionarias (Mora, 1980; Chandrasekaran, 1981), sugiriéndose que debía tener una función habitual dentro de la fisiología celular.

En pocos años, fue caracterizada como una fosfoproteína (McCormick, 1980; Rotter, 1981; Jay, 1983) de origen nuclear (Gurney, 1980; Dippold, 1981) con una vida media muy corta (20 min) en células no transformadas (Oren, 1981).

Los niveles elevados encontrados en células transformadas podrían ser debidos a:

- aumento de la estabilidad por mutaciones
- por unión a proteínas víricas (Oren, 1981)
- aumento de su síntesis (Reich, 1983)

Mercer (1982; 1984) confirmó la relación de p53 con la regulación del ciclo celular mediante la microinyección de un anticuerpo monoclonal anti-p53. Este anticuerpo

monoclonal frente a p53 producía una inhibición de la síntesis de DNA en las células 3T3 por bloqueo del paso de G<sub>0</sub> a S.

Todas estas características llevaron a considerar a la proteína p53 como un miembro de la familia de los proto-oncogenes nucleares, como *fos*, *myc*, *myb* ó *ski*, ya que era una proteína de localización nuclear con una vida media muy corta que se encontraba a altas concentraciones en células transformadas y se sintetizaba durante la proliferación en células normales. Experimentos de cotransformación apoyaban esta hipótesis al producir inmortalización y transformación (junto con el oncogén *ras*) en células de roedores (Jenkins, 1984; Eliyahu, 1984; Parada, 1984; Rovinski, 1988).

Paralelamente, la revisión de los clones utilizados en los experimentos de cotransformación (Jenkins, 1984; Eliyahu, 1984; Parada, 1984; Rovinski, 1988) demostró que se habían utilizado variantes mutadas del gen normal (Editorial Oncogene, 1988) y cuestionó los experimentos de transformación realizados hasta el momento. Experimentos de transfección llevados a cabo con las variantes normales no mutadas se mostraron incapaces de inducir inmortalización ó cotransformación con el oncogén *ras* (Hinds, 1989). Ello hizo que el gen TP53 normal fuera considerado como gen supresor de tumor.

Esta idea fue apoyada por Green (1989) basándose en la formación de complejos del antígeno T del virus SV40 con p53 y con pRb y en la interacción de los dos oncogenes dominantes de los adenovirus, E1A y E1B, con pRb y p53 respectivamente. De este modo, los virus inducirían la transformación mediante el secuestro de estas proteínas a través de la formación de complejos no funcionantes.

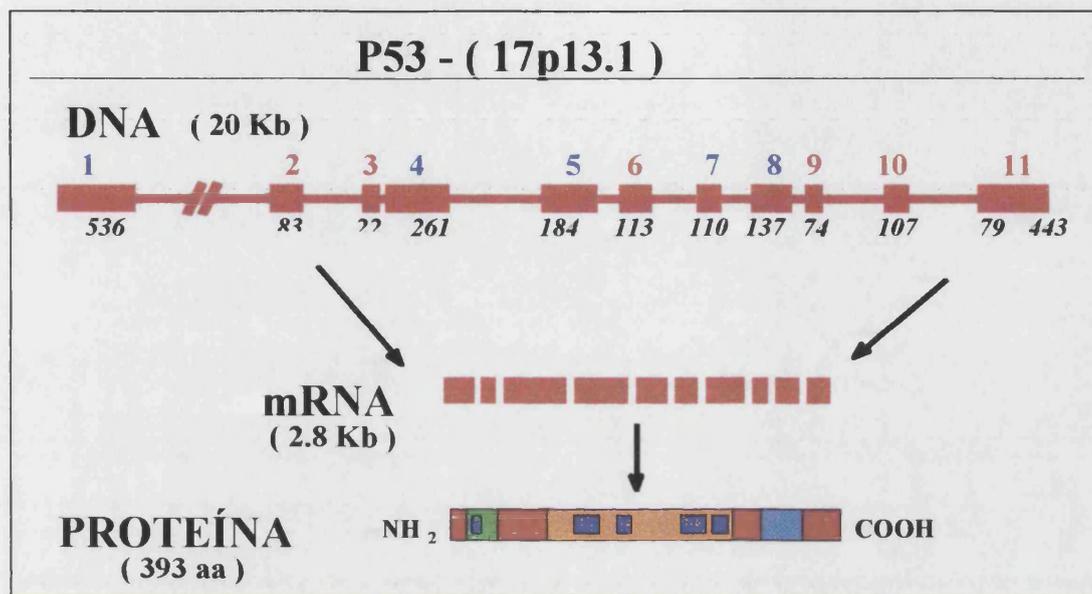
Vogelstein revalidó el papel de TP53 como anti-oncogén al demostrar en el carcinoma colorrectal la coexistencia de delección del cromosoma 17 en uno de sus alelos (en la región 17p12-p13.3, donde se localiza TP53) con mutaciones en el alelo presente (Vogelstein, 1989). Dicha característica se considera un marcador de la presencia de un gen supresor ó anti-oncogén, cuya pérdida de función induciría el desarrollo del fenotipo neoplásico (Sager, 1989).

Dos experimentos del grupo de Levine aclaran definitivamente los resultados de la transformación neoplásica después de la transfección de p53 mutantes. Este grupo demostró que la cotransfección de fibroblastos de rata con p53 mutante y *ras* induce la transformación neoplásica, mientras que si la cotransfección es con p53 normal no existe dicha transformación (Hinds, 1989). Por lo tanto, la actividad oncogénica de *ras* estaría suprimida por la acción de p53 normal. La triple transfección de p53 mutante, p53 normal y *ras* tampoco es capaz de inducir transformación (Finlay, 1989). Aunque la proteína p53 mutada transfectada suprime la función de p53 normal de la célula, este fracaso de inducir transformación se explica por la incapacidad de la variante mutada de desplazar a la p53 normal, ya que se expresan de forma equivalente.

De todo ello se deriva la conclusión lógica de asignarle a p53 la función de supresión de la transformación, es decir, antioncogénica. La proteína p53, considerada en un primer momento como una molécula favorecedora de los procesos de malignización, se encuadra actualmente dentro de los anti-oncogenes ó, más correctamente, como una proteína supresora de la transformación (Calle, 1990).

### 3.3- ESTRUCTURA GÉNICA

El gen que codifica la proteína p53 fue aislado en 1984 por Matlashewski y McBride y col (1985; 1986), lo localizaron en el cromosoma 17, en la banda 13.1. Paralelamente varios trabajos corroboraron dichos resultados (Benchimol, 1985; Miller, 1986; Isobe, 1986), localizándolo concretamente en 17p13,105-p12 (vanTuinen, 1987). Tiene una longitud aproximada de 16-20Kb (McBride, 1986; Miller, 1986).



*Figura 3.3.1:* esquema del gen P53, mRNA y su producto génico

Está formado por 11 exones. Transcribe un mRNA de 2.8 Kb que traduce una proteína de 393 aminoácidos. Las regiones que codifican la proteína se extienden desde el principio del exón 2 hasta el primer tercio del exón 11. *Figura 3.3.1.*

El análisis de nucleótidos y secuencia de aminoácidos revela cinco dominios conservados a lo largo de la evolución localizados en los exones 1, 4, 5, 7 y 8 considerados esenciales para el funcionamiento normal de la proteína.

### SECUENCIA DETALLADA DEL GEN TP53:

Indicamos a continuación la secuencia del gen TP53, tal como se puede encontrar en la siguiente referencia de internet:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?uid=189461&form=6&db=n&Dopt=f>)

**DEFINITION:** Human cellular phosphoprotein p53 gene

**SOURCE:** Human: fetal liver DNA, clones lambda-p53-[alpha,pi]; lymphoblastoid cell line MANN DNA (library of S.Carson), clone pcos53PHD; Jurkat T-cell line J6, cDNA to mRNA (library of Kataoka and Collins), clone p53J6K.

**REFERENCE:** 1 (bases 1 to 528)

**AUTHORS:** Lamb,P. and Crawford,L.

**TITLE:** Characterization of the human p53 gene

**JOURNAL:** Mol. Cell. Biol. 6 (5), 1379-1385 (1986)

>gi|189450|gb|M13111|HUMP5301 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 1

GGGAGAAAACGTTAGGGTGTGGATATTACGGAAAGCCTTCCTAAAAAATGACATTTAACTGATGAGAA  
GAAAGGATCCAGCTGAGAGCAAACGCAAAAGCTTTCTTCCCTCCACCCTTCTATTTGACACAATGCAG  
GATTCCTCCAAAATGATTTCCACCAATTCTGCCCTCACAGCTCTGGCTTGCAAGATTTTCCACCCCAA  
AATGTTAGTATCTACGGCACCAGGTCGGCGAGAACCTGACTCTGCACCCCTCCTCCCAACTCCATTTTC  
CTTTGCTTCTCCGGCAGGCGGATTACTTGCCCTTACTTGTTCATGGCGACTGTCCAGCTTTGTGCCAG  
GAGCCTCGCAGGGGTTGTGGGATTGGGGTTTCCCTCCCATGTGCTCAAGACTGGCGCTAAAAGTTT  
TGAGCTTCTCAAAGTCTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTG  
GTTCCGGGCTGGGAGCGTGTTCACGACGGTGACACGCTTCCCTGGATTGG

>gi|189451|gb|M13112|HUMP5302 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 2

CAGCCAGACTGCCCTCCGGGTCACTGCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTC  
TGAGTCAGGAAACATTTTTCAGACCTATGGAAACT

>gi|189452|gb|M13113|HUMP5303 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 3

ACTTCCTGAAAACAACGTTCTG

>gi|189453|gb|M13114|HUMP5304 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 4

TCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCAC  
TGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCGGACCAG  
CAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCGTGCATCTTCTGTCCCTTCCAG  
AAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCAATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGAC  
TTGCACG

>gi|189454|gb|M13115|HUMP5305 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 5

TACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGA  
TTCCACACCCCCGCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGG  
AGGTTGTGAGGGCGTGCACCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG

>gi|189455|gb|M13116|HUMP5306 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 6

GTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGA  
AACACTTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCTGAG

>gi|189456|gb|M13117|HUMP5307 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 7

GTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAA  
CCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAG

>gi|189457|gb|M13118|HUMP5308 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 8

TGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCTGGGAGAGACCGGCGCA  
CAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGA  
G

>gi|189458|gb|M13119|HUMP5309 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 9

CACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACC  
CTTCAG

>gi|189459|gb|M13120|HUMP5310 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 10

ATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACCTCAAGGATGCCCA  
GGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAG

>gi|189460|gb|M13121|HUMP5311 Human cellular phosphoprotein p53 gene, exon 11

CCACCTGAAGTCCAAAAGGGTCACTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGC  
CTGACTCAGACTGACATTCTCCACTTCTTGTTCCTCCACTGACAGCCTCCACCCCCATCTCTCCCTCC  
CCTGCCATTTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCAGGA  
CTTCCATTTGCTTTGTCCCGGGGCTCCACTGAACAAGTTGGCCTGCACTGGTGTTTTGTGGGGAG  
GAGGATGGGGAGTAGGACATAACAGCTTAGATTTTAAAGTTTTTACTGTGAGGGATGTTTGGGAGATG  
TAAGAAATGTTCTTGCAGTTAAGGGTTAGTTTACAATCAGCCACATTTAGGTAGGGGCCCACTTCAC

CGTACTAACCAGGGAAGCTGTCCCTCACTGTTGAATTTTCTCTAACTTCAAGGCCCATATCTGTGAAA  
 TGCTGGCATTTCACCTACCTCACAGAGTGCATTGTGAGGGTTAATGAAATAATGTACATCTGGCCTT  
 GAAACCACCTTTTATTACATGGGGTCTAGAACTTGACCCCTTGAGGGTGCTTGTTCCCTCTCCCTGT  
 TGGTCGGTGGGTGGTAGTTTCTACAGTTGGGCAGCTGGTTAGGTAGAGGGAGTTGTCAAGTCTCTGC  
 TGGCCCAGCCAAACCCTGTCTGACAACCTCTTGGTGAACCTTAGTACCTAAAAGGAAATCTCACCCCA  
 TCCCACACCCTGGAGGATTTTCATCTCTTGTATATGATGATCTGGATCCACCAAGACTTGTTTTATGCT  
 CAGGGTCAATTTCTTTTTTCTTCTTTT  
 GAGACTGGGTCTCGCTTTGTT  
 GCCCAGGCTGGAGTGGAGTGGCGTGATCTTGGCTTACTGCAGCCTTTGCCTCCCCGGCTCGAGCAGTC  
 CTGCCTCAGCCTCCGGAGTAGCTGGGACCACAGGTTTCATGCCACCATGGCCAGCCAACTTTTGCATGT  
 TTTGTAGAGATGGGGTCTCACAGTGTGCCCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTGGGCTCAGGCGATCCACC  
 TGCTCAGCCTCCAGAGTGCTGGGATTACAATTGTGAGCCACCACGTCCAGCTGGAAGGGTCAACAT  
 CTTTTACATTCTGCAAGCACATCTGCATTTTACCCACCCTTCCCCTCTTCTCCCTTTTTATATCC  
 CATTTTTATATCGATCTCTTATTTTACAATAAACTTTGCTGCCACCTGTGTGTCTGAGGGGTG

### 3.4- ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA

El producto del gen TP53 es una fosfoproteína nuclear de 53Kd y 393 aminoácidos. Contiene característicamente un número elevado de prolina (10%) lo cual es responsable de la diferencia observada entre su peso molecular real (43-45Kd) y su movilidad electroforética más lenta (Zakut-Houri, 1983). Una característica es su heterogeneidad. Se presenta bajo la forma de dos proteínas que migran con diferente movilidad, pudiendo coexistir ambas formas en una misma célula (Crawford, 1981). Posteriormente se descubrió que la diferencia observada en la movilidad electroforética se debe a la existencia de dos alelos, que se distinguen por la presencia de una arginina ó de una prolina a nivel del residuo 72 (Matlashewski, 1987).

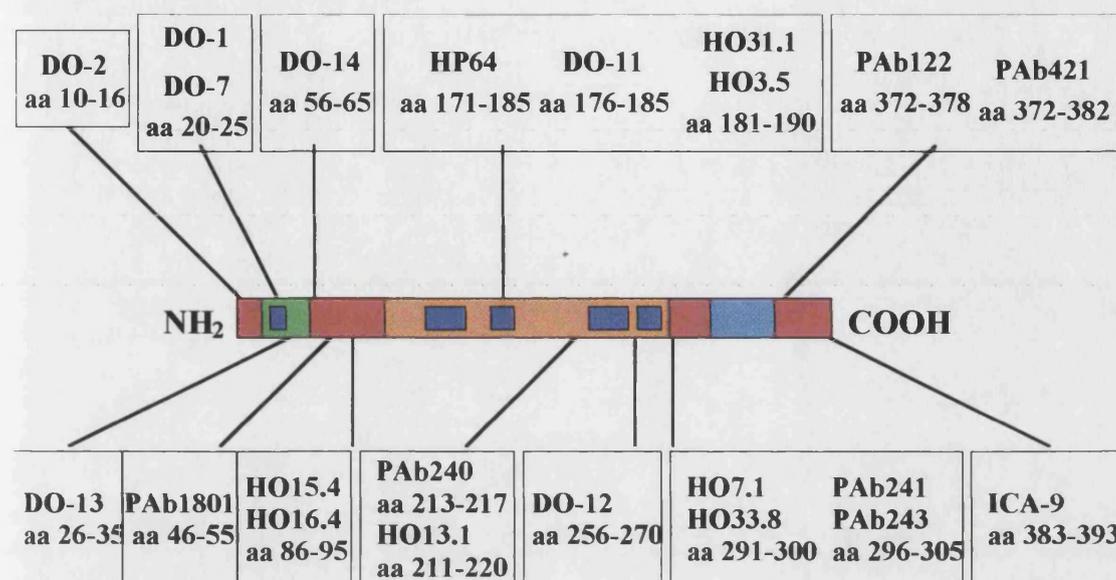
Existe un **dominio central** que es capaz de unirse específicamente al DNA de doble cadena y que está conservado en especies muy separadas desde el punto de vista evolutivo, por lo que se supone que es fundamental para su función (Levine, 1991). Este dominio también contiene los sitios de unión del antígeno T grande de SV40, que forma complejos específicos con p53.

La **región N terminal** está menos conservada que la anterior y contiene los sitios de unión para algunas proteínas víricas y humanas, como la proteína mdm2. Una característica importante de este dominio es que puede actuar como transactivador de la transcripción de otros genes al interaccionar con algunos de los factores de transcripción generales. Igualmente, parece estar implicado en la regulación de la vida media de la proteína p53 normal, por lo que las mutaciones que se localizan en esta región aumentan la estabilidad de la proteína (Unger, 1992).

El **dominio C terminal** es responsable de la conformación tetramérica de la proteína (Iwabuchi, 1993) y contiene múltiples sitios de fosforilación, sustrato para varias quinasas. En esta región también se encuentra la secuencia que permite el transporte y acumulación de la proteína en el núcleo (Shaulsky, 1990).

Se ha descrito la estructura cristalográfica por rayos-X del dominio central de p53 interaccionando con el DNA (Cho, 1994). Los cuatro dominios conservados de esta región central proporcionan el elemento de unión al DNA. Puesto que la mayoría de las mutaciones publicadas ocurren en estos dominios, afectan directamente a la interacción de p53 con el DNA (Vogelstein, 1994).

Actualmente se dispone de una amplia variedad de anticuerpos monoclonales que ha sido fundamental para definir la función de la proteína y la caracterización de su regulación e interacción (Hall, 1996). *Figura 3.4.1*



*Figura 3.4.1:* Mapa de epitopos de la proteína humana p53. Los recuadros internos más oscuros representan los dominios altamente conservados. Se definen los epitopos reconocidos por los diferentes anticuerpos (Hall, 1996).

### 3.5- FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA

La proteína p53 está implicada en muchas y muy variadas funciones celulares como son el control del ciclo celular, la reparación y síntesis del DNA, la diferenciación celular y la muerte celular programada ó apoptosis (Levine, 1991; Vogelstein, 1992).

La participación de p53 en actividades tan diferentes, puede explicarse en parte por el hecho de que regula la transcripción de muchos y distintos genes. p53 se une a una secuencia determinada del DNA, denominada *elemento de respuesta a p53* situada en la región reguladora de ciertos genes y activa su transcripción. Esta activación transcripcional es suprimida por las proteínas p53 mutadas y por la unión a proteínas víricas o celulares como mdm2.

A lo largo del ciclo celular existen una serie de controles, denominados *checkpoints* o puntos de comprobación, en los que se asegura la correcta progresión por las distintas fases del ciclo, así como la integridad del genoma (Hartwell, 1989; Murray, 1992). Por ejemplo, en respuesta a un daño en el DNA, la célula reacciona con una señal de alerta que induce una parada del ciclo celular para permitir la reparación del DNA dañado, o bien con la inducción de apoptosis, cuando el daño es imposible de reparar.

En timocitos del ratón se ha comprobado un aumento de p21, mdm2 y ciclina G dos horas después de irradiarlas, y un aumento de *bax* y *Fas* cuatro horas después. Esta diferencia puede ser debida a las funciones particulares de estos genes. La “decisión celular” de comenzar la apoptosis no debería hacerse hasta detectar la extensión del daño celular y permitir a p53 la transcripción de los genes relacionados con el proceso de reparación. De este modo, los genes relacionados con la apoptosis (*bax* y *Fas*) serían requeridos posteriormente (Reinke, 1997).

Estos puntos de control o “*checkpoints*” son reacciones concretas en cascadas de transmisión de señales, de manera que el daño es detectado y transmitido por reacciones sucesivas a los complejos CDK/ciclinas, o a los reguladores de la apoptosis (Bolaños, 1995).

La proteína p53 mantendría la estabilidad genómica gracias a su actuación a nivel del punto de control de la fase G1/S del ciclo celular. En este punto, p53 bloquearía el ciclo en aquellas células que tuvieran alterado el DNA, permitiendo a la célula la reparación del DNA antes de su duplicación ó, induciendo la apoptosis si el daño es muy severo (Vogelstein, 1992; Lane, 1994; Kastan, 1995)

Las células que carecen de p53 no se bloquean en G1 en respuesta al daño en el DNA y tampoco llevan a cabo apoptosis. Por lo tanto, p53 es un elemento central en ese control. La proteína p53 actúa como un factor de transcripción muy inestable, cuyos niveles aumentan tras la inducción de daño en el DNA; p53 es capaz de inducir la expresión de una serie de genes y de reprimir otros:

→Induce:

- **p21Cip1/Waf1**- Intervienen en la parada del ciclo celular en G1. La proteína p21 es un miembro de la familia de inhibidores de CDK/ciclinas. La síntesis de p21 inhibe los complejos CDK/ciclinas, previniendo la fosforilación e inactivación de la proteína del retinoblastoma. Sin embargo, un trabajo reciente sugiere que p21 y p53 pueden estar reguladas por mecanismos distintos (Brugarolos, 1995).

- **Gadd45**- Los genes GADD (growth arrest on DNA damage) son inducidos en muchas células por agentes que lesionan el DNA y otros que producen detención del ciclo celular. Interviene en la reparación del DNA. La proteína p53 induce también la transcripción de GADD45 mediante unión al elemento de respuesta a p53 localizado en su tercer intrón. Es posible por tanto que p53 produzca la detención del ciclo celular activando GADD45 (Kastan, 1992).

- **Bax y Fas**- Inducen apoptosis

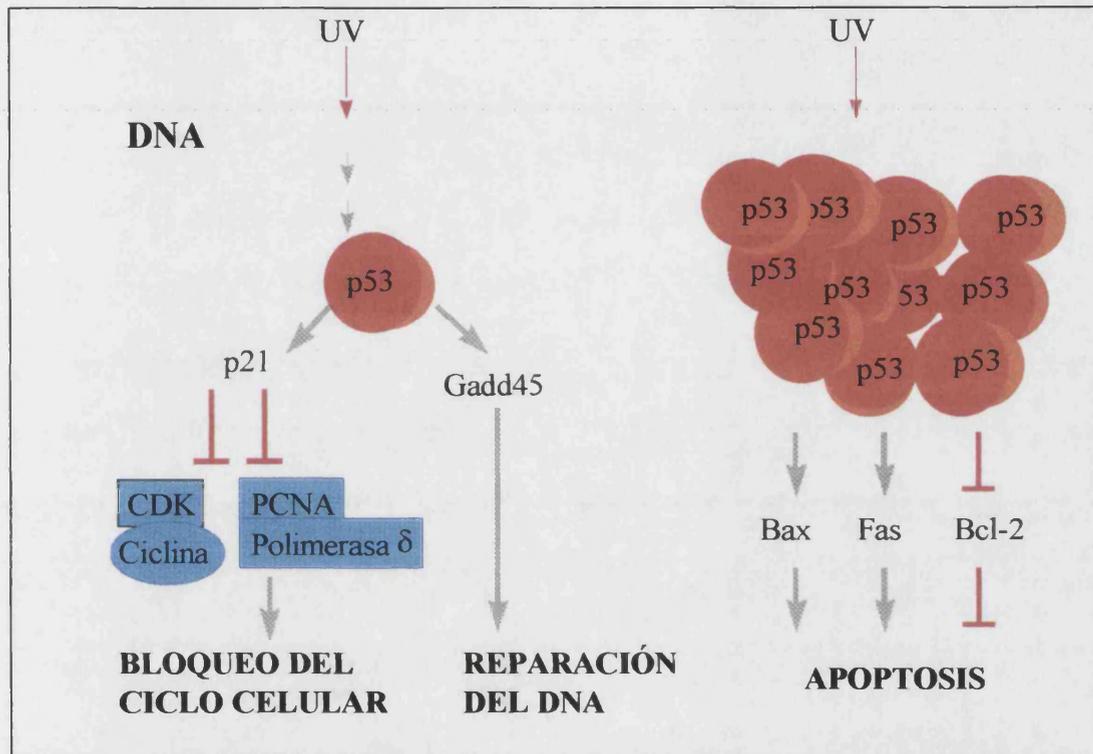
→Reprime:

- **Bcl2**- Bloquea la apoptosis

Se ha propuesto un modelo cuantitativo para explicar el papel de p53 en respuesta a bajo y alto nivel de daño en el DNA. Según este modelo, cuando el daño al DNA es bajo se induce una señal que estabiliza la proteína p53, con lo que su nivel sube temporalmente; una vez reparado el daño la señal desaparece, los niveles de p53 caen y el ciclo celular prosigue.

Si el daño es elevado, la señal persiste con lo que p53 se induce constitutivamente y esto desencadena la apoptosis (Enoch, 1995). *Figura 3.5.1*

Las células mutantes para p53 no responden a ninguno de los dos tipos de daño y, en consecuencia, dichas células presentan un alto nivel de inestabilidad genética. Estas células acumulan multitud de alteraciones genéticas como translocaciones, amplificaciones génicas y otros reordenamientos cromosómicos comúnmente encontrados en tumores.



*Figura 3.5.1:* La lesión del DNA activa un mecanismo de seguridad que estabiliza a la proteína p53. Esta proteína activa la expresión de una serie de genes (Bolaños, 1995).

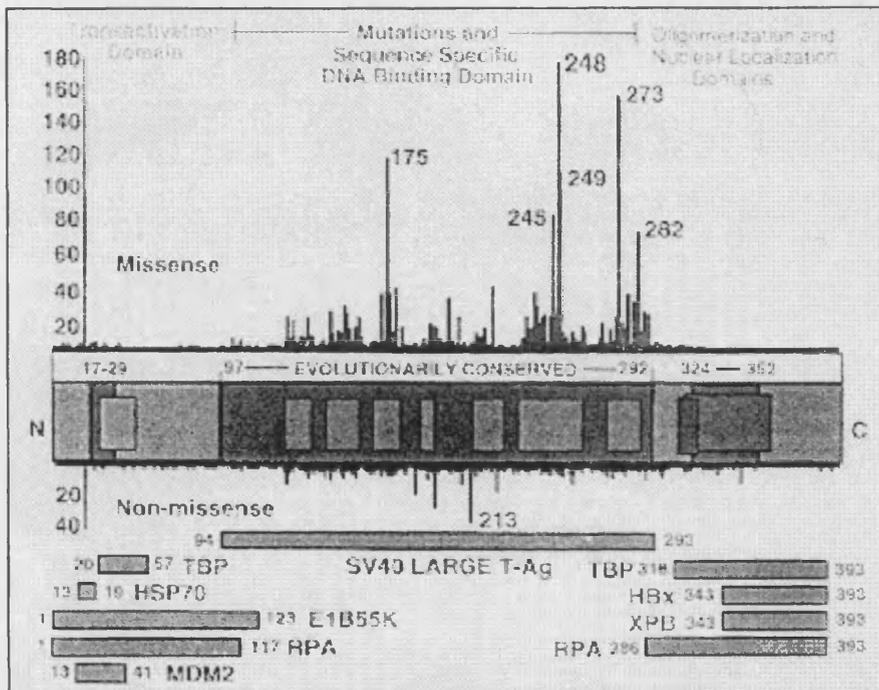
Se ha propuesto un modelo de progresión y evolución tumoral relacionado con p53 (Kinzler, 1996). La hipoxia, establecida en aquellas áreas del tumor con un aporte de sangre inadecuado, inducen la muerte celular programada dependiente de p53 (Graeber, 1996). Estas condiciones de hipoxia confieren una ventaja de supervivencia a aquellas células con mutaciones de p53, que además no expresan factores anti-angiogénicos como las células normales con p53 normal (Hung, 1997).

En el artículo publicado con los avances más importantes presentados en el *8<sup>th</sup> International p53 Workshop* celebrado en Dundee en 1996 (abstracts disponibles en *p53 Workshop Web Site*: <http://www.dundee.ac.uk/Pathology>), destaca la designación consensuada de p53 como “integrador de señales de respuesta al stress” (Hall, 1996).

### 3.6- ALTERACIONES DEL GEN P53

#### • TUMORES HUMANOS

La mutación del gen P53 es considerada como el cambio genético más común en el cáncer humano (Vogelstein, 1990). Estas mutaciones son más frecuentes en las regiones altamente conservadas a lo largo de la evolución (dominios II-V). Se han identificado siete puntos preferentes de mutación o "hotspots" en los aminoácidos 130-142, 151-164, 171-181, 193-200, 213-223, 234-258 y 270-286.



**Figura 3.6.1:** Representación esquemática de p53 con localización y frecuencia de mutaciones publicadas (Harris, 1996).

(Esquema obtenido en <http://www.ciit.org/ACT95/ACTIVITIESMAY95/Fig2may95.gif>)

Las mutaciones de P53 afectan su función mediante un efecto negativo dominante ó una ganancia ó pérdida de función del gen. Algunos alelos mutados tienen un efecto transdominante a través de la tetramerización de la proteína, a la cual afectan, bloqueando su capacidad de unión al DNA y consiguientemente su capacidad de activar la transactivación (efecto negativo dominante) (Hann, 1995; Harvey, 1995). Si hay una pérdida de uno de los alelos de la forma salvaje de p53, entonces puede haber una presión selectiva que retiene el alelo mutante. Algunas investigaciones sugieren que formas mutadas de p53 son capaces de inducir una ganancia de función (Ditter, 1993) e incluso activar la transcripción de genes normalmente no regulados por p53, como el *MDR1*. La ganancia de función del gen P53

mutado conlleva un aumento del potencial metastásico y de la oncogenicidad y expresión de factores de crecimiento del endotelio vascular.

Existen varias bases de datos actuales con las mutaciones del gen TP53 en tumores humanos:

- De Vries y col (1996) describen 2.300 publicadas hasta Septiembre de 1993.
- Hollstein y col (1996) publican una actualización de la realizada en 1994, con cerca de 4.496 mutaciones obtenidas del *EMBL Outstation-the European Bioinformatics Institute (EBI)* hasta Julio de 1995.
- Beroud y col (1996) recogen en su artículo alrededor de 4.200 mutaciones hasta Septiembre de 1995.
- Hay también algunas bases de datos disponibles a través de *internet*:
  - **OMIM** (*Online Mendelian Inheritance in Man*) editada por la Universidad *Johns Hopkins* para el *National Center for Biotechnology Information*:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>
  - **HGMD** (Human gene mutation database):  
<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120445.html>
  - **P53/APC DATABASE** de la Clínica Mayo:  
<http://www.mayo.edu/research/papers/P53%20Mutations>

Según estas bases de datos, las mutaciones de TP53 que se encuentran en tumores humanos pueden ser de varios tipos: puntuales, pérdidas alélicas, reordenaciones y deleciones. Las más comunes son las mutaciones puntuales, frecuentemente acompañadas de deleciones del segundo alelo. La mayoría de las mutaciones puntuales son por sustitución de una base, pero el 10-15%, son pequeñas inserciones ó deleciones intragénicas (Hollstein, 1991; Greenblatt, 1994; Hollstein, 1994).

Desde la primera recopilación publicada (Hollstein, 1994), la prevalencia de deleciones e inserciones entre todas las mutaciones de P53 ha disminuido del 13 al 11%. Según Greenblatt (Greenblatt, 1996), esta reducción probablemente refleja la falta de análisis de los exones 2-4 y 9-11, donde la mayoría de las mutaciones son deleciones e inserciones, ya que muchos de los trabajos recientes sólo examinan los exones 5-8, donde las mutaciones erróneas o "missense" son más comunes. Las mutaciones erróneas constituyen el 77% de las mutaciones en los exones 5-8, pero menos de la mitad en las mutaciones de los otros exones (Greenblatt, 1994). Las mutaciones en los exones 2-4 y 9-11 son menos analizadas, ya que la sustitución de un aminoácido en estas regiones no afecta la capacidad de transactivación, mientras que en la región central de unión al DNA (exones 5-8) sí que se altera.

El análisis de las mutaciones del gen TP53 es una herramienta excepcionalmente útil en la epidemiología del cáncer, por numerosas razones. Es la mutación más frecuente en todos los tipos de cáncer. El análisis de las mutaciones es especialmente revelador por la propiedad bioquímica fortuita de su producto génico: la función de ésta proteína es especialmente sensible a cualquier cambio mínimo en su secuencia. Esto permite conocer las modificaciones características de cada tipo de mutación puntual. Como se ha visto, las mutaciones erróneas son las más frecuentes en contraste con las detectadas en otros genes supresores como el gen *APC* (Harris, 1993).

Puesto que la proteína mutada tiene típicamente una vida media más larga que la forma no mutada, la inmunohistoquímica nos puede facilitar la búsqueda de mutaciones puntuales *missense*, ya que las proteínas ausentes, truncadas ó inestables causadas por mutaciones *nonsense* son generalmente indetectables.

## • FHM

La mayoría de los estudios sobre mutaciones del TP53 en FHM están incluidos en series amplias de sarcomas (Soini, 1992; Toguchida, 1992; Andreassen, 1993; Leach, 1993; Florenes, 1994; Latres, 1994; Wadayama, 1993; Drobniak, 1994; Kawai, 1994; Yang, 1995) y contienen un numero reducido de casos (15-20) estudiados con PCR-SSCP-Secuenciación (tabla 3.6.1). Las series más amplias estudian los FHM de forma independiente (Taubert, 1995; Reid, 1996).

La frecuencia de alteraciones en TP53 depende de los métodos utilizados; la inmunohistoquímica detecta sobreexpresiones de p53 sin alteraciones del gen, que pueden ser debidas a mecanismos alternativos que estabilizan la proteína (unión a proteínas víricas ó endógenas) ó a mutaciones existentes en los exones no analizados. Por tanto, suele haber mayor numero de alteraciones en los trabajos realizados con técnicas inmunohistoquímicas.

En los FHM, la sobreexpresión de la proteína p53 y su implicación clínico-patológica es muy variable dependiendo de las series analizadas:

- Soini y col (1992) realizan un estudio comparativo de la sobreexpresión de p53 en 14 FHM en relación a otros tipos de sarcoma (22 tumores) y 25 lesiones mesenquimales benignas. 4/14 FHM (29%) y 9/22 (41%) sarcomas presentaron inmunopositividad frente a p53. En cuatro de las 25 lesiones benignas (16%) se observaron células p53-positivas, aunque en menor proporción (menos del 1% de la población celular).
- Kawai y col (1994) demuestran que la sobreexpresión de p53 en 96 sarcomas de partes blandas implica un peor pronóstico. Sin embargo en los 40 FHM, incluidos en la serie, esta relación no es estadísticamente significativa. El porcentaje de positividad en estos fibrohistiocitomas malignos analizados es del 20%.
- Yang y col (1995) estudian las implicaciones pronósticas de la proteína p53 y el antígeno Ki-67 en 54 FHM. La frecuencia de sobreexpresión de p53 (39%) obtenida es superior a la descrita en estudios anteriores sobre FHM y otros sarcomas de partes blandas (19-36%). Este mayor porcentaje puede ser explicado por los diferentes índices de valoración de células p53-positivas y los anticuerpos utilizados. No observan ningún tipo de relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de p53 y el grado histológico, la aparición de recidivas o metástasis y el tiempo de supervivencia. La única variable relacionada fue el tamaño tumoral.
- Taubert y col (1995) detectan tres mutaciones del gen TP53 en 30 FHM (10%) y 21/30 FHM (70%) con sobreexpresión de la proteína p53. Tanto las mutaciones de

TP53 como la detección de p53 no se relacionan con el grado tumoral pero si conllevan un peor pronóstico.

- Reid y col (1996) estudian 52 FHM con los siguientes resultados: 6 tumores con mutación de TP53 y 8 tumores con sobreexpresión de p53. No observan correlación con el pronóstico, sin embargo al estratificarlos según el grado histológico, los resultados indican una supervivencia menor en aquellos con alteraciones de p53.

Existen suficientes datos para establecer un papel importante de las alteraciones de p53 en la evolución de estos tumores, identificadas en un 15% aproximadamente de los FHM analizados. En la siguiente tabla se puede observar la frecuencia de alteraciones del gen TP53 y de la proteína p53 especificando la metodología utilizada en cada estudio:

**Tabla 3.6.1**  
**FRECUENCIA DE ALTERACIONES DE P53 EN FHM**

METODO	nº casos positivos	REFERENCIA
PCR-SSCP-SECUENCIACIÓN (ex 2-11)	2 de 13 (15.4%)	Toguchida, 1992
PCR-SSCP-SECUENCIACIÓN (ex 5,7 y 8) INMUNO (Pab1801, CM-1)	3 de 11 (27.3%)	Andreassen, 1993
PCR-SOUTHERN-SECUENC. (ex 5-8) INMUNO (PAB1801)	1 de 10 (10%)	Leach, 1993
PCR-SSCP-SECUENCIACIÓN (ex 5,7 y 8)	4 de 20 (20%)	Florenes, 1994
PCR-SSCP-SECUENCIACIÓN (ex 2-9)	1 de 9 (11.11%)	Latres, 1994
PCR-SSCP-SECUENCIACIÓN (ex 4-9)	3 de 30 (10%)	Taubert, 1995
PCR-SECUENCIACIÓN (ex 5-8)	5 de 52 (9.6%)	Reid, 1996
INMUNO (CM-1)	4 de 14 (28.6%)	Soini, 1992
INMUNO (PAB1801, CM-1)	4 de 11 (36.36%)	Wadayama, 1993
INMUNO (PAb1801, PAb240, PAb1620)	3 de 19 (15.8%)	Drobnjak, 1994
INMUNO (RSP-53)	8 de 40 (20%)	Kawai, 1994
INMUNO (DO-7)	21 de 54 (38.9%)	Yang, 1995

## 4.- GEN MDM2.

### 4.1- IDENTIFICACIÓN

El gen MDM2 fue identificado por Fakhrazadeh y col. en 1991 gracias a su amplificación en una línea celular transformada espontáneamente (3T3DM) del ratón Balb/c3T3.

Oliner y col (1992) clonaron el gen MDM2 utilizándolo para localizar al gen humano en el cromosoma 12 (12q13-14) y mostraron in vitro la unión de la proteína humana recombinada a la proteína p53.

Montes de Oca y col (1996) clonaron y caracterizaron el gen MDM2 murino. Contiene al menos 12 exones y tiene una longitud aproximada de 25 Kb de DNA. El estudio de su expresión muestra bajos niveles de mRNA en tejidos adultos y embrionarios, los cuales por RT-PCR, no incluyen muchas de las variantes detectadas en la línea celular 3T3DM.

## 4.2- ESTRUCTURA GÉNICA

Secuencia del cDNA MDM2 humano (Oliner, 1992):

<http://www.ebi.ac.uk/htbin/emblfetch?Z12020>

Submitted (29-APR-1992) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Kinzler K., Johns Hopkins School of Medicine, 424 North Bond Street, Baltimore, MD, U.S.A.

DE *H.sapiens mRNA for p53-associated gene*

RA Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B.;

RT "Amplification of a gene p53-associated protein in Human Sarcomas";

RL *Nature* 358:80-86(1992).

RL Submitted (29-APR-1992) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

RL Kinzler K., Johns Hopkins School of Medicine, 424 North Bond Street,

RL Baltimore, MD, U.S.A. .

SEQUENCE 2372 BP; 698 A; 491 C; 541 G; 642 T; 0 OTHER;

```

GCACCGCGCG AGCTTGGCTG CTCTGGGGC CTGTGTGGCC CTGTGTGTCG GAAAGATGGA      60
GCAAGAAGCC GAGCCCGAGG GCGGGCCGCG ACCCCTCTGA CCGAGATCCT GCTGCTTTCG      120
CAGCCAGGAG CACCGTCCCT CCCC GGATTA GTGCGTACGA GCGCCAGTG CCCTGGCCCG      180
GAGAGTGGAA TGATCCCGA GGCCAGGGC GTCGTGCTTC CGCAGTAGTC AGTCCCGGTG      240
AAGGAAACTG GGGAGTCTTG AGGGACCCC GACTCCAAGC GCGAAAACCC CGGATGGTGA      300
GGAGCAGGCA AATGTGCAAT ACCAACATGT CTGTACCTAC TGATGGTGCT GTAACCACT      360
CACAGATTCC AGCTTCGGAA CAAGAGACCC TGGTTAGACC AAAGCCATTG CTTTTGAAGT      420
TATTTAAAGT TGTGGGTGCA CAAAAAGACA CTTATACTAT GAAAGAGGTT CTTTTTATC      480
TTGGCCAGTA TATATGACT AAACGATTAT ATGATGAGAA GCAACAACAT ATTGTATATT      540
GTTCAAATGA TCTCTAGGA GATTTGTTG GCGTGCCAAG CTCTCTGTG AAAGAGCACA      600
GGAAAATATA TACCATGATC TACAGGAACT TGGTAGTAGT CAATCAGCAG GAATCATCGG      660
ACTCAGGTAC ATCTGTGAGT GAGAACAGGT GTCACCTTGA AGGTGGGAGT GATCAAAAGG      720
ACCTTGATCA AGAGCTTCAG GAAGAGAAAC CTTCACTTTC ACATTTGGTT TCTAGACCAT      780
CTACCTCATC TAGAAGGAGA GCAATTAGTG AGACAGAAGA AAATTCAGAT GAATTATCTG      840
GTGAACGACA AAGAAAACGC CACAAATCTG ATAGTATTTT CCTTCCCTTT GATGAAAGCC      900
TGGCTCTGTG TGTAATAAGG GAGATATGTT GTGAAAGAAG CAGTAGCAGT GAATCTACAG      960
GGACGCCATC GAATCCGGAT CTGTGATGCT GTGTAAGTGA ACATTCAGGT GATTGGTTGG      1020
ATCAGGATTC AGTTTCAGAT CAGTTTAGTG TAGAATTTGA AGTGAATCT CTCGACTCAG      1080
AAGATTATAG CCTTAGTGAA GAAGGACAAG AACTCTCAGA TGAAGATGAT GAGGTATATC      1140
AAGTTACTGT GTATCAGGCA GGGGAGAGTG ATACAGATTC ATTTGAAGAA GATCCTGAAA      1200
TTTCCCTTAGC TGAATATTGG AAATGCACCT CATGCAATGA AATGAATCCC CCCCTCCAT      1260
CACATTGCAA CAGATGTTGG GCCCTTCGTG AGAATTGGCT TCCTGAAGAT AAAGGGAAAAG      1320
ATAAAGGGGA AATCTCTGAG AAAGCCAAAC TGGAAAACCT AACACAAGCT GAAGAGGGCT      1380
TTGATGTTCC TGATGTGAAA AAAACTATAG TGAATGATTC CAGAGAGTCA TGTGTTGAGG      1440
AAAATGATGA TAAAATTACA CAAGCTTCAC AATCACAAGA AAGTGAAGAC TATTCTCAGC      1500
CATCAACTTC TAGTAGCATT APTTATAGCA GCCAAGAAGA TGTGAAAGAG TTTGAAAGGG      1560
AAGAAACCCA AGACAAAGAA GAGAGTGTGG AATCTAGTTT GCCCCTTAAT GCCATTGAAC      1620
CTTGTGTGAT TTGTCAAAGG CGGCCTAAAA ATGGTTGCAT TGTCCATGGC AAAACAGGAC      1680
ATCTTATGGC CTGCTTTACA TGTGCAAAGA AGCTAAAGAA AAGGAATAAG CCCTGCCCAG      1740
TATGTAGACA ACCAATTCAG ATGATTGTGC TAACTTATTT CCCTAGTTG ACCTGTCTAT      1800
AAGAGAATTA TATATTTCTA ACTATATAAC CCTAGGAATT TAGACAACCT GAAATTTATT      1860
CACATATATC AAAGTGAGAA AATGCCTCAA TTCACATAGA TTTCTTCTCT TTAGTATAAT      1920
TGACCTACTT TGGTAGTGGG ATAGTGAATA CTTACTATAA TTTGACTTGA ATATGTAGCT      1980
CATCCTTTAC ACCAACTCCT AATTTTAAAT AATTTCTACT CTGTCTTAAA TGAGAAGTAC      2040
TTGGTTTTTT TTTTCTTAAA TATGTATATG ACATTTAAAT GTAACCTATT ATTTTTTTTG      2100

```

AGACCGAGTC	TTGCTCTGTT	ACCCAGGCTG	GAGTGCAGTG	GGTGATCTTG	GCTCACTGCA	2160
AGCTCTGCCC	TCCCCGGGTT	CGCACCATTC	TCCTGCCTCA	GCCTCCCAAT	TAGCTTGGCC	2220
TACAGTCATC	TGCCACCACA	CCTGGCTAAT	TTTTGTACT	TTTAGTAGAG	ACAGGGTTTC	2280
ACCGTGTTAG	CCAGGATGGT	CTCGATCTCC	TGACCTCGTG	ATCCGCCAC	CTCGGCTCC	2340
CAAAGTGCTG	GGATTACAGG	CATGAGCCAC	CG			2372

### 4.3- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEINA

Momand y col. en 1992 caracterizaron, purificaron e identificaron a la proteína mdm2, como una fosfoproteína celular de 90 Kd, que formaba un complejo con la proteína p53, tanto en su forma normal como mutada. Está compuesta por 489 aminoácidos (Fakharzadeh, 1991). La proteína fue identificada como un producto del gen *murine double minute 2'* (MDM2). El gen MDM2 aumenta el potencial de transformación maligna celular cuando está sobreexpresado y codifica un factor de transcripción. Al formar un complejo estable con el gen TP53, el oncogén MDM2 puede inhibir la transactivación mediada por TP53 (Momand, 1992).

La inactivación de la actividad de transactivación de p53 se produce porque el sitio de unión de mdm2 coincide con el dominio de activación de p53 en la región N terminal (Oliner, 1992). Este sitio de unión se ha identificado según autores en los aa 1-41 y 13-57 (Oliner, 1992), aa 1-52 (Chen, 1993), aa 1-159 (Brown, 1993) y aa 18-23 (Picksley, 1994) localizados en la región I (extremo N-terminal de la proteína). Las secuencias fuera de este dominio podrían ayudar a estabilizar la unión entre ambas proteínas (Chen, 1993).

Por otro lado, uno de los muchos genes diana que se conocen de la activación transcripcional de p53 es el gen MDM2 (Barak, 1993; Wu, 1993). MDM2 contiene un sitio de unión al DNA para p53 en su primer intrón (Juven, 1993; Wu, 1993), estimulándose su transcripción de un modo p53-dependiente. De esta forma la expresión de MDM2 estaría regulada por los niveles de la forma normal de la proteína p53. Como se ha visto, la proteína mdm2 se une y modula la actividad transcripcional de la proteína p53 ya que se une en su dominio de transactivación. Por consiguiente, existe un *feedback* que regula la actividad de la proteína p53 y la expresión del gen MDM2 (*Figura 4.3.1 y Figura 4.3.2*). La importancia de este *feedback* queda plasmada en experimentos con ratones transgénicos. Ratones MDM2<sup>-</sup> solo son viables en ausencia de TP53 (Jones, 1995; Montes de Oca, 1995).

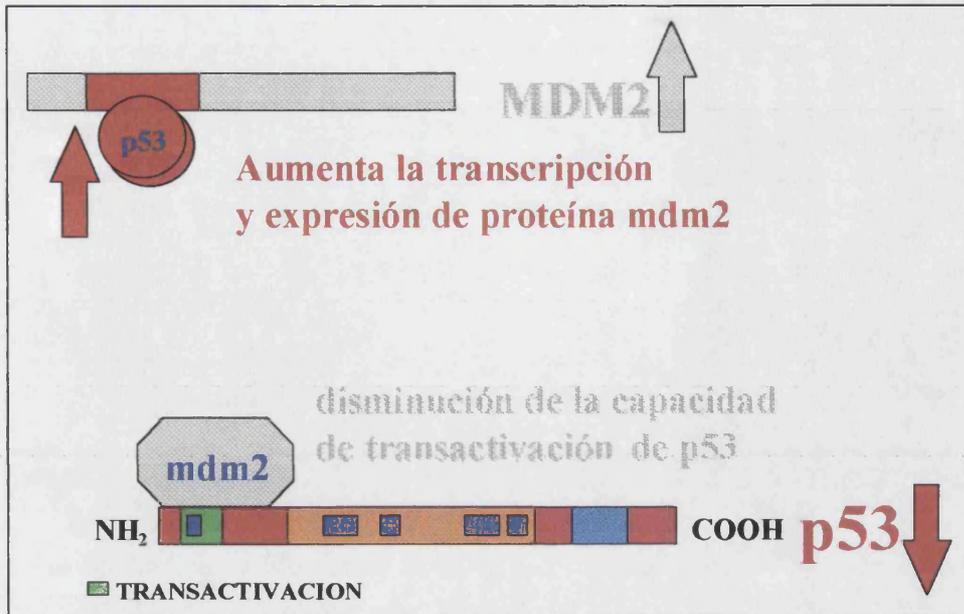


Figura 4.3.1: Interacción entre p53 y el gen y proteína mdm2.

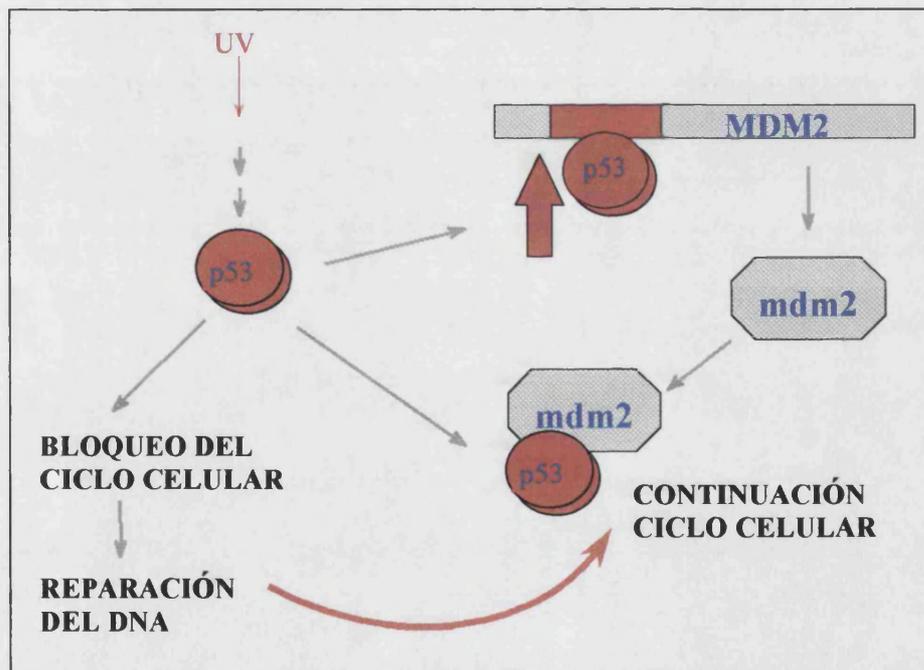


Figura 4.3.2: Feed-back negativo: la inhibición de la actividad de p53 por mdm2 permitiría a la célula continuar el ciclo celular bajo determinadas circunstancias, por ejemplo, tras reparación del ADN.

Una célula normal contiene unos niveles bajos de p53. Cuando exponemos esta célula a agentes genotóxicos, la proteína p53 se acumula y aumenta la transcripción de genes p53-dependientes. La respuesta puede inducir tanto el bloqueo celular como la apoptosis. Esta

acumulación se debe a un mecanismo post-translacional relacionado con la regulación de su degradación (Maki, 1996). Recientemente se ha demostrado la implicación de mdm2 en la degradación de p53 mediante la activación de proteasas (Haupt, 1997; Kubbutat, 1997). Por otro lado, también se ha implicado directamente a mdm2 en el proceso de apoptosis (Erhardt, 1997; Chen, 1997) y en la progresión del ciclo celular (Teoh, 1997).

La respuesta de p53 está constitutivamente regulada en las células normales por mdm2. La alteración de esta interacción es suficiente para estabilizar a p53 y activar su respuesta, como demuestran Bottger y col (1997) al introducir una proteína pequeña capaz de bloquear eficazmente la interacción p53-mdm2 *in vitro* y observar una acumulación de p53 y un bloqueo del ciclo celular.

En esta misma línea, Chen y col (1998) han identificado un oligonucleótido antisentido frente a MDM2 que inhibe la expresión de MDM2 en células tumorales. Esta inhibición de MDM2 se asocia con una disminución de la formación de complejos p53-mdm2, un aumento de la expresión de genes inducidos por p53, un aumento en la actividad transcripcional de p53 y un aumento de la apoptosis. De este modo, la actividad autorregulatoria negativa de mdm2 es un factor limitante importante en la activación de p53 inducida por lesión del DNA.

Olson y col (1997) caracterizan el producto del gen MDM2 y su interacción con p53 mediante anticuerpos monoclonales, observando que, además de la proteína de 90 Kd, existen al menos cuatro polipéptidos adicionales (p85, p76, p74 y p58-57). Este hecho plantea la posible existencia de diferentes funciones de estas proteínas, con un posible potencial oncogénico de mdm2 independiente de la interacción con p53. MDM2 también se ha identificado en tejidos adultos diferenciados (Dazard, 1997). Esta expresión podría proporcionar un papel protector contra la activación de p53 ó una función no relacionada con p53.

Recientemente se está estudiando el complejo de unión entre ambas proteínas. Freedman y col (1997), al estudiar en la proteína mdm2 los aminoácidos críticos para la unión a p53 e inhibición de su función antioncogénica, observa que mutaciones de MDM2 (G58D y C77Y) alteran la unión de p53 *in vitro*, sin alterar la conformación de mdm2 determinada por anticuerpos monoclonales sensibles a la conformación. Las mutaciones en dos aminoácidos adicionales impiden la unión a p53 *in vitro*. La estructura cristalina del complejo mdm2-p53 muestra que dos de los cuatro residuos críticos contactan con p53 directamente, mientras que los otros dos juegan un papel estructural importante. De este modo, la alteración del sitio de unión de mdm2 a p53 impediría su interacción y regulación *in vivo*.

La inactivación de los genes supresores tumorales permite una proliferación celular no regulada, siendo un factor clave en la formación de tumores. Las mutaciones de los genes TP53 y retinoblastoma ocurren en muchos tipos de tumores humanos, así como su inactivación por diversos virus oncogénicos (papovavirus, adenovirus y virus del papiloma humano). Xiao y col (1995) muestran que mdm2 interacciona física y funcionalmente con la proteína Rb pudiendo inhibir su capacidad de regulación del crecimiento, y por tanto demuestra que tanto el gen TP53 como el gen Rb pueden estar sujetos a una regulación negativa por parte de un único proto-oncogén celular.

MDM2 se une también al factor de transcripción E2F1/DP1, aumentando su actividad (Xiao, 1995; Martin, 1995). También se conoce su unión a L5, un miembro del complejo ribosómico (Marechal, 1994). Haines y col identifican varias formas de transcripción del gen MDM2 que podrían codificar proteínas con funciones alteradas (Haines, 1994).

#### 4.3- ALTERACIONES DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA MDM2 EN FHM.

El gen MDM2 se ha estudiado detalladamente en sarcomas humanos fundamentalmente por dos hechos: su localización en la región 12q13-14, frecuentemente alterada en este tipo de tumores y por su interacción con el gen p53, que permitiría a estos tumores escapar del control del crecimiento celular mediado por p53.

Por todo ello, muchos de los trabajos realizados sobre sarcomas y FHM, analizan simultáneamente las alteraciones en ambos genes (Leach, 1993; Kovar, 1993; Cordon-Cardo, 1994; Florenes, 1994; Patterson, 1994; Keleti, 1996; Miller, 1996; Reid, 1996).

La mayoría de los trabajos no encuentran alteración de ambos genes en el mismo tumor, apoyando la existencia de mecanismos alternativos de inactivación de la misma vía de supresión del crecimiento celular (Leach, 1993; Kovar, 1993; Florenes, 1994; Miller, 1996; Reid, 1996). Sin embargo, en estos mismos trabajos sí que se describen tumores con co-sobreexpresión de ambas proteínas. Este hecho es concebible por la existencia de un *feed-back* entre ambas proteínas y por la estabilización de mdm2 por p53 (Keleti, 1996).

En FHM, la frecuencia de amplificación de MDM2 varía entre las diferentes series entre un 30% y ninguna observada, según la metodología utilizada (Southern blot, dPCR):

AMPLIFICACIÓN MDM2	REFERENCIA
7 de 22 (30%)	Oliner, 1992
0 de 20	Forus, 1993
2 de 52 (4%)	Leach, 1993
0 de 20	Florenes, 1994
3 de 20 (15%)	Nakayama, 1995
0 de 2	Berner, 1996
15 de 52 (30%)	Reid, 1996
3 de 16 (20%)	Patterson, 1997

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1.- MATERIAL

---

El material utilizado en nuestro estudio se obtuvo de 28 muestras tumorales diagnosticadas de Fibrohistiocitomas Malignos (Clasificación de tumores de partes blandas de la Organización Mundial de la Salud, 1994) en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia desde Febrero de 1985 hasta Enero de 1996, procedentes del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, del Instituto Valenciano de Oncología (IVO), del Hospital La Fe de Valencia y del Hospital de Requena. Se revisaron las historias clínicas, los informes histopatológicos y las preparaciones histológicas de todos los casos.

El análisis del ADN y de las proteínas se realizó sobre muestras de tejido crioconservado (-80°C) y el control morfológico y las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica sobre muestras de tejido tumoral fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina.

De los 27 FHM seleccionados para nuestro estudio, 21 fueron xenotransplantados en ratones atímicos *nude* con prendimiento positivo y crecimiento en sucesivos subpases de un total de 11. El material obtenido de los tumores xenotransplantados se utilizó conjuntamente con sus tumores primarios correspondientes.

## 2.- XENOTRANSPLANTES EN RATONES NUDE

---

Muestras tumorales humanas procedentes de tumores primarios, recidivas ó metástasis diagnosticados de FHM en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia fueron transplantadas en ratones atímicos (*nude mice*) de 4-6 semanas de vida (IFFA-CREDO) siguiendo protocolos previamente descritos (Taetle, 1986; Carda, 1988).

El tumor debe ser remitido en fresco, en el mínimo tiempo posible y en las máximas condiciones de esterilidad. Se realiza un estudio anatomopatológico extemporáneo de la pieza mediante cortes por congelación y tras seleccionar un área no necrótica se conserva en medio de cultivo (RPMI-1640, suero bovino fetal 10%, glutamina 1%, penicilina 1%, gentamicina 0.2% ).

En un margen de 1-6 horas se procede al implante del tumor en dos ratones *nude*. Los animales se mantienen en condiciones estériles y se controlan periódicamente. Cuando el tamaño del tumor alcanza 2-3 cm<sup>3</sup> se sacrifican, xenotransplantando varios fragmentos de distintas zonas del tumor a nuevos animales (Carda, 1988). El resto del material tumoral se procesa y destina a diferentes estudios: microscopía óptica, ultraestructural, inmunohistoquímica, cultivos-citogenética y biología molecular.

## 3.- ESTUDIO HISTOLÓGICO

---

Las muestras tumorales de los tumores originales y de los tumores xenotransplantados, fueron fijadas por inmersión en una solución de formol tamponado al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron bloques de 5µ de grosor para el estudio morfológico (Hematoxilina-Eosina, PAS, Gomori y tricómico).

#### 4.- ESTUDIO IMUNOHISTOQUÍMICO

Tras el análisis histológico completo, se selecciona el material incluido en parafina y se procede, sobre secciones histológicas de 5 µm, con el estudio inmunohistoquímico, empleando la técnica de la avidina-biotina-immunoperoxidasa (ABC) descrita por Hsu y col (1981), con algunas modificaciones.

• **MÉTODO:**

- 1.- Desparafinar los cortes en la estufa (37°C durante 24 horas).
- 2.- Realizar tres cambios sucesivos en xilol (15 min).
- 3.- Incubar en alcoholes de concentración decreciente (100%, 95%, 70%).
- 4.- Lavar en agua corriente.
- 5.- Inhibir la peroxidasa endógena mediante incubación en agua oxigenada al 3% en metanol durante 30 min a temperatura ambiente.
- 6.- Lavar en agua corriente.
- 7.- Pretratamiento en estufa microondas en tampón para la recuperación antigénica 10X, DAKO Chem Mate. Este paso solo es requerido en determinados anticuerpos (DO-7, 1801 y MDM2).
- 8.- Lavar con tampón PBS 0.2M, pH 7.4 durante 3 min.
- 9.- Incubar 20 min a temperatura ambiente con suero de caballo (OXOID) al 20% en suero fisiológico para reducir las uniones inespecíficas del anticuerpo primario a distintos componentes tisulares.
- 10.- Incubación con el primer anticuerpo diluido en suero de caballo al 10%:

Anticuerpo	Dilución	Origen
<b>Vimentina</b>	1:50	DAKO
<b>Desmina</b>	1:500	DAKO
<b>Actina</b>	1:50	NOVOCASTRA
<b>CD 68</b>	1:50	DAKO
<b>CAM 5.2</b>	1:40	NOVOCASTRA
<b>S-100</b>	1:200	DAKO
<b>DO-7*</b>	1:50	DAKO
<b>1801*</b>	1:20	NOVOCASTRA
<b>MDM2*</b>	1:50	NOVOCASTRA

\* Tratamiento de recuperación antigénica con tampón citrato

- 11.- Lavar tres veces con PBS.
- 12.- Incubar con el anticuerpo secundario en una dilución 1:200, diluido en suero de caballo al 10%.

#### 5.- TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LOS GENES TP53 Y MDM2

##### 5.1- ESTUDIO DEL ADN GENÓMICO

• **AISLAMIENTO DEL ADN**

**• MÉTODO:**

1.- Utilizar 0.10 - 0.15 g de tejido congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pesar en balanza sobre placa de Petri. Añadir 5 ml de la solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 M pH 8.0, RNAasa pancreática 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SDS 0.5%). Trocear con bisturí. Homogeneizar (IKA WERK, ROT RW 20 DZM) y pasar a tubo de 10ml.

2.- Incubar en baño a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.

3.- Añadir proteinasa K hasta una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e incubar 3 horas a  $50^{\circ}\text{C}$ .

4.- Enfriar la solución hasta que alcance la temperatura ambiente. Añadir un volumen igual de fenol equilibrado con Tris ClH. Es esencial que el pH del fenol sea no inferior a 8, para evitar que el ADN quede atrapado en la interfase entre el fenol y la solución acuosa. Colocar los tubos en un agitador rotatorio hasta que desaparezcan las dos fases y se forme una emulsión, como mínimo durante 1 hora. Centrifugar a 5.000 g, 15 min, a temperatura ambiente.

5.- Con una pipeta de boca ancha, transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de centrifuga y repetir la extracción dos veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y una vez con cloroformo.

6.- Pasar la solución acuosa a un tubo grande para proceder a la precipitación. Añadir 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 7 y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Agitar con cuidado y mezclar bien. Aparece un precipitado que se recoge con una varilla de vidrio. Si no es posible (ADN escaso ó muy fragmentado), centrifugar a 5.000 g, 5 min, a temperatura ambiente (previamente se puede dejar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Lavar el precipitado con etanol 70%. Dejar secar. Colocar el ADN en un ependorf y añadir la cantidad adecuada de agua.

7.- Medir la concentración de ADN y almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ , preferentemente a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**• CUANTIFICACIÓN DEL ADN**

La concentración del ADN se estima mediante la medida de absorción de luz UV a 260 nm en un espectofotómetro (SHIMADZU, UV-120-02).

Teniendo en cuenta el coeficiente de extinción del ADN de doble cadena, se sabe que una D.O. de 1 corresponde a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Davies y col, 1986). De este modo, cuando se utiliza una dilución de 2  $\mu\text{l}$  de la solución de ADN en 998  $\mu\text{l}$  de agua, hemos de multiplicar el valor obtenido por 25 para que nos dé la concentración de ADN en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La relación entre la medida obtenida a 260 nm y la obtenida a 280 nm, nos da el grado de pureza de nuestro ADN; si esta relación está en torno a 2, tenemos un ADN bastante limpio, mientras que si esta relación es  $< 1.6$ , entonces existe bastante contaminación de proteínas u otros elementos que absorben a 280 nm.

**• DIGESTIÓN DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Antes de la electroforesis del ADN para su posterior transferencia a una membrana e hibridación con la sonda MDM2, se procede a la digestión del mismo, mediante los enzimas de restricción Hind III y ECO R1. Estos enzimas se unen al ADN de doble cadena y lo cortan en sitios específicos dentro ó junto a secuencias particulares conocidas como secuencias de reconocimiento.

• **MÉTODO:**

- 1.- Preparar las muestras de ADN (generalmente en una concentración aproximada de 1 µg/µl).
- 2.- Poner en un tubo de ependorf pequeño:  
 Solución de ADN ..... 8 µl  
 Tampón 10X ..... 1 µl  
 Enzima ..... 1 µl (mínimo 10 U)
- 3.- Incubar en baño a 37°C. El tiempo de incubación es variable. Se trata de conseguir una digestión completa, para evitar después la aparición de bandas que dificulten la interpretación de los resultados. Si la concentración de enzima es baja, hay que incubar 16-24 horas. Si la concentración de enzima es alta (5 U/µl - 10 U/µl), el tiempo de incubación se puede reducir a 3 horas.
- 4.- Centrifugar 10-20 seg a máxima velocidad en una centrifuga de sobremesa.
- 5.- Añadir el tampón de carga (azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol 0.25%, sacarosa 40%) para la electroforesis (*véase apartado 2.4*).

• **ELECTROFORESIS DEL ADN EN GELES DE AGAROSA**

\* **PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA**

- 1.- Calentar 1 g de agarosa (BRL, ultra pure, cat # 5510-B) en 100 ml del tampón de electroforesis TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M).
- 2.- Añadir 3 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) y dejar enfriar a 55-60°C.
- 3.- Preparar el soporte del gel que hará de molde para la agarosa con el peine adecuado. Verter la agarosa líquida. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 4.- Colocar en la cubeta de electroforesis (DNA SUB CELL, Bio-Rad) con tampón de electroforesis TAE.

\* **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Añadir 1 µl de tampón de carga por cada 5 µl de producto que se carga en el gel de agarosa.

\* **ELECTROFORESIS**

Cargar las muestras en los pocillos y conectar la cubeta de electroforesis a una fuente de alimentación (MODEL 1000/500, Bio-Rad) y aplicar un voltaje de 80 V/cm. Parar la electroforesis cuando la banda correspondiente al azul de bromofenol alcanza ¾ partes del gel. Los fragmentos de ADN se visualizan poniendo el gel sobre un transiluminador de luz UV.

• **TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS DE NYLON**

• **MÉTODO**

- 1.- Despurinar el gel en CIH 0.25 M durante 10-15 min.
  - 2.- Lavar en agua. Desnaturalizar en NaCl 1.5 M, Na OH 0.5 M durante 30 min.
  - 3.- Lavar en agua. Neutralizar en NaCl 1.5 M, Tris CIH 0.5 M pH 7.2, EDTA 0.001 M dos veces durante 15 min.
  - 4.- Lavar en agua.
- Equilibrar la membrana de nylon (HYBOND-N) y el gel en tampón de transferencia SSC 20X:

NaCl..... 175.3 g  
 CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O ..... 88.2 g  
 Ajustar pH a 7.0  
 Agua hasta ..... 1 litro

5.- Transferir por capilaridad durante toda la noche utilizando el tampón de transferencia SSC 20X.

6.- Fijar el ADN a la membrana mediante calor (2 horas a 80°C).

## **5.2- PREPARACIÓN DE LA SONDA MDM2**

La sonda MDM2B fue sintetizada como describe Ladanyi y col (1993) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de cDNA de tejido renal humano normal. Tiene una longitud de 476 pares de bases y se corresponde con los nucleótidos 1208-1631 de la secuencia del cDNA publicada por Oliner y col (1992). Los iniciadores utilizados (MDM2AS y MDM2A AS) fueron:

5' - GCTGACTATTGGAAATGCAC -3'  
 5' - TCGACCTTGACAAATCACAC -3'

Como control se utilizó el gen de la actina, cuya sonda se sintetizó con los siguientes iniciadores:

5' - CATTCCATCCTGCGTCTGGAC -3'  
 5' - CACGGAGTACTTGCGCTCAGGAGG -3'

La reacción se lleva a cabo en tubos de polipropileno de pared delgada con capacidad hasta 0.2 ml. Los reactivos empleados se detallan en la siguiente tabla:

COMPONENTES	VOLUMEN
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	10 µl
DNTPs (10 µM)	20 µl
Tampón PCR 10x	5 µl
Hexámeros aleatorios (50 µM)	2.5 µl
RNA total (1 µg/µl)	7.5 µl
INHibitor	2.5 µl
M-MLV transcriptasa reversa (50 U/µl)	2.5 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>50 µl</b>

Se utiliza un termociclador Perkin-Elmer 9600 para la obtención del cDNA y su posterior amplificación. La mezcla anterior se somete al siguiente programa de temperaturas: 42°C- 30 min, 99°C- 5 min y 5°C- 30 min.

El cDNA obtenido tras realizar la transcripción reversa del ARN se utiliza para amplificar una secuencia determinada del gen MDM2 y del gen de la actina mediante una posterior reacción de PCR con los iniciadores descritos previamente.

Los componentes utilizados en la reacción de PCR son los siguientes:

COMPONENTES	VOLUMEN
cDNA	20 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 $\mu$ l
Tampón PCR 10x	8 $\mu$ l
Iniciador 5' (15 $\mu$ M)	6 $\mu$ l
Iniciador 3' (15 $\mu$ M)	6 $\mu$ l
Taq DNA polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>

Programa de temperaturas al que se somete la muestra anterior:

94°C..... 5 min  
 35 ciclos.... 94°C..... 1 min  
                   56°C ..... 1 min y medio  
                   72°C ..... 2 min  
 72°C..... 10 min  
 4°C..... 5 min

### **5.3- HIBRIDACIÓN DE LAS MEMBRANAS CON LA SONDA MARCADA**

Se ha utilizado el Kit Southern-Light (cat# SL100SB, TROPIX) para la hibridación de las membranas con la sonda MDM2 previamente biotinizada y su posterior detección mediante quimioluminiscencia.

• **MÉTODO:**

- 1.- **Lavar** membrana en fosfato disódico 0.25 M, pH 7.2
- 2.- **Prehibridar** en el tampón de hibridación a 55°C durante 1 ó 2 horas con agitación constante en una estufa con dispositivo rotatorio. Verter el tampón.
- 3.- **Hibridación:** diluir la sonda biotinizada (0.1-5.0 pmol/ml) en 10 ml de tampón de hibridación y añadir a la membrana. Incubar durante toda la noche a 55°C con agitación constante.
- 4.- Finalizada la hibridación la membrana se somete a los siguientes **lavados** (1 ml/cm<sup>2</sup>):
  - Lavar 2 x 5 min a temperatura ambiente en SSC 2X, SDS 1%
  - Lavar 2 x 5 min a la temperatura de hibridación en SSC 1X, SDS 1%
  - Lavar 2 x 5 min a temperatura ambiente en SSC 1X
- 5.- Proceder a la **detección quimioluminiscente:**
  - Lavar 2 x 5 min en tampón de bloqueo (0.5 ml/cm<sup>2</sup>)
  - Incubar durante 10 min en tampón de bloqueo (1 ml/cm<sup>2</sup>)
  - Diluir el conjugado Avidx-AP en el tampón de bloqueo con una concentración final de 1:5.000. Utilizar 2.0  $\mu$ l del conjugado Avidx-AP en 10 ml del tampón de bloqueo por 100 cm<sup>2</sup> (0.1 ml/cm<sup>2</sup>).
  - Incubar durante 20 min a temperatura ambiente con constante agitación.
  - Lavar 1 x 5 min en el tampón de bloqueo (0.5 ml/cm<sup>2</sup>).
  - Lavar 3 x 5 min en el tampón de lavado (1 ml/cm<sup>2</sup>).
  - Lavar 2 x 2 min en el tampón Assay (0.25 ml/cm<sup>2</sup>).
  - Secar la membrana y colocar en una bolsa de plástico.

- Pipetear la solución de *CSPD Ready-to-Use substrate solution* en la membrana (3 ml/100cm<sup>2</sup>) e incubar 5 min.
- Eliminar el exceso de solución CSPD de la membrana y colocarla en una nueva bolsa de plástico.

6.- **Exponer** la membrana a una placa radiográfica en un chasis con pantalla intensificadora, a temperatura ambiente y revelar pasado un tiempo adecuado. Dependiendo de la intensidad de la reacción de color, se puede volver a exponer la membrana a otra placa radiográfica durante más ó menos tiempo, según convenga.

• SOLUCIONES:

<b>SDS 20%</b>	
<b>Fosfato disódico 0.5 M, pH 7.2</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O 0.5 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%
<b>SSC 25X, pH 7.0</b>	Cloruro sódico 3.75 M Citratato sódico dihidratado 0.375 M
<b>EDTA 0.2 M, pH 8.0</b>	
<b>Tampón de hibridación</b>	EDTA 1 mM SDS 7% Fosfato disódico 0.25 M, pH 7.2
<b>PBS</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.58 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O 0.17 M NaCl 0.68 M
<b>Tampón de bloqueo</b>	I-Block Reagent 0.2% PBS 1X SDS 0.5%
<b>Tampón de lavado</b>	PBS 1X SDS 0.5%

#### **5.4- ESTUDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN MDM2**

Se realiza mediante captación de imagen sobre las placas con la señal quimioluminiscente, utilizando un sistema EDAS (*Electrophoresis digital analysis system*) DC40 (Kodak). El programa para el análisis de la imagen fue: *Kodak digital science 1D image analysis software*. La intensidad de las bandas fue cuantificada también en un densitómetro LKB2202 Ultrascan acoplado a un integrador Hewlett Packard HP-3390.

#### **5.5- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

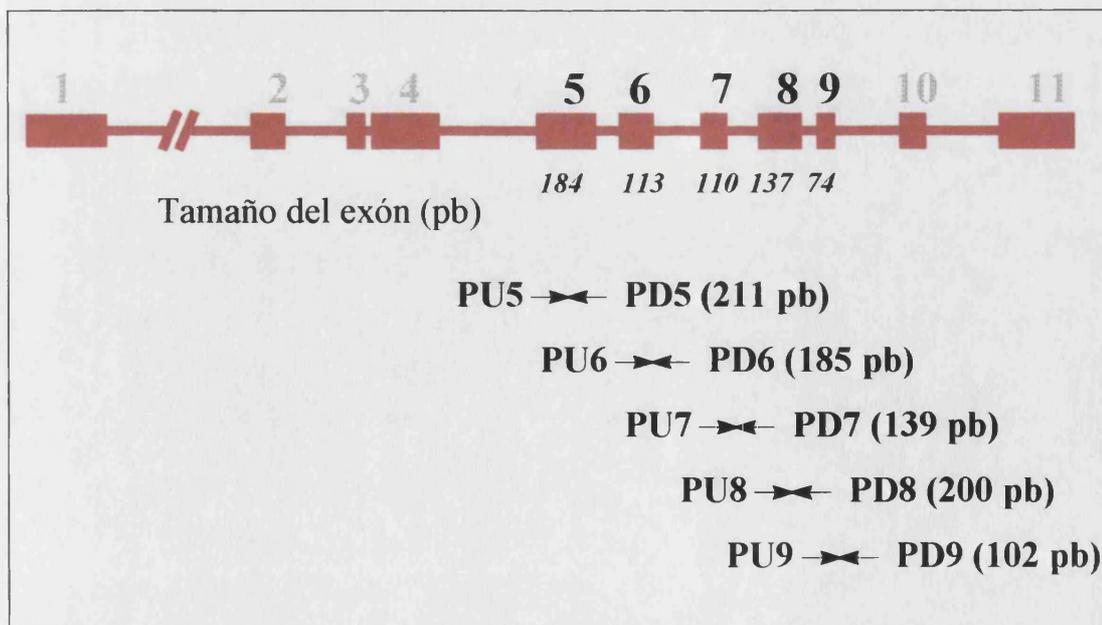
##### **•AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 5, 6, 7, 8 Y 9 DEL GEN P53**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa fue descrita por Mullis y cols. (Mullis y Faloona, 1987). Consiste en la síntesis enzimática "in vitro" de un elevado número de copias de un determinado segmento del ADN, y se basa en la hibridación y extensión de dos oligonucleótidos que actúan como "primers" ó cebadores de la ADN polimerasa que cataliza la reacción y que flanquean la región objeto de estudio en la doble cadena de ADN.

El primer paso de la reacción consiste en la desnaturalización del ADN que va a ser amplificado, con objeto de que los cebadores puedan hibridar con la región de la que son complementarios en el segundo paso de la reacción. En el tercer paso se lleva a cabo la extensión ó copia de las nuevas cadenas a partir de los grupos hidroxilo situados en el extremo 3' de los cebadores, sobre los que la polimerasa va incorporando los nucleótidos complementarios a los de las cadenas que actúan como moldes. Los tres pasos descritos: desnaturalización, hibridación y elongación se realizan a diferentes temperaturas que deben ajustarse en cada caso (Iniesta, 1995).

En nuestro estudio se pretende amplificar las regiones correspondientes a los exones 5, 6, 7, 8 y 9 del gen P53 humano, utilizando para ello, los siguientes iniciadores para cada exón (Human p53 Amplimer Panels, cat # 6398-1, CLONTECH):

<b>EXÓN 5</b>	<b>PU5</b>	5'-CTC TTC CTG CAG TAC TCC CCT GC-3'
	<b>PD5</b>	5'-GCC CCA GCT GCT CAC CAT CGC TA-3'
<b>EXÓN 6</b>	<b>PU6</b>	5'-GAT TGC TCT TAG GTC TGG CCC CTC-3'
	<b>PD6</b>	5'-GGC CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC-3'
<b>EXÓN 7</b>	<b>PU7</b>	5'-GTG TTG TCT CCT AGG TTG GCT CTG-3'
	<b>PD7</b>	5'-TCC AGG TCA GGA GCC ACT TG-3'
<b>EXÓN 8</b>	<b>PU8</b>	5'-ACC TGA TTT CCT TAC TGC CTC TGG C-3'
	<b>PD8</b>	5'-GTC CTG CTT GCT TAC CTC GCT TAG T-3'
<b>EXÓN 9</b>	<b>PU9</b>	5'-GCC TCT TTC CTA GCA CTG CCC AAC-3'
	<b>PD9</b>	5'-CAC CCT TCA GGT ACT AAG TCT TGG G-3'



**FIGURA 1:** Representación esquemática del gen P53 con la localización y tamaño de cada exón estudiado y del producto amplificado por los iniciadores utilizados.

- Componentes utilizados en la **REACCIÓN** de PCR:

COMPONENTES	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua	41.1 $\mu$ l	
ADN (1 mg/ml)	0.7 $\mu$ l	0.7 mg/50 ml
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5 $\mu$ l	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 $\mu$ l	0.1 mM
Tampón 10X	5 $\mu$ l	1X
Iniciador 5'	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
PU5, PU6, PU7, PU8 y PU9		
Iniciador 3'	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
PD5, PD6, PD7, PD8 y PD9		
Taq DNA pol (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	1U
VOLUMEN TOTAL	50 $\mu$ l	

- Condiciones de **AMPLIFICACIÓN** para los exones 5, 6, 7 y 9:  
(Termociclador Perkin Elmer 9600)

		Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización</b>		94°C	5 min
<b>35 ciclos</b>	Desnaturalización	95°C	30 seg
	Hibridación	66°C	45 seg
	Elongación	72°C	1 min
<b>Elongación final</b>		72°C	10 min

- Condiciones de **AMPLIFICACIÓN** para el oxeen 8:  
(Termociclador Perkin Elmer 9600)

		Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización</b>		94°C	5 min
<b>35 ciclos</b>	Desnaturalización	94°C	20 seg
	Hibridación	57°C	30 seg
	Elongación	72°C	45 seg
<b>Elongación final</b>		72°C	10 min

- Comprobación de la amplificación:

Se realiza una electroforesis de los productos amplificados (5  $\mu$ l del producto de la PCR + 1  $\mu$ l del tampón de carga), en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. Se fotografía sobre un transiluminador de luz UV.

## 5.6- POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DEL ADN DE CADENA SIMPLE (SSCP)

El polimorfismo conformacional de cadena simple es un método rápido, sensible y de gran utilidad para detectar cambios que tienen lugar en secuencias de ADN, lo que nos ayuda a descartar aquellos casos estudiados que mantienen la estructura del gen P53 normal y seleccionar, para una posterior secuenciación, los que presentan mutaciones.

La técnica consiste en separar las dos cadenas del ADN amplificado y por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, la movilidad electroforética del fragmento amplificado, al depender no solo de su tamaño sino también de su carga, se llevará a cabo mediante la separación de fragmentos que difieran entre sí en un solo nucleótido. De este modo se observarán bandas de movilidad anómala en aquellos casos que presenten mutaciones.

### • MÉTODO:

1.- Montar el sistema de electroforesis vertical. Limpiar las placas de cristal y separadores con metanol-KOH, agua corriente, agua destilada y etanol. Dejar secar al aire.

2.- Preparar el gel de poliacrilamida al porcentaje adecuado, según el exón estudiado (ver *tabla n° 1-2*). Verter la poliacrilamida en el molde formado por placas de cristal separadas 1 mm y dejar polimerizar 1 hora.

3.- Preparar las muestras: 5 µl de ADN amplificado + 15 µl de tampón de electroforesis + 10 µl de TBE 5X. Hervir 5-10 min y enfriar rápido en el baño a -10°C.

4.- Colocar las muestras en los pocillos y realizar la electroforesis durante 15 horas a 125 v.

5.- Retirar el gel y realizar una tinción de plata para visualizar las bandas de ADN (Kit de Bio Rad cat.# 161-1443). Ver *tabla n° 3*.

6.- Parar la tinción con ácido acético al 5% y fotografiar el gel en un transiluminador de luz visible.

### • SOLUCIONES:

- TBE 5X:	Tris	54.0 g
	Acido Bórico	27.5 g
	EDTA 0.5 M, pH 8.0	20 ml
	Agua hasta	1 litro
	Ajustar a pH 8.3	

- Tampón de electroforesis:	Formamida	75%
	NaOH	10 mM
	SDS	0.01 %
	EDTA	3 mM
	Glicerol	6.25%
	Azul de bromofenol	0.03%
	Xileno Cianol	0.03%

• GELES DE POLIACRILAMIDA:

\* **Tabla n° 1:** Gel de poliacrilamida 14%, glicerol 5%. Porcentaje utilizado para los exones 6, 7, 8, y 9 del gen P53.

Acrilamida 40%	8.75 ml
Agua	12.32 ml
TBE 5X	2.5 ml
Persulfato de amonio	0.18 ml
Glicerol	1.25 ml
TEMED	8.75 $\mu$ l

\* **Tabla n° 2:** Gel de poliacrilamida 12%, glicerol 5%. Porcentaje utilizado para el exón 5 del gen P53.

Acrilamida 40%	7.5 ml
Agua	13.57 ml
TBE 5X	2.5 ml
Persulfato de amonio	0.18 ml
Glicerol	1.25 ml
TEMED	8.75 $\mu$ l

• **Tabla n° 3:** TINCIÓN DE PLATA.

REACTIVO	VOLUMEN	TIEMPO
Metanol 40%	400 ml	30 min
Etanol 10%	400 ml	15 min
Etanol 10%	400 ml	15 min
Oxidante	200 ml	5 min
Agua desionizada	400 ml, hasta desteñir gel	5 min
Reactivo de plata	200 ml	20 min
Agua desionizada	400 ml	1 min
Revelador	200 ml	30 seg
Revelador	200 ml	5 min
Revelador	200 ml	5 min

### 5.7- SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Los exones amplificados que presentan bandas de movilidad anómala en los geles de poliacrilamida se proceden a secuenciar automáticamente con un secuenciador Modelo 373A (Applied Biosystems), perteneciente al *Servicio de Secuenciación del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universitat Literaria de Valencia*.

Las muestras se preparan eliminando los restos de la reacción PCR mediante el uso de columnas Microcon-100 (Amicón). En los casos donde se amplifican fragmentos de diferente tamaño en la misma reacción, se realiza una electroforesis del producto de la amplificación en

un gel de agarosa y posteriormente se extrae el ADN de la banda deseada mediante el sistema de purificación de ADN Wizard PCR Preps (Promega).

## **6.- TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS P53 Y MDM2**

### **6.1- AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS**

• **MÉTODO:**

- 1.- Partiendo de muestras congeladas en Nitrógeno líquido, obtener aproximadamente 0.2 g.
- 2.- Machacar en mortero con Nitrógeno líquido hasta reducir a polvo.
- 3.- Pasar a placa de Petri y añadir tampón de lisis frío (0-4°C). Añadir de 3 a 5 volúmenes del tampón (1 ml para 0.2 g).
- 4.- Homogeneizar en frío.
- 5.- Pasar a un tubo eppendorf e incubar en baño frío durante 45 minutos. Agitar de vez en cuando en vortex.
- 6.- Centrifugar a 13.000 g, durante 20 minutos, en frío.
- 7.- Recoger el sobrenadante, en frío (0-4°C).
- 8.- Diluir y alicuotar. Guardar a -20°C ó a -70°C para períodos prolongados.

• **SOLUCIONES:**

<b>-Tampón de lisis:</b>	Tris HCl	25 mM, pH 7.5
	SDS	0.1%
	Triton X100	1%
	ClNa	50 mM
	FNa	50 Mm
	Dexoxicolato	0.5%
	Aprotinina	10 ug/ml
	PMSF	1 mM
	Agua	

### **6.2- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Utilizamos el **Sigma Protein assay Kit** (cat # P5656)

• **PRINCIPIO:**

Un reactivo alcalino de tartrato cúprico forma complejos con las uniones peptídicas y adquiere un color azul-violáceo cuando se le añade un reactivo fenólico. La densidad óptica se lee a una longitud de onda entre 500 y 800 nm. La concentración proteica se determina en comparación con una curva standard de calibración.

• **REACTIVOS:**

- 1.- **Reactivo de Lowry modificado** (cat # L1013): añadir 40 ml de agua a la botella con el reactivo modificado. Estable a temperatura ambiente.
- 2.- **Reactivo fenólico de Folin y Ciocalteu** (cat # F9252): transferir el contenido de la botella stock (18 ml) a la botella de solución de trabajo y añadir 90 ml de agua destilada desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

3.- **Standard proteico** (cat # P7656): Preparado de BSA, fracción V. Preparar solución 400 ug/ml.

• **MÉTODO:**

1.- Preparación de la curva patrón: se utiliza un volumen de 1 ml, haciendo diluciones seriadas de la proteína de referencia según el siguiente esquema:

Volumen de proteína de referencia	Agua	Concentración proteica
0.125 ml	0.875 ml	50 ug/ml
0.250 ml	0.750 ml	100 ug/ml
0.500 ml	0.500 ml	200 ug/ml
0.750 ml	0.250 ml	300 ug/ml
1 ml	-	400 ug/ml

2.- Preparar un tubo blanco con 1 ml de agua.

3.- Preparar las diluciones adecuadas de cada una de muestras, con un volumen final de 1 ml.

4.- Añadir 1 ml del Reactivo de Lowry a los tubos de la proteína de referencia, blanco y muestras problema. Incubar a temperatura ambiente durante 20 min.

5.- Añadir 0.5 ml de la solución de trabajo del reactivo de Folin y Ciocateu a cada tubo, mezclándolo de forma rápida e inmediata. Dejar que tenga lugar la reacción durante 30 min, a temperatura ambiente. Aparecerá el color azul.

6.- Medir la densidad óptica de la proteína de referencia y la muestra en relación con el blanco. Longitud de onda: entre 500 y 800 nm. Las lecturas deben completarse en 30 min a partir del punto 5.

7.- Con las absorbancias obtenidas de los tubos de la proteína de referencia y conociendo sus concentraciones, realizamos una curva patrón, la cual se utiliza para extrapolar la concentración proteica de los casos en estudio.

### **6.3-TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A MEMBRANAS PVDF (WESTERN-BLOT)**

• **PREPARACIÓN DEL GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA**

1.- Preparar la solución del gel separador al 10% (para estudiar la proteína p53) ó 7.5% (para estudiar la proteína mdm2). Ver *tabla n° 1*.

2.- Esta solución se polimeriza como gel en la unidad Mighty Small Dual Gel Caster SE 245 (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, San Francisco). Dejar polimerizar durante una hora.

3.- Preparar la solución del gel iniciador al 5% (para estudiar p53) ó 4% (para estudiar mdm2). Ver *tabla n° 1*.

4.- Colocar el peine sobre el gel separador y verter la solución del gel iniciador. Dejar polimerizar durante una hora, retirar el peine y trasladar el gel a la unidad de electroforesis (Mighty Small II, SE 250, HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, San Francisco) con tampón de electroforesis ( Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8.3).

**Tabla n° 1:** Composición de los geles de SDS-Poliacrilamida según concentraciones

	GEL SEPARADOR		GEL INICIADOR	
	7.5%	10%	4%	5%
<b>Acrilamida 40%</b>	3.75 ml	5 ml	0.5 ml	0.63 ml
<b>Agua destilada</b>	10.94 ml	8.79 ml	3.17 ml	3.04 ml
<b>1.5M Tris-HCl, pH 8.8</b>	5 ml	5 ml	-	-
<b>0.5M Tris-HCl pH 6.8</b>	-	-	1.25 ml	1.25 ml
<b>SDS 10%</b>	200 µl	200 µl	50 µl	50 µl
<b>PSA 10%</b>	100 µl	100 µl	25 µl	25 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	5 µl	5 µl
<b>Volumen total</b>	20 ml	20 ml	5 ml	5 ml

### • ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA

1.- Preparar las muestras de proteínas (20-40 µg) y un marcador de pesos moleculares (Bio-Rad), añadiéndoles un volumen igual de tampón de carga (Tris HCl 62.5 mM, pH 6.8, Glicerol 10%, SDS 2%, B-mercaptoetanol 5%, Azul de bromofenol 0.05%). Hervir las muestras y el marcador durante 4-5 min para desnaturalizar las proteínas.

2.- Cargar las muestras en los pocillos e iniciar la electroforesis utilizando una fuente de alimentación (MODEL 200/2.0 POWER SUPPLY, Bio-Rad) manteniendo un voltaje de 125 V durante 1-2 horas.

3.- Preparación de la unidad de transferencia: el gel y la membrana forman un sándwich que se coloca en una unidad de transferencia eléctrica (TRANS-BLOT CELL, Bio-Rad), con 3 litros de tampón de transferencia (Tris 0.25 mM, Glicina 192 mM). La unidad va colocada sobre un agitador magnético e incorpora un sistema de enfriamiento. Se utilizan membranas de PVDF (Inmobilon-P), las cuales necesitan de un tratamiento previo en metanol durante 3 segundos. Seguidamente se lavan con agua destilada y se equilibran con el tampón de transferencia. Condiciones para la transferencia: voltaje constante a 110 V durante 3 horas.

4.- Terminada la transferencia, el gel se tiñe durante al menos 30 minutos para comprobar la calidad de la transferencia, con Coomassie Blue (R-250, Bio-Rad) y posterior decoloración con ácido acético al 10% y metanol al 40%.

### 6.4-DETECCIÓN DE PROTEÍNAS P53 Y MDM2

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PDVF se procede a su detección mediante quimioluminiscencia, utilizando el Kit Western-Light (cat # WT10RC, TROPIX).

#### • MÉTODO:

1.- Lavar la membrana con PBS durante 5 min (50 ml).

2.- Incubar en tampón de bloqueo durante 30-60 min (50 ml).

3.- Diluir el anticuerpo primario en el tampón de bloqueo (10 ml) e incubar la membrana toda la noche:

<b>p53</b>	<b>DO-7 (clon DO-7)</b>	dilución 1:400
	<b>(CAT# M7001, DAKO)</b>	
	<b>1801 (clon Pab 1801)</b>	dilución 1:200
	<b>(CAT# OPA22/1, Novocastra laboratories)</b>	

**mdm2**                      **mdm2 (clon 1B10)**    dilución 1:500  
 (CAT# NCL-MDM2, Novocastra laboratories)

- 4.- Lavar un mínimo de 2 x 5 min en tampón de bloqueo (50 ml).
- 5.- Diluir el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina 1:10.000 en el tampón de bloqueo. Incubar durante 1 hora.
- 6.- Lavar un mínimo de 3 x 5 min en tampón de bloqueo (50 ml).
- 7.- Lavar 2 x 5 min en tampón ASSAY (0.1M Dietanolamina, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 8.- Secar la membrana y colocar en una bolsa plastificada.
- 9.- Pipetear una capa delgada de *CSPD Ready-to-Use substrate solution* + 1:20 Nitro-Block en la membrana (3 ml/100cm<sup>2</sup>) e incubar 5 min.
- 10.- Eliminar el exceso de solución CSPD de la membrana y plastificar.
- 11.- Exponer la membrana plastificada a una placa radiográfica y revelar pasado un tiempo determinado. Dependiendo de la intensidad de la reacción de color, se puede volver a exponer la membrana a otra placa radiográfica durante más ó menos tiempo, según convenga.

• SOLUCIONES:

<b>PBS</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.58 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O 0.17 M NaCl 0.68 M
<b>Tampón de bloqueo</b>	I-Block Reagent 0.2% PBS 1X Tween-20 0.1%
<b>Tampón de lavado</b>	PBS 1X Tween-20 0.1%

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos tras el estudio, mediante diferentes técnicas, de los genes **TP53** y **MDM2** y sus correspondientes productos génicos en los **FIBROHISTIOCITOMAS MALIGNOS** se desarrollan a continuación, según el siguiente esquema de trabajo:



## • ESTUDIO HISTOLÓGICO

En el presente estudio, un total de 27 Fibrohistiocitomas Malignos (FHM) fueron analizados histológicamente en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario según la Clasificación de tumores de partes blandas de la Organización Mundial de la Salud. Se obtuvieron los siguientes resultados: la variante PLEOMÓRFICO/ESTORIFORME fue el subtipo histológico más frecuente (81%), con un predominio del grado III (13/22) sobre el grado II (9/22) y el grado I (1/27). Entre los cuatro tumores restantes hay dos FHM MIXOIDES, un FHM GIGANTO-CELULAR y un FHM INFLAMATORIO. Las características morfológicas individualizadas de los diferentes tumores se esquematizan en el Apartado nº 1.

## • ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

En el estudio inmunohistoquímico realizado para tipificar fenotípicamente cada uno de los FHM, se observó una tendencia a expresar los antígenos Vimentina,  $\alpha_1$ -antitripsina y  $\alpha_1$ quimiotripsina mayoritariamente. De forma aislada, se detectó inmunopositividad focal frente a CD68, desmina, S-100, Ulex Europaeus y Factor XIII. En la tabla 2.1 se detallan estos resultados inmunohistoquímicos.

Una vez establecido el diagnóstico morfológico e inmunofenotípico de Fibrohistiocitoma Maligno, se procedió al estudio del gen TP53 y de su producto génico mediante técnicas de Biología Molecular e Inmunohistoquímica.

## • GEN TP53

Para el estudio del gen TP53 utilizamos la técnica de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple, SSCP (*single strand conformational polymorphism*). Esta técnica detecta, de forma rápida y sensible, cualquier cambio (un solo nucleótido) en la secuencia del gen. Basándonos en que la frecuencia de mutaciones del gen TP53, publicadas hasta la fecha, se concentra en los exones 5, 6, 7, 8, y 9, elegimos éstos mismos para nuestro análisis. Previamente a la técnica de SSCP, es necesaria la amplificación de dichos exones mediante PCR y la determinación cuantitativa del producto amplificado (-, + ó ++) para fijar la cantidad necesaria para la SSCP. Los resultados, tanto de la PCR como de la SSCP, se muestran por series de tumores y exones correlativos (*Figuras 3.1→3.16*). Los casos en los que se obtuvo un resultado negativo en la amplificación o en la SSCP se repitieron posteriormente y sus resultados se hallan reflejados en las figuras correspondientes. En la *tabla 3.1* se detalla la relación completa de ambas técnicas con la totalidad de las muestras tumorales, obteniéndose los siguientes resultados:

**TABLA 3.1: PCR-SSCP**

EXÓN	AMPLIFICACIÓN PCR		SSCP ALTERADA			
	nº	%	nº	%	TUMOR	FIGURA
5	27	100%	2	7.4%	FHM 571 FHM 2435	Fig. 3.1 Fig. 3.7
6	27	100%	2	7.4%	FHM 176 FHM 1116	Fig. 3.2 Fig. 3.12
7	27	100%	0	0%		
8	25	92.8%	0	0%		
9	27	100%	0	0%		
		TOTAL	4	14.8%		

Los tumores **FHM 176** y **FHM 571** son dos de los ocho casos con crecimiento positivo de sus xenotransplantes en ratones *nude* y por consiguiente, con material crioconservado de sus sucesivos pasajes. Dichas muestras también se han utilizado en nuestro estudio (como se indica en MATERIAL Y MÉTODOS) y se han obtenido resultados similares a los tumores primarios (*Fig. 3.2* y *Fig. 3.1*).

Los seis casos que mostraron bandas de movilidad anómala en la SSCP (cuatro tumores primarios y dos xenotransplantados) fueron secuenciados (*ver tabla 3.2*). Al amplificar el exón 6 del tumor **FHM 1116** se obtuvo, tanto en la PCR como en la SSCP, dos fragmentos de diferente tamaño. La banda del fragmento de tamaño diferente al tamaño del exón 6 se aisló del gel de agarosa y se purificó para su posterior secuenciación. Los resultados de la secuencia mutada de cada caso se esquematizan de forma individualizada en las *figuras 3.17→3.20*.

**TABLA 3.2 SECUENCIACIÓN: RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL GEN P53**

Tumor	exón	codón	cambio nucleótido	alteración	cambio aa
<b>FHM 176</b>	6	213	CGA→CGG	mutación neutra	silente
<b>Nu 55*</b>	6	213	CGA→CGG	mutación neutra	silente
<b>FHM 571</b>	5	178	GAC→CAC	mutación	His→Asp
<b>Nu 80*</b>	5	178	GAC→CAC	mutación	His→Asp
<b>FHM 1116</b>	6	199-219	+(63 pb)	duplicación	duplicación
<b>FHM 2435</b>	5	-	-	-	-

\* El caso Nu 55 y el caso Nu 80 son, respectivamente, tumores xenotransplantados de los Fibrohistiocitomas Malignos FHM 176 y FHM 571.

aa: aminoácido; pb: pares de bases; His: histidina; Asp: asparragina

En dos casos (**FHM 2091** y **FHM 2853/Nu 213**) no obtuvimos producto amplificado del exón ocho. Se repitió la técnica de PCR bajo condiciones más permisivas y se intentó amplificar un fragmento que incluyera ambos exones contiguos utilizando los *primers* adecuados pero no obtuvimos resultados positivos. De este modo, aunque no se ha podido demostrar ningún tipo de mutación específica, existe la posibilidad, aunque no valorable objetivamente, de que haya algún tipo de alteración (delección?) a este nivel.

En nuestro estudio obtuvimos bandas de movilidad anómala mediante SSCP en los productos amplificados del exón cinco en dos tumores. En uno de ellos se detectó una mutación puntual mediante secuenciación automática, mientras que el otro (**FHM 2435**), tras repetidas secuenciaciones, dio una lectura correcta.

#### • PROTEÍNA p53

Puesto que la proteína mutada tiene, típicamente, una vida media más larga que la forma no mutada, nos pareció interesante realizar un estudio de la expresión de la proteína p53. La técnica inmunohistoquímica nos puede facilitar la búsqueda de mutaciones puntuales *missense* (las proteínas ausentes, truncadas o inestables causadas por mutaciones *nonsense* son generalmente indetectables). La frecuencia de alteraciones en p53 depende de los métodos utilizados. La inmunohistoquímica detecta sobreexpresiones de p53 sin alteraciones del gen, que pueden ser debidas a mecanismos alternativos que estabilizan la proteína (unión a

proteínas víricas o endógenas) o a mutaciones existentes en los exones no analizados. Por tanto, suele haber mayor número de alteraciones en los trabajos realizados con técnicas inmunohistoquímicas.

En nuestro caso, se decidió estudiar la proteína p53 mediante inmunohistoquímica y posterior comprobación con la técnica de Western-blot, tanto para comprobar la correlación de resultados con las alteraciones encontradas a nivel génico, como para estudiar la posibilidad de interacción con la amplificación del gen MDM2 ó con su producto génico, la proteína mdm2.

La técnica de Western-blot seguida de la detección de la proteína por un sistema de quimioluminiscencia no se pudo valorar en los casos de tumores xenotransplantados debido a la interacción del anticuerpo secundario (monoclonal, obtenido de ratón) con las proteínas propias de los ratones *nude*, posiblemente inmunoglobulinas. Esta decisión se valoró tras realizar un control sin anticuerpo primario (resultado no mostrado) en dichos tumores.

Un 29.6% (8 de 27) de los casos estudiados fueron inmunohistoquímicamente positivos para p53 (Ac DO-7). Al contrastar los resultados con la técnica Western-blot (Ac DO-7 y 1801), en uno (FHM 184/Nu 64) de los 8 casos positivos no se detectó la proteína, se detectó en un caso negativo inmunohistoquímicamente (FHM 2991) y en el FHM 1569/Nu 127 no se pudo realizar por problemas técnicos (ausencia de material ó material escaso en la muestra). Dos de los casos (FHM 711 y FHM 1943) en que se detectó la proteína p53 mediante Western-blot no pudieron ser estudiados por inmunohistoquímica por falta de material.

Tumor	Gen P53	p53-Inmuno	p53-Western-blot
FHM 176/Nu 55	MN	-	-
FHM 184/Nu 64	-	mod ++	-
FHM 571/Nu 80	MP	int +++	•
FHM 711	-	NM	•
FHM 1047/FHM 1782*	-	mod ++	•
FHM 1116	DP	-	-
FHM 1569/Nu 127	-	mod +++	NM
FHM 1615	-	int +++	•
FHM 1666	-	int ++	•
FHM 1943	-	NM	•
FHM 2091	E8?	-	•
FHM 2435	SSCP	int +++	•
FHM 2802/FHM 3066	-	mod +++	•
FHM 2853Nu 213	E8?	-	-
<b>TOTAL</b>		8	9

→ Abreviaturas: **NM**: no material, material escaso en la muestra; **MN**: mutación neutra; **MP**: mutación puntual; **DP**: duplicación; **SSCP**: SSCP alterada sin confirmación por secuenciación.

\* Los resultados del caso FHM 1047/FHM 1782 se valoraron en conjunto.

Los resultados obtenidos con las técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot, el estudio comparativo entre ambas técnicas y su relación con las alteraciones detectadas en el gen TP53 se detallan a continuación (*Tabla 4.1→Tabla 4.3*). Las imágenes de las diferentes técnicas, individualizadas por casos se muestran en las *figuras 4.1→4.4*.

#### • GEN MDM2

La amplificación del gen MDM2 se ha implicado en la patogénesis de neoplasias humanas. Esta hipótesis se basa en la posible inhibición de P53 por MDM2 y de la amplificación de MDM2 como posible mecanismo de escape de los sarcomas al control del ciclo celular mediado por p53. Debido a la ya conocida amplificación de MDM2 en sarcomas humanos y más concretamente en FHM, pretendemos estudiar las alteraciones de este gen y su relación con los casos en los que se ha encontrado mutaciones en el gen p53 o expresión de la proteína. Para ello utilizamos la técnica Southern-blot con posterior hibridación de las membranas con la sonda MDM2B y detección mediante el sistema de quimioluminiscencia. La intensidad de las autorradiografías se cuantificó mediante un sistema EDAS DC40 (Kodack) y densitometría en un densitómetro LKB 2202 Ultrosan acoplado a un integrador Hewlett Packard HP-3390. Las diferencias en cantidad de muestra se corrigieron dividiendo el área del densitometrado de los amplificados por la del amplificado de actina. Se valoraron como no informativos aquellos casos en que los valores del amplificado de actina fueron menores a 1 y como amplificados aquellos casos cuyo valor del amplificado fue mayor de 4.5. El estudio comparativo del gen de la actina, en las mismas condiciones técnicas, nos permitió detectar dos tumores con amplificación de MDM2: FHM 184 y FHM 571, en este último tumor, la amplificación de MDM2 también se observó en su homólogo xenotransplantado (Nu 80). Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 5.1 y las imágenes de las membranas hibridadas en las figuras 5.1→5.3.

#### • PROTEÍNA mdm2

Con las técnicas realizadas hasta el momento, hemos detectado tumores con mutaciones en el gen TP53 y sobreexpresión de la proteína mutada, tumores con mutaciones neutras del gen que no alteran la expresión proteica, tumores con sobreexpresión de p53 y amplificación de MDM2 y tumores con sobreexpresión de la proteína p53 sin alteración de ambos genes. En esta última circunstancia resulta interesante el estudio de la proteína mdm2, ya que se han descrito niveles elevados de mdm2 con ausencia de amplificación ó niveles aumentados de ARNm. Este hecho se explicaría mediante un mecanismo de regulación post-transcripcional y justificaría la detección de p53 (feed-back).

Utilizamos la técnica de inmunohistoquímica y Western-blot seguida de la detección de la proteína por un sistema de quimioluminiscencia, que al igual que en el estudio de la proteína p53, no pudo valorarse en los casos de tumores xenotransplantados (véase *apartado 4*).

En nuestro trabajo hemos encontrado expresión de la proteína mdm2 en trece FHM. Al igual que ocurría con la proteína p53, la valoración conjunta de ambas técnicas utilizadas en la detección de mdm2 (inmunohistoquímica y Western-blot) resulta más precisa. En este caso la inmunohistoquímica ha presentado mayor sensibilidad. Los resultados obtenidos con las técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot y el estudio comparativo entre ambas técnicas se detallan en las *Tablas 6.1 y 6.2*. Las imágenes de las diferentes técnicas, individualizadas por casos se muestran en las *figuras 6.1→6.4*.

## 1.- ESTUDIO HISTOLÓGICO

El estudio histológico fue realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario según la Clasificación de tumores de partes blandas de la Organización Mundial de la Salud. Los resultados son los siguientes:

### 1.- FHM 179-Nu 20

G.B.P	28.11.1985	Sinovial rodilla	H-121821
-------	------------	------------------	----------

*Tumoración maligna de origen mesenquimal con extensas áreas necróticas y hemorrágicas. La celularidad muestra un marcado pleomorfismo con formas gigantocelulares. No se observa diferenciación muscular ó adiposa. El índice divisional es alto, oscilando entre 18-22 mitosis por 10 HPF. Mantiene una fuerte reacción inflamatoria estromal.*

*La celularidad tumoral muestra positividad frente a  $\alpha_1$ -quimiotripsina y  $\alpha_1$ -antitripsina. Es negativo frente a los marcadores epiteliales, vasculares, musculares y neuromelánicos.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III**

### 2.- FHM 176-Nu 55

J.G.M.	20-5-1987	Axila	H-148501
--------	-----------	-------	----------

*Tumoración constituida por una población de células pleomórficas y gigantocelulares, predominando elementos mononucleados de tamaño mediano y aisladas células fusiformes. La necrosis tumoral es abundante y el índice mitótico superior a 3 mitosis por campo de gran aumento. No se observa ningún signo de diferenciación ósea, condral, vascular ó mioblástica.*

*Se observa positividad celular frente a  $\alpha_1$ -quimiotripsina y  $\alpha_1$ -antitripsina, vimentina y desmina.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III**

### 3.- FHM 184-Nu 64

V.C.P.	15.12.1987	Glúteo	H- 155151
--------	------------	--------	-----------

*Proliferación neoplásica de carácter estoriforme, constituida por células con acusado grado de atipia y morfología fusiforme en unas áreas alternando con otras de mayor tamaño, contornos poligonales y citoplasma pálido. Existen amplias áreas de necrosis que ocupan la mayor parte de la toma remitida.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III**

### 4.- FHM 571-Nu 80

R.C.S.	3.4.1987	Pierna	H-146067
--------	----------	--------	----------

*Producción tumoral maligna de carácter fibrohistiocitario pleomórfico, pobremente diferenciada y altamente agresiva. Hay un intenso pleomorfismo celular con elementos multinucleados gigantes con mitosis elevadas de 15-17 por HPF y la necrosis es muy importante.*

**Recidiva por Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III**

**5.- FHM 711-Nu 90**

M.J.A.	3.4.1989	Muslo derecho	H-181622
--------	----------	---------------	----------

*Se trata de una proliferación tumoral maligna de carácter sarcomatoso, formada por elementos de estirpe fibrohistiocitaria que crece adoptando patrones pleomórficos en rueda de carro ó en una imagen más difusa. Destaca el intenso pleomorfismo nuclear y la intensa densidad celular, aunque por otro lado no se encuentran signos de necrosis. El número de mitosis por diez campos a gran aumento es de 12, lo cual le da un grado medio de malignidad. La reacción inflamatoria es muy discreta.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado II**

**6.- FHM 857-Nu 97**

T.G.M.	14.3.1989	Región trocanterea	H-187799
--------	-----------	--------------------	----------

*Tumor altamente agresivo maligno de carácter fusocelular y disposición estoriforme, con gran cantidad de necrosis y con importante actividad invasora y proliferativa. Las células son fundamentalmente de aspecto fibroblástico acompañadas de una importante reacción inflamatoria y numerosos focos de necrosis.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III**

**7.- FHM 1047-Nu 105 / 8.- FHM 1782-Nu 146**

A.S.C.	16.1.1990	Fémur	H-195209
--------	-----------	-------	----------

*La imagen tumoral responde a una proliferación de carácter sarcomatoso con disposición pleomórfica adoptando un patrón fibrohistiocitario. Los elementos tumorales crecen formando bandas y redes entrelazadas, son extremadamente grandes y muy atípicas y muestran un índice divisional de 25 mitosis por HPF. Hay infiltración del canal medular óseo.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III**

**9.- FHM 1116-Nu 109**

B.M.	28.2.1990	Muslo	H-196843
------	-----------	-------	----------

*Proliferación maligna de carácter fibroblástico histiocitario adoptando un patrón pleomorfo. El crecimiento es invasivo y hay abundante necrosis. Existe un fuerte pleomorfismo celular y una actividad divisional baja.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado II**

**10.- FHM 1557-Nu 125**

C.G.C	16.5.1991	Retroperitoneo	H-48681
-------	-----------	----------------	---------

*Neoformación constituida por células fusiformes y estrelladas laxamente distribuidas y separadas por un intersticio fibroso de densidad variable. Dichas células presentan un núcleo prominente de cromatina fina con uno ó varios nucleolos ostensibles. Se aprecian abundantes células multinucleados gigantes e infiltrados inflamatorios de tipo linfoplasmocelular, polimorfonuclear e histiocitario. La actividad mitótica es poco ostensible y se aprecian extensas áreas de necrosis. Inmunohistoquímicamente presenta positividad frente a vimentina,  $\alpha_1$ -quimiotripsina y  $\alpha_1$ -antitripsina.*

**Fibrohistiocitoma maligno de tipo inflamatorio grado II**

**11.- FHM 1569-Nu 127**

C.E.F.	22.5.1991	Costal	H-FM1792
--------	-----------	--------	----------

*La imagen histológica configura un patrón estoriforme, sarcomatoso y pleomórfico. La proliferación es de grado alto con una gran celularidad, pleomorfismo nuclear, actividad divisional elevada y necrosis. Inmunohistoquímicamente muestra intensa positividad de las células tumorales frente a la vimentina,  $\alpha_1$ -quimiotripsina y  $\alpha_1$ -antitripsina. Es negativa frente a desmina.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III

**12.- FHM 1666-Nu 134**

J.T.B.	24.6.1994	Hombro	H-213669
--------	-----------	--------	----------

*La imagen histológica de la muestra confirma el diagnóstico previo de la lesión, descubriéndose una proliferación maligna de carácter fibrohistiocitario con presencia de elementos de tipología mesenquimatosa que alternan con otros formados por células más claras de citoplasma y apariencia epitelioide y otros de naturaleza fasciculada y fibrosarcomatosa. La lesión es pleomórfica, la actividad mitótica es de grado medio habiendo siete mitosis por 10 campos a gran aumento.*

Recidiva por Fibrohistiocitoma maligno de tipo estoriforme grado II

**13.- FHM 1755-Nu 145**

B.S.S.	3.12.1991	Rodilla	H-FM3723
--------	-----------	---------	----------

*Tumoración con pobre grado de diferenciación de naturaleza mesenquimal. Las células tumorales son positivas frente a vimentina, siendo desmina negativas y discretamente positivas frente a  $\alpha_1$ -quimiotripsina y  $\alpha_1$ -antitripsina. No hay signos de diferenciación neural (S-100 y HNK negativos).*

Fibrosarcoma anaplásico pobremente diferenciado grado II

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado II

**14.- FHM 2298-Nu 167**

E.R.A.	14.2.1994	Cuero cabelludo	H-249420
--------	-----------	-----------------	----------

*Neoformación mesenquimal dérmica constituida por células de morfología fusiforme ó poligonal de núcleos abigarrados, observándose formas multinucleadas bizarras y ocasionales mitosis, 4-5 por 10 campos de gran aumento. El tumor presenta un estroma xantomizado y vascularizado con fenómenos trombóticos y áreas hemorrágicas. Importante componente inflamatorio de predominio plasmocelular.*

Fibrohistiocitoma grado I

**15.- FHM 2407-Nu 179**

A.R.M.	13.6.1994	Glúteo	H-256023
--------	-----------	--------	----------

*Lesión de límites bien definidos constituida por células fusiformes y estrelladas de densidad variable con abundante material mixoide y colágeno entre las mismas, así como numerosos espacios vasculares. No se observa actividad mitótica, atipia destacable, necrosis ni hemorragia.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo mixoide grado I

**16.- FHM 2479-Nu 182**

R.A.M.	19.12.1994	Axila	H-259992
--------	------------	-------	----------

*Neoplasia mesenquimal constituida por una densa celularidad fusiforme con marcado pleomorfismo, atipia nuclear y frecuentes células multinucleadas y bizarras que adoptan un patrón estoriforme. Se observan 15-10 mitosis por 10 campos de gran aumento. Existen áreas con abundante estroma mixoide, zonas con focos de necrosis, focos inflamatorios y áreas de hemorragia. Se observan áreas de tejido adiposo con atipia celular en el seno de la tumoración, así como infiltración por el tumor del tejido adiposo circundante. En el estudio inmunohistoquímico se aprecia positividad de las células tumorales para vimentina, siendo negativas para actina y desmina. Focal positividad frente a la S-100 en las células de aspecto lipoblástico.*

Sarcoma de partes blandas grado III, con focal componente de liposarcoma pleomórfico y patrón fibrohistiocitario dominante.

**17.- FHM 2660-Nu 196**

C.L.C.	11.3.95	Cuadriceps izquierdo	H-45285C
--------	---------	----------------------	----------

*Tumoración de carácter maligno y naturaleza mesenquimal, en donde participan elementos de estirpe fibrohistiocitaria con dominio del componente fibroblástico, áreas de diferenciación mixoide y zonas plexiformes con carácter estoriforme. Existen células de carácter anaplásico gigantocelular. El pleomorfismo celular es importante y la actividad divisional de 9 mitosis por 10 campos de gran aumento. La necrosis es discreta. Hay vimentina positividad y clara, aunque focal, positividad frente a desmina. Los marcadores neuronales son negativos.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado II

**18.- FHM 2726-Nu 206**

A.F.G.	22.6.1995	Rodilla	H-FM23643
--------	-----------	---------	-----------

*Proliferación de aspecto mesenquimal maligna, con carácter fibrohistiocitario compuesta por elementos mesenquimales que crecen formando áreas fibrohistiocitarias, estoriformes, plexiformes, angiomatosas de irregular distribución y recorrido. La celularidad varía entre áreas fusiformes y zonas pleomórficas. Hay moderada necrosis. Se cuentan 10 mitosis por 10 campos de gran aumento. El estudio inmunohistoquímico muestra positividad frente a la vimentina de la mayoría de las células neoplásicas. Hay ocasional positividad de la desmina, siendo negativo frente a actina y CD68.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado II

**19.- FHM 2736-Nu 207**

A.P.R.	6.6.1995	Brazo derecho	H-FM23746
--------	----------	---------------	-----------

*Proliferación histiocitaria altamente pleomórfica y extremadamente indiferenciada que contiene células gigantes muy abundantes, necrosis extensa e intensa, fuerte pleomorfismo nuclear y escaso componente estrófico. El estudio inmunohistoquímico muestra las siguientes características: los elementos histiocitarios son positivos frente a vimentina, muestran discreta inmunorreacción frente a la actina y CD68 positivo. Los marcadores de diferenciación neural son negativos.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III

**20.- FHM 2802-Nu 209 / FHM 3066-Nu 225**

S.Y.L.	19.7.1995	Pierna	H-272191
--------	-----------	--------	----------

*Tumoración ulcerada e infiltrante constituida por masas de células tumorales pleomórficas con elementos fusiformes junto con células gigantes con alto pleomorfismo nuclear y bajo índice mitótico. Amplias áreas de necrosis y degeneración mixoide. Inmunohistoquímicamente se aprecia reactividad únicamente frente a vimentina. Marcadores musculares y neurales negativos.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo mixoide grado II

**21.- FHM 2853-Nu 213**

C.L.C.	17.12.1995	Nalga derecha	H-274715
--------	------------	---------------	----------

*Neoformación sólida, no encapsulada, con hialinización central y focos de necrosis. Esta constituida por células predominantemente fusiformes, con marcado pleomorfismo nuclear. En las zonas más periféricas del tumor se observan numerosas células multinucleadas gigantes entremezcladas con el resto. Se cuentan más de 30 mitosis por 10 campos de gran aumento. El estudio inmunohistoquímico revela positividad para vimentina, focal frente a la actina y factor XIII. Es negativa frente a desmina y S-100.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo gigantocelular grado III

**22.- FHM 2091**

I.S.M.	12.5.1993	Pared abdominal	H-239454
--------	-----------	-----------------	----------

*Neoformación de carácter heterogéneo constituida por proporciones variables de células fibroblásticas fusiformes, histiocitarias y aisladas células multinucleadas gigantes. Dicha tumoración de localización subdérmica se dispone en un patrón estoriforme, fascicular ó pleomórfico con áreas de aspecto mixoide infiltrando dermis y tejido celular subcutáneo. Muestra una media de 8 mitosis por 10 campos de gran aumento. No se observa necrosis. Inmunohistoquímicamente es positiva frente a  $\alpha_1$ -antitripsina y focal frente a vimentina. Desmina, actina y S-100 son negativas.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado II

**23.- FHM 3020**

E.S.G.	29.1.1996	dorso del pie	H-B5596
--------	-----------	---------------	---------

*Formación tumoral constituida por celularidad fusocelular e histiocitaria con aislada multinucleación. Existe importante atipia celular, elevado índice divisional y extenso componente necrótico.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico III

**24.- FHM 277**

J.M.	NC	NC	H-87504
------	----	----	---------

*Proliferación neoplásica de carácter pleomórfico constituida por elementos celulares fusiformes, histiocitarios y gigantocelulares multinucleados. Existe moderado pleomorfismo e índice divisional.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico II

**25.- FHM 1615**

J.C.F.	28.5.1991	tronco	H-212743
--------	-----------	--------	----------

*Tumoración constituida por elementos mesenquimales atípicos de estirpe fibrohistiocitaria y carácter pleomórfico. El estudio histológico e inmunohistoquímico confirman la positividad de las células tumorales frente a los antígenos de filamentos intermedios tipo vimentina,  $\alpha_1$ -antitripsina y  $\alpha_1$ -quimiotripsina. Sin embargo son negativos frente a la proteína S-100.*

Recidiva por Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III

**26.- FHM 1943**

F.D.	NC	NC	NC
------	----	----	----

*Tumoración maligna constituida por celularidad fusiforme y distribución en bandas y redes entrelazadas. El componente pleomórfico muestra formas gigantocelulares y multinucleación frecuentes. El índice divisional es alto y existen amplias áreas necróticas.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III

**27.- FHM 2435**

R.B.A.	7.9.94	Glúteo	H-FM20154
--------	--------	--------	-----------

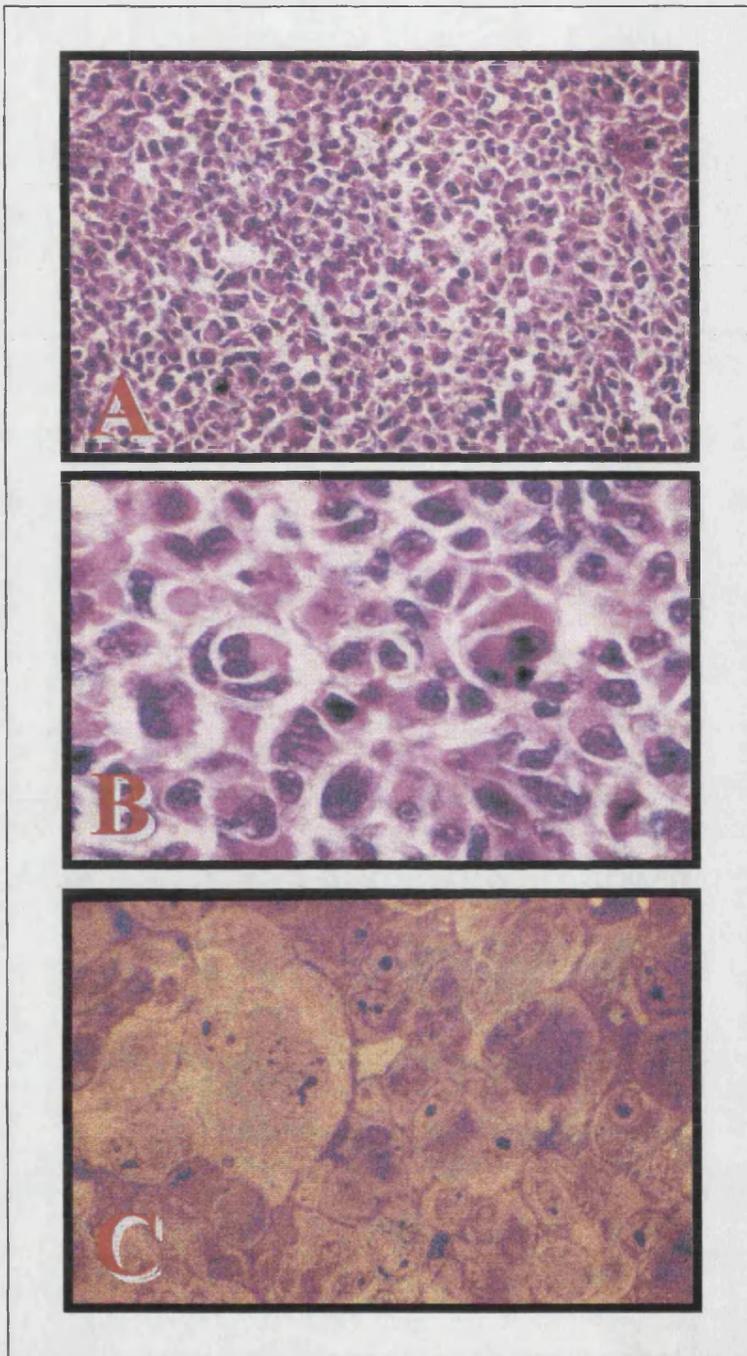
*Tumor muy pleomórfico en el que alternan áreas fibroblásticas con áreas histiocitarias, áreas angiomatosas vasculares y zonas más indiferenciadas. Existe un intenso pleomorfismo celular y una alta actividad divisional. El estudio inmunohistoquímico descubre una fuerte positividad de las células tumorales frente a vimentina y  $\alpha_1$ -antitripsina. También hay una positividad importante, tanto de los elementos mesenquimatosos como de las células más pleomórficas frente al CD68. Tanto la desmina como la actina aparecen positivas con carácter ocasional.*

Fibrohistiocitoma maligno de tipo pleomórfico grado III

**TABLA 1.1: RESUMEN DE LOS DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS**

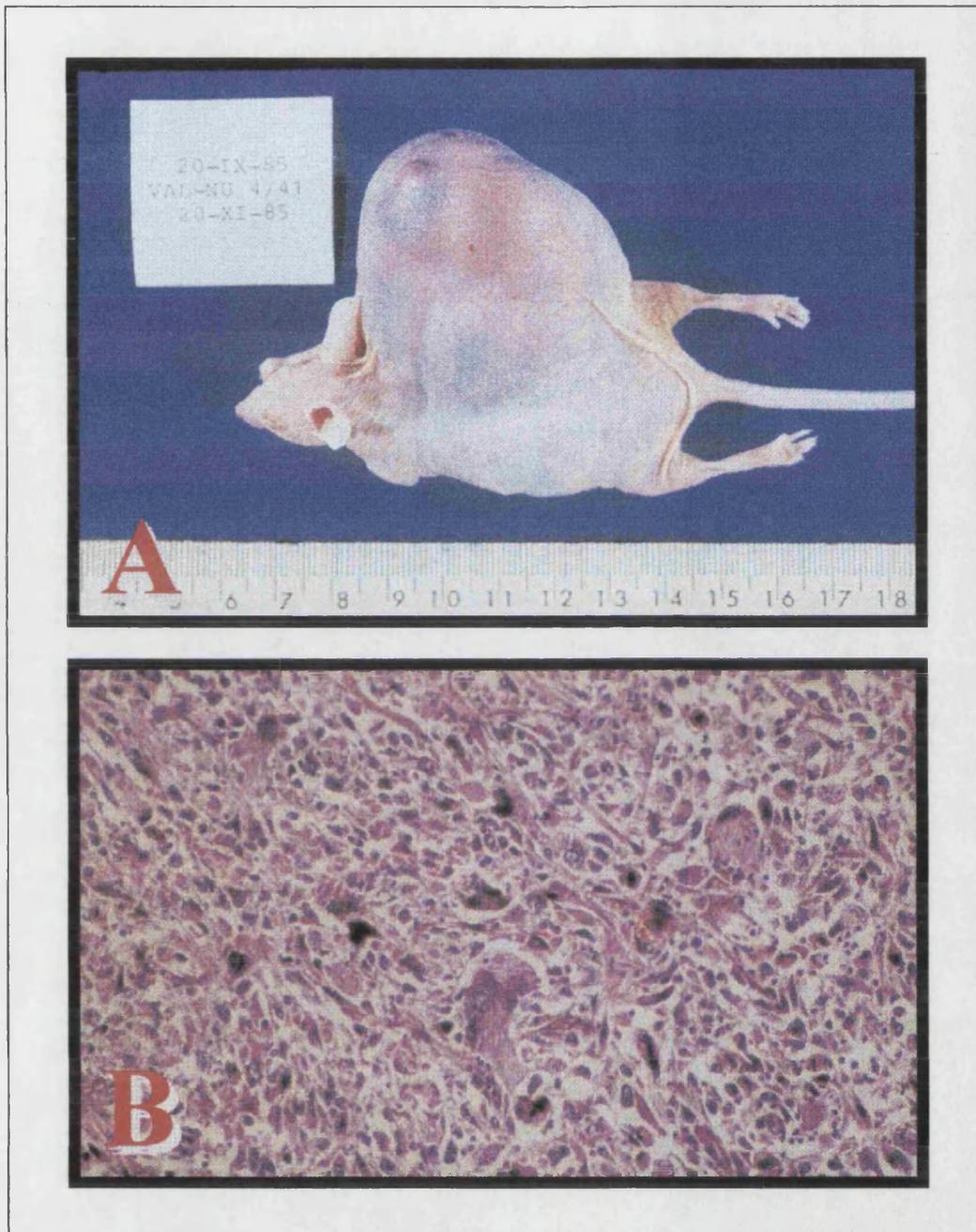
DIAGNÓSTICO	GRADO	Nº CASOS	%
FHM tipo pleomórfico	III	13	48.15 %
	II	9	33.33 %
	I	1	3.7%
FHM tipo mixoide	II	1	3.7 %
	I	1	3.7 %
FHM tipo gigantocelular	III	1	3.7 %
FHM tipo inflamatorio	II	1	3.7 %

## HISTOLOGÍA



**FIGURAS A, B y C:** Nu 55. La neoplasia original así como los sucesivos tumores xenotransplantados muestra una población de células polimorfas de gran tamaño y frecuente multinucleación, que alternan con otros elementos mononucleados de menor tamaño y aspecto poligonal, siendo escasas las células fusiformes. A: 400X; B: 1000X; C: 1600X.

## HISTOLOGÍA



**FIGURA A:** Nu 4. Imagen macroscópica del ratón *nude* portador del xenotransplante Nu-4, pase 5.

**FIGURA B:** Nu 4. El tumor xenotransplantado presenta características histológicas similares al tumor original: combinación de áreas sólidas con áreas más laxas de estroma mixoide. La celularidad tumoral, como vemos en la imagen, muestra importante pleomorfismo, numerosas imágenes mitóticas y elementos gigantes multinucleados.

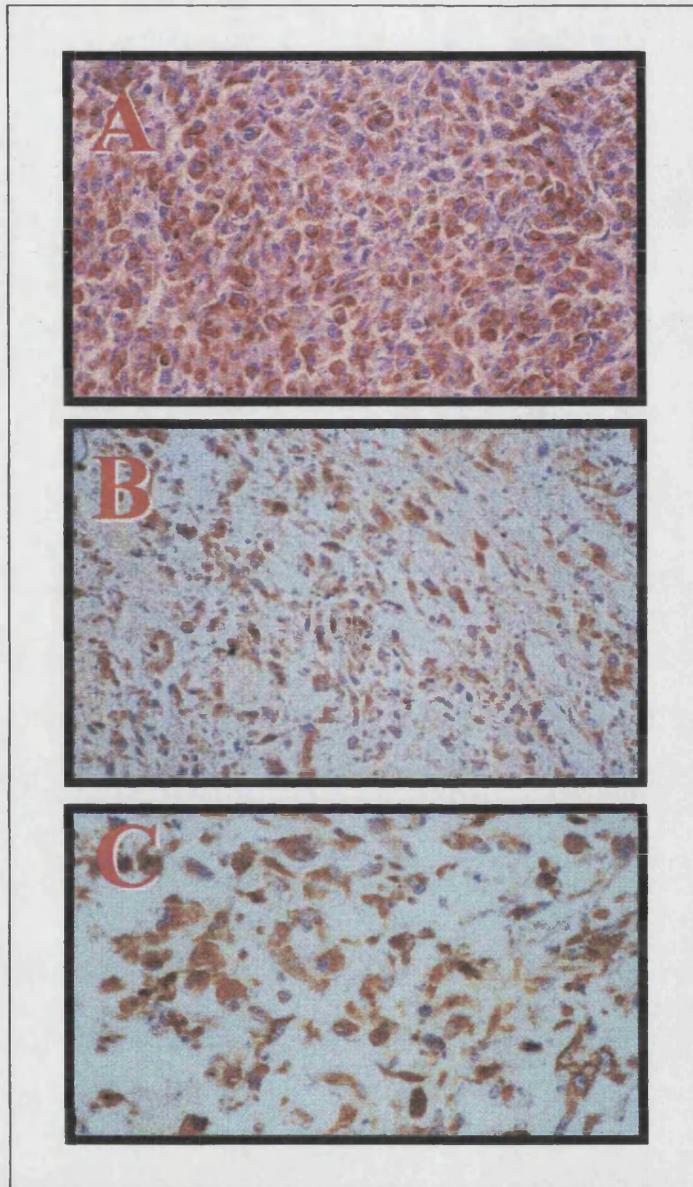
## 2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Se realizó un estudio inmunohistoquímico estandarizado para tipificar fenotípicamente cada uno de los FHM. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

TUMOR	VIM	AT	QT	CD68	ACT	DES	S100	HNK	EMA	NSE	C5.2	CK	UL	CD31	F VIII	F XIII
Nu 4	X		X			X										
179 (Nu 20)	X	X	X		○	○	○	○	○			○	○			
176 (Nu 55)	X	X	X			X	○									
184 (Nu 64)	X	○	○		○	○		○		○						
571 (Nu 80)	X	X				X			○							
1047 (Nu 105)	X					○	○	○	○	○		○				
1557 (Nu 125)	X	X	X			○	○									
1569 (Nu 127)	X	X	X			○										
1755 (Nu 145)	X	X	X			○	○	○								
2407 (Nu 179)	○				○	○	○						X	○	○	
2479 (Nu 182)	X			X	○	○	○									
2660 (Nu 196)	X					Xf	○	○		○	○	○				
2726 (Nu 206)	X			○	○	Xf	○									
2736 (Nu 207)	X			X	Xf	○	○		○			○				
2802 (Nu 209)	X				○	○	Xf									
2853 (Nu 213)	X	X			X	○	○									Xf
1615	X	X	X				X									
2435	X	X	X	X	X	X										

→Abreviaturas: **VIM**: vimentina; **AT**:  $\alpha_1$ -antitripsina; **QT**:  $\alpha_1$ quimiotripsina; **ACT**: actina; **DES**: desmina; **S-100**: proteína S-100; **EMA**: antígeno epitelial de membrana; **NSE**: enolasa neuronal específica; **C5.2**: CAM-5.2 (citoqueratina de bajo peso molecular); **CK**: citoqueratinas 8, 18, 19; **UL**: ulex europaeus; **Xf**: positividad focal; **X**: inmunopositividad; **○**: inmunonegatividad.

## INMUNOHISTOQUÍMICA



**FIGURA A:** Nu 55. Intensa inmunoposividad en la mayoría de las células tumorales frente a Vimentina. 250X

**FIGURA B:** Nu 4. Intensa positividad de la celularidad tumoral frente a  $\alpha_1$ -quimiotripsina. 250X

**FIGURA C:** Nu 4. Intensa positividad de la celularidad tumoral frente a  $\alpha_1$ -quimiotripsina. 400X

### 3.- ESTUDIO DEL GEN P53

En la tabla siguiente y en las figuras posteriores se muestran los resultados de las técnicas PCR y SSCP detalladas por tumores. En dos tumores se observaron bandas de movilidad anómala mediante SSCP en el exón cinco y en otros dos tumores se observaron dichas bandas en el exón seis. Los correspondientes xenotransplantes de los tumores primarios presentaron los mismos resultados.

**TABLA 3.1:** resultados del estudio del gen p53 mediante PCR-SSCP

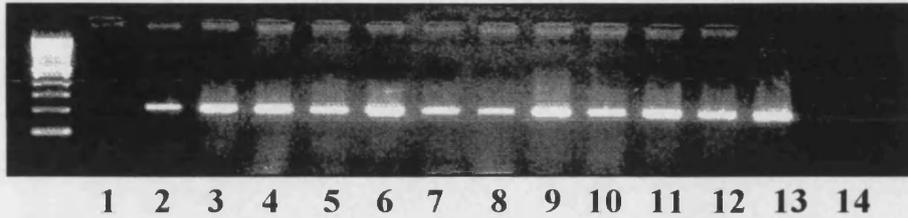
	TUMOR	EXÓN 5	EXÓN 6	EXÓN 7	EXÓN 8	EXÓN 9	P53 total
1	Nu 4	N	N	N	N	N	N
2	FHM 179	N	N	N	N	N	N
3	FHM 176	N	MUT	N	N	N	E 6
	Nu 55	N	MUT	N	N	N	E 6
4	FHM 184	N	N	N	N	N	N
	Nu 64	N	N	N	N	N	N
5	FHM 277	N	N	N	N	N	N
6	FHM 571	MUT	N	N	N	N	E 5
	Nu 80	MUT	N	N	N	N	E 5
7	FHM 711	N	N	N	N	N	N
8	FHM 857	N	N	N	N	N	N
9	FHM 1047	N	N	N	N	N	N
	FHM 1782	N	N	N	N	N	N
10	FHM 1116	N	MUT	N	N	N	E 6
11	FHM 1557	N	N	N	N	N	N
12	FHM 1569	N	N	N	N	N	N
	Nu 127	N	N	N	N	N	N
13	FHM 1615	N	N	N	N	N	N
14	FHM 1666	N	N	N	N	N	N
15	FHM 1755	N	N	N	N	N	N
16	FHM 1943	N	N	N	N	N	N
17	FHM 2091	N	N	N	NEG	N	N
18	FHM 2298	N	N	N	N	N	N
19	FHM 2407	N	N	N	N	N	N
20	FHM 2435	MUT	N	N	N	N	E 5
21	FHM 2479	N	N	N	N	N	N
22	FHM 2660	N	N	N	N	N	N
	Nu 196	N	N	N	N	N	N
23	FHM 2726	N	N	N	N	N	N
24	FHM 2736	N	N	N	N	N	N
	Nu 207	N	N	N	N	N	N
25	FHM 2802	N	N	N	N	N	N
	FHM 3066	N	N	N	N	N	N
26	FHM 2853	N	N	N	N	N	N
	Nu 213	N	N	N	NEG	N	N
27	FHM 3020	N	N	N	N	N	N

→ Abreviaturas: N: normal; MUT: mutación; NEG: negativo; E: exón

Figura 3.1

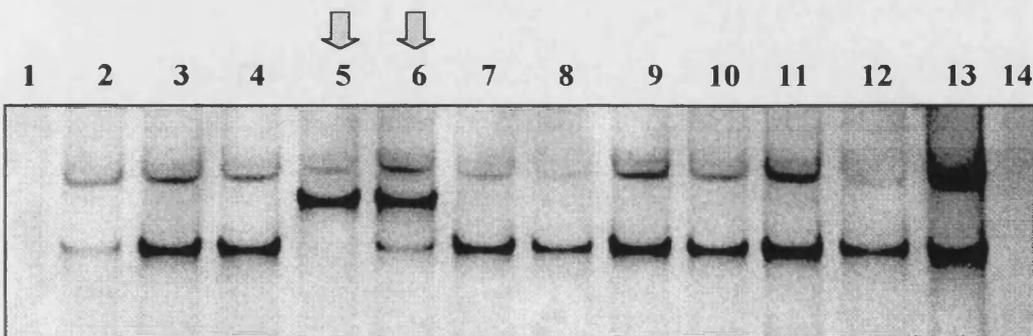
**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 5**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	Nu 55	-	Negativo*
2	FHM 176	+	normal
3	Nu 207	+	normal
4	FHM 2736	+	normal
5	<b>Nu 80</b>	+	<b>alterado</b>
6	<b>FHM 571</b>	++	<b>alterado</b>
7	FHM 2802	+	normal
8	FHM 3066	+	normal
9	FHM 1943	++	normal
10	FHM 2298	+	normal
11	FHM 184	+	normal
12	FHM 857	+	normal
13	Riñón humano	++	normal
14	Control negativo	-	negativo

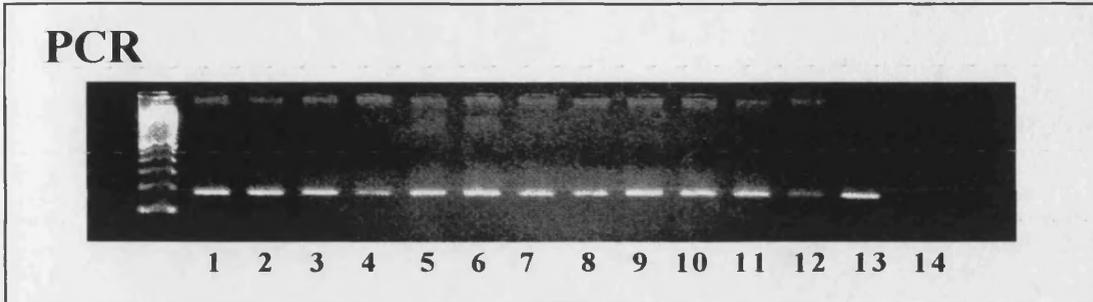
**SSCP**



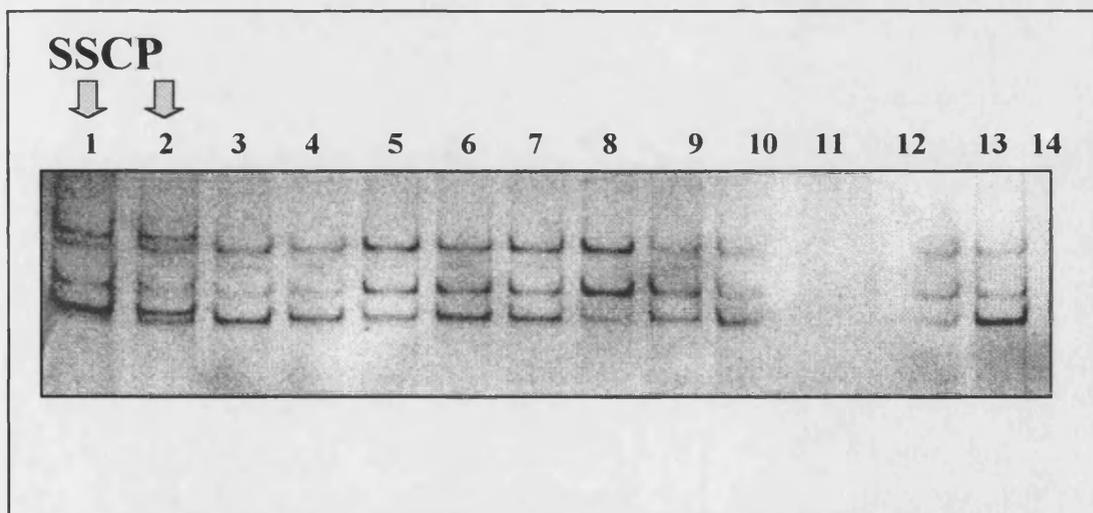
\* El caso Nu 55 se repite posteriormente con resultado normal.

Figura 3.2

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 6**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	Nu 55	+	alterado
2	FHM 176	+	alterado
3	Nu 207	+	normal
4	FHM 2736	+	normal
5	Nu 80	+	normal
6	FHM 571	+	normal
7	FHM 2802	+	normal
8	FHM 3066	+	normal
9	FHM 1943	+	normal
10	FHM 2298	+	normal
11	FHM 184	+	Negativo*
12	FHM 857	-/+	normal
13	Riñón humano	+	normal
14	Control negativo	-	negativo

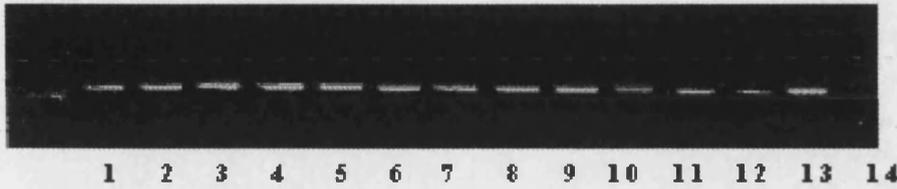


\* El caso FHM 184 se repite posteriormente con resultado normal (Ver Figura: 1.12)

Figura 3.3

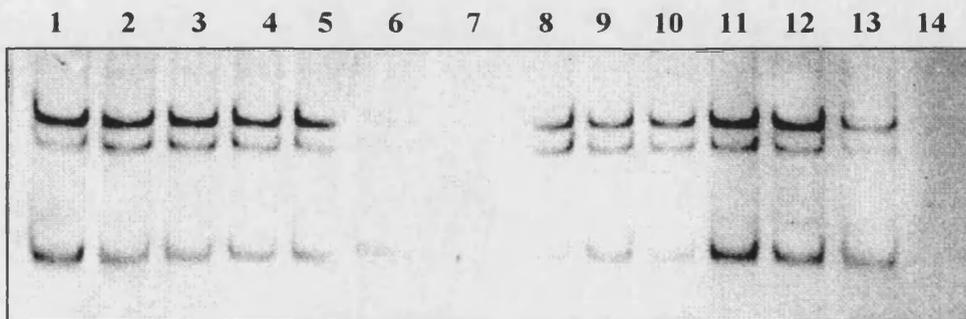
**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 7**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	Nu 55	-	normal
2	FHM 176	+	normal
3	Nu 207	+	normal
4	FHM 2736	+	normal
5	Nu 80	+	normal
6	FHM 571	++	normal
7	FHM 2802	+	Negativo*
8	FHM 3066	+	normal
9	FHM 1943	++	normal
10	FHM 2298	-/+	normal
11	FHM 184	+	normal
12	FHM 857	+	normal
13	Riñón humano	++	normal
14	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

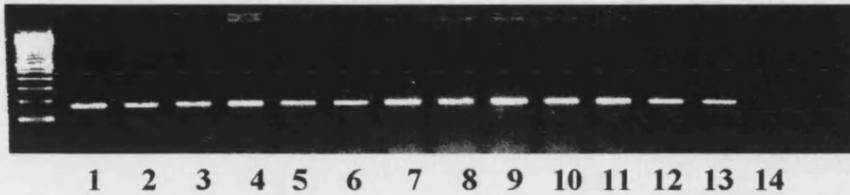


\* El caso FHM 2802 se repite posteriormente con resultado normal (Ver Figura: 1.14)

Figura 3.4

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 8**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	Nu 55	+	normal
2	FHM 176	+	normal
3	Nu 207	+	normal
4	FHM 2736	+	normal
5	Nu 80	+	normal
6	FHM 571	+	normal
7	FHM 2802	+	normal
8	FHM 3066	+	normal
9	FHM 1943	+	normal
10	FHM 2298	+	normal
11	FHM 184	+	normal
12	FHM 857	+	normal
13	Riñón humano	+	normal
14	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

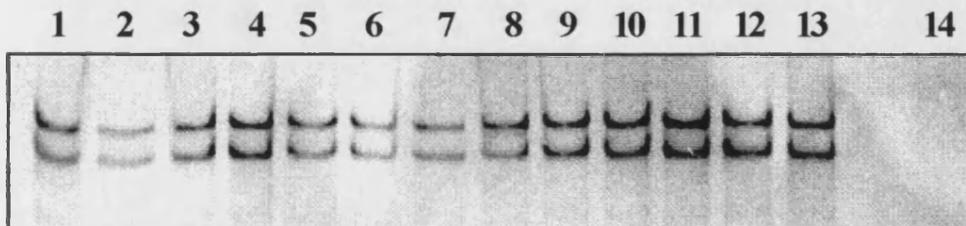


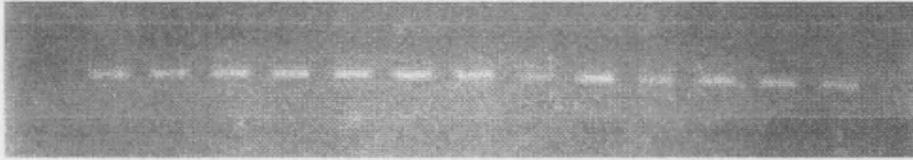
Figura 3.5

**PCR-SSCP**

**Estudio del gen P53**

**Exón 9**

**PCR**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	Nu 55	+	normal
2	FHM 176	+	normal
3	Nu 207	+	normal
4	FHM 2736	+	normal
5	Nu 80	+	normal
6	FHM 571	+	normal
7	FHM 2802	+	normal
8	FHM 3066	+	normal
9	FHM 1943	+	normal
10	FHM 2298	+	normal
11	FHM 184	+	normal
12	FHM 857	+	normal
13	Riñón humano	+	normal
14	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

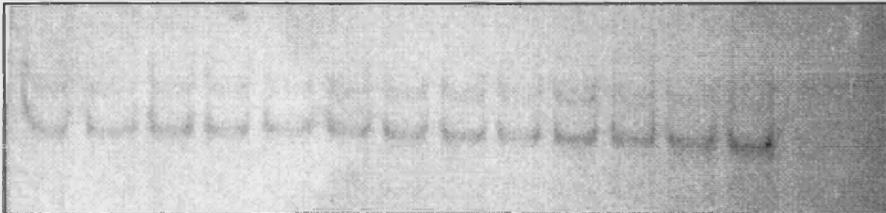
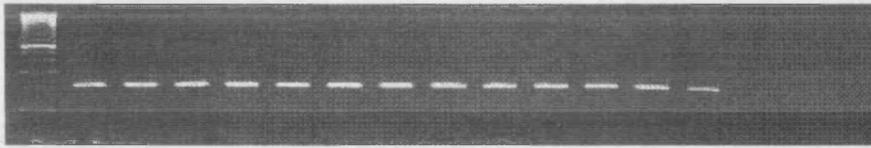


Figura 3.6

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 5**

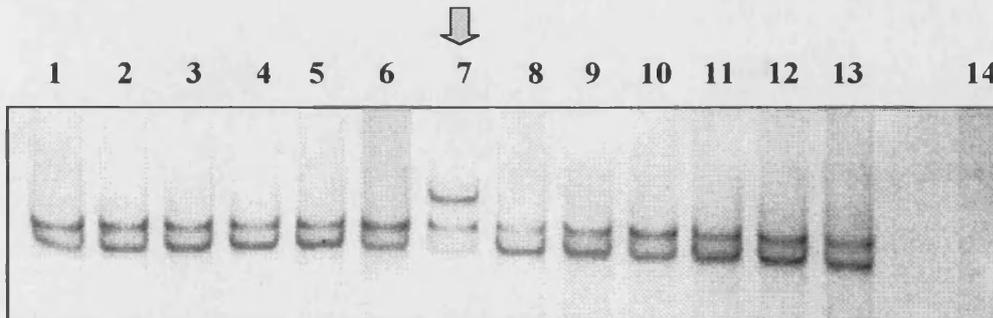
**PCR**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	FHM 1615	+	normal
2	FHM 1666	+	normal
3	FHM 1755	+	normal
4	FHM 1782	+	normal
5	FHM 2091	+	normal
6	FHM 2407	+	normal
7	FHM 2435	+	alterado
8	FHM 2479	+	normal
9	FHM 2660	+	normal
10	FHM 2726	+	normal
11	FHM 2853	+	normal
12	FHM 3020	+	normal
13	Riñón humano	+	normal
14	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

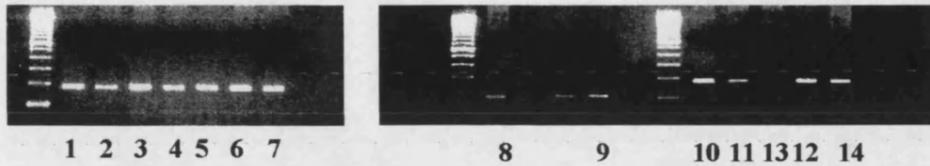


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Figura 3.7

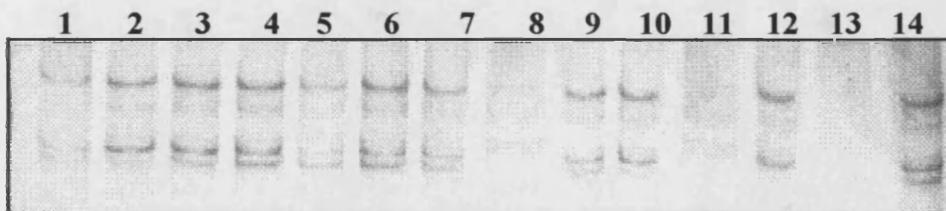
**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 6**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	Nu 213	+	normal
2	Nu 127	+	normal
3	FHM 1569	+	normal
4	FHM 1615	+	normal
5	FHM 1666	+	normal
6	FHM 1782	+	normal
7	FHM 2091	+	normal
8	FHM 2407	+	normal
9	FHM 2435	+	normal
10	FHM 2479	+	normal
11	FHM 2660	+	normal
12	FHM 2726	+	normal
13	FHM 2853	-	Negativo*
14	FHM 3020	+	normal

**SSCP**

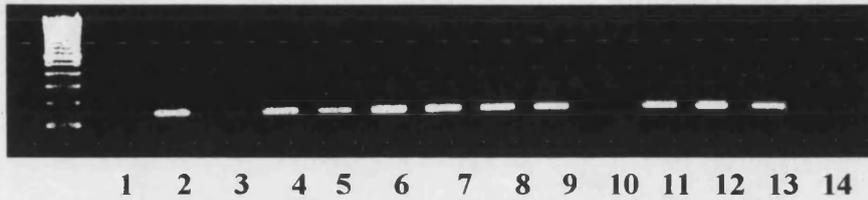


\* El caso FHM 2853 se repite posteriormente con resultado normal.

Figura 3.8

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 7**

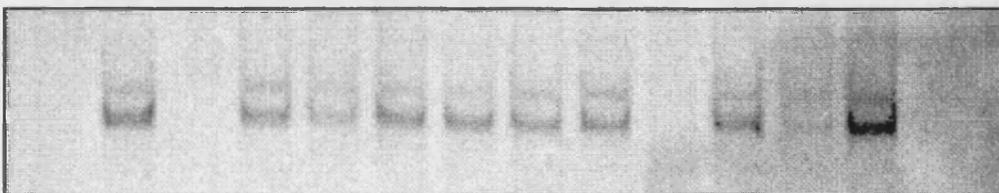
**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	FHM 1615	-	Negativo*
2	FHM 1666	+	normal
3	FHM 1755	-	Negativo*
4	FHM 1782	+	normal
5	FHM 2091	+	normal
6	FHM 2407	+	normal
7	FHM 2435	+	normal
8	FHM 2479	+	normal
9	FHM 2660	+	normal
10	FHM 2726	-	Negativo*
11	FHM 2853	+	normal
12	FHM 3020	+/-	normal
13	Riñón humano	+	normal
14	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

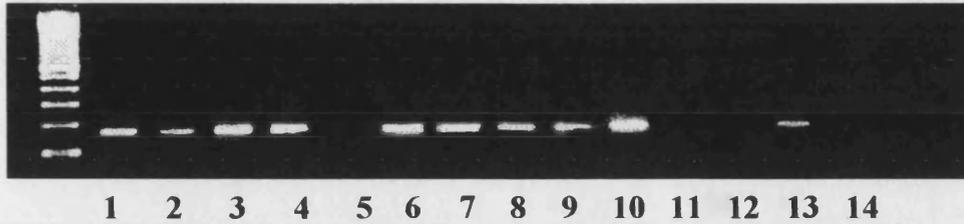


\* Los casos FHM 1615, FHM 1755 y FHM 2726 se repiten posteriormente con resultado normal (Ver Figura: 1.13).

Figura 3.9

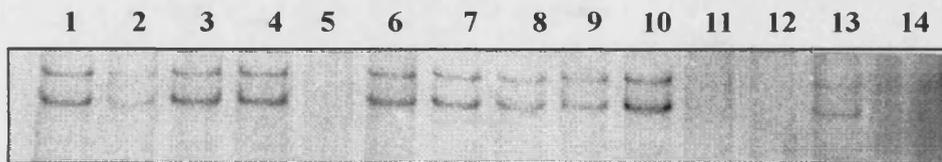
**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 8**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	FHM 1615	+	normal
2	FHM 1666	+	normal
3	FHM 1755	+	normal
4	FHM 1782	+	normal
5	FHM 2091	-	Negativo <sup>†</sup>
6	FHM 2407	+	normal
7	FHM 2435	+	normal
8	FHM 2479	+	normal
9	FHM 2660	+	normal
10	FHM 2726	+	normal
11	FHM 2853	-	Negativo*
12	Control negativo	-	negativo
13	Riñón humano	+	normal
14	FHM 3020	-	Negativo*

**SSCP**

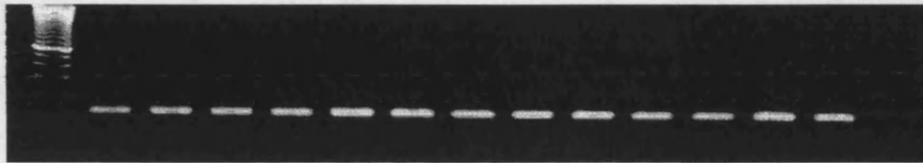


\* Los casos FHM 2853 y FHM 3020 se repiten posteriormente con resultado normal (Ver Figura 1.16). † El FHM 2091 se repite con posterioridad con resultado negativo (Ver figura 1.16).

Figura 3.10

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 9**

**PCR**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	FHM 1615	+	normal
2	FHM 1666	+	normal
3	FHM 1755	+	normal
4	FHM 1782	+	normal
5	FHM 2091	+	normal
6	FHM 2407	+	normal
7	FHM 2435	+	normal
8	FHM 2479	+	normal
9	FHM 2660	+	normal
10	FHM 2726	+	normal
11	FHM 2853	+	normal
12	FHM 3020	+	normal
13	Riñón humano	+	normal
14	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

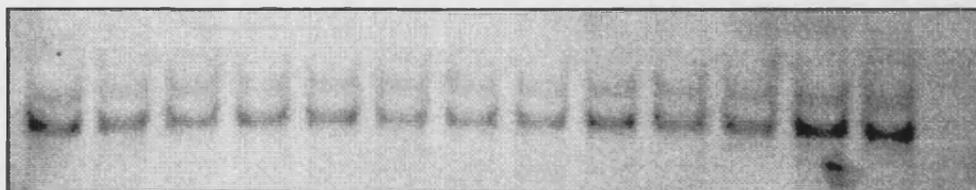
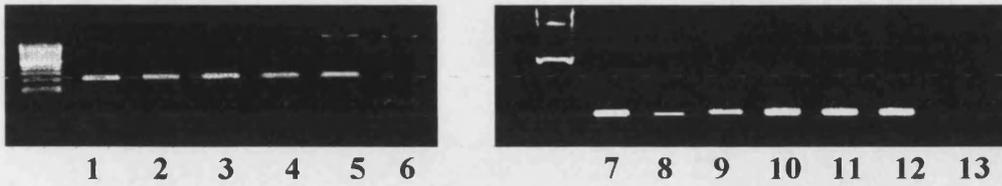


Figura 3.11

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 5**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	FHM 277	+	normal
2	Nu 4	+	normal
3	Nu 196	+	normal
4	FHM 444	+	normal
5	FHM 711	+	normal
6	Control negativo	-	negativo
7	Nu 64	+	normal
8	FHM 2	+	normal
9	FHM 179	+	normal
10	FHM 1047	+	normal
11	FHM 1116	+	normal
12	Riñón humano	+	normal
13	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

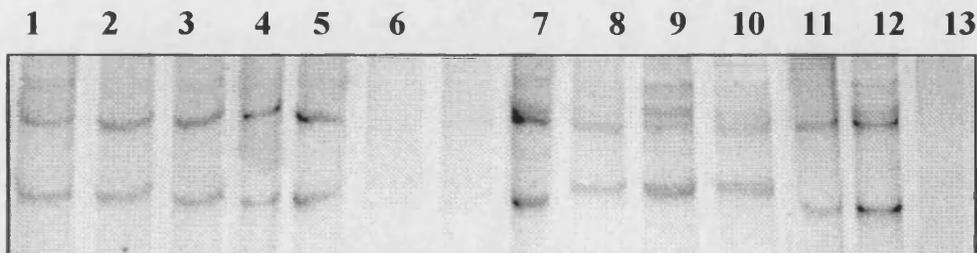
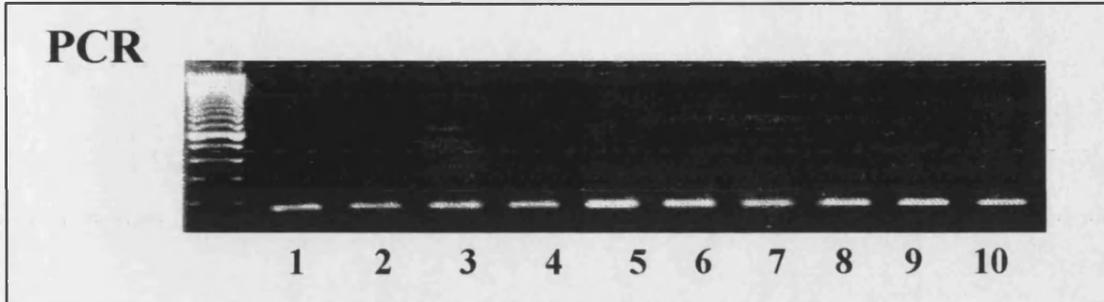


Figura 3.12

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 6**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	FHM 277	+	normal
2	Nu 4	+	normal
3	Nu 196	+	normal
4	FHM 184	+	normal
5	FHM 711	+	normal
6	FHM 1557	+	normal
7	Nu 64	+	normal
8	FHM 2	+	normal
9	FHM 179	+	normal
10	FHM 1047	+	normal
11	<b>FHM 1116</b>	+	<b>alterado</b>
12	Control negativo	-	negativo
13	Riñón humano	-	normal

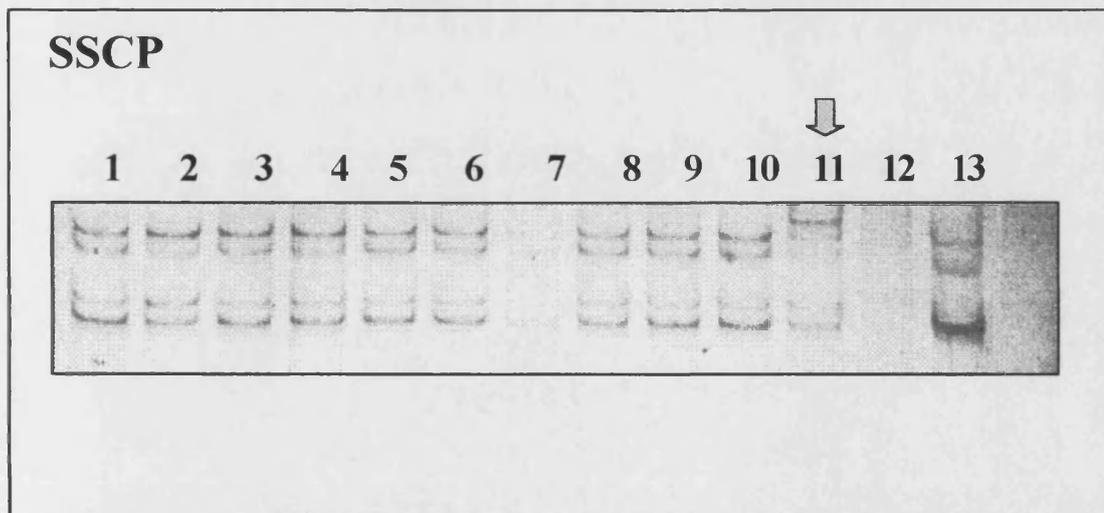
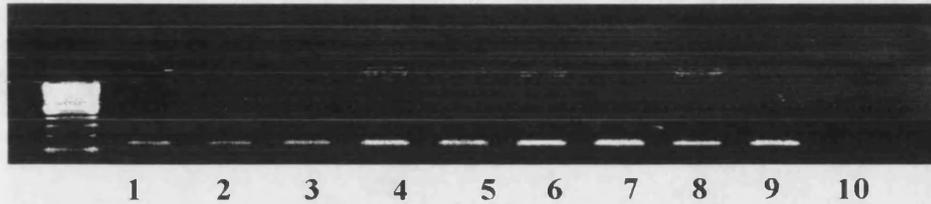


Figura 3.13

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 7**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
1	marker 100 pb		
2	Nu 64	+	normal
3	FHM 2	+	normal
4	FHM 179	+	normal
5	FHM 1047	+	normal
6	FHM 1116	+	normal
7	FHM 1615	+	normal
8	FHM 1755	+	normal
9	FHM 2726	+	normal
10	Riñón humano	+	normal
	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

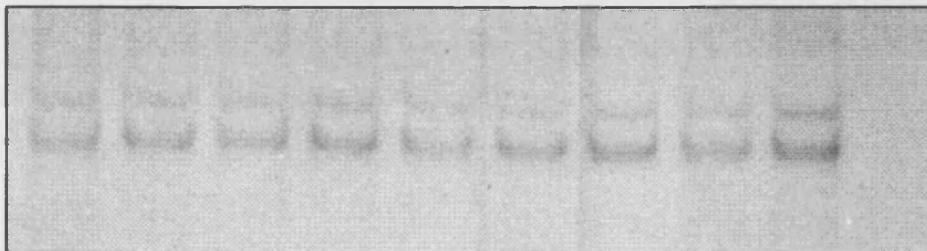
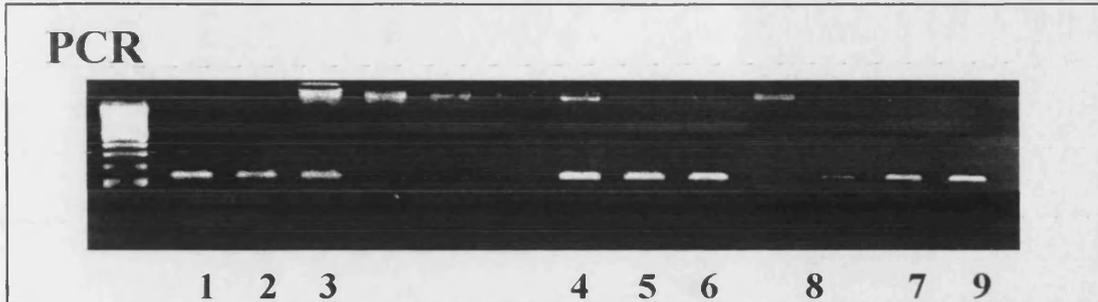


Figura 3.14

**PCR-SSCP**

**Estudio del gen P53**

**Exón 7**



	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	FHM 277	+	normal
2	Nu 4	+	normal
3	Nu 196	+	normal
4	FHM 444	+	normal
5	FHM 711	+	normal
6	FHM 1557	+	normal
7	Riñón humano	+	normal
8	Control negativo	-	negativo
9	FHM 2802	++	normal

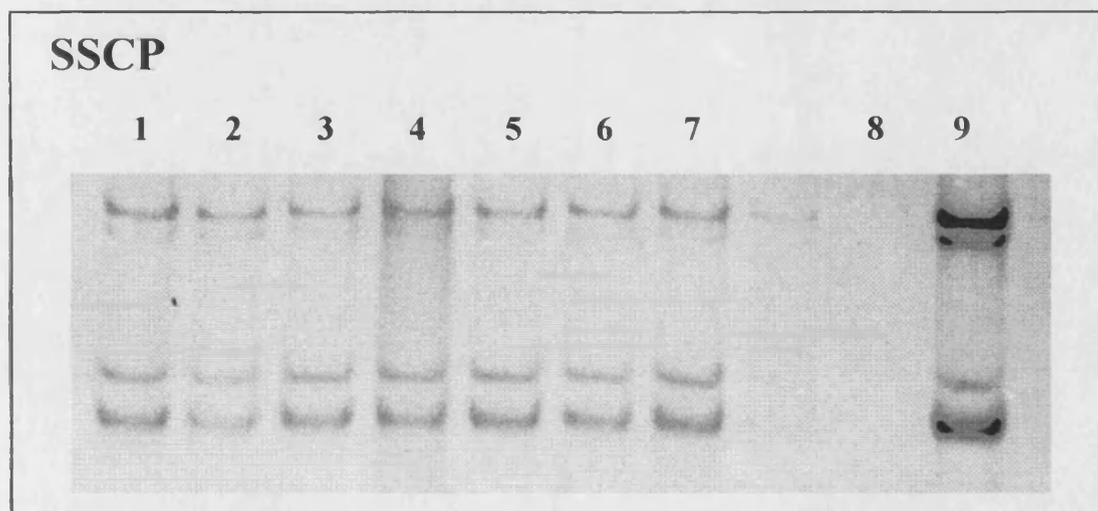
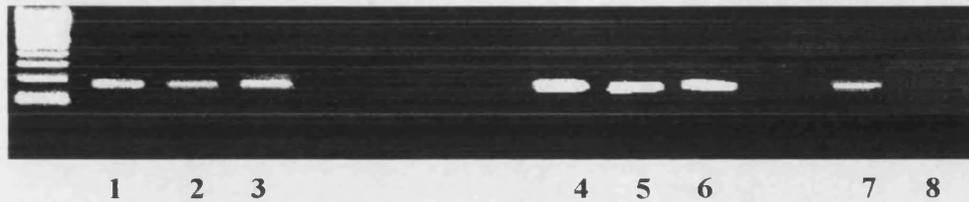


Figura 3.15

**PCR-SSCP Estudio del gen P53 Exón 8**

**PCR**



	Muestra	PCR	SSCP
1	marker 100 pb		
2	FHM 277	+	normal
3	Nu 4	+	normal
4	Nu 196	++	normal
5	FHM 444	++	normal
6	FHM 711	++	normal
7	FHM 1557	+	normal
8	Riñón humano	+	normal
	Control negativo	-	negativo

**SSCP**

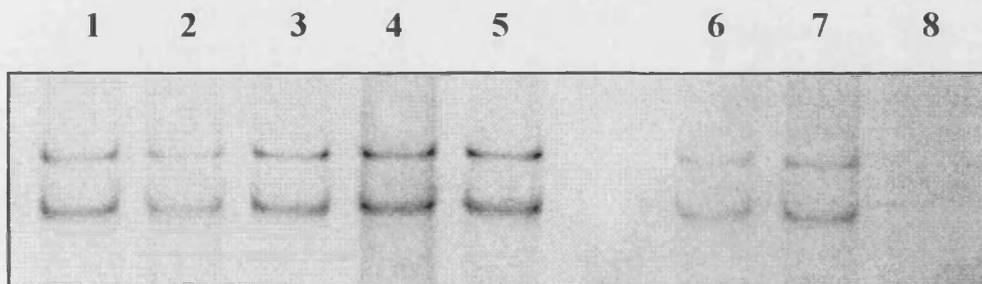
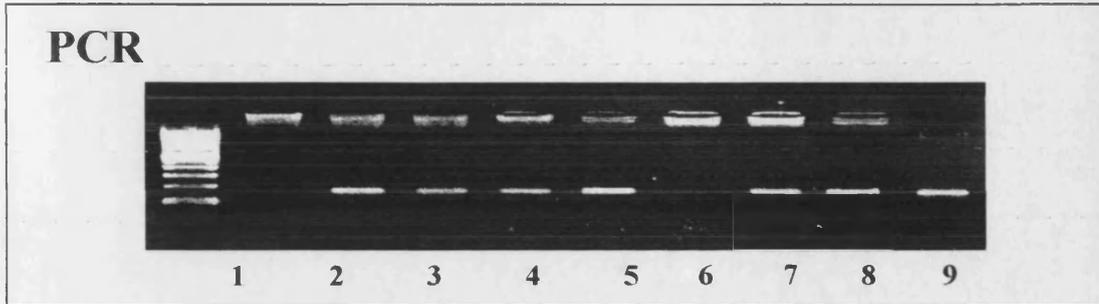


Figura 3.16

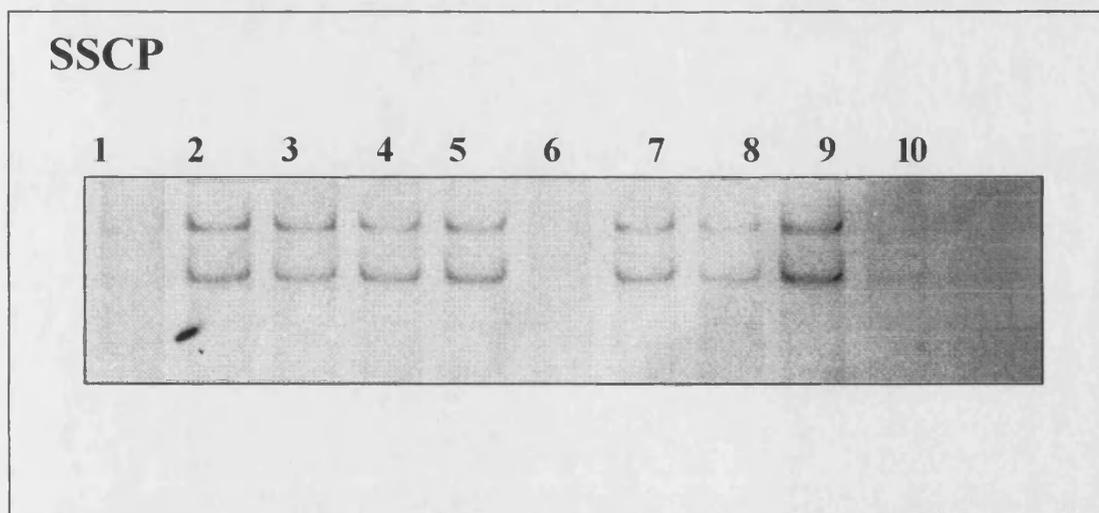
**PCR-SSCP**

**Estudio del gen P53**

**Exón 8**



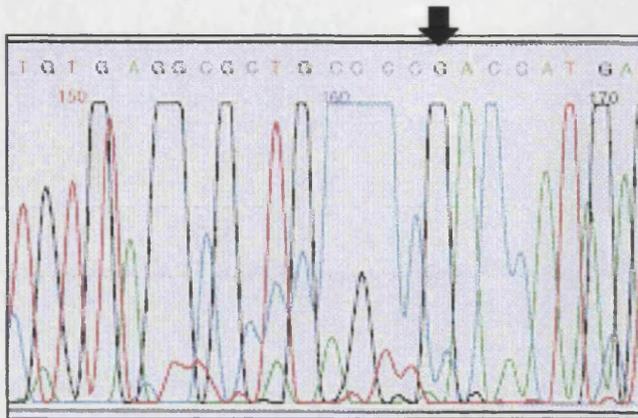
	Muestra	PCR	SSCP
	marker 100 pb		
1	Nu 64	-	negativo
2	FHM 2	+	normal
3	FHM 179	+	normal
4	FHM 1047	+	normal
5	FHM 1116	+	normal
6	FHM 2091	-	negativo
7	FHM 2853	+	normal
8	FHM 3020	+	normal
9	Riñón humano	+	normal
10	Control negativo	-	negativo





**FIGURA 3.18**

**SECUENCIACIÓN R.C.S.:FHM 571 (Nu 80) PU 5 EXÓN 5**



Esquema de la secuenciación automática

Secuencia del exón 5 del gen TP53 del tumor FHM 571 contrastada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* mediante el programa **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Q: 33 AGGCGCTGCCCC**G**ACCATGAGCGCTGCTCAGA 2  
 |||||  
 S: 160 AGGCGCTGCCCC**C**ACCATGAGCGCTGCTCAGA 191

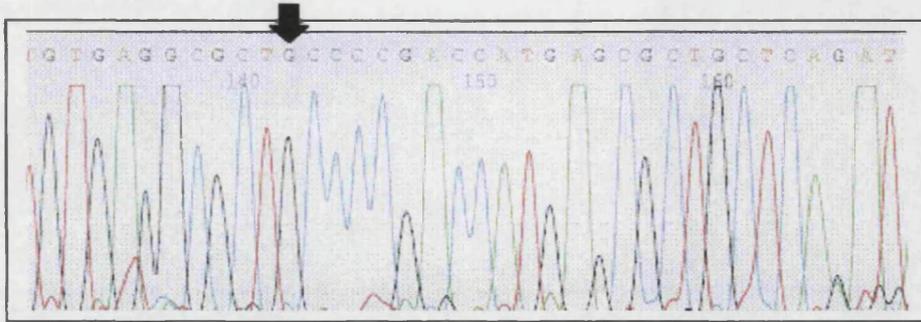
**gb|M22887|HUMP53A05 Human phosphoprotein p53 gene, exon 5.**  
 gb|I22235|I22235 Sequence 5 from patent US 5527676

(<http://query?form=6&dopt=g&db=n&vid=00189468> en [www3.ncbi.nlm.nih.gov](http://www3.ncbi.nlm.nih.gov))

175	176	177	178	179	180	181	
CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TP53 normal
CGC	TGC	CCC	<b>GAC</b>	CAT	GAG	CGC	TP53 mutada
Arg	Cys	Asp	Asp	Glu	Arg	Arg	proteína p53 normal
Arg	Cys	Asp	<b>His</b>	Glu	Arg	Arg	proteína p53 mutada

**FIGURA 3.19**

**SECUENCIACIÓN R.C.S.: NU 80 (FHM 571) PU 5 EXÓN 5**



Esquema de la secuenciación automática

Secuencia del exón 5 del gen TP53 del tumor Nu 80 contrastada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* mediante el programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*).

```

Q: 14  GTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCC 73
      |
S: 39  GTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCC 98

Q: 74  CGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGT 133
      |
S: 99  CGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGT 158

Q: 134 GAGGCGCTGCCCCGACCATGAGCGCTGCTCANATAGCGATGGTGAGCAGCTGGGG 188
      |
S: 159 GAGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTGAGCAGCTGGGG 213
    
```

gb|M22887|HUMP53A05 Human phosphoprotein p53 gene, exon 5.

gb|I22235|I22235 Sequence 5 from patent US 5527676

(<http://query?form=6&dopt=g&db=n&vid=00189468> en [www3.ncbi.nlm.nih.gov](http://www3.ncbi.nlm.nih.gov))

(<http://query?form=6&dopt=g&db=n&vid=00189468> en [www3.ncbi.nlm.nih.gov](http://www3.ncbi.nlm.nih.gov))

175	176	177	178	179	180	181	
CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TP53 normal
CGC	TGC	CCC	GAC	CAT	GAG	CGC	TP53 mutada
Arg	Cys	Asp	Asp	Glu	Arg	Arg	proteína p53 normal
Arg	Cys	Asp	His	Glu	Arg	Arg	proteína p53 mutada

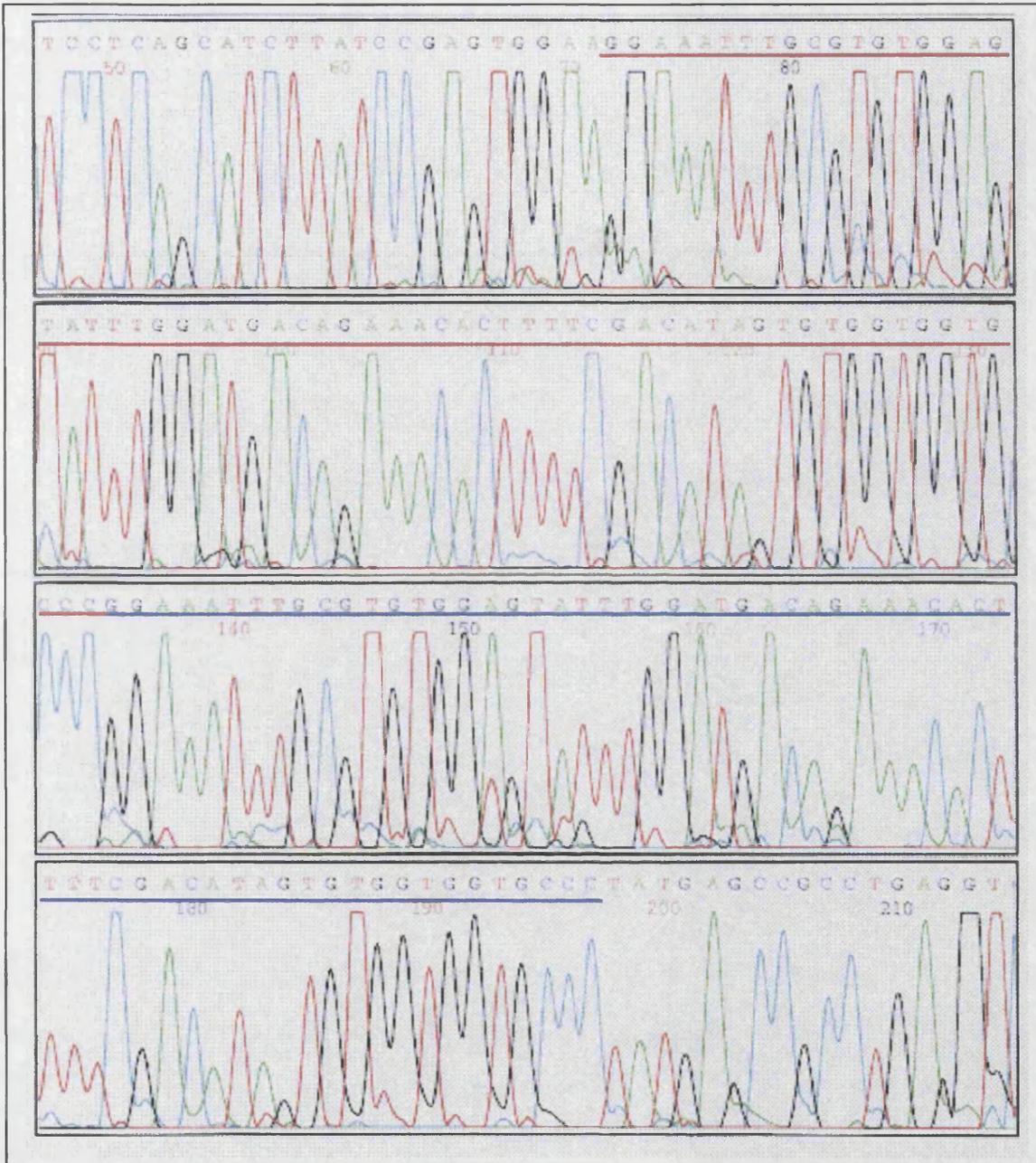
**FIGURA 3.20**

**SECUENCIACIÓN**

**B.M. : FHM 1116**

**PU 6**

**EXÓN 6**



Esquema de la secuenciación automática

<b>FRAGMENTO DUPLICADO :</b>	<span style="color: red;">—</span>	<b>72-134</b>
	<span style="color: blue;">—</span>	<b>135-197</b>



## 4.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA p53

Los resultados obtenidos con las técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot, el estudio comparativo entre ambas técnicas y su relación con las alteraciones detectadas en el gen P53 se detallan a continuación (*Tabla 4.1*→*Tabla 4.3*). Las imágenes de las diferentes técnicas, individualizadas por casos se muestran en las *Figuras 4.1*→*4.4*.

### • TABLA 4.1

#### INMUNOHISTOQUÍMICA: RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN FHM

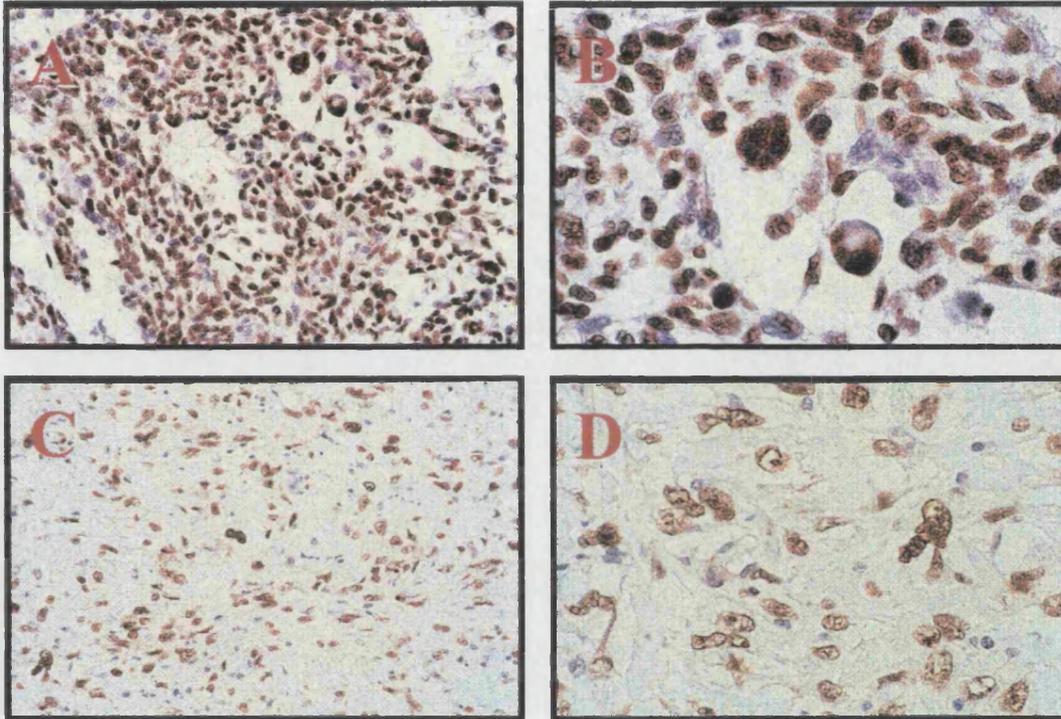
TUMOR	IR	TUMOR	IR
Nu 4	neg	<b>FHM 1666</b>	<b>int ++</b>
FHM 179	NM	FHM 1755	neg
FHM 176	neg	FHM 1943	NM
Nu 55	neg	FHM 2091	neg
<b>FHM 184</b>	<b>mod ++</b>	FHM 2298	neg
FHM 277	NM	FHM 2407	neg
Nu 64	<b>mod ++</b>	<b>FHM 2435</b>	<b>int +++</b>
<b>FHM 571</b>	<b>int +++</b>	FHM 2479	neg
Nu 80	<b>mod ++</b>	FHM 2660	neg
FHM 711	NM	Nu 196	neg
FHM 857	neg	FHM 2726	NM
FHM 1047	neg	FHM 2736	neg
<b>FHM 1782</b>	<b>mod ++</b>	Nu 207	neg
FHM 1116	neg	FHM 2802	neg
FHM 1557	neg	FHM 2853	neg
<b>FHM 1569</b>	<b>mod +++</b>	Nu 213	neg
<b>FHM 1615</b>	<b>int +++</b>	FHM 3020	neg
Nu 127	<b>mod +++</b>	<b>FHM 3066</b>	<b>mod +++</b>

→ Abreviaturas: IR: Inmunorreactividad; NM: no material, material escaso en la muestra; neg: inmunorreactividad negativa.

→ Cuantificación de la inmunopositividad:

•Porcentaje de celularidad positiva		•Intensidad de la inmunorreacción	
menos del 10%	negativa		leve
10-40%	+		moderada
40-70%	++		intensa
más del 70%	+++		

## DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA p53



---

**FIGURA A:** FHM 2435. Intensa inmunoposividad en la mayoría de las células tumorales (más del 70%, +++). 400X.

**FIGURA B:** FHM 2435. Intensa inmunoposividad en la mayoría de las células tumorales (más del 70%, +++). 1000X.

**FIGURA C:** FHM 184. Moderada inmunoposividad en la mayoría de las células tumorales (más del 70%, ++). 400X.

**FIGURA D:** FHM 184. Moderada inmunoposividad en la mayoría de las células tumorales (más del 70%, ++). 1000X.

---

## • TABLA 4.2

**WESTERN-BLOT - INMUNOHISTOQUÍMICA: RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN FHM**

TUMOR	WESTERN-BLOT		INMUNOHISTOQUÍMICA
	DO-7	1801	DO-7
Nu 4	NV	NV	NEGATIVA
FHM 179	NEGATIVA	-	NM
FHM 176	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
Nu 55	NV	NV	NEGATIVA
<b>FHM 184</b>	NEGATIVA	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>
<b>Nu 64</b>	NV	NV	<b>POSITIVA</b>
FHM 277	NEGATIVA	-	NM
<b>FHM 571</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
Nu 80	NV	NV	<b>POSITIVA</b>
<b>FHM 711</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	NM
FHM 857	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
<b>FHM 1047</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	NEGATIVA
<b>FHM 1782</b>	NEGATIVA	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>
FHM 1116	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
FHM 1557	NM	NM	NEGATIVA
<b>FHM 1569</b>	NM	NM	<b>POSITIVA</b>
<b>Nu 127</b>	NV	NV	<b>POSITIVA</b>
<b>FHM 1615</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
<b>FHM 1666</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 1755	NM	NM	NEGATIVA
<b>FHM 1943</b>	<b>POSITIVA</b>	-	NM
<b>FHM 2091</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	NEGATIVA
FHM 2298	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
FHM 2407	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
<b>FHM 2435</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 2479	NEGATIVA	-	NEGATIVA
FHM 2660	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
Nu 196	NV	NV	NEGATIVA
FHM 2726	NEGATIVA	-	NM
FHM 2736	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
Nu 207	NV	NV	NEGATIVA
FHM 2802	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
<b>FHM 3066</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 2853	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
Nu213	NV	NV	NEGATIVA
FHM 3020	NEGATIVA	-	NM
<b>TOTAL</b>	<b>9 (33.3%)</b>	<b>8 (29.6%)</b>	<b>8 (29.6%)</b>

NV: resultado no valorable; NM: no material, material escaso en la muestra

## Figura 4.1

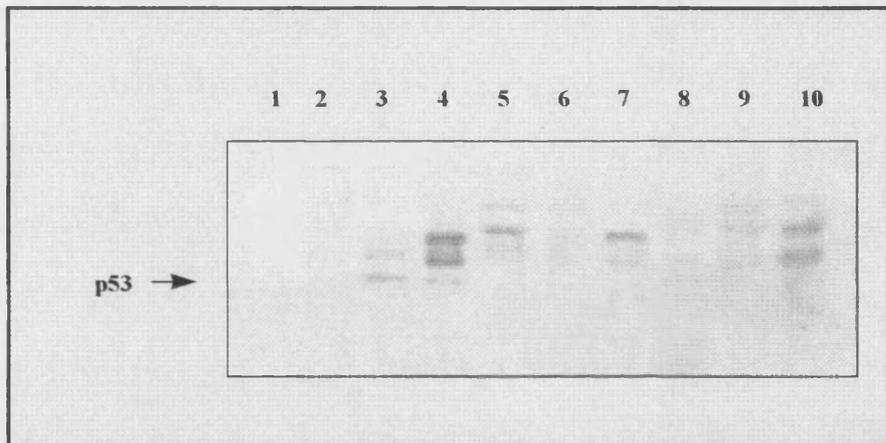
**WESTERN-BLOT**    Estudio de la expresión  
de la proteína p53                    Anticuerpo  
DO-7



	Muestra	Expresión de la proteína p53
1	marker	
2	FHM 184	NEGATIVA
3	<b>FHM 571</b>	<b>POSITIVA</b>
4	<b>FHM 1615</b>	<b>POSITIVA</b>
5	<b>FHM 1666</b>	<b>POSITIVA</b>
6	<b>FHM 2091</b>	<b>POSITIVA</b>
7	<b>FHM 2435</b>	<b>POSITIVA</b>
8	FHM 2802	NEGATIVA
9	FHM 2853	NEGATIVA
10	<b>FHM 3066</b>	<b>POSITIVA</b>

## Figura 4.2

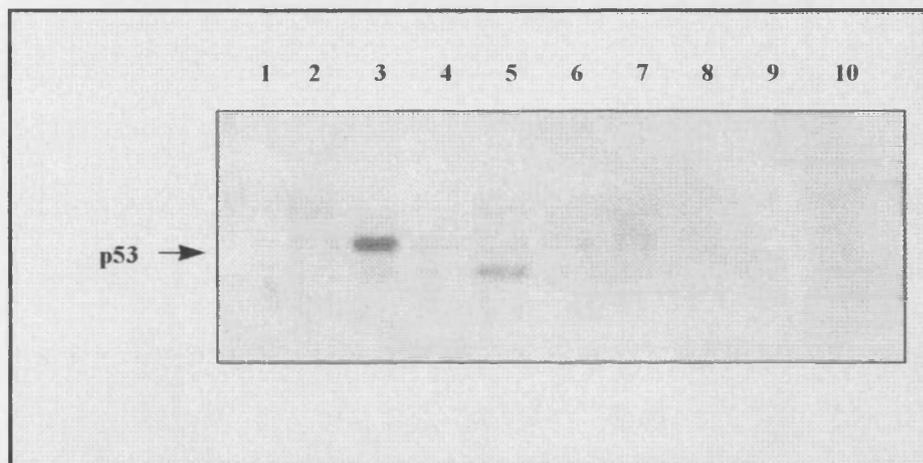
**WESTERN-BLOT**    Estudio de la expresión de la proteína p53    Anticuerpo 1801



	Muestra	Expresión de la proteína p53
1	marker	
2	FHM 184	NEGATIVA
3	<b>FHM 571</b>	<b>POSITIVA</b>
4	<b>FHM 1615</b>	<b>POSITIVA</b>
5	<b>FHM 1666</b>	<b>POSITIVA</b>
6	<b>FHM 2091</b>	NEGATIVA
7	<b>FHM 2435</b>	<b>POSITIVA</b>
8	FHM 2802	NEGATIVA
9	FHM 2853	NEGATIVA
10	<b>FHM 3066</b>	<b>POSITIVA</b>

## Figura 4.3

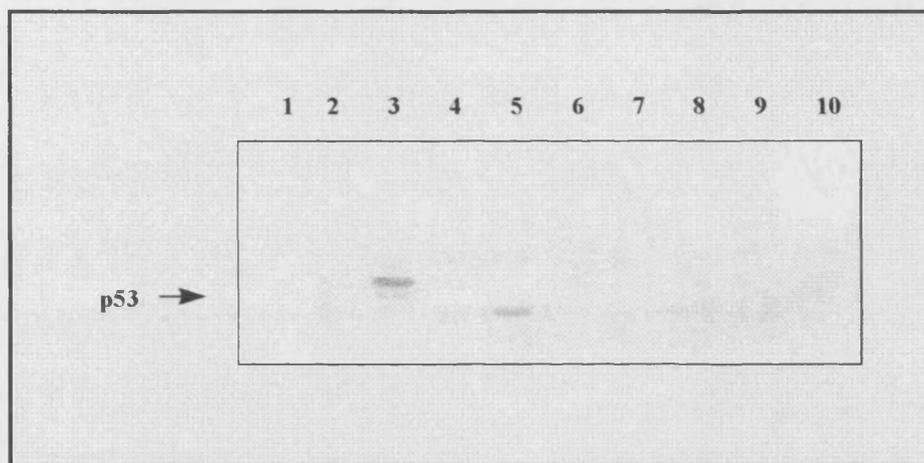
**WESTERN-BLOT** Estudio de la expresión de la proteína p53 **Anticuerpo DO-7**



	Muestra	Expresión de la proteína p53
1	marker	
2	FHM 176	NEGATIVA
3	<b>FHM 711</b>	<b>POSITIVA</b>
4	FHM 857	NEGATIVA
5	<b>FHM 1047</b>	<b>POSITIVA</b>
6	FHM 1782	NEGATIVA
7	FHM 1116	NEGATIVA
8	FHM 2298	NEGATIVA
9	FHM 2736	NEGATIVA
10	PLACENTA	NEGATIVA

## Figura 4.4

**WESTERN-BLOT**    Estudio de la expresión  
de la proteína p53                    Anticuerpo  
1801



	Muestra	Expresión de la proteína p53
1	marker	
2	FHM 176	NEGATIVA
3	<b>FHM 711</b>	<b>POSITIVA</b>
4	FHM 857	NEGATIVA
5	<b>FHM 1047</b>	<b>POSITIVA</b>
6	FHM 1782	NEGATIVA
7	FHM 1116	NEGATIVA
8	FHM 2298	NEGATIVA
9	FHM 2736	NEGATIVA
10	PLACENTA	NEGATIVA

• TABLA 4.3

**PCR-SSCP, SECUENCIACIÓN, WESTERN-BLOT  
E INMUNOHISTOQUÍMICA: RESULTADOS COMPARATIVOS DEL  
ESTUDIO DEL GEN TP53 Y DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53**

TUMOR	PCR-SSCP-SEC		WESTERN-BLOT		INMUNOHISTOQUÍMICA
	EXÓN	ALT	DO-7	1801	DO-7
FHM 176	<b>E 6</b>	<b>MN</b>	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
Nu 55	<b>E 6</b>	<b>MN</b>	NV	NV	NEGATIVA
FHM 184	-	-	NEGATIVA	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>
Nu 64	-	-	NV	NV	<b>POSITIVA</b>
FHM 571	<b>E 5</b>	<b>MP</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
Nu 80	<b>E 5</b>	<b>MP</b>	NV	NV	<b>POSITIVA</b>
FHM 711	-	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	NM
FHM 1047	-	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	NEGATIVA
FHM 1782	-	-	NEGATIVA	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>
FHM 1116	<b>E 6</b>	<b>DP</b>	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
FHM 1569	-	-	NM	NM	<b>POSITIVA</b>
Nu 127	-	-	NV	NV	<b>POSITIVA</b>
FHM 1615	-	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 1666	-	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 1943	-	-	<b>POSITIVA</b>	-	NM
FHM 2091	-	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	NEGATIVA
FHM 2435	<b>E 5</b>	<b>MP</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 3066	-	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
	<b>14.8%</b>	<b>14.8%</b>	<b>33.3%</b>	<b>29.6%</b>	<b>29.6%</b>

→ Abreviaturas: **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*); **SSCP**: Polimorfismo conformacional de cadena simple (*single strand conformational polymorphism*); **SEC**: secuenciación automática; **ALT**: alteración-tipo de mutación; (-) : PCR-SSCP negativa. **NV**: resultado no valorable; **NM**: no material, material escaso en la muestra; **MN**: mutación neutra; **MP**: mutación puntual; **DP**: duplicación;

---

## 5.- ESTUDIO DEL GEN MDM2

---

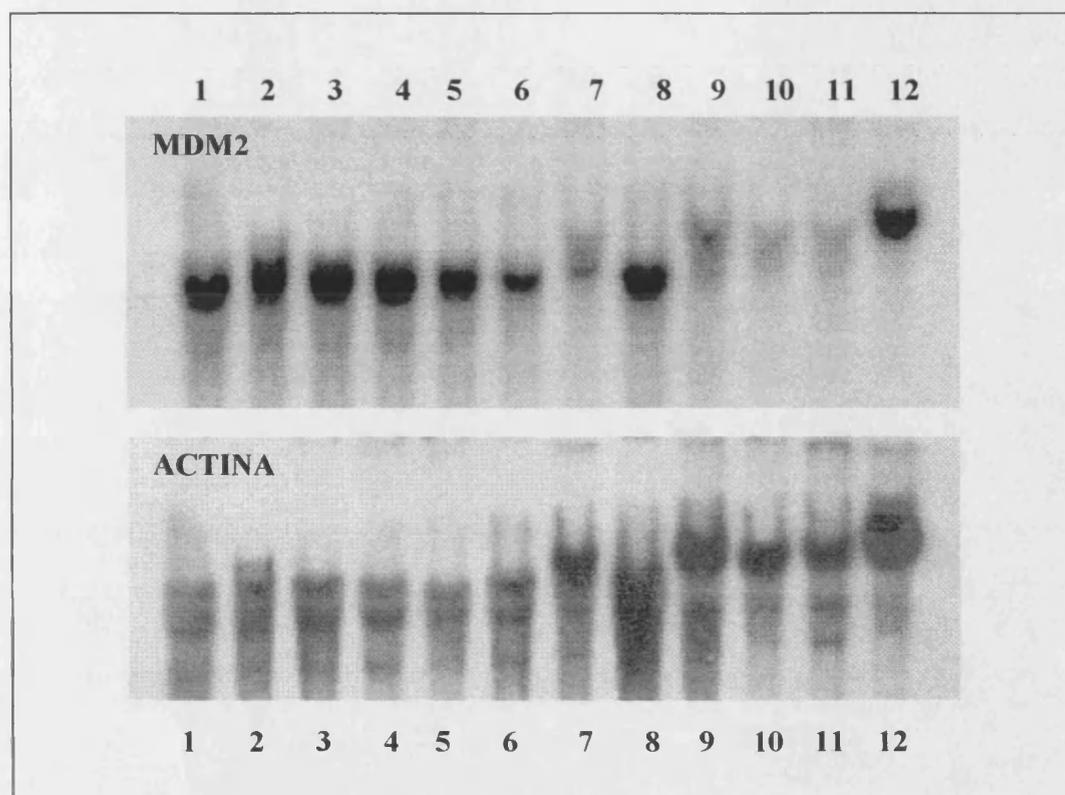
El estudio del gen MDM2 se ha realizado mediante la técnica Southern-blot con posterior hibridación de las membranas con la sonda MDM2B y detección mediante el sistema de quimioluminiscencia. El estudio comparativo con el gen de la actina, en las mismas condiciones técnicas, nos permitió detectar dos tumores con amplificación del gen MDM2. En uno de ellos se demostró tanto en el tumor primario (FHM 571) como en el tumor xenotransplantado (Nu 80) en ratones atímicos *nude*. La valoración de las placas radiográficas con la técnica southern-blot se realizó con el sistema EDAS DC40 y el densitómetro 2202 ULTROSCAN- Laser densitometer, LKB BROMMA y 3390 A Integrator- Hewlett packard.

Las imágenes de las membranas hibridadas y el resultado de la valoración densitométrica se exponen a continuación en las figuras 5.1→ 5.3.

Figura 5.1

## SOUTHERN-BLOT

## Estudio del gen MDM2

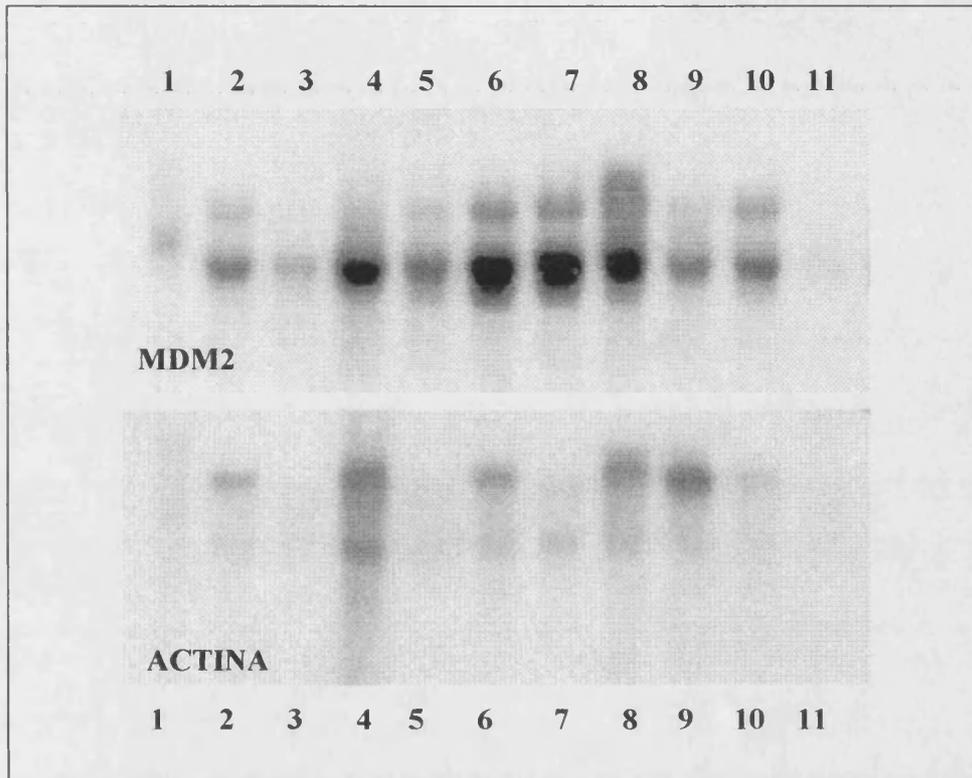


n°	MUESTRA	AMPLIFICACIÓN	VALORACIÓN DENSITOMÉTRICA		
			MDM2	ACTINA	MDM2/ACT
1	FHM 2298	-	7.16	6.82	1.05
2	FHM 2407	-	7.4	8.09	0.91
3	FHM 2726	-	7.8	7.10	1.1
4	FHM 2736	-	4.95	5.49	0.9
5	FHM 2802	-	3.76	3.24	1.16
6	FHM 3066	-	2.36	6.34	0.37
7	FHM 2660	-	1.06	10.9	0.1
8	FHM 2853	-	5.94	9.6	0.6
9	FHM 2435	-	3.18	12.8	0.2
10	FHM 2479	-	0.07	9.86	0.007
11	FHM 3020	-	0.19	9.6	0.02
12	FHM 2091	-	4.29	16.06	0.27

Figura 5.2

SOUTHERN-BLOT

Estudio del gen MDM2

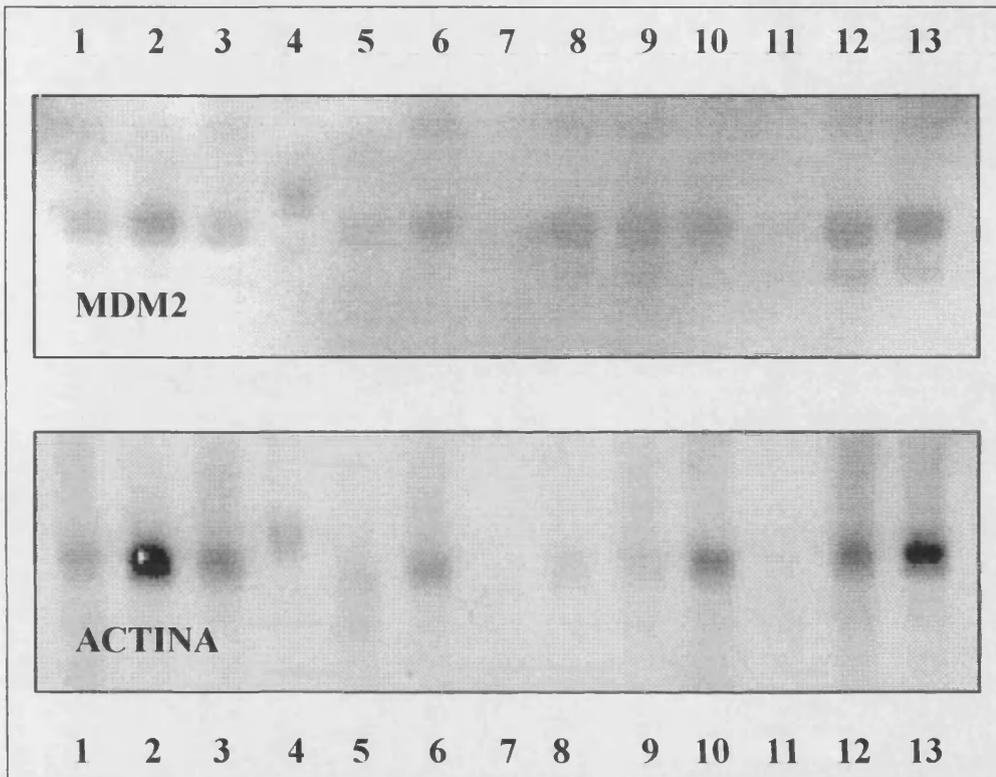


n°	MUESTRA	AMPLIFICACIÓN	VALORACIÓN DENSITOMÉTRICA		
			MDM2	ACTINA	MDM2/ACT
1	NU 4	-	2.2	1.3	1.69
2	NU 55	-	6.8	2.2	3.09
3	FHM 176	-	3.1	0.7	4.43
4	NU 64	-	11.1	8.6	1.29
5	FHM184	+	9.7	1.7	5.7
6	NU 80	+	19.5	4.2	4.64
7	FHM 571	+	20	2.3	8.7
8	NU 196	-	21	5.8	3.62
9	NU 207	-	6.2	5.8	1.07
10	NU 213	-	9.4	2.2	4.27
11	NU 127	-	0.8	0.4	2

Figura 5.3

SOUTHERN-BLOT

Estudio del gen MDM2



VALORACIÓN DENSITOMÉTRICA					
nº	MUESTRA	AMPLIFICACIÓN	MDM2	ACTINA	MDM2/ACT
1	FHM 711	-	0.4	2.79	0.14
2	FHM 1666	-	1.6	17.04	0.09
3	FHM 857	-	0.4	10.1	0.03
4	FHM 1557	-	0.9	3.5	0.25
5	FHM 1943	-	0.6	2.12	0.28
6	FHM 2091	-	1.3	7.86	0.16
7	FHM 2435	-	0.14	0.46	0.3
8	FHM 3066	-	1.5	1.75	0.85
9	FHM 1615	-	2.07	3.23	0.64
10	Nu 64	-	1.3	8.24	0.16
11	FHM 1569	-	0.42	0.36	1.16
12	RIÑÓN	-	2.9	13.08	0.22
13	PLACENTA	-	3.2	15.35	0.21

## 6.- ESTUDIO DE LA PROTEÍNA mdm2

El estudio de la proteína mdm2 se efectuó mediante la técnica de inmunohistoquímica y Western-blot seguida de la detección de la proteína por un sistema de quimioluminiscencia. El anticuerpo utilizado fue el 1B10. Los resultados, el estudio comparativo y las imágenes obtenidas con ambas técnicas se detallan a continuación.

**TABLA 6.1: INMUNOHISTOQUÍMICA**  
RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA mdm2 EN FHM

TUMOR	IR	TUMOR	IR
Nu 4	neg	FHM 1943	NM
FHM 179	NM	<b>FHM 2091</b>	<b>mod +++</b>
FHM 176	neg	FHM 2298	neg
Nu 55	neg	FHM 2407	neg
<b>FHM 184</b>	<b>mod +++</b>	<b>FHM 2435</b>	<b>int +++</b>
FHM 277	NM	FHM 2479	neg
<b>FHM 571</b>	<b>mod +++</b>	FHM 2660	neg
FHM 711	NM	Nu 196	neg
FHM 857	<b>mod +++</b>	FHM 2726	NM
<b>FHM 1782</b>	<b>mod ++</b>	FHM 2736	neg
FHM 1116	neg	<b>FHM 2802</b>	<b>mod ++</b>
<b>FHM 1557</b>	<b>int ++</b>	FHM 2853	neg
FHM 1569	neg	<b>Nu 213</b>	<b>mod +++</b>
<b>FHM 1615</b>	<b>mod +++</b>	FHM 3020	neg
<b>FHM 1666</b>	<b>int +++</b>	<b>FHM 3066</b>	<b>mod ++</b>

→ Abreviaturas: **IR**: Inmunorreactividad; **NM**: no material, material escaso en la muestra; **neg**: inmunorreactividad negativa.

→ Cuantificación de la inmunopositividad:

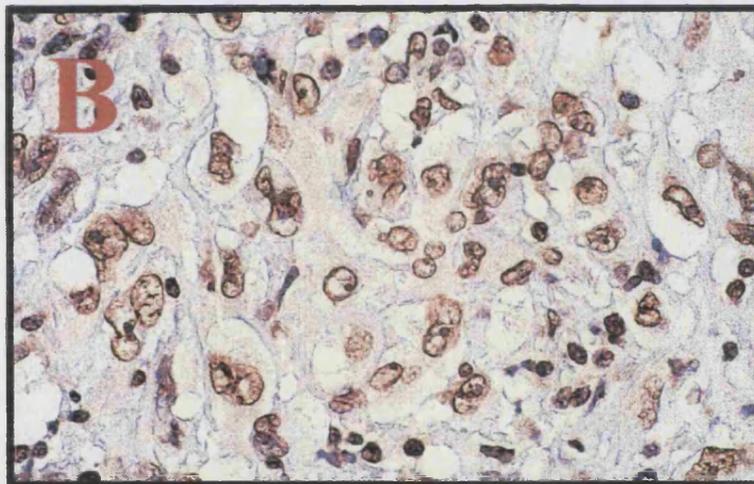
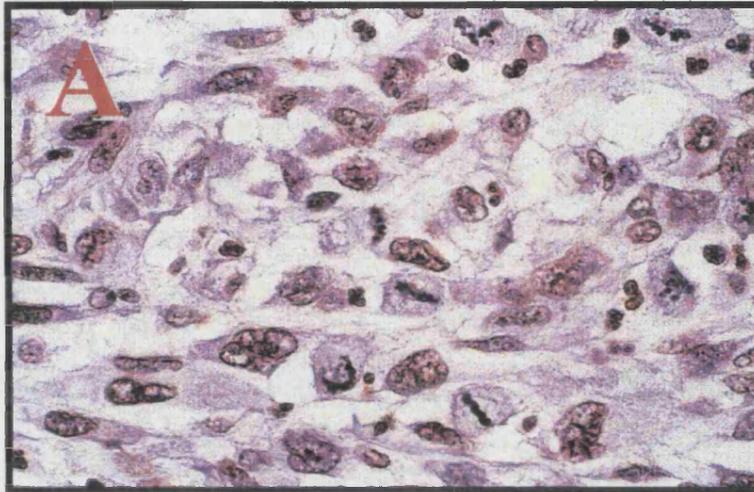
●Porcentaje de celularidad positiva		●Intensidad de la inmunorreacción	
menos del 10%	negativa	leve	
10-40%	+	moderada	
40-70%	++	intensa	
más del 70%	+++		

**TABLA 6.2: WESTERN-BLOT - INMUNOHISTOQUÍMICA**  
RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA mdm2 EN FHM

TUMOR	WESTERN-BLOT	INMUNO	TUMOR	WESTERN-BLOT	INMUNO
Nu 4	NV	NEGATIVA	<b>FHM 1666</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 179	-	NM	FHM 1755	NM	<b>POSITIVA</b>
FHM 176	NEGATIVA	NEGATIVA	<b>FHM 1943</b>	-	NM
Nu 55	NV	NEGATIVA	<b>FHM 2091</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
<b>FHM 184</b>	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>	FHM 2298	NEGATIVA	NEGATIVA
Nu 64	NV		FHM 2407	NEGATIVA	NEGATIVA
FHM 277	-	NM	<b>FHM 2435</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
<b>FHM 571</b>	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>	FHM 2479	-	NEGATIVA
Nu 80	NV		FHM 2660	NEGATIVA	NEGATIVA
<b>FHM 711</b>	<b>POSITIVA</b>	NM	Nu 196	NV	NEGATIVA
<b>FHM 857</b>	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>	FHM 2726	-	NM
<b>FHM 1047</b>	NEGATIVA		FHM 2736	NEGATIVA	NEGATIVA
<b>FHM 1782</b>	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>	Nu 207	NV	NEGATIVA
FHM 1116	NEGATIVA	NEGATIVA	FHM 2802	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>
<b>FHM 1557</b>	NM	<b>POSITIVA</b>	<b>FHM 3066</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 1569	NM	NEGATIVA	<b>FHM 2853</b>	<b>POSITIVA</b>	NEGATIVA
Nu 127	NV		<b>Nu 213</b>	NV	<b>POSITIVA</b>
<b>FHM 1615</b>	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b>	FHM 3020	-	NM

NV: resultado no valorable; NM: no material, material escaso en la muestra

## DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA mdm2



---

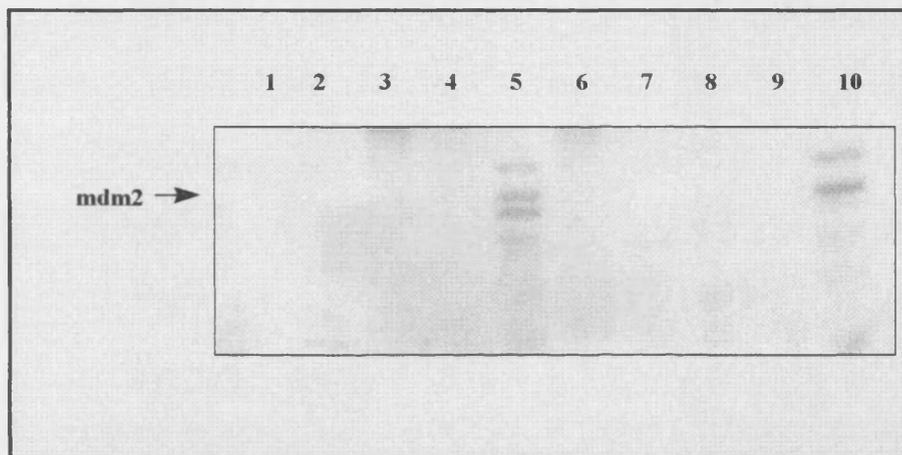
**FIGURA A:** FHM 2435. Intensa inmunoposividad en la mayoría de las células tumorales (más del 70%, +++). 1000x.

**FIGURA B:** FHM 184. Moderada positividad en más del 70% de la celularidad tumoral (más del 70%, ++). 1000x.

---

## Figura 6.1

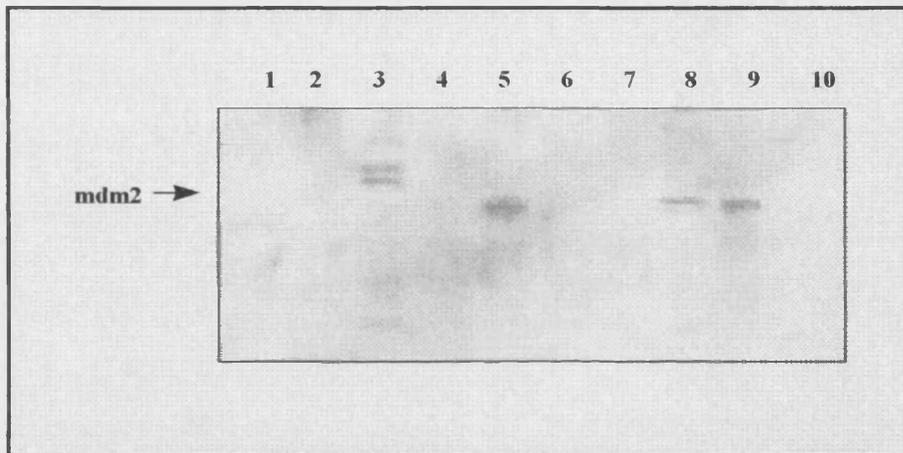
**WESTERN-BLOT**    Estudio de la expresión  
de la proteína mdm2                    Anticuerpo  
1B10



	Muestra	Expresión de la proteína mdm2
1	marker	
2	FHM 176	NEGATIVA
3	FHM 184	NEGATIVA
4	FHM 571	NEGATIVA
5	FHM 711	<b>POSITIVA</b>
6	FHM 857	NEGATIVA
7	FHM 1047	NEGATIVA
8	FHM 1116	NEGATIVA
9	FHM 1615	NEGATIVA
10	FHM 1666	<b>POSITIVA</b>

## Figura 6.2

**WESTERN-BLOT**    Estudio de la expresión de la proteína mdm2    Anticuerpo 1B10



	Muestra	Expresión de la proteína mdm2
1	marker	
2	FHM 1782	NEGATIVA
3	<b>FHM 2091</b>	<b>POSITIVA</b>
4	FHM 2298	NEGATIVA
5	<b>FHM 2435</b>	<b>POSITIVA</b>
6	FHM 2736	NEGATIVA
7	FHM 2802	NEGATIVA
8	<b>FHM 2853</b>	<b>POSITIVA</b>
9	<b>FHM 3066</b>	<b>POSITIVA</b>
10	PLACENTA	NEGATIVA

## 7.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES DE LOS GENES P53 Y MDM2 Y DE LA EXPRESIÓN DE AMBAS PROTEÍNAS EN LOS FIBRIOHISTIOCITOMAS

**TABLA 7.1**

INDIVIDUALIZADO POR TÉCNICAS Y POR MUESTRAS DE TUMORES PRIMARIOS Y XENOTRANSPLANTADOS

TUMOR	GEN TP53	WESTERN-BLOT		INMUNO	GEN MDM2	PROTEÍNA MDM2	
		DO-7	1801	DO-7		WESTERN	INMUNO
FHM 176 Nu 55	<b>E6-MN</b> <b>E6-MN</b>	- NV	- NV	- -	- -	- NV	- -
FHM 184 Nu 64	- -	- NV	- NV	<b>POSITIVA</b> <b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b> <b>POSITIVA</b>	- NV	<b>POSITIVA</b> -
FHM 571 Nu 80	<b>E5-MP</b> <b>E5-MP</b>	<b>POSITIVA</b> NV	<b>POSITIVA</b> NV	<b>POSITIVA</b> <b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b> <b>POSITIVA</b>	- NV	<b>POSITIVA</b> -
FHM 711	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	NM	-	<b>POSITIVA</b>	NM
FHM 857	-	-	-	-	-	-	<b>POSITIVA</b>
FHM 1047	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	-	-	-	-
FHM 1782	-	-	-	<b>POSITIVA</b>	-	-	<b>POSITIVA</b>
FHM 1116	<b>E6-DP</b>	-	-	-	-	-	-
FHM 1557	-	NM	NM	-	-	NM	<b>POSITIVA</b>
FHM 1569 Nu 127	- -	NM NV	NM NV	<b>POSITIVA</b> <b>POSITIVA</b>	- -	- NV	- -
FHM 1615	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	-	-	<b>POSITIVA</b>
FHM 1666	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 1775	-	NM	NM	-	-	-	<b>POSITIVA</b>
FHM 1943	-	<b>POSITIVA</b>	-	NM	-	-	-
FHM 2091	<b>E8?</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	-	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 2435	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	-	<b>POSITIVA b</b>	<b>POSITIVA</b>
FHM 2853 Nu 213	<b>E8?</b> -	- NV	- NV	- -	- -	<b>POSITIVA b</b> NV	- <b>POSITIVA</b>
FHM 2802	-	-	-	-	-	-	<b>POSITIVA</b>
FHM 3066	-	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	<b>POSITIVA</b>	-	<b>POSITIVA b</b>	<b>POSITIVA</b>
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>12</b>
	<b>11.11%</b>	<b>33.3%</b>	<b>29.6%</b>	<b>29.6%</b>	<b>7.4%</b>	<b>22.2%</b>	<b>44.4%</b>

→ Abreviaturas: **NV**: resultado no valorable; **NM**: no material, material escaso en la muestra; **MN**: mutación neutra; **MP**: mutación puntual; **DP**: duplicación;

TABLA 7.2

VALORACIÓN CONJUNTA DE TÉCNICAS Y DE TUMORES PRIMARIOS Y  
XENOTRANSPLANTADOS

TUMOR	P53	p53	MDM2	mdm2	DIAGNÓSTICO
FHM 176/ Nu 55	<b>E6-MN</b>	-	-	-	FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 184/ Nu 64	-				FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 571/ Nu 80	<b>E5-MP</b>				FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 711	-		-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 857	-	-	-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO II
FHM 1047/ FHM 1782	-		-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 1116	<b>E6-DP</b>	-	-	-	FHM PLEOMÓRFICO GRADO II
FHM 1557	-	-	-		FHM INFLAMATORIO GRADO II
FHM 1569/ Nu 127	-			-	FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 1615	-		-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 1666	-		-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO II
FHM 1775	-	-	-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO II
FHM 1943	-		-	-	FHM PLEOMÓRFICO
FHM 2091	<b>E8?</b>		-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 2435	<b>SSCP</b>		-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 2853/ Nu 213	<b>E8?</b>	-	-		FHM PLEOMÓRFICO GRADO III
FHM 2802/ FHM 3066	-		-		FHM MIXOIDE GRADO III
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	
	<b>11.11%</b>	<b>40.7%</b>	<b>7.4%</b>	<b>48.1%</b>	

→ Abreviaturas: **MN**: mutación neutra; **MP**: mutación puntual; **DP**: duplicación; **P53**: gen P53 (PCR-SSCP-Secuenciación); **p53**: proteína p53 (Western-blot + Inmunohistoquímica); **MDM2**: gen MDM2 (Southern-blot); **mdm2**: proteína mdm2 (Western-blot + Inmunohistoquímica);

## 8.- DATOS CLÍNICOS

En la siguiente tabla se exponen los datos clínicos más relevantes de los pacientes incluidos en este estudio y su relación con las alteraciones de p53 y mdm2 halladas en los tumores:

TUMOR	ED	LOCL	TAMAÑO	TIPO	G	NUDE	QT	RECIDIVA	MET	F. SUP	P53	p53	MDM2	mdm2
Nu 4	85	CODO	NC	PLEOMÓRFICO	II	X	0	0	0	60 meses	0	0	0	0
179	59	RODILLA	2.5 X 3	PLEOMÓRFICO	III	X	0	0	0	60 meses	0	0	0	0
176/Nu 55	80	AXILA	10 X 15	PLEOMÓRFICO	III	X	0				MN	0	0	0
184	NC	GLUTEO	16 X 10	PLEOMÓRFICO	III	X	0	0	12 meses	14 meses	0	X	X	X
571	46	PIERNA	18 X 16	REC PLEOM	III	X	0	24 meses	25 meses	36 meses	MP	X	X	X
711	47	MUSLO	NC	PLEOMÓRFICO	II	0	X	24 meses	0	60 meses	0	X	0	X
857	78	MUSLO	NC	PLEOMÓRFICO	III	0	0				0	0	0	X
1047/ 1782	50	MUSLO	10 X 11	PLEOMÓRFICO	III	X	X	12 meses	24 meses	36 meses	0	X	0	X
1116	77	MUSLO	6 X 6	PLEOMÓRFICO	II	0	0	17 meses	30 meses	44 meses	DP	0	0	0
1557	67	RETROP	20 X 17	INFLAMATORIO	II	0	0	15 meses	0	17 meses	0	0	0	X
1569	50	COSTAL	6 X 4	PLEOMÓRFICO	III	X	0	1 mes	0	60 meses	0	X	0	0
1666	34	HOMBRO	6 X 5	PLEOMÓRFICO	II	0	X	19 meses	19 meses	28 meses	0	X	0	X
1755	88	RODILLA	8 X 7	PLEO/FIBRSAR	II	0	0	12 meses	0	30 meses	0	0	0	X
2298	76	CABEZA	4 X 1	XANTOIDAL	I	0	0	0	0	60 meses	0	0	0	0
2407	58	GLUTEO	5.4 X 4.5	MIXOIDE	I	0	0	0	0	60 meses	0	0	0	0
2479	76	AXILA	12 X 10	PLEOMLIPO	III	0	X	3 meses	0	60 meses	0	0	0	0
2660	NC	MUSLO	9 X 8	PLEOMÓRFICO	II	X	0				0	0	0	0
2726	95	RODILLA	4 X 4	PLEOMÓRFICO	II	0	0	res. incom	0	60 meses	0	0	0	0
2736	74	BRAZO	15 X 10	PLEOMÓRFICO	III	X	0	3 meses	0	60 meses	0	0	0	0
2802/3066	NC	MUSLO	22 X 5	MIXOIDE	II	X	0	7 meses			0	X	0	X
2853	54	GLUTEO	8.5 X 7	GIGANTOCEL	III	X	0	1 mes	7 meses	15 meses	0	0	0	X
2091	83	ABDOMEN	8 X 5, 4	PLEOMÓRFICO	II	NI	0	0	0	60 meses	0	X	0	X
3020	22	PIE	4 X 2	PLEOMÓRFICO	III	NI	0	0	0	60 meses	0	0	0	0
277	NC	NC		PLEOMORFICO	II	NI	0				0	0	0	0
1615	53	TRONCO	10	REC PLEOM	III	NI	X	17 meses	0	60 meses	0	X	0	X
1943	NC	NC	NC	PLEOMORFICO	II	NI	0				0	X	0	0
2435	80	GLUTEO	8 X 6.5	PLEOMÓRFICO	III	NI	0	5 meses	6 meses	8 meses	0	X	0	X

→ Abreviaturas: **ED**: edad; **LOCL**: localización; **G**: Grado tumoral de diferenciación; **NUDE**: crecimiento positivo del tumor xenotransplantado en los ratones nude; **QT**: Tratamiento quimioterápico previo; **MET**: metástasis; **F. SUP**: Fecha de supervivencia **P53**: gen P53 (PCR-SSCP-Secuenciación); **p53**: proteína p53 (Western-blot + Inmunohistoquímica); **MDM2**: gen MDM2 (Southern-blot); **mdm2**: proteína mdm2 (Western-blot + Inmunohistoquímica); **X**: resultado positivo; **0**: resultado negativo; **NC**: no consta; **NI**: tumor no implantado en ratones nude; ; **MN**: mutación neutra; **MP**: mutación puntual; **DP**: duplicación;

## 9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

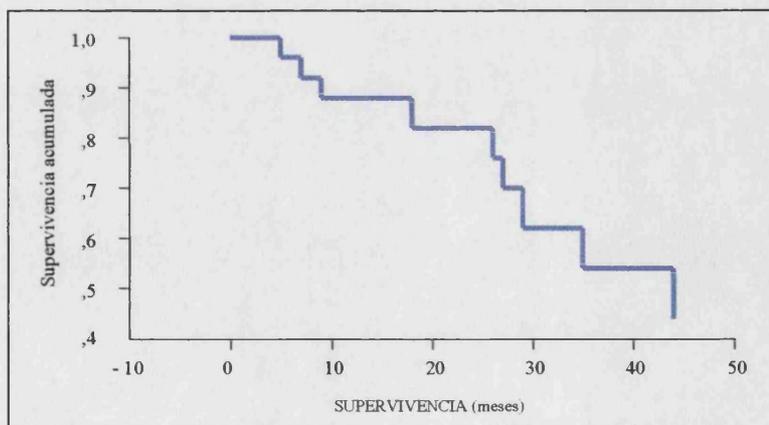
Para el análisis estadístico de las diferentes variables estudiadas se han utilizado las curvas de supervivencia (metodo de Kaplan-Meier) y para la comparación de dos distribuciones de supervivencia separadas por algún criterio de los establecidos se ha utilizado la prueba de Mantel-Haenszel (Log Rank) del programa estadístico SPSS. Con todos los datos recogidos, se creó una tabla con las consiguientes variables codificadas en caracteres numéricos, que se detallan a continuación:

VARIABLE	SUBDIVISIONES
Edad	(meses)
Grado histológico	1- Grado 1, 2- Grado II, 3- Grado III
Mutación gen TP53	0-No, 1-Si
Amplificación gen MDM2	0-No, 1-Si
Sobreexpresión proteína p53	0-No, 1-Si
Sobreexpresión proteína mdm2	0-No, 1-Si
Coexpresión de ambas proteínas	0-No, 1-Si
Recidiva local y/o metástasis	0-No, 1-Si
Supervivencia	(meses)

### • RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA

La curva de supervivencia representa la estimación de la probabilidad de que el paciente sobreviva un determinado tiempo. Las probabilidades se calculan en los precisos instantes en que una paciente de la muestra fallece, según el método de Kaplan-Meier. La gráfica siguiente representa la curva de supervivencia obtenida:

**GRÁFICA 9.1: FUNCIÓN DE SUPERVIVENCIA**



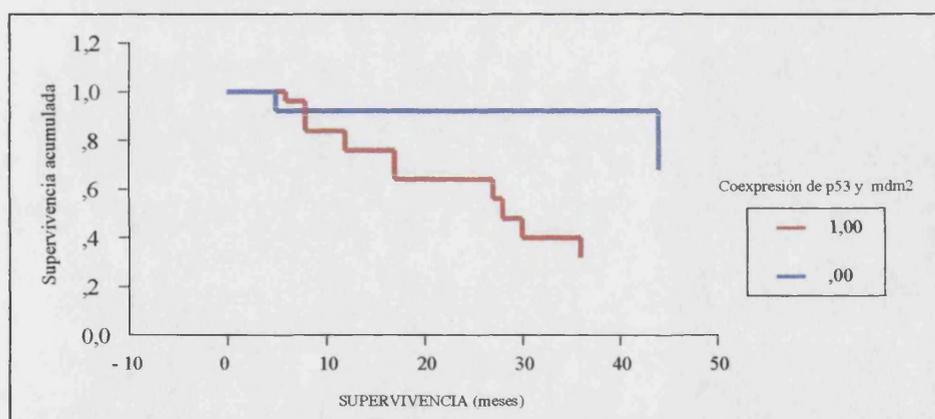
• **ASOCIACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LOS GENES TP53 Y MDM2 CON LA SUPERVIVENCIA Y RECIDIVA/METÁSTASIS**

Debido al reducido número de tumores con alteración de los genes P53 y MDM2, no se ha podido establecer ninguna relación estadísticamente significativa relacionada con su pronóstico.

• **ASOCIACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 Y/O mdm2 CON LA SUPERVIVENCIA**

La supervivencia fue significativamente reducida en aquellos casos con sobreexpresión de ambas proteínas (**GRÁFICA 9.2, TABLA 9.1**) ó con sobreexpresión de mdm2 (**TABLA 9.2**), sin embargo, la valoración aislada de sobreexpresión de p53 no obtuvo valores significativos desde el punto de vista estadístico.

**GRÁFICA 9.2: FUNCIÓN DE SUPERVIVENCIA SEGÚN COEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 y mdm2:**



**TABLA 9.1: COEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 y mdm2 SEGÚN SUPERVIVENCIA**

		Tiempo superv.	Error estandar	Intervalo confianza 95%
Coexpresión +	Media:	28,00	8,2	( 11.88 ; 44.12)
Coexpresión -	Media:	50,90	5,76	( 39.62 ; 62.18)

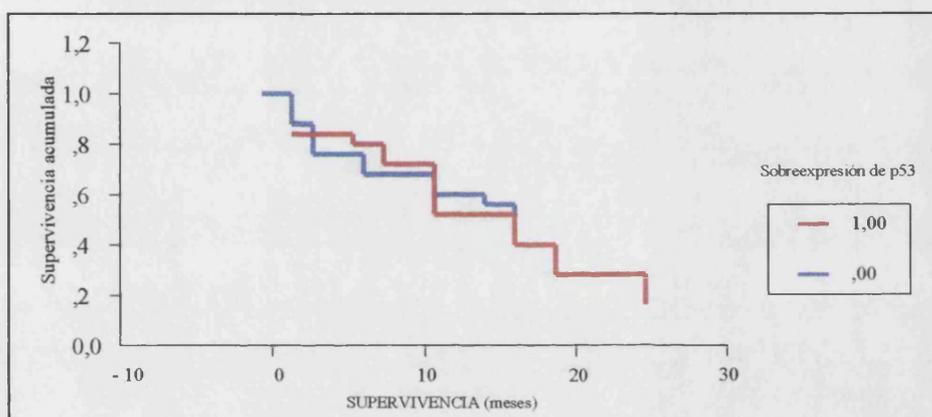
**TABLA 9.2: SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA mdm2 SEGÚN SUPERVIVENCIA**

		Tiempo superv.	Error estandar	Intervalo confianza 95%
Coexpresión +	Media:	28,00	8,46	( 11.41 ; 44.59)
Coexpresión -	Media:	51,36	5,43	( 40.73 ; 62.00)

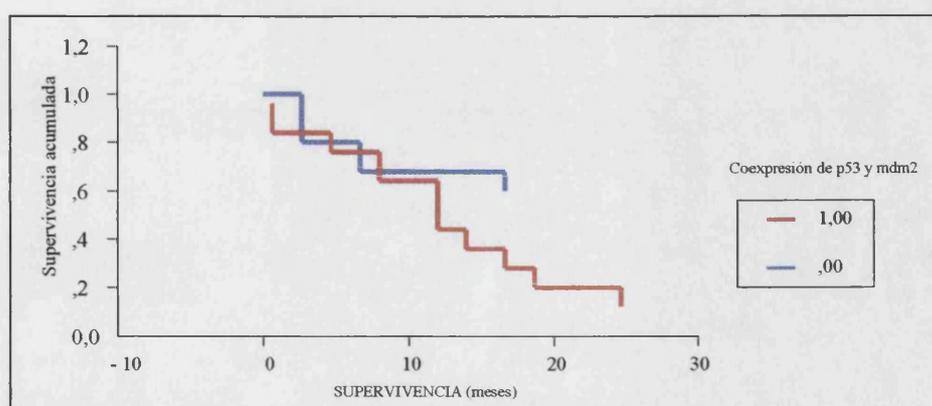
• ASOCIACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE LAS **PROTEÍNAS p53 Y/O mdm2** CON LA APARICIÓN DE RECIDIVA Y/O METÁSTASIS

En relación con la sobreexpresión de ambas proteínas y la aparición de recidiva local y/o metástasis, no obtuvimos significación estadística valorando aisladamente la sobreexpresión de la proteína p53 (**GRÁFICA 9.3**). Esta relación sí fue estadísticamente significativa con la sobreexpresión de mdm2 ó con la valoración conjunta de ambas proteínas (**GRÁFICA 9.4, TABLA 9.3**). De igual modo observamos esta misma relación valorando tres grupos: tumores sin expresión de p53 y mdm2, tumores con expresión de una de las dos proteínas y tumores con expresión de ambas proteínas (**TABLA 9.4**).

**GRÁFICA 9.3:** APARICIÓN DE RECIDIVA Y/O METÁSTASIS SEGÚN EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53:



**GRÁFICA 9.4:** APARICIÓN DE RECIDIVA Y/O METÁSTASIS SEGÚN COEXPRESIONES DE LAS PROTEÍNAS p53 y/o mdm2:



**TABLA 9.3: COEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 Y mdm2 SEGÚN APARICIÓN DE RECIDIVA Y/O METÁSTASIS**

		Tiempo superv.	Error estandar	Intervalo confianza 95%
Coexpresión +	Media:	12,00	3,59	( 4,95 ; 19,05)
Coexpresión -	Media:	38,90	8,25	( 22.72 ; 55,08)

**TABLA 9.4: SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53, mdm2 Y p53/mdm2 SEGÚN APARICIÓN DE RECIDIVA Y/O METÁSTASIS**

		Tiempo superv.	Error estandar	Intervalo confianza 95%
Sobreenpresión -	Media:	38,90	8,25	( 22.72 ; 55,08)
Sobreenpresión p53 o mdm2	Media:	1,0	3,66	( 0,08 ; 14,42)
Coexpresión p53 y mdm2	Media	17,00	7,45	(2,39 ; 31,61)

• **ASOCIACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 Y/O mdm2 CON EL GRADO HISTOLÓGICO:**

Se observa una tendencia en la coexpresión de ambas proteínas en tumores con grados II y III de diferenciación, aunque no es estadísticamente significativa (TABLA 9.5).

**TABLA 9.5: COEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 Y mdm2 SEGÚN EL GRADO HISTOLÓGICO**

	1,00	2,00	3,00	Total
Coexpresión -	2	5	5	12 (44.4%)
Coexpresión +		6	9	15 (55.6%)
Total	2 (7.4%)	11 (40.7%)	14 (51,9%)	27 (100%)

$\chi^2$	Valor	DF	Sig
Pearson	2,93669	2	0,23031
Likelihood ratio	3,68854	2	0,15814
Mantel-Haenszel	1,99063	1	0,15828

• **ASOCIACIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p53 Y/O mdm2 CON LA EDAD:**

Respecto a la **edad** de aparición del tumor se observa una mayor frecuencia de inmunorreactividad frente a p53 o mdm2 en pacientes con menor edad, que es estadísticamente significativa en el caso de p53 (si tomamos un criterio de significatividad del 90%). La media de edad observada para la sobreexpresión de p53 fue 55.37 años y para mdm2, 61.81 años (TABLA 9.6, TABLA 9.7).

**TABLA 9.6: SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53 LA EDAD**

	Nº casos	Mean	SD	SE de sig
Sobreexpresión p53 -	14	70,6429	18,194	4,863
Sobreexpresión p53 +	8	55,3750	17,104	6,047

Levene's Test for equality of variances:  $F= 0.003$   $P= 0,960$

t-test for equality of means

	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	95% CI for Diff
Equal	1,93	20	0,067	7,898	(-1,211; 31,747)
Unequal	1,97	15,49	0,067	7,760	(-1,276; 31,811)

**TABLA 9.7: SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA mdm2 LA EDAD**

	Nº casos	Mean	SD	SE de sig
Sobreexpresión mdm2 -	11	68,3636	20,066	6,050
Sobreexpresión mdm2 +	11	61,8182	18,099	5,457

Levene's Test for equality of variances:  $F= 0.011$   $P= 0,917$

t-test for equality of means

	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	95% CI for Diff
Equal	0,80	20	0,431	8,148	(-10,454; 23,545)
Unequal	0,80	19,79	0,431	8,148	(-10,454; 23,545)

## **DISCUSIÓN**

En los últimos años se ha realizado un gran número de trabajos experimentales que indican que la pérdida de función del gen supresor tumoral TP53 es un paso importante implicado en el complejo proceso de la carcinogénesis humana (Levine, 1991; Hann, 1995; Harvey, 1995).

La inactivación de este gen puede ser debida no sólo a anomalías estructurales del propio gen (mutaciones, deleciones, inserciones), sino también a la unión de la proteína p53 a oncoproteínas virales (Lane, 1979; Sarnow, 1982; Hollstein, 1991).

Experimentos *in vitro* han demostrado que el producto del gen celular MDM2 es capaz de unirse e inactivar funcionalmente a la proteína p53 (Momand, 1992; Olson, 1993). A través de esta interacción, mdm2 puede estabilizar a la proteína p53 (Marchetti, 1995; Keleti, 1996).

Resulta por ello interesante comprobar si esta relación funcional entre ambos genes se mantiene en las células tumorales, o se altera de alguna manera. En el presente trabajo se ha estudiado este problema en los FHM, comparando diversas técnicas de detección de alteraciones génicas, para valorar su utilidad como complemento a las técnicas histopatológicas.

## TP53

Los estudios del gen TP53 realizados sobre FHM identifican mutaciones en aproximadamente un 15% de los casos estudiados. En la tabla siguiente se indican las mutaciones en FHM, recopiladas de las diferentes bases de datos. Como se puede apreciar, las mutaciones son preferentemente puntuales y afectan a distintos codones de los exones 5-9, sin que exista un lugar preferente (hot spot) donde se acumulen. En total hay descritas mutaciones en 19 casos de 145 estudiados a nivel de secuenciación.

MUTACIONES DE TP53 EN FHM HUMANOS					
Referencia	Nº casos	Exón	Codón	Cambio nucleótido	Cambio aa
TOGUUCHIDA, 1992	2 de 13 (15.4%)	6	196	CGA→TGA	Arg→Stop
		8	273	CGT→CAT	Arg→His
ANDREASSEN, 1993	3 de 11 (27.3%)	5	143	GTG→ATG	Val→Met
		5	163	TAC→TGC	Tir→Sis
		7	244	GGC→GAC	Gli→Asp
LEACH, 1993	1 DE 10 (10%)	NC	NC	CGC→CUC	Arg→His
FLORENES, 1994	4 de 20 (20%)	7		NC	NC
		5		NC	NC
		7		NC	NC
		8		NC	NC
LATRES, 1994	1 de 9 (11.11%)	5	165	CAG→TAG	Gln→Stop
TAUBERT, 1995	3 de 30 (10%)	5	177-182	-(18 pb)	6 aa- Delección frameshift
		5	176-177	-(1pb)	
		8	280	AGA→GGA	Lis→Glu
REID, 1996	5 de 52 (9.6%)	5	132	AAG→GAG	Arg→His
		7	232-233	-(1pb)	Stop en 246
		8	273	CGT→CAT	Arg→His
		8	280	AGA→ACA	Arg→Thr
		8	286	GAC→CAG	Glu→Gln

→ Abreviaturas; NC: no consta; pb: pares de bases.

En nuestro trabajo se han estudiado 27 FHM, encontrándose mutaciones del gen P53 en 2 de ellos (7.41 %): una mutación puntual y una duplicación. La mutación puntual (G/C) en el codón 178 (His/Asp) del exón 5 se obtuvo tanto en el tumor original como su xenotransplante en ratones *nude*. La duplicación hallada afecta a 63 pares de bases correspondientes a los codones 199-219 del exón 6 del gen TP53.

Hemos encontrado también una mutación neutra (A/G) en el codón 213 (Arg/Arg) del exón 6, pero no la consideramos porque su efecto no se traduce en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Pellín y col (1998) en un reciente estudio de los genes RB1, TP53 y MDM2 en Osteosarcomas obtiene tres mutaciones puntuales neutras sin correlación con el fenotipo tumoral de dichos tumores. En el estudio de diversos sarcomas que se realiza en nuestro laboratorio, esta mutación en el codón 213 (Arg/Arg) se detecta con una frecuencia muy elevada. Quizá sea debido a las particulares condiciones que se utilizan en la técnica SSCP-PCR, pues como es sabido, pequeñas variaciones en la temperatura del tampón de electroforesis, densidad de la acrilamida o la proporción de glicerina utilizada, pueden facilitar la detección de determinadas bandas que reflejan cambios concretos en la estructura del DNA monocatenario.

En dos casos (FHM 2091 y FHM 2853) no obtuvimos producto amplificado del exón ocho mediante la técnica de la PCR. Se repitió la técnica bajo condiciones más permisivas y se intentó amplificar un fragmento que incluyera los exones contiguos utilizando los *primers* adecuados pero no obtuvimos resultados positivos. De este modo, aunque no se ha podido demostrar ningún tipo de mutación específica, existe la posibilidad, aunque no valorable objetivamente, de que exista a este nivel una delección.

En nuestro estudio se observaron bandas de movilidad anómala mediante SSCP en los productos amplificados del exón cinco en dos tumores. En uno de ellos se detectó una mutación puntual mediante secuenciación automática, mientras que el otro, tras repetidas secuenciaciones, dio una lectura correcta. Este mismo resultado ha sido descrito también en un caso de carcinoma de mama (Visscher, 1996).

Las dos mutaciones halladas afectan al dominio central que es capaz de unirse específicamente al DNA de doble cadena (Bargonetti, 1993, Pavletich, 1993) y que está conservado en especies muy separadas desde el punto de vista evolutivo, por lo que se supone que es fundamental para su función (Levine, 1991).

Cho y col (1994) desarrollan mediante técnicas de difracción de Rayos X un modelo estructural del dominio central de la proteína p53, que permite comprender cómo afectan las mutaciones a la capacidad de unión de p53 a una secuencia específica del ADN. En el área de interacción de la proteína con el ADN se pueden distinguir tres regiones: una que contacta más ampliamente con la secuencia pentamérica del ADN (*H2 helix* y *L1 loop*), una de menor contacto (*L3 loop*) y uniones fosfato covalentes. Ver *Figura n°1*.

La mutación puntual del caso FHM 571/Nu 80 situada en el codón 178, afecta a la estructura del asa L2 (*L2 loop*), interfiriendo en la unión con el ADN y está incluida en una de las regiones altamente conservadas de la proteína (III) y dentro de ella, en una de las seis regiones más frecuentemente mutadas en el conjunto de los tumores humanos. Aunque la estructura *L2 loop* no interacciona directamente con el ADN, esta implicada en diversos tipos de interacciones con *L3 loop*. Un 17% de las mutaciones de todos los tumores se centran en esta estructura (Cho, 1994).

Respecto a la mutación del caso **FHM 1116**, hay una duplicación de 63 pares de bases (exón 6-codones 199-219) que aunque se sitúa en el dominio central, no afecta a ninguna de las regiones altamente conservadas de la proteína. La duplicación de secuencias más o menos grandes en el gen TP53 son muy poco frecuentes. En la bibliografía estudiada y las bases de datos disponibles en internet no aparece una duplicación similar a la que hemos encontrado; se describe una duplicación de 9 pb (exón 5-codones 165,166) en un tumor carcinoide de pulmón (Mitsudomi, 1992) y una duplicación de 42 pb (exón 5) en un liposarcoma (Taubert, 1995).

Un estudio comparativo de la distribución de mutaciones de TP53 por codones entre tumores humanos (excepto sarcomas) y sarcomas de partes blandas revela patrones de distribución semejantes (Taubert, 1995). Las mutaciones del gen TP53 identificadas en este trabajo sugieren un patrón de distribución similar, afectando al dominio central de la proteína (codón 102-292). Los cuatro dominios conservados de esta región central proporcionan el elemento de unión al ADN. Puesto que la mayoría de las mutaciones publicadas ocurren en estos dominios (90%), afectan directamente a la interacción de p53 con el DNA (Vogelstein, 1994).



**Figura n°1:** Estructura tridimensional de la unión de p53 al ADN utilizando difracción de rayos X, realizada por Cho y col. La imagen muestra el ADN (azul), el dominio central de p53 (Verde), el átomo de Zinc (Rojo) y la posición de los residuos de aminoácidos (amarillo) de los seis hot spot (regiones más frecuente mutadas de p53). Las mutaciones en estas regiones interfieren con la unión de la proteína al ADN ó alteran la integridad del dominio. Debido a ésto, todas las mutaciones que directa ó indirectamente afectan la interacción de p53 con el ADN, demuestran que la unión al ADN mediante una secuencia específica es crucial para el funcionamiento normal de la proteína p53 como supresora tumoral.

→<http://zapruder.pds.med.umich.edu/users/Frank/Logo.html>

En nuestro estudio, un **29.6%** (8 de 27) de los casos fueron inmunohistoquímicamente positivos para p53 utilizando el anticuerpo DO-7. Los trabajos realizados sobre sarcomas de partes blandas y FHM mediante esta técnica, revelan resultados similares. Soini y col (1992) observan inmunopositividad frente a p53 en 4/14 FHM (29%) y 9/22 (41%) sarcomas. En cuatro de las 25 lesiones benignas (16%) se observaron células p53-positivas, aunque en menor proporción (menos del 1% de la población celular). Kawai y col (1994) demuestran un porcentaje de positividad en Fibriohistiocitomas Malignos del 20%. Yang y col (1995) encuentran una frecuencia de sobreexpresión de p53 (39%), superior a la descrita en estudios anteriores sobre FHM y otros sarcomas de partes blandas (19-36%). Este mayor porcentaje puede ser explicado por los diferentes índices de valoración de células p53-positivas y los anticuerpos utilizados. Taubert y col (1995) detectan 21/30 FHM (70%) con sobreexpresión de la proteína p53. Reid y col (1996) estudian 52 FHM y encuentran 8 tumores con sobreexpresión de p53.

Si valoramos conjuntamente las técnicas de detección de proteínas: inmunohistoquímica y Western-blot, se demuestra un porcentaje superior respecto a la expresión de la proteína p53 en FHM: un **40.7%** (11 de 27 tumores). No obstante, en este estudio en concreto, si omitimos aquellos casos en los que no se han podido realizar ambas técnicas obtenemos resultados similares.

En relación con los dos anticuerpos utilizados para la detección de la proteína p53, según nuestra experiencia y los resultados obtenidos, el clon DO-7 muestra mayor intensidad en la señal y mayor sensibilidad que el clon Pab 1801. Esta apreciación se halla en concordancia con la expuesta por Bonsing y col (1997) en su análisis de siete anticuerpos monoclonales frente a p53.

Este estudio comparativo pone de manifiesto la fiabilidad de ambas técnicas y la obtención de resultados similares respecto a la detección de la proteína p53 en tumores. No obstante, se consiguen resultados más precisos estudiando la proteína p53 con más de una técnica diagnóstica, ya que este hecho implica analizar simultáneamente material de la misma pieza tumoral sometidos a distinto proceso de conservación (formaldehído con posterior inclusión en parafina y criocongelación).

En los 27 FHM estudiados, hemos encontrado **dos** tumores con mutación del gen TP53 y **once** con expresión de la proteína p53.

Alteración del gen P53	Expresión de la proteína p53
1	-
1	1
-	10
7.41 %	40.7 %

En el tumor que presenta el polimorfismo ó mutación silente en el codón 213 no detectamos la proteína p53. Esto parece lógico puesto que no hay alteración de la proteína.

En el caso en que aparece la duplicación de 63 pares de bases, tampoco hay reacción inmunohistoquímica positiva. Puede haber varias explicaciones para ello: que dicha alteración no altere la estabilización de la proteína por no afectar a las regiones altamente conservadas, imprescindibles para su correcto funcionamiento, que esta duplicación produzca un error en el proceso de ensamblaje o “*splicing*” de la proteína y la altere funcionalmente (Taubert, 1995) o que por el contrario, no se sintetice nada de proteína. En uno de los dos casos de duplicación publicados se realiza un estudio inmunohistoquímico comparativo y tampoco se detecta la proteína p53 con los mismos anticuerpos que se utilizan en este trabajo (Taubert, 1995).

Por otro lado, se ha observado expresión de la proteína p53 en diez FHM sin que aparentemente exista alteración del gen TP53. Se pueden deducir varias explicaciones:

- Existencia de mutaciones en alguno de los exones no analizados.  
Las mutaciones en los exones 2-4 y 9-11 son menos estudiadas, ya que la sustitución de un aminoácido en estas regiones no afecta la capacidad de transactivación, mientras que en la región central de unión al DNA (exones 5-8) sí que se altera (Greenblatt, 1994). Sin embargo, Visscher y col estudian los exones 2-11 de P53 en carcinomas de mama y encuentran un 30% de casos con inmunohistoquímica positiva sin alteración del gen (Visscher, 1996).
- Existencia de mutaciones erróneas (*missense*) no detectadas en el *screening* inicial con las técnicas de PCR-SSCP.  
La técnica previa a la secuenciación que hemos utilizado es la detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP). En los trabajos dedicados al estudio de la sensibilidad de la SSCP en relación con distintas variables (Hayashi, 1992; Condie, 1993; Sheffield, 1993), se calculan valores de sensibilidad entre un 56-95% y se sugiere como variable crítica el tamaño del fragmento analizado: óptimo= 150 pares de bases. No obstante, Nakamori y col (1995) indican una sensibilidad mayor al 95% en fragmentos amplificados de ADN de 100-300 pares de bases, tal como los que hemos analizado nosotros.
- Estabilización de la proteína no mutada por proteínas celulares o aumento de su síntesis en respuesta a la lesión del ADN por agentes tóxicos.  
En estos casos, la proteína detectada es normal. Este hecho se ha demostrado en estudios realizados mediante técnicas de inmunoprecipitación con anticuerpos que reconocen únicamente una de las dos formas de la proteína (Wadayama, 1993). Los anticuerpos utilizados (DO-7 y PAb1801) en este estudio detectan tanto la forma normal como la mutada.

La mayoría de los estudios comparativos del gen y de la proteína p53 realizados sobre FHM y sarcomas obtienen resultados similares (Ver tabla 1). La variabilidad de las cifras expuestas está en relación con los distintos métodos utilizados por los autores: tipo de anticuerpo, valoración de la inmunorreactividad en relación con el porcentaje e intensidad de las células positivas y tipo histológico y grado tumoral (no mencionados en algunos trabajos).

TABLA 1. Revisión de la frecuencia de sobreexpresión de la proteína p53 en sarcomas y FHM mediante inmunohistoquímica y comparación de estos resultados con las alteraciones del gen TP53 en estos mismos tumores en diferentes trabajos.

Referencia	p53/sarcomas <sup>1</sup>	p53/FHM <sup>2</sup>	p53+/TP53- <sup>3</sup>	Anticuerpo <sup>4</sup>	Interpretación <sup>5</sup>
SOINI, 1992	9/22 (41) <sup>6</sup>	4/14 (29)	ND <sup>8</sup>	CM1	Cualquier positividad
ANDREASSEN, 1993	9/39 (23)	3/12 (25)	4/39 (10)	PAb1801	>5%
WADAYAMA, 1993	29/113 (25)	4/11 (36)	16/56 (28)	PAb421	>10%
CORDON-CARDO, 1994	56/211 (26)		13/73 (17.8)	PAb1801	>20%
DROBNJAK, 1994	44/174 (25)	3/16 (19)	ND	PAB1801	>20%
KAWAI, 1994	31/96 (32)	8/40 (20)	ND	RSP-53	>10%
LATRES, 1994	25/73 (34)	4/15 (26) <sup>7</sup>	16/73 (22)	PAb1801, PAb240	>20%
TAUBERT, 1995	14/32 (43)	21/30 (70)	20/62 (32)	DO7, CM1, PAb1801, PAb240, DO1	>10% con al menos dos AC
YANG, 1995		21/54 (39)	ND	DO7	Cualquier positividad
REID, 1996		8/52 (15)	6/52 (11)	DO7	>10%
WURL, 1997	115/198 (58)	30/37 (82)	ND	DO1	>10%

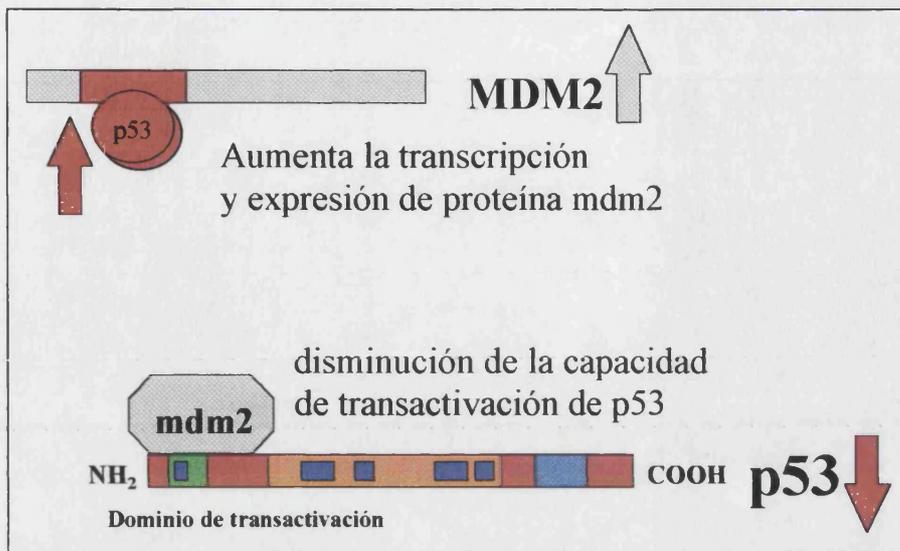
<sup>1</sup> Numero de casos con sobreexpresión de la proteína p53 sobre el total de sarcomas estudiados. <sup>2</sup> Numero de casos con sobreexpresión de la proteína p53 sobre el total de FHM estudiados. <sup>3</sup> Numero de casos (sarcomas y FHM) con expresión de p53 en ausencia de mutación del gen TP53. <sup>4</sup> Anticuerpo utilizado en cada trabajo. <sup>5</sup> Valoración inmunohistoquímica según el porcentaje de células inmunopositivas para p53. <sup>6</sup> Porcentajes en paréntesis. <sup>7</sup> FHM y fibrosarcomas. <sup>8</sup> No determinado.

Los resultados que se han obtenido son significativos en cuanto a la incidencia de las mutaciones del gen TP53 o presencia de su producto génico en los Fibrohistiocitomas Malignos. Las mutaciones puntuales son el mecanismo más frecuente implicado en la inactivación de p53 (Donehower, 1992; Levine, 1992).

No obstante, existen otras formas de inactivación de la proteína que igualmente implican la pérdida de su función supresora tumoral en ausencia de mutación. Se han implicado una serie de proteínas celulares y virales que son capaces de unirse a p53 e inactivarla (Oren, 1981; Sarnow, 1982). En este sentido está dirigido nuestro estudio paralelo de p53 con el gen y la proteína mdm2, ya que, al margen de las posibles mutaciones en los exones no estudiados o la falta de detección por SSCP, hemos encontrado un numero considerable de tumores sin mutación del gen P53 pero con expresión de la proteína.

## MDM2

Las proteínas p53 y mdm2 participan en un *feedback* de autorregulación (Wu, 1993; Chen, 1994). De esta forma, la expresión de MDM2 estaría regulada por los niveles de la forma normal de la proteína p53. La proteína mdm2 se une y modula la actividad transcripcional de la proteína p53 al unirse a su dominio de transactivación. Cualquier circunstancia que altere la relación p53/mdm2 podría provocar una disfunción de la autorregulación de ambas proteínas con la consiguiente cascada de eventos patológicos.



En nuestro trabajo hemos encontrado amplificación del gen MDM2 en **dos** FHM y expresión de la proteína en **trece**. Al igual que ocurría con la proteína p53, la valoración conjunta de ambas técnicas utilizadas en la detección de mdm2 (inmunohistoquímica y Western-blot) resulta más precisa. En este caso la inmunohistoquímica ha presentado mayor sensibilidad.

En las distintas series consultadas, la frecuencia de amplificación de MDM2 en FHM es muy variable, dependiendo de la metodología utilizada y del subtipo y grado histológico predominantes:

REFERENCIA	AMPLIFICACIÓN MDM2 EN FHM
Oliner, 1992	7 de 22 (30%)
Forus, 1993	0 de 20
Leach, 1993	2 de 52 (4%)
Florenes, 1994	0 de 20
Nakayama, 1995	3 de 20 (15%)
Berner, 1996	0 de 2
Reid, 1996	15 de 52 (30%)
Patterson, 1997	3 de 16 (20%)

La falta de correlación entre la amplificación del gen MDM2 y la sobreexpresión de la proteína mdm2 (2/13), como veremos posteriormente, podría explicarse por la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcionales.

Existen varios trabajos sobre sarcomas de partes blandas con resultados similares: Patterson y col (1997) identifican sobreexpresión de mdm2 en 21 sarcomas (21/39) y amplificación génica en solo 11. Cordon-Cardo y col (1994) demuestran sobreexpresión de mdm2 en 76 sarcomas de 207 analizados y amplificación de MDM2 en solo 11. En este último estudio, de los 11 sarcomas que presentaban amplificación génica, sólo 6 de ellos expresaron la proteína.

## P53 y MDM2

Como hemos visto hasta ahora, la pérdida de función de p53 puede ser debida a mutaciones del gen P53 o a su inactivación por proteínas virales o celulares. La detección de esta proteína p53 mutada o normal depende de su estabilización. ¿Cómo influye la pérdida de función de p53 en su estabilidad?

Recientemente se ha propuesto un modelo que podría explicar este interrogante (Blagosklonny, 1997). La estabilización de la proteína se debería a la disminución de su degradación que aumenta su vida media. Se ha demostrado que los niveles de la proteína p53 están exclusivamente regulados por su proceso de degradación y que la inhibición del complejo molecular degradativo permite la acumulación de p53 (Maki, 1996). Ante la lesión del DNA, la célula responde con un aumento de p53 disminuyendo su degradación, manteniendo de esta forma unos niveles y funcionalidad constantes. Este modelo propone trasladar este mecanismo de regulación a la pérdida de función de p53, ya sea por mutación o bien mediante inactivación por proteínas virales o celulares. De este modo, la célula ante la falta de función de p53 respondería con una disminución de su degradación. Se alcanzarían unos niveles mucho más elevados que en condiciones normales, ya que en este caso, el estímulo es mantenido.

En relación con el mecanismo de autorregulación ó *feedback* clásico, este modelo lo explicaría de la siguiente forma: p53 mediante su capacidad de activación transcripcional de otros genes, induce la producción de una serie de proteínas sensoras, que a su vez son capaces de estimular la degradación de p53. La pérdida de función de p53 implicaría la no inducción de estas proteínas y por lo tanto, la falta de degradación de p53 con el consiguiente aumento de sus niveles. Recientemente se ha implicado a mdm2 en el mecanismo de degradación de p53 (Haupt, 1997; Kubbutat, 1997). Puesto que mdm2 es activado transcripcionalmente por p53, podría ser una de las proteínas sensoras propuestas.

En el funcionamiento normal de una célula, los niveles endógenos de mdm2 mantendrían unos valores bajos de p53. De este modo, ante cualquier estímulo que active a p53, mdm2 controlaría la extensión y duración de la respuesta de p53. La alteración de esta interacción es suficiente para estabilizar a p53 y activar su respuesta, como demuestran Bottger y col al introducir una proteína pequeña capaz de bloquear eficazmente la interacción p53-mdm2 *in vitro* y observar una acumulación de p53 y un bloqueo del ciclo celular (Böttger, 1997).

El hecho de que la expresión de mdm2 regule la estabilidad de p53 puede explicar el aumento de la vida media de la proteína p53 mutada frecuentemente observada en tumores, ya que al ser transcripcionalmente inactiva, es incapaz de inducir la expresión de mdm2 responsable de su degradación (Haupt, 1997; Kubbutat, 1997).

Sin embargo, se ha visto que fibroblastos normales muestran una respuesta de p53 mantenida y aparentemente irreversible demostrada por los niveles aumentados de p53 tras lesión del DNA que no descienden posteriormente. Es interesante que en estas células se mantienen todas las características de una respuesta de p53 normal, es decir, aumento de la expresión de mdm2 y p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Es posible que la modificación de p53 y/o mdm2, por fosforilación por ejemplo (Guerra, 1997; Martinez, 1997; Mayo, 1997; Shieh, 1997), pueda proteger frente a la degradación inducida por mdm2 y de esta forma, mantener la respuesta de

p53 (Kubbutat, 1997). Esta serie de descubrimientos recientes respecto a la interacción p53-mdm2 son muy variables y dependen del tipo celular estudiado (Haupt, 1997).

### • Valoración conjunta de los resultados obtenidos en el estudio de p53 y mdm2 en FHM:

En nuestro estudio con 27 Fibrohistiocitomas hemos encontrado mutación del gen TP53 en dos tumores, de los cuales, uno de ellos se acompaña de sobreexpresión de la proteína p53, amplificación del gen MDM2 y sobreexpresión de la proteína mdm2. El otro tumor que muestra amplificación del gen MDM2, tiene sobreexpresión de ambas proteínas p53 y mdm2. En siete tumores se ha obtenido sobreexpresión de ambas proteínas sin alteración genética detectable. La sobreexpresión aislada de la proteína p53 se ha encontrado en dos tumores y de la proteína mdm2 en cuatro tumores.

VALORACIÓN DEL ESTUDIO DE P53 Y MDM2 EN FHM				
P53	p53	MDM2	mdm2	TOTAL
1				1
1	1	1	1	1
	1	1	1	1
	7		7	7
			4	4
	2			2
2	11	2	13	TOTAL

→ Abreviaturas: **P53**: Mutación del gen P53; **p53**: sobreexpresión de la proteína p53; **MDM2**: amplificación de MDM2; **mdm2**: sobreexpresión de la proteína mdm2.

• En los dos casos con el gen P53 mutado (FHM 184 y FHM 1116) no se observa amplificación o sobreexpresión de MDM2 en uno de ellos (duplicación). Este hecho es el más frecuentemente encontrado en las series de sarcomas estudiadas (Leach, 1993; Cordon-Cardo, 1994; Reid, 1996; Lonardo, 1997; Pellín, 1998) y establecen un mecanismo alternativo de inactivación de p53.

• Contrariamente, el FHM 571 presenta una mutación puntual del gen P53 junto con amplificación de MDM2 y el FHM 184 presenta amplificación de MDM2 y sobreexpresión de ambas proteínas: p53 y mdm2. Esta coexistencia raramente se observa aunque hay casos descritos. Florenes y col en un estudio de 68 sarcomas encuentran un Fibrohistiocitoma Maligno con mutación de P53 y aumento de MDM2-ARNm (Florenes, 1994). Pollock y col describen un sarcoma (no se especifica el tipo histológico) con mutación de P53 y amplificación de MDM2 (Pollock, 1997), al igual que Miller y col en su serie de 81 osteosarcomas (Miller, 1996). Lonardo y col describen un caso (osteosarcoma) similar al FHM 184 (Lonardo, 1997), así como Higashiyama y col en su estudio sobre tumores pulmonares (Higashiyama, 1997). Esta infrecuente combinación puede representar varios fenómenos implícitos: la actividad oncogénica del gen MDM2 independiente de su interacción con p53 (Sigalas, 1996; Piette, 1997), la estabilización y acumulación de p53 (normal o mutada) por los niveles elevados de MDM2 (Midgley, 1997) y la facilitación de amplificación génica tras la inactivación de p53.

• En siete tumores (25.9%) hemos encontrado sobreexpresión de ambas proteínas sin alteración génica (FHM 711, FHM 1047/1782, FHM 1615, FHM 1666, FHM 2091 y FHM 2802/3066). Resultados similares se han obtenido en las series estudiadas con sarcomas y otros tipos tumorales: 30% de 201 tumores de pulmón (Higashiyama, 1997), 10.6% de 207 sarcomas de partes blandas (Cordon-Cardo, 1994), 28% de 61 gliomas (Korkolopoulou, 1997), 12.9% de 31 carcinomas de mama (Günther, 1997), 51% de 41 tumores de pulmón (Gorgoulis, 1996), 18% de 87 tumores vesicales (Lianes, 1994). Dellas y col (1997) detectan co-expresión de p53 y mdm2 en un 32% de los carcinomas cervicales estudiados, demostrando que la expresión de mdm2 se asocia de forma significativa ( $p < 0.02$ ) a la acumulación de p53. Estos resultados apoyan la existencia de mecanismos biológicos de tumorigénesis y progresión tumoral relacionados con ambas proteínas.

Aunque los anticuerpos utilizados detectan tanto la forma normal como la mutada, podemos sugerir que, excepto en el FHM 2091 (no amplificación del exón ocho) y el FHM 2435 (SSCP alterada sin confirmación por secuenciación), la proteína p53 detectada en estos tumores estaría en su forma normal.

En un estudio realizado sobre líneas celulares derivadas de Rabdomiosarcomas (Keleti, 1996) se demuestran niveles elevados y aumento de la vida media de la forma normal de p53 en células no portadoras de mutaciones del gen P53. En estas células se evidencia co-localización de p53 y mdm2 y co-inmunoprecipitación de ambas, lo que implica su interacción física. En este mismo estudio se observan niveles elevados de proteína mdm2 y de ARNm en ausencia de amplificación del gen, sugiriendo un mecanismo transcripcional.

Landers y col (1994) describen un mecanismo postranscripcional asociado a un aumento de la traducción de la proteína, al identificar una línea celular derivada de coriocarcinoma humano con expresión de proteína mdm2 en ausencia de amplificación del gen MDM2, niveles elevados de RNAm o alteración de la estabilidad de la proteína mdm2. En estas mismas células encuentran niveles aumentados de p53 en su forma salvaje. Pollock y col obtienen similares resultados en sarcomas humanos (Pollock, 1997).

En una revisión sobre el tema de la interpretación de la inmunopositividad de p53 en tumores, Hall y Lane ponen de manifiesto la necesidad de especificar los parámetros técnicos e interpretativos utilizados a la hora de valorar las células p53-positivas en un tumor (Hall y Lane, 1997). En este sentido, los métodos de recuperación antigénica pueden detectar sobreexpresiones de p53 provocadas por una respuesta apropiada aunque aumentada por estímulos internos o externos. En este trabajo aunque se han utilizado métodos de recuperación antigénica se han realizado con controles negativos y positivos y la determinación de un tumor p53-positivo se ha establecido a partir de un 40% de células positivas y una intensidad de tinción moderada, criterios severos en relación con los utilizados por otros autores.

• En cuatro casos (FHM 857, FHM 1557, FHM 1775 y FHM 2853) solo se ha detectado la proteína mdm2. Expresión de mdm2 independiente de p53 se ha observado en tejidos normales o en líneas celulares (Mayo, 1996; Dazard, 1997) y se han descrito funciones alternativas de mdm2 p53-independientes con implicación de los dominios *N-terminal* y *C-terminal* (Sigalas, 1996). Paralelamente, se han observado mutaciones del gen MDM2 que estabilizan a la proteína, detectándose inmunohistoquímicamente. (Schlott, 1997). En un estudio realizado sobre 58 FHM de partes blandas con la técnica de CGH (Hibridación genómica comparativa) se observa amplificación de la región 12q13-14 en tan sólo el 5% de

ellos. Estos resultados sugieren que los oncogenes relacionados normalmente con este amplicón podrían activarse por mecanismos distintos a la amplificación como mutaciones puntuales, activación genética transcripcional o translocaciones cromosómicas (Larramendy, 1997).

MDM2 parece estar relacionado con la proliferación y transformación, no sólo a través de su capacidad de modular la actividad transcripcional de p53, sino también mediante funciones adicionales poco conocidas hasta ahora en donde podrían intervenir sus extremos *N-terminal* y *C-terminal* (Piette, 1997). Al margen de la posibilidad de problemas técnicos en la detección de la proteína p53, la expresión aislada de mdm2 puede ser debida a mecanismos independientes o a la alteración de la interacción de ambas proteínas; en ambas posibilidades podrían estar implicados otros genes relacionados con el ciclo celular y/o apoptosis. Por ejemplo, se ha demostrado que el extremo C-terminal de mdm2 está relacionado con la activación del gen promotor de la ciclina A y es capaz de unirse con el factor de transcripción TFIID in vivo (Leveillard, 1997).

- Por último, la sobreexpresión de la proteína p53 en dos tumores (**FHM 1569** y **FHM 1943**) podría deberse a su estabilización por distintas proteínas, ya sea de origen viral como celular o a diversos estímulos no identificados, existiendo siempre la posibilidad de una mutación no detectada por SSCP.

### •Implicaciones clinico-patológicas

Para el análisis estadístico de las diferentes variables estudiadas se han utilizado las curvas de supervivencia (método de Kaplan-Meier) y para la comparación de dos distribuciones de supervivencia separadas por algún criterio de los establecidos se ha utilizado la prueba de Mantel-Haenszel (Log Rank) del programa estadístico SPSS.

Debido al reducido número de tumores con alteración de los genes P53 y MDM2, no se ha podido establecer ninguna relación estadísticamente significativa relacionada con su pronóstico. Sin embargo, los tres tumores con mutación de P53 y/o amplificación de MDM2 presentaron recidivas locales, metástasis y supervivencia menor a 5 años. Estos resultados son concordantes con trabajos anteriores (Leach, 1993; Cordon-Cardo, 1994; Latres, 1994; Nakayama, 1995; Taubert, 1995) y sugieren un peor pronóstico en aquellos tumores con mutación de TP53 o amplificación de MDM2.

En relación con la sobreexpresión de ambas proteínas y la aparición de **recidiva local y/o metástasis**, no obtuvimos significación estadística valorando aisladamente la sobreexpresión de la proteína p53. Esta relación sí fue estadísticamente significativa con la sobreexpresión de mdm2 ó con la valoración conjunta de ambas proteínas ( $p=0,0693$ ). De igual modo observamos esta misma relación valorando tres grupos: tumores sin expresión de p53 y mdm2, tumores con expresión de una de las dos proteínas y tumores con expresión de ambas proteínas ( $p=0.0198$ ). La **supervivencia** fue más reducida en aquellos casos con sobreexpresión de ambas proteínas ( $P=0.0675$ ) ó con sobreexpresión de mdm2 ( $p=0.0505$ ), sin embargo, la valoración aislada de sobreexpresión de p53 no obtuvo valores significativos.

En varios estudios sobre sarcomas y/o Fibrohistiocitomas Malignos se obtienen resultados similares: Cordon-Cardo y col analizan 211 sarcomas y demuestran un peor pronóstico y un periodo de supervivencia más corto en aquellos tumores con sobreexpresión de p53 y mdm2 (Cordon-Cardo, 1994).

Aunque en la mayoría de las series de sarcomas estudiadas sí que existe correlación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de p53 y la supervivencia (Drobnjak, 1994; Kawai, 1994; Taubert, 1995), en las series que estudian únicamente Fibrohistiocitomas Malignos no obtienen resultados paralelos. De este modo, la falta de correlación encontrada en nuestro estudio está en concordancia con los hallazgos descritos por otros autores en sus series de FHM:

- Kawai y col estudian 96 sarcomas, y aunque sí que encuentran relación entre p53-inmunopositividad y peor pronóstico, en los 40 FHM estudiados esta relación no es estadísticamente significativa (Kawai, 1994).
- Yang y col analizan la sobreexpresión de p53 en 54 FHM y obtienen una correlación no lineal con la supervivencia (Yang, 1995).
- Reid y col en su trabajo con 52 FHM obtienen resultados similares (Reid, 1996).

Ante estos resultados se deduce que la sobreexpresión de la proteína p53, aunque es un fenómeno frecuente en los FHM, no parece tener implicaciones pronósticas, analizándola como un hecho aislado. Resulta interesante esta falta de correlación con la supervivencia en los FHM, en contraposición al resto de los sarcomas de partes blandas, donde sí que se encuentran valores estadísticamente significativos. Aunque las alteraciones en ambos genes y proteínas detectadas en los FHM mantienen características similares al resto de sarcomas de partes blandas, no ocurre lo mismo en relación con su valor pronóstico.

Respecto a la **edad** de aparición del tumor se observa una mayor frecuencia de inmunorreactividad frente a p53 o mdm2 en pacientes con menor edad, que es estadísticamente significativa en el caso de p53 (si tomamos un criterio de significatividad del 90%). La media de edad observada para la sobreexpresión de p53 fue 55.37 años y para mdm2, 61.81 años. Estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios si tenemos en cuenta los grupos de edades establecidos en el análisis estadístico (Kawai, 1994; Lonardo, 1997; Pellín, 1998).

Se observa una tendencia en la sobreexpresión de ambas proteínas en tumores con grados II y III de **diferenciación**, aunque no es estadísticamente significativa. A este respecto, los resultados descritos en trabajos con FHM y/o sarcomas son contradictorios: existen estudios con correlaciones significativas (Kawai, 1994; Latres, 1994), mientras que otros trabajos no encuentran relación con el grado tumoral (Taubert, 1995; Yang, 1995; Patterson, 1997).

Los resultados obtenidos en relación con el pronóstico indican la importancia de detectar co-expresiones de p53 y mdm2 en ausencia de alteraciones de ambos genes. En estos casos sería interesante el conocer la proporción de p53 unida a mdm2 para determinar si p53 se encuentra funcionalmente inactivada por mdm2. Si se consigue elucidar y manipular el mecanismo post-translacional que regula la formación de complejos p53-mdm2, podría restablecerse la actividad supresora tumoral en este tipo de tumores (Momand, 1996).

---

## **CONCLUSIONES**

1.- Estudiamos las alteraciones de los genes TP53 y MDM2 y de sus correspondientes proteínas en 27 Fibriohistiocitomas Malignos con el objetivo de contribuir a la caracterización biológica de este tipo tumoral y correlacionar clinico-patológicamente los resultados obtenidos. Los resultados obtenidos son: 2 casos con mutaciones del gen TP53, 11 casos con sobreexpresión de la proteína p53, 2 casos con amplificación de MDM2 y 13 casos con sobreexpresión de la proteína mdm2. La frecuencia de alteraciones moleculares es similar en ambos genes, mientras que la expresión de la proteína mdm2 es ligeramente superior a p53. El fenómeno mas frecuentemente encontrado ha sido la co-sobreexpresión de ambas proteínas y el menos hallado, la amplificación de MDM2 con mutación del gen P53.

2.- Las alteraciones del gen TP53 halladas en el presente trabajo han sido: una mutación puntual (G/C) situada en el codón 178 (His/Asp) del exón 5 y una duplicación de 63 pares de bases en el exón 6 del gen TP53 (codones 199-219) que no altera la pauta de lectura de la proteína, aunque incorpora 21 aminoácidos adicionales.

3.- En un FHM se demuestra amplificación de MDM2 y mutación de TP53 simultáneamente. Esta situación se ha confirmado tanto en el tumor original como en xenotransplantado en ratón atímico *nude*. La infrecuente combinación de amplificación del gen MDM2 junto con mutación del gen TP53 puede representar varios fenómenos implícitos: la actividad oncogénica del gen MDM2 independiente de su interacción con p53, la estabilización y acumulación de p53 por los niveles elevados de MDM2 y la facilitación de amplificación génica tras la inactivación de p53. El comportamiento clínico del tumor primario así como el comportamiento biológico de su homólogo xenotransplantado indican una mayor agresividad y un peor pronóstico.

4.- La presencia de la proteína p53 en células tumorales observada mediante técnicas inmunohistoquímicas o Western-blot no siempre va asociada con las alteraciones moleculares que se detectan en el gen TP53, tal como ocurre en estudios similares con otros tipos de tumor.

5.- La sobreexpresión aislada de la proteína mdm2 detectada inmunohistoquímicamente o mediante la técnica Western-blot en cuatro FHM con ausencia de amplificación génica puede indicar la existencia de mecanismos de regulación post-traduccionales o la estabilización de la proteína por posibles mutaciones del gen MDM2.

6.- En ocho de los diez FHM (80%) que presentaron expresión de la proteína p53 sin alteración genética demostrable se confirmó la presencia simultánea de la proteína mdm2. Esta coexpresión podría indicar la estabilización de p53 por interacción con la proteína mdm2.

7.- Los resultados obtenidos en relación con el pronóstico indican la importancia de detectar co-expresiones de p53 y mdm2 en FHM mediante técnicas inmunohistoquímicas en ausencia de alteraciones de ambos genes. En este trabajo se ha demostrado una relación estadísticamente significativa entre la detección simultánea de ambas proteínas y la aparición de recidiva local y/o metástasis y la reducción del período de supervivencia. Sin embargo, la valoración aislada de sobreexpresión de p53 no obtuvo valores significativos. La sobreexpresión de la proteína p53, aunque es un fenómeno frecuente en los FHM, no parece tener implicaciones pronósticas, analizándola como un hecho aislado.

8.- Los tres FHM con mutación del gen P53 y/o amplificación del gen MDM2 presentaron recidivas locales, metástasis y supervivencia menor a 5 años. Estos resultados no se han podido analizar estadísticamente debido al reducido número de tumores con dichas alteraciones genéticas. No obstante, esta clara tendencia a agravar el pronóstico ha sido descrita en numerosos estudios de sarcomas de partes blandas.

9.- No se ha demostrado una correlación estadísticamente significativa entre el grado tumoral y la sobreexpresión de las proteínas p53 y mdm2, aunque sí que se observa una tendencia de los tumores más indiferenciados (grados II y III) a expresar inmunofenotípicamente alguna de las dos proteínas.

10.- En nuestra serie de FHM se ha demostrado una mayor frecuencia de inmunorreactividad frente a p53 o mdm2 en pacientes con menor edad, que es estadísticamente significativa en el caso de p53. La media de edad observada para la sobreexpresión de p53 fue 55.37 años y para mdm2, 61.81 años.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Akerman M:** Malignant fibrous histiocytoma-the commonest soft tissue sarcoma or a nonexistent entity?. *Acta Orthop Scand Suppl*, 1997. 273: 41-46.
- Alguacil-Garcia A, Unni KK, Goellner JR:** Malignant fibrous histiocytoma: an ultrastructural study of six cases. *Am J Clin Pathol*, 1978. 69: 121-129.
- Andreassen A, Oyjord T, Hoving E, Holm R, Florenes VA, Nesland JM, Myklebost O, Hoie J, Bruland OS, Borresen AL, Fodstad O:** p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res*, 1993. 53: 468-71.
- Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, Manara MC, Maurici D, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Sottili S, Campanacci M:** Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *New Eng J Med*, 1995. 333: 1380-1385.
- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M:** mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J*, 1993. 12: 461-468.
- Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C:** A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev*, 1993. 7: 2565-2574.
- Bauer HC, Brosjo O, Brostrom LA, Nilsson OS, Reinholt FP, Tribukait B:** Growth and ploidy of human osteosarcomas xenografts in serial passage in nude mice. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1986. 22: 821-830.
- Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, Peacock J:** Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Genet*, 1985. 11: 505-509.
- Berner JM, Forus A, Elkahloun A, Meltzer PS, Fodstad O, Myklebost O:** Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. *Gen Chrom Cancer*, 1996. 7: 254-259.
- Beroud C, Verdier F, Soussi T:** p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res*, 1996. 24: 147-150.
- Binder SW, Said JW, Shintaku IP, Pinkus GS:** A histiocyte-specific marker in the diagnosis of malignant fibrous histiocytoma. Use of monoclonal antibody KP-1 (CD68). *Am J Clin Pathol*, 1992. 97: 759-63.
- Blagosklonny MV:** Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene*, 1997. 15: 1889-1893.
- Bohle RM, Brettreich S, Repp R, Borkhardt A, Kosmehl H, Altmannsberger HM:** Single somatic ras gene point mutation in soft tissue malignant fibrous histiocytoma. *Am J Pathol*, 1996. 148: 731-738.
- Bolaños P, Moreno S:** Papel de los proto-oncogénos y de los genes supresores tumorales en la regulación del ciclo de división celular. *Rev Cancer*, 1995. 9: 165-169

- Bonsing BA, Corver WE, Gorsira MCB, van Vliet M, Oud PS, Cornelisse CJ, Fleuren GJ:** Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry. *Cytometry*, 1997. 28: 11-24.
- Bos JL:** ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 1989. 49: 4682-4689.
- Böttger A, Böttger V, Sparks A, Liu W, Howard SF, Lane DP:** Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol*, 1997. 7: 860-869.
- Brinck U, Stachura J, Kellner S, Schauer A:** Prognostic relevance of Ki-67 antigen and c-myc oncoprotein in malignant fibrous histiocytoma. *Anticancer Res*, 1995. 15: 1915-1919.
- Brooks JJ:** The significance of double phenotypic patterns and markers in human sarcomas. A new model of mesenchymal differentiation. *Am J Pathol*, 1986. 125: 113-123.
- Brooks JSJ:** The spectrum of fibrohistiocytic tumours with special emphasis on malignant fibrous histiocytoma. *Curr Diagn Pathol*, 1994. 1: 3-12.
- Brostrom LA, Crnalic S, Lofvenberg R, Stenling R, Boquist L:** Structure, growth and cell proliferation of human osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma xenografts in serial transplantation in nude mice. *APMIS*, 1996. 104: 775-783.
- Brown DR, Deb S, Munoz RM, Subler MA, Deb:** The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein. *Mol Cell Biol*, 1993. 13: 6849-6857.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ:** Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, 1995. 377: 552-557.
- Calle O, Romero M, Yagüe J:** Aspectos biológicos y moleculares del oncogen/antioncogen p53. *Inmunología*, 1990. 9: 39-49.
- Carda Batalla C:** Heterotransplantes de tumores humanos en ratones atímicos. Tesis doctoral, Valencia. 1988.
- Chan HS, Haddad G, Thorner PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H, Ling V:** P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *New Eng J Med*, 1991. 325: 1608-1614.
- Chandrasekaran K, McFarland VW, Simmons DT, Dziadek M, Gurney EG, Mora PT:** Quantitation and characterization of a species-specific and embryo stage dependent 55 Kilodalton phosphoprotein also present in cells transformed by simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981. 78: 6953-6957.
- Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ, Vogelstein B, Kastan MB:** Interaction between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci*, 1994. 91: 2684-2688.

- Chen J, Marechal V, Levine AJ:** Mapping of the p53 and mdm2 interaction domains. *Mol Cell Biol*, 1993. 13: 4107-4114.
- Chen L, Marechal V, Moreau J, Levine AJ, Chen J:** Proteolytic cleavage of the mdm2 oncoprotein during apoptosis. *J Biol Chem*, 1997. 272: 22966-22973.
- Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J:** Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95: 195-200.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD:** Pavietich Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 1994. 265: 346-55.
- Choong PFM, Mandahl N, Mertens F, Willen H, Alvegard T, Kreicbergs A, Mitelman F, Rydholm A:** 19p+ Marker chromosome correlates with relapse in Malignant Fibrous Histiocytoma. *Gen Chrom Cancer*, 1996. 16: 88-93.
- Condie A, Eeles R, Borresen AL, Coles C, Cooper C, Prosser J:** Detection of point mutations in the p53 gene: comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques. *Hum Mutat*, 1993. 2: 58-66.
- Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen J, Brennan MF, Levine AJ:** Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res*, 1994. 54: 794-9.
- Corpron CA, Black CT, Raney RB, Pollock RE, Lally KP, Andrassy RJ:** Malignant fibrous histiocytoma in children. *J Pediatr Surg*, 1996. 31: 1080-1083.
- Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J:** Detection of a common feature in several human tumor cell lines: 53.000 dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981. 78: 41-45.
- Davis LG, Dibner MD, Battey JF:** Basic method in molecular biology. Editorial Elsevier Science Publishing Co. 1986.
- Dazard JE, Augias D, Neel H, Mils V, Marechal V, Basset-Séguin N, Piette J:** MDM2 protein is expressed in different layers of normal human skin. *Oncogene*, 1997. 14: 1123-1128.
- De Vries EM, Ricke DO, De Vries TN, Hartmann A, Blaszyk H, Liao D, Soussi T, Kovach JS, Sommer SS:** Database of mutations in the p53 and APC tumor suppressor genes designed to facilitate molecular epidemiological analyses. *Hum Mutat*, 1996. 7: 202-213.
- Dehner LP:** Malignant fibrous histiocytoma. Non specific morphology pattern, specific pathology entity, or both?. *Arch Pathol Lab Med*, 1988. 112: 236-237.
- DeLeo 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.

- Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Gudat F, Oberholzer M, Fleichter G, Moch H, Torhorst J:** Altered expression of mdm2 and its association with p53 protein status, tumor-cell-proliferation rate and prognosis in cervical neoplasia. *Int J Cancer Oncol*, 1997. 74: 421-425.
- Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH:** Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4 and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet Cell Genet*, 1994. 66: 72-74.
- Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B, Friend SH:** p53 function as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol*, 1990. 10: 5772-5781.
- Dippold WG, Jay G, DeLeo AB, Khoury G, Old LJ:** p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981. 78: 1695-1699.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ:** Gain of functions mutations in p53. *Nature Genetics*, 1993. 4: 42-45.
- Donehower IA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A:** Mice deficient for p53 are developmentally normal susceptible to spontaneous tumors. *Nature*, 1992. 356: 215-221.
- Dreinhofer KE, Akerman M, Willen H, Anderson C, Gustafson P, Rydholm A:** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in high-grade malignant fibrous histiocytoma: prognostic value in 48 patients. *Int J Cancer*, 1994. 59: 379-82.
- Drobnjak M, Latres E, Pollack D, Karpeh M, Dudas M, Woodruff JM, Brennan MF, Cordon-Cardo C:** Prognostic implications of p53 nuclear overexpression and high proliferation index of Ki-67 in adult soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst*, 1994. 86: 549-554.
- Editorial.** Genomic p53 genes immortalises. *Oncogene*, 1988. 2: 419-420.
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M:** Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature*, 1984. 312: 646-649.
- Elkahloun AG, Bittner M, Hoskins K, Gemmill R, Meltzer PS:** Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. *Gen Chrom Cancer*, 1996. 17: 205-214.
- Enjoji M, Hashimoto H, Tsuneyoshi M, Iwasaki H:** Malignant fibrous histiocytoma. A clinicopathologic study of 130 cases. *Acta Pathol Jpn*, 1980. 30: 727-741.
- Enoch T, Norbury C:** Cellular responses to DNA damage: cell cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci*, 1995. 20: 426-430.
- Enzinger FM, Weiss SW:** *Soft tissue tumors*, 3rd ed. St. Louis: CV Mosby, 1995. pp. 351-380.

- Erhard P, Tomaselli KJ, Cooper GM:** Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptosis proteases. *J Biol Chem*, 1997. 272: 15049-15052.
- Eriksson M, Hardell L, Berg NO, Moller T, Axelson O:** Soft tissue sarcomas and exposure to chemical substances: a case referent study. *Br J Indust Med*, 1981. 38: 27-32.
- Fakharzadeh SS, Trusko SP, and George DL:** Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J*, 1991. 10: 1565-1569.
- Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ:** Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol*, 1988. 8: 531-539.
- Fletcher C.D:** Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. *Am J Surg Pathol*, 1992. 16: 213-28.
- Florenes VA, Maelandsmo GM, Forus A, Andreassen A, Myklebost O, Fodstad O:** MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J Natl Cancer Inst*, 1994. 86: 1297-1335.
- Forus A, Florenes VA, Maelandsmo GM, Meltzer PS, Fodstad O, Myklebost O:** Mapping of amplification units in the q13-14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplicons do not include MDM2. *Cell Growth Differ*, 1993. 4: 1065-1070.
- Forus A, Florenes VA, Maelandsmo GM, Fodstad O, Myklebost O:** The protooncogene CHOP/GAD153, involved in growth arrest and DNA damage response, is amplified in a subset of human sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 1994. 78: 165-171.
- Freedman DA, Epstein CB, Roth JC, Levine AJ:** A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Molec Med*, 1997. 3: 248-259.
- Fu YS, Gabbiani G, Kaye GI, Lattes R:** Malignant soft tissue tumors of probable histiocytic origin (malignant fibrous histiocytomas): general consideration and tissue culture studies. *Cancer*, 1975. 35: 176-198.
- Gaffney E.F, Dervan PA, Fletcher CDM:** Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adulthood. Analysis of 11 cases with definition of diagnostic criteria. *Am J Surg Pathol*, 1993. 17: 601-609.
- Genberg M, Mark J, Hakelius L, Ericsson J, Nister M:** Origin and relationship between different cell types in malignant fibrous histiocytoma. *Am J Pathol*, 1989. 135: 1185-1196.
- Gonzalez-Vitale JC, Slaviv RE, McQueen DJ:** Radiation-induced intracranial malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, 1976. 37: 2960-2964.

**Gorgoulis VG, Zoumpourlis V, Rassidakis GZ, Karameris A, Rassidakis AN, Spandidos DA, Kittas C:** A molecular and immunohistochemical study of the MDM2 protein isoforms and p53 gene product in bronchogenic carcinoma. *J Pathol*, 1996. 180: 129-137.

**Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ:** Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 1996. 379: 88-91.

**Green MR:** When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell*, 1989. 56: 1-3.

**Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC:** Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994. 54: 4855-4878.

**Greenblatt MS, Grollman P, Harris CC:** Deletions and insertions in the p53 tumor suppressor gene in human cancers: confirmation of the DNA Polymerase Slippage/Misalignment model. *Cancer Res*, 1996. 56: 2130-2136.

**Guerra B, Götz C, Wagner P, Monternarh M, Issinger O:** The carboxy terminus of p53 mimics the polysine of protein kinase CK2-catalyzed MDM2 phosphorylation. *Oncogene*, 1997. 14: 2683-2688.

**Günther T, Schneider-Stock R, Rys J, Niezabitowski A, Roessner A:** p53 gene mutations and expression of p53 and mdm2 proteins in invasive breast carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997. 123: 388-394.

**Gurney EG, Harrison RO, Fenno J:** Monoclonal antibodies against simian virus 40 T-antigens: evidence for distinct subclasses of large T-antigen and similarities among nonviral T-antigens. *J Virol*, 1980. 34: 752-763.

**Haines DS, Landers JE, Engle LJ, George DL:** Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol Cell Biol*, 1994. 14: 1171-1178.

**Hall PA and Lane DP:** p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?-revisited!. *J Pathol*, 1994. 172:1-4.

**Hall PA, Meek D, Lane DP:** p53-integrating the complexity. *J Pathol*, 1996. 180: 1-5

**Hann BC, Lane DP:** The dominating effect of mutant p53. *Nature Genetics*, 1995. 9: 221-222.

**Harris CC, Hollstein M:** Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl J Med*, 1993. 329: 1318-1327.

**Harris CC:** The 1995 Walter Hubert Lecture-molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumour-suppressor gene. *British J Cancer*, 1996. 73: 261-269.

**Hartwell LH, Weinert, T:** Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989. 246: 629-634.

**Harvey M, Vogel H, Morris D, Bradley A, Bernstein A, Donehower LA:** A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nature Genetics*, 1995. 9: 305-311.

**Hashimoto H, Daimaru Y, Tsuneyoshi M, Enjoji M:** Soft tissue sarcoma with additional anaplastic components: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 27 cases. *Cancer*, 1990. 66: 1578-1589.

**Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M:** mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997. 387: 296-299.

**Hayashi K:** PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl*. 1992. 9: 73-79.

**Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S, Takami K, Nishisho I:** MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer*, 1997. 75: 1302-1308.

**Hinds P, Finlay C, Lavine AJ:** Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol*, 1989. 63: 739-746.

**Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B, Levine AJ:** Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Diff*, 1990. 1: 571-580.

**Hirose T, Kudo E, Hasegawa T, Abe J, Hizawa K:** Expression of intermediate filaments in malignant fibrous histiocytomas. *Hum Pathol*, 1989. 20: 871.

**Hoffman MA, Dickersen GR:** Malignant fibrous histiocytoma: an ultrastructural study of eleven cases. *Hum Pathol*, 1983. 14: 913-923.

**Hollowood K, Fletcher CDM:** Malignant fibrous histiocytoma: morphologic pattern or pathologic entity?. *Seminars Diag Pathol*, 1995. 12: 210-220.

**Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC:** p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991. 253: 49-53.

**Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC:** Database of p53 gene somatic mutations in human tumours and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22: 3547-3551.

**Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC:** Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: update compilation. *Nucleic Acids Res*, 1996. 24: 141-146.

- Hsu S, Raine L, Fanger H:** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison of ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *Histochem Cytochem*, 1981. 29: 577-580.
- Hung J, Anderson R:** p53: function, mutations and sarcomas. *Acta Orthop Scand*, 1997. (Suppl 273): 68-73.
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP:** Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, 1992. 71: 875-886.
- Iniesta P:** Introducción a los métodos utilizados en biología molecular. *Rev Cancer*, 1995. 9: 79-84.
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM:** Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 1986. 320: 84-85.
- Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields S:** Use of the 2-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, 1993. 8: 1693-1696.
- Iwasaki H, Isayama T, Johzaki H, Kikuchi M:** Malignant fibrous histiocytoma: evidence of perivascular mesenchymal cell origin, immunohistochemical studies with monoclonal anti-MFH antibodies. *Am J Pathol*, 1987. 128: 528-537.
- Iwasaki H, Yoshitake K, Ohjimi Y, Kikuchi M, Isayama T, Yoh S, Shinohara N, Enjoji M:** Malignant fibrous histiocytoma. Proliferative compartment and heterogeneity of "histiocytic" cells. *Am J Surg Pathol*, 1992. 16: 7-35-745.
- Jankowski SA, Mitchell DS, Smith SH, Trent JM, Meltzer PS:** SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. *Oncogene*, 1994. 9: 1205-11.
- Jankowski SA, De Jong P, Meltzer PS:** Genomic structure of SAS, a member of the transmembrane superfamily amplified in human sarcomas. *Genomics*, 1995. 25: 501-506.
- Jay G, Khoury G, DeLeo AB, Dippold WG, Old LJ:** p53 transformation-related protein: detection of an associated phosphotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981. 78: 2932-2936.
- Jenkins JR, Rudge K, Currie GA:** Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, 1984. 312: 651-654.
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A:** Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, 1995. 378: 206-208.
- Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M:** Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene*, 1993. 8: 3411-3416.

**Kapadia GJ, Paul BD, Chung EB, Ghosh B, Pradhan SN:** Carcinogenicity of *Camelia sinesis* (tea) and some tannin-containing fold medicinal herbs administered subcutaneously in rats. *J Natl Cancer Inst*, 1976. 57: 207-211.

**Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Kato T, Takeya M, Takagi K, Takahashi K:** Chemical induced transplantable malignant fibrous histiocytoma of the rat: analyses with immunohistochemistry, immunoelectron microscopy and (<sup>3</sup>H)thymidine autoradiography. *Lab Invest*, 1990. 62: 635-645.

**Kastan MB, Canman CE, and Leonard CJ:** P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 1995. 14: 3-15.

**Kawai A, Noguchi M, Beppu Y, Yokoyama R, Mukai K, Hirohashi S, Inoue H, Fukuma H:** Nuclear immunoreaction of p53 protein in soft tissue sarcomas. A possible prognostic factor. *Cancer*, 1994. 73: 2499-2505.

**Kearney MM, Soule EH, Ivins JC:** Malignant fibrous histiocytoma. A retrospective study of 167 cases. *Cancer*, 1980. 45: 167-178.

**Keleti J, Quezado MM, Abaza MM, Raffeld M, Tsokos M:** The MDM2 oncoprotein is overexpressed in rhabdomyosarcoma cell lines and stabilizes wild-type p53 protein. *Am J Pathol*, 1996. 149: 143-51.

**Kempson RL, Kyriakos M:** Fibroxanthosarcoma of the soft tissue. A type of malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, 1972. 29: 961-976.

**Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B:** Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*, 1991. 252: 1708-1711.

**Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT:** Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res*, 1993. 53: 5535-5541.

**Kinzler KW, Vogelstein B:** Life (and death) in a malignant tumor. *Nature*, 1996. 379: 19-20.

**Klindblom LG Jacobsen GK, Jacobsen M:** Immunohistochemical investigations of tumours of supposed fibroblastic-histiocytic origin. *Hum Pathol*, 1982. 13: 834-839.

**Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kouzelis K, Hadjiyannakis M, Priftis A, Stamoulis G, Seretis A, Thomas-Tsagli E:** MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer*, 1997. 75: 1269-1278.

**Koshlan DE:** Molecule of the year. *Science* 1993. 262: 1953

**Kovar H, Auinger A, Jug G, Aryee D, Zoubek A, Salzer-Kuntschik M, Gadner H:** Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in Ewing tumours. *Oncogene*, 1993. 8: 2683-2690.

- Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH:** Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature*, 1997. 387: 299-303.
- Landers JE, Haines DS, Strauss JF, George DL:** Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells. *Oncogene*, 1994. 9: 2745-2750.
- Lane DP, Crawford LV:** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979. 278: 261-263.
- Lane DP, Benchimol S:** p53: oncogene or antioncogene?. *Gene Develop*, 1990. 4: 1-8.
- Lane DP:** p53, gardian of the genome. *Nature*, 1992. 358: 15-16.
- Lane DP:** The regulation of p53 function: Steiner Award Lature. *Int J Cancer*, 1994. 57: 623-627.
- Larramendy ML, Tarkkanen M, Blomqvist C, Virolainen M, Wiklund T, Asko-Seljavaara S, Elomaa I, Knuutila S:** Comparative genomic hybridization of malignant fibrous histiocytoma reveals a novel prognostic marker. *Am J Pathol*, 1997. 151: 1153-1161.
- Latres E, Drobnjak M, Pollack D, Oliva MR, Ramos M, Karpeh M, Wooddruff JM, Cordon-Cardo C:** Chromosome 17 abnormalities and TP53 mutations in adult soft tissue sarcomas. *Am J Pathol*, 1994. 145: 345-355.
- Le Doussal V, Coindre JM, Leroux A, Hacene K, Terrier P, Bui NB, Bonichon F, Collin F, Mandard AM, Contesso G:** Prognostic factors for patients with localized primary malignant fibrous histiocytoma: a multicenter study of 216 patients with multivariate analysis. *Cancer*, 1996. 77: 1823-30.
- Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B:** P53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res*, 1993. 15: 2231-2234.
- Leader M, Patel J, Collins M, Henry K:** Anti-alpha 1-antichymotrypsin staining of 194 sarcomas, 38 carcinomas and 17 malignant melanomas. Its lack of specificity as a tumor marker. *Am J Surg Pathol*, 1987. 11: 133-139.
- Leveillard T, Wasylyk B:** The MDM2 C-terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter. *J Biol Chem*, 1997. 272: 30651-30661.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA:** The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 1991. 351: 453-456.
- Levine AJ:** The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 1992. 326: 1350-1352.
- Lianes P, Orlow I, Zhang Z, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C:** Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1994. 86: 1325-1330.

- Linzer DIH, Levine AJ:** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 1979. 17: 43-52.
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD:** Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*, 1979. 17: 923-935.
- Llombart-Bosch A, Carda C, Boix J, Pellin A, Peydro-Olaya A:** Value of nude mice xenografts in the expression of cell heterogeneity of human sarcomas of bone and soft tissue. *Path Res Pract*, 1988. 183: 683-692.
- Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M:** p53 y MDM2 alterations in osteosarcomas. *Cancer*, 1997. 79: 1541-1547.
- Luethy JD, Fargnoli J, Park JS, Fornace AJ Jr, Holbrook NJ:** Isolation and characterization of the hamster gadd153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA. *J Biol Chem*, 1990. 265: 16521-16526.
- Luka J, Jornvall H, Klein G:** Purification and biochemical characterization of the Epstein-Barr virus determined nuclear antigen and an association protein with a 53.000 dalton subunit. *J Virol*, 1980. 35: 592-602.
- Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM:** *In vivo* ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res*, 1996. 56: 2649-2654.
- Mandahl N, Heim S, Willen H, Rydholm A, Eneroth M, Nilbert M, Kreicbergs A, Mandahl N:** Cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. *Adv Cancer Res*, 1996. 69: 63-99.
- Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, Bevilacqua G:** mdm2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Diagn Mol Pathol*, 1995. 4: 93-97.
- Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ:** The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol*, 1994. 14: 7414-7420.
- Martin K, Trouche D, Hagemeier C, Sorensen TS, La-Thangue NB, Kouzarides T:** Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature*, 1995. 375: 691-4.
- Martinez JD, Craven MT, Joseloff E, Milczarek, Bowden GT:** Regulation of DNA binding and transactivation in p53 nuclear localization and phosphorylation. *Oncogene*, 1997. 14: 2511-2520.
- Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S:** Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*, 1984. 3: p. 3257-3262.

**Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV:** Primary structure polymorphism at aminoacid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*, 1987. 7: 961-963.

**Mayo LD, Berberich SJ:** Wild-type p53 protein is unable to activate the mdm-2 gene during F9 cell differentiation. *Oncogene* 1996. 13: 2315-232.

**Mayo LD, Turchi JJ, Berberich SJ:** Mdm2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res*, 1997. 57: 5013-5016.

**McBride OW, Merry D, Givol D:** Human p53 cellular tumor antigen is on chromosome 17p13. (Abstract) *Cytogenet Cell Genet*, 1985. 40: 694-695.

**McBride OW, Merry D, Givol D:** The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Nat Acad Sci USA*, 1986. 83: 130-134.

**McCormick F, Harlow E:** Association of a murine 53.000 dalton phosphoprotein with simian virus 40 large T antigen in transformed cells. *J Virol*, 1980. 34: 213-224.

**Meister P, Nathrath W:** Immunohistochemical markers of histiocytic tumors. *Hum Pathol*, 1980. 11: 300-306.

**Meister P:** Malignant fibrous histiocytoma: histomorphological pattern or tumour type. *Path Res Pract*, 1996. 192: 877-881.

**Meltzer PS, Jankowski SA, Dal-Cin P, Sandberg AA, Paz IB, Coccia MA:** Identification and cloning of a novel amplified DNA sequence in human malignant fibrous histiocytoma derived from a region of chromosome 12 frequently rearranged in soft tissue tumors. *Cell Growth Differ*, 1991. 2: 495-501.

**Mercer WE, Nelson D, DeLeo AB, Old LJ, Baserga R:** Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982. 79: 6309-6312.

**Mercer WE, Avignolo C, Baserga R:** Role of the protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Mol Cell Biol*, 1984. 4: 276-281.

**Michael RH, Dorfman HD:** Malignant fibrous histiocytoma associated with bone infarcts. *Clin Orthop*, 1976. 118: 180-184.

**Midgley CA, Lane DP:** p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene*, 1997. 15: 1179-1189.

**Miettinen M, Soini Y:** Malignant fibrous histiocytoma: heterogeneous patterns of intermediate filament proteins by immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*, 1989. 113: 1363-1366.

**Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP:** Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996. 122: 559-565.

- Miller CW, Aslo A, Won A, Tan-M, Lampkin B, Koeffler HP:** Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature*, 1986. 319: 783-784.
- Mirra JM, Gold RH, Mariafote R:** Malignant (fibrous) histiocytoma arising in association with a bone infarct in sickle cell disease: coincidence or cause-and-effect?. *Cancer*, 1977. 39: 186-190.
- Mitchell EL, White GR, Santibanez-Koref MF, Varley JM, Heighway J:** Mapping of gene loci in the q13-q15 region of chromosome 12. *Chromosome Res*, 1995. 3: 261-262.
- Mitelman F:** Characteristic karyotypic anomalies identify subtypes of malignant fibrous histiocytoma. *Genes Chrom Cancer*, 1989. 1: 9-14.
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD, Gazdar AF:** p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*, 1992. 7:171-180.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ:** The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 1992. 69: 1237-1245.
- Momand J, Zambetti G:** Analysis of the proportion of p53 bound to mdm2 in cells with defined growth characteristics. *Oncogene*, 1996. 12: 2279-2289.
- Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G:** Rescue of early embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, 1995. 378: 203-206.
- Montes de Oca Luna R, Tabor AD, Eberspaecher H, Hulboy D, Worth LL, Colman MS, Finlay CA, Lozano G:** The organization and expression of the mdm2 gene. *Genomics*, 1996. 33: 352-357.
- Mora PT, Chandrasekaran K, McFarland VW:** An embryo protein induced by SV40 virus transformation of mouse cells. *Nature*, 1980. 288: 722-724.
- Mullis KB and Faloona FA:** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. 155: 335-350.
- Murray A:** Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 1992. 359: 599-604.
- Nakamori S, Yashima K, Murakami Y, Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Yaegashi S, Konishi Y, Sekiya T:** Association of p53 gene mutations with short survival in pancreatic adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 1995: 86:174-181.
- Nakayama T, Toguchida J, Wadayama B, Kanoe H, Kotoura Y, Sasaki M:** MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1995, 64: 342-346.

- Nemes Z, Thomazy V:** Factor XIIIa and the classic histiocytic markers in malignant fibrous histiocytoma: a comparative immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 1988. 19: 822-826.
- Nilbert M, Mandahl N, Aman P, Rydholm A, Mitelman F:** No rearrangements of the CHOP gene in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1994. 72: 155-6.
- Nilbert M, Rydholm A, Willen H, Mitelman F, Mandahl N:** MDM2 gene amplification correlates with ring chromosomes in soft tissue tumors. *Genes Chromosom Cancer*, 1994. 9: 261-265.
- Nilbert M, Rydholm A, Mitelman F, Meltzer PS, Mandahl N:** Characterization of the 12q13-15 amplicon in soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995. 83: 32-36.
- Nowell PC:** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976. 194: 23-28.
- O'Brien JE, Stout AP:** Malignant fibrous xanthomas. *Cancer*, 1964. 17: 1445-1455.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B:** Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 1992. 358: 80-86.
- Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B:** Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 1993. 362: 857-60.
- Olson DC, Marechal V, Momand J, Chen J, Romocki C, Levine AJ:** Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene*, 1993. 8: 2353-2360.
- Oren M, Maltzman W, Levine AJ:** Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol*, 1981. 1: 101-110.
- Orndal C, Rydholm A, Willen H, Mitelman F, Mandahl N:** Cytogenetic intratumor heterogeneity in soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 1994. 78: 127-137.
- Ozello L, Stout AP, Murray MR:** Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. *Cancer*, 1963. 16: 331-344.
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V:** Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature*, 1984. 312: 649-651.
- Park JS, Luethy JD, Wang MG, Fargnoli J, Fornace Jr AJ, McBride OW, Holbrook NJ:** Isolation, characterization and chromosomal localization of the human GADD153 gene. *Gene*, 1992. 116: 259-267.
- Patterson H, Gill S, Fisher C, Law MG, Jayatilake H, Fletcher CDM, Thomas M, Grimer R, Gusterson BA, Cooper CS:** Abnormalities of the p53 MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas. *Br J Cancer*, 1994. 69: 1052-1058.

**Patterson H, Barnes D, Gill S, Spicer J, Fisher C, Thomas M, Grimer R, Fletcher C, Gusterson B, Cooper C:** Amplification and over-expression of the MDM2 gene in human soft tissue tumours. *Sarcoma*, 1997. 1: 17-22.

**Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO:** The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spot. *Genes Dev*, 1993. 7: 2556-2564.

**Pedeutour F, Suijkerbuijk RF, Forus A, Van Gaal J, Van de Klundert W, Coindre JM, Nicolo G, Collin F, Van Haelst U, Huffermann K, et al:** Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma. *Gen Chromosom Cancer*, 1994. 10: 85-94.

**Pellin A, Boix-Ferrero J, Carpio D, López-Terrada D, Carda C, Navarro S, Peydró-Olaya A, Triche TJ, Llombart-Bosch A:** Molecular alterations of the RB1, TP53 and MDM2 genes in primary and xenografted human osteosarcomas. *Diag Mol Pathol*, 1998 (en prensa).

**Perez-Bacete MJ, Llombart-Bosch A:** FU-3 monoclonal antibody: a specific marker for malignant fibrous histiocytoma? An analysis of 32 malignant soft tissue and bone sarcomas. *Virchows Arch*, 1994. 424: 243-247.

**Pezzi CM, Rawlings MS Jr, Esgro JJ, Pollock RE, Romsdahl MM:** Prognostic factors in 227 patients with malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, 1992. 69: 2098-103.

**Piette J, Neel H, Marechal V:** Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, 1997. 15: 1001-1010.

**Pollock RE, Lang A, El-Naggar AK, Radinsky R, Hung MC:** Enhanced MDM2 oncoprotein expression in soft tissue sarcoma: several possible regulatory mechanisms. *Sarcoma*, 1997. 1: 23-29.

**Povlsen CO, Visfeldt J, Rygaard J, Jensen G:** Growth patterns and chromosome constitutions of human malignant tumours after long-term serial transplantation in nude mice. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A*, 1975. 83: 709-716.

**Pritchard DJ, Reiman HM, Turcotte RE, Ilstrup DM:** Malignant fibrous histiocytoma of the soft tissue of the trunk and extremities. *Clin Orthop*, 1993. 289: 58-65.

**Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Aaronson SA, Barbacid M:** Oncogenes in solid human tumours. *Nature*, 1982. 300: 539-542.

**Rabbitts TH:** Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 1994. 372: 143-149.

**Reich N, Oren M, Levine AJ:** Two distinct mechanisms regulate levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol*, 1983. 3: 2143-2150.

**Reid AH, Tsai MM, Venzon DJ, Wright CF, Lack EE, O'Leary TJM:** DM2 amplification, P53 mutation, and accumulation of the P53 gene product in malignant fibrous histiocytoma. *Diag Mol Pathol*, 1996. 5: 65-73.

- Reinke V, Lozano G:** The p53 targets mdm2 and Fas are not required as mediators of apoptosis in vivo. *Oncogene*, 1997. 15: 1527-1534.
- Roberts WM, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ, Look AT:** Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res*, 1989. 49: 5407-5413.
- Roholl PJ, Kleyne J, Elbers J:** Characterization of tumor cells in malignant fibrous histiocytoma and related fibrohistiocytic tumors. *Hum Pathol*, 1988. 19: 74-78.
- Roholl PJ, Elbers HR, Prinsen I, Claessens JA, van Unnik JA:** Distribution of actin isoforms in sarcomas: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 1990. 21: 1269-1274.
- Roholl PJ, Prinsen I, Rademakers LP, Hsu SM, Van-Unnik JA:** Two cell lines with epithelial cell-like characteristics established from malignant fibrous histiocytomas. *Cancer*, 1991. 68: 1963-72.
- Ron D, Habener JF:** CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, 1992. 6: 439-453.
- Rosser B, Willen H, Gustafson P, Alvegard TA, Rydholm A:** Malignant fibrous histiocytoma of soft tissue. A population-based epidemiologic and prognostic study of 137 patients. *Cancer*, 1991. 67: 499-505.
- Rosenberg AE, O'Connell JX, Dickersin GR, Bhan AK:** Expression of epithelial markers in malignant fibrous histiocytoma of the musculoskeletal system: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Hum Pathol*, 1993. 24: 284-93.
- Rotter V, Boss MA, Baltimore D:** Increased concentration of an apparently identical cellular protein in cells transformed by either Abelson murine leukemia virus or other transforming agents. *J Virol*, 1981. 38: 336-346.
- Rovinski B, Benchimol S:** Immortalization of rat embryo fibroblast by the cellular p53 oncogene. *Oncogene*, 1988. 2: 445-452.
- Sager R:** Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, 1989. 246: 1406-1412.
- Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ:** Adenovirus E1b-58Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 Kd cellular protein in transformed cells. *Cell*, 1982. 28: 387-394.
- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH:** Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 1983. 305: 245-248.
- Schlott T, Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M:** Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. *J Pathol*, 1997. 182: 54-61.

- Sharkey FE, Fogh J:** Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer*, 1984. 3: 341-360.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V:** Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol*, 1990. 10: 6565-6577.
- Sheffield VC, Fishman GA, Beck JS, Kimura AE, Stone EM:** Identification of novel rhodopsin mutations associated with retinitis pigmentosa by GC-clamped denaturing gradient gel electrophoresis. *Am J Hum Genet*, 1993. 49: 699-706.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C:** DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 1997. 91: 325-334.
- Shinjo K:** Analysis of prognostic factors and chemotherapy of malignant fibrous histiocytoma of soft tissue: a preliminary report. *Jpn J Clin Oncol*, 1994. 24: 154-9.
- Shih C, Shilo BZ, Goldfarb MP, Dannenberg A, Weinberg RA:** Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979. 76: 5714-5718.
- Shirasuna K, Sukiyaama M, Miyazaki T:** Establishment and characterization of neoplastic cells from a malignant fibrous histiocytoma: a possible stem cell line. *Cancer*, 1985. 55: 2521-2532.
- Sigalas I, Calvert AH, Anderson JJ, Neal DE, Lunec J:** Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med*, 1996. 2: 912-91.
- Smith SH, Weiss SW, Jankowski SA, Coccia MA, Meltzer PS:** SAS amplification in soft tissue sarcomas. *Cancer Res*, 1992. 52: 3746-3749.
- Snover DC, Sumner HW, Dehner LP:** Variability of histologic pattern in recurrent soft tissue sarcomas originally diagnosed as liposarcoma. *Cancer*, 1982. 49: 1005-1015.
- Soini Y, Miettinen M:** Immunohistochemistry of markers of histiomonocytic cells in malignant fibrous histiocytomas: a monoclonal antibody study. *Pathol Res Pract*, 1990. 186: 759-767.
- Soini Y, Vahakangas K, Nuorva K, Kamel D, Lane DP, Paakko P:** P53 immunohistochemistry in malignant fibrous histiocytoma and other mesenchymal tumours. *J. Pathol*, 1992. 168: 29-33.
- Soule EH, Enriquez P:** Atypical fibrous histiocytoma, malignant fibrous histiocytoma, malignant histiocytoma and epithelioid sarcoma. A comparative study of 65 tumors. *Cancer*, 1974. 30: 128-143.
- Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK:** DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 1976. 260: 170-173

**Stein U, Wunderlich V, Haensch W, Schmidt-Peter P:** Expression of the *mdr1* gene in bone and soft tissue sarcomas of adult patients. *Eur. J Cancer*, 1993. 29: 1979-1981.

**Strauchen J.A, Dimitriu-Bona A:** Malignant fibrous histiocytoma: expression of monocyte/macrophage differentiation antigens detected with monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, 1986. 124: 303-309.

**Sugiura H, Sato K, Yamamura S, Nagasaka T, Takahashi M, Katagiri H:** Proliferating cell nuclear antigen staining as a prognostic indicator in soft tissue malignant fibrous histiocytoma. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1995. 114: 248-52.

**Taetle R:** Use of nude mice xenografts as preclinical drug screens. *Cancer*, 1986. 58: 1969-1978.

**Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Kato T, Okabe H, Takahashi K:** Production of monocyte chemoattractant protein-1 by malignant fibrous histiocytoma: relation to the origin of histiocyte-like cells. *Exp Mol Pathol*, 1991. 54: 61-71.

**Takeya M, Yamashiro S, Yoshimura T, Takahashi K:** Immunophenotypic and immunoelectron microscopic characterization of major constituent cells in malignant fibrous histiocytoma using human cell lines and their transplanted tumors in immunodeficient mice. *Lab Invest*, 1995. 72: 679-688.

**Taubert H, Wurl P, Meye A, Berger D, Thamm B, Neumann K, Hinze R, Schmidt H, Rath FW:** Molecular and immunohistochemical p53 status in liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma: identification of seven new mutations for soft tissue sarcomas. *Cancer*, 1995. 76: 1187-96.

**Teoh G, Urashima M, Chauhan D, DeCaprio A, Treon SP, Schlossman RL, Anderson C:** MDM2 protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood*, 1997. 90: 1982-1992.

**Tetu B, Lacasse B, Bouchard HL, Lagace R, Huot J, Landry J:** Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer-Res*, 1992. 52: 2325-8.

**Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, Yamamuro T, Kotoura Y, Sasaki MS, Little JB, et al :** Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res*, 1992. 52: 6194-6199.

**Tooze J:** DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1980.

**Tsuchiya T, Takahashi K, Takeya M, Hosokawa Y, Hattori T, Takagi K:** Immunohistochemical, quantitative immunoelectron microscopic, and DNA cytofluorometric characterization of chemically induced rat malignant fibrous histiocytoma. *J Am Pathol*, 1993. 143: 431-445.

**Turc-Carel C, Limon J, Dal Cin P, Rao U, Karakousis C, Sandberg AA:** Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(q13→1) in myxoid liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 1986. 23: 291-299.

**Unger T, Nau MM, Segal S, Minna JD:** p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J*, 1992. 11: 1383-1389.

**vanTuinen P, Ledbetter DH:** Construction and utilization of a detailed somatic cell hybrid mapping panel for human chromosome 17: localization of an anonymous clone to the critical region of Miller-Dieker syndrome, deletion 17p13. (Abstract) *Cytogenet Cell Genet*, 1987. 46: 708-709.

**Vera-Sempere FJ, Alemany P, Perez-Bacete M, Llombart-Bosch A:** Fibrohistiocitoma maligno (FHM). Estudio óptico e inmunohistoquímico. *Rev Senologia y Patol Mam*, 1989. 2: 153-160.

**Vergier B, Cany L, Bonnet F, Robert J, Mascarel A, Coindre JM:** Expression of MDR1/p glycoprotein in human sarcomas. *Br J Cancer*, 1993. 68: 1221-1226.

**Visscher DW, Sakar FH, Shimoyama RK, Crissman JD:** Correlation between p53 immunostaining patterns and gene sequence mutations in breast carcinoma. *Diagn Mol Pathol*, 1996. 5: 187-193.

**Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R:** Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 1989. 244: 207-211.

**Vogelstein B:** Cancer. A deadly inheritance. *Nature*, 1990. 348: 681-682.

**Vogelstein B, Fornace AJ Jr A:** mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-teleangiectasia. *Cell*, 1992. 71: 587-597.

**Vogelstein B, Kinzler KW:** p53 function and dysfunction. *Cell*, 1992. 70: 523-526.

**Vogelstein B, Kinzler KW:** X-rays strike p53 again. *Nature*, 1994. 370: 174-175.

**Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, Sasaki MS, Kotoura Y, Yamamuro T:** P53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Br J Cancer*, 1993. 68: 1134-1139.

**Walter TA, Weh HJ, Schlag PM, Zornig C, Hossfeld DK:** Cytogenetic studies in malignant fibrous histiocytoma al. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997. 94: 131-134.

**Weinberg, R.A.** Oncogenes and multistep carcinogenesis. En: *Oncogenes and the molecular origins of cancer*. (Weinberg, R.A.), 1989. pp. 307-326. Weinberg, R.A. New York.

**Weiss SW, Ezinger FM:** Malignant fibrous histiocytoma. An analysis of 200 cases. *Cancer*, 1978. 41: 2250-2266.

**Weiss SW, Bratthauer GL, Morris PA:** Postirradiation malignant fibrous histiocytoma expressing cytokeratin. Implications for the immunodiagnosis of sarcomas. *Am J Surg Pathol*, 1988. 12: 554-558.

**Weiss SW, Rao VK:** Well-differentiated liposarcoma of deep soft tissue: a follow-up study of 95 cases with analysis of the incidence of "dedifferentiation". *Lab Invest*, 1991. 64: 9<sup>a</sup>.

**Wilke W, Maillet M, Robinson R:** H-ras-1 point mutations in soft tissue sarcomas. *Mod Pathol*, 1993. 6: 129-132.

**Wood GS, Beckstead JH, Turner RR, Hendrickson MR, Kempson RL, Warnke RA:** Malignant fibrous histiocytoma tumor cells resemble fibroblast. *Am J Surg Pathol*, 10: 323-335.

**Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ:** The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Develop*, 1993. 7: 1126-1132.

**Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM:** Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*, 1995. 375: 694-8.

**Yamate J, Tajima M, Togo M, Shibuya K, Ihara M, Kudow S:** Heterogeneity of cloned cell lines established from a transplantable rat malignant fibrous histiocytoma. *Jpn J Cancer Res*, 1991. 82: 298-307.

**Yang P, Hirose T, Hasegawa T, Seki K, Sano T, Hizawa K:** Prognostic implication of the p53 protein and Ki-67 antigen immunohistochemistry in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, 1995. 76: 618-25.

**Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M:** Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin 6. *Nature*, 1991. 352: 345-347.

**Yumoto T, Morimoto K:** Experimental approach to fibrous histiocytoma. *Acta Pathol Jpn*, 1980. 30: 767-771.

**Zagars GK, Mullen JR, Pollack A:** Malignant fibrous histiocytoma: outcome and prognostic factors following conservation surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol-Biol Phys*, 1996. 34: 983-94.

**Zakut-Houri R, Oren M, Bienz B, Lavie V, Hazum S, Givol DA:** single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature*, 1983. 306: 594-597.