

***“Correlación entre el gen
y la proteína supresora
P53 en el carcinoma
epidermoide de laringe”***

*Pérez-Carro Ríos, A.
Lozano Ramírez, A.
García Caballero, T.
Labella Caballero, T.*

*Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.
Travesía de la Choupana, s/n. Santiago de Compostela. A Coruña.*

RESUMEN

El gen supresor p53 se localiza dentro de un segmento de ADN de 16 a 20 kilobases en el brazo corto del cromosoma 17, en el locus 13.1 (17p13.1) y codifica la fosfoproteína P53 que está compuesta por un total de 393 aminoácidos, tiene un peso molecular de 53 kilodaltons.

La proteína P53 actúa detectando el ADN celular dañado, deteniendo el ciclo celular para repararlo y estimulando la "apoptosis" o muerte celular programada cuando no lo consigue.

Realizamos un estudio mediante biología molecular de 48 carcinomas epidermoides de laringe para detectar el gen supresor p53 y un estudio mediante inmunohistoquímica de 58 carcinomas epidermoides de laringe de la proteína P53 intervenidos de su patología entre 1991 y 1996.

Se detecta la mutación del gen mediante PCR-SSPC en un 31,3% de los casos y en un 14,6% mediante secuenciación y se observa la proteína mutada en 31 casos (el 53,44%).

No encontramos una relación estadísticamente significativa mediante la prueba de t de Student para muestras independientes entre la proteína y el oncogén tanto valorándolo mediante PCR-SSCP como mediante secuenciación.

PALABRAS CLAVE

p53, P53, gen supresor, proteína supresora, carcinoma epidermoide de laringe.

INTRODUCCIÓN

El gen p53 está situado dentro de un segmento de ADN de 16 a 20 kilobases en el brazo corto del cromosoma 17, en el locus 13.1 (17p13.1) en los humanos, y en el cromosoma 11 en los ratones [1, 2].

La organización genómica de p53 es muy similar en el hombre, ratón, rata rana, pollo, peces y otras especies animales analizadas. En su estructura molecular se han encontrado once exones, estando los exones 2, 4, 5, 7 y 8 muy conservados filogenéticamente. La mayoría de las mutaciones que tienen lugar en el gen se localizan sobre los dominios de los exones 4 a 8 [3, 4, 5, 6, 7, 8].

El gen codifica un ARN mensajero de 2.2 a 2.5 kilobases, que se expresa en casi todas las células del organismo y tiene las mayores concentraciones a nivel del timo, el bazo, el testículo y el ovario. Da lugar a la síntesis de la fosfoproteína nuclear P53 [1, 4, 9].

Está compuesta por un total de 393 aminoácidos, tiene un peso molecular de 53 kilodaltons y en su forma biológicamente activa (endógena, nativa o "wild-type") regula de forma negativa la proliferación celular [1, 4, 3, 6, 8, 10].

En tumores humanos, la mayoría de las mutaciones que inactivan la proteína P53 se localizan entre los aminoácidos 117 a 290, en cuatro regiones de la misma: los residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286, las cuales están muy conservadas entre las distintas especies animales. Entre estas cuatro regiones existen tres "puntos calientes" para las mutaciones, que se localizan en los aminoácidos 175, 248 y 273 [1, 11, 12, 13].

El mecanismo preciso por el cual actúa la proteína P53 es desconocido, actualmente el modelo más aceptado sugiere que la proteína nativa reconoce el ADN celular dañado. Esto aumenta la síntesis de la proteína, que actúa deteniendo el ciclo celular y reparando el daño infringido sobre el ADN. Cuando no se consigue reparar la lesión del ADN, la proteína es capaz de desencadenar la muerte celular o apoptosis. Por el contrario, si el gen ha mutado, la proteína mutada no es operativa y la célula continúa a través del ciclo celular con su defecto a nivel del ADN. Esta situación favorecerá que surjan clones de células inestables genéticamente, los cuales darán lugar a un cáncer [3, 7, 8, 12, 13].

El objetivo del presente artículo es el poder determinar la posible correlación entre las técnicas de biología molecular e inmunohistoquímicas en la detección del gen p53 por un lado y, por otro lado, la proteína.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Para realizar el estudio se consideraron un total de 58 pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de laringe e intervenidos de su patología entre los años 1991 y 1996 en el Servicio de Otorrinolaringología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

La pieza quirúrgica fue valorada en el Servicio de Anatomía patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela y se consideraron aquellas preparaciones en las que se evidenciaban el tumor.

Para el tratamiento informático del trabajo, se utilizó un ordenador Toshiba Satellite 210 OCT y los siguientes programas informáticos:

- * Un procesador de textos: Microsoft Word para Windows 95 versión 7.0.
- * Un programa para realizar dibujos y gráficos: Microsoft Power Point para Windows 95 versión 7.0.
- * Un sistema para clasificación bibliográfica: Papyrus versión 7.0.8.
- * Un programa para clasificación y recogida de datos: Access para Windows 95 versión 7.0.
- * Un programa estadístico: SPSS para Windows 95 versión 7.0.

MÉTODO

Tras el estudio con técnicas habituales de hematoxilina-eosina, se realizaron las técnicas de biología molecular a 48 casos y de inmunohistoquímica a 58 piezas.

La técnica de biología molecular para detectar el oncogén p53 está compuesta por las siguientes fases:

1. Extracción del ADN:

Una vez realizado el diagnóstico histopatológico, se seleccionó un bloque mediante observación microscópica de la preparación, buscando en cada caso el que tuviera menos áreas de necrosis y mayor muestra tumoral.

De los bloques elegidos se obtuvieron tres cortes de 10 µm de grosor para estudio molecular en la Unidad

de Medicina Molecular de la I.N.G.O. Estas secciones se tiñeron durante 3 minutos con un colorante inerte (azul de toluidina) y se dejaron sin cubreobjetos.

La preparación así obtenida fue observada al microscopio, seleccionando una zona adecuada de parénquima tumoral (libre de necrosis), de aproximadamente 5 mm² de superficie. Dicha zona fue raspada con bisturí del 22 y recogida en tubo eppendorf.

El material fue sometido a sucesivos lavados con xilol y etanol, con el fin de eliminar las impurezas (restos de parafina, por ejemplo). Tras los lavados, el material se incluyó en 50 µl de un tampón Tris ClH 50 mM, EDTA 1 mM y Tween 20 al 0,5%, a un pH de 8,3. A continuación se añadieron 2 µl de proteinasa K, procediéndose a la incubación de la muestra (a 56° durante toda una noche). Tras esto, las muestras se someten a 95 °C durante 7 minutos con el fin de desnaturar la proteinasa K.

El ADN extraído mediante este procedimiento se puede conservar en nevera durante unas dos semanas y es el método que en la actualidad se considera como más simple y efectivo para la extracción de ADN de material fijado en formol e incluido en parafina.

2. PCR-SSCP:

A partir del ADN extraído se realizó una amplificación de los exones 4 a 8 de p53 mediante PCR convencional.

Para una reacción de 25 µl se añadieron 2 µl del ADN extraído a una mezcla 10 mM de ClH (pH=8,3), 50 mM de Cl₂ Mg, 200 µM de cada dNTP y 1,25 U de Taq-polimerasa (Promega).

La amplificación de los cinco exones de p53 se llevó a cabo en un termociclador programable "Hyaid" (Omnigene). Las condiciones de PCR fueron 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C 30 segundos y 72 °C 1 minuto (para el exón 5 la temperatura de hibridación es de 55 °C).

El exón 4 tiene 296 pares de bases (bp); el 5, 325 bp; el 6, 235 bp, el 7, 139 bp y el 8, 255 bp. Se realizaron amplificaciones separadas para cada exón, empleándose 10 pmoles de cada uno de los cebadores ("primers") (Tabla 1).

Seguidamente se realizó un estudio de mutaciones para cada uno de los exones amplificados mediante análisis SSCP utilizando un sistema automatizado de electroforesis ("Phast System", Pharmacia LKB). Previamente a la SSCP se comprobó que en la muestra existía material amplificado realizando una elec-

troforesis convencional en gel de agarosa al 2%.

En la SSCP se utilizó formamida como agente desnaturante del ADN. Cada muestra contenía 4 µl de formamida y 2 µl de producto de PCR. Dicha muestra se calentó en termociclador a 95° durante 5 minutos para separar las dos cadenas de ADN.

En la electroforesis se utilizaron minigeles (5x5 cms.) de poliacrilamida no desnaturantes ("Phas Gels native T-20", Pharmacia LKB). Estos geles tenían una zona de concentración de 13 mm., con una concentración de polímero (acrilamida+bisacrilamida) (T) del 7,5%, un 3% de bisacrilamida (C), y una zona de separación de 32 mm., con un T del 20% y un C del 2%. El tampón de los geles estaba compuesto de acetato 0,112 M y Tris 0,112, pH=6,4. Como electrodos se emplearon tiras de agarosa al 2% ("Phast Gels Buffer Strips" Pharmacia LKB) con un tampón de Tricina 0,20 M, Tris 0,20 M, pH=7,5.

Las muestras (2 µl de producto amplificado) se cargaron en el polo catódico del gel. La electroforesis se realizó a 400 V/cm, 5 mA y 1 W durante un periodo de tiempo variable en función del tamaño del fragmento (hasta alcanzar 200 V/h para el exón 7 y 300 V/h para el exón 5). La detección de los productos amplificados se realizó mediante el método de tinción de plata.

El tiempo total de análisis, incluyendo la separación electroforética y el revelado, fue de unas cinco horas aproximadamente.

3. Secuenciación.

Para la caracterización de las posibles mutaciones se recurrió a la secuenciación cíclica empleando el sistema de secuenciación "fmol", de Promega.

Previamente los productos de PCR se purificaron en columnas "Microspin S-300" (Pharmacia LKB), con el fin de eliminar restos de cebadores y otros componentes de la mezcla de la PCR anterior que pudieran interferir en el proceso.

Para cada muestra se realizaron cuatro mezclas, incluyendo en cada una componentes de PCR (tampón, dinucleótidos y Taq) y un dideoxinucleótido (A, C, G o T), todo ello en proporciones adecuadas. A cada tubo de mezcla se le añadieron 2 µl de muestra y 2 pmoles de un único cebador específico para cada exón, marcado con un fluorocromo.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador con las siguientes condiciones: una desnaturación previa a 95° durante 30 segundos, 60° durante 30 segundos y 72° durante 30 segundos.

En cada etapa de la secuenciación cíclica, se produce una elongación de la cadena de ADN hasta la incorporación de un “dideoxinucleótido de terminación de cadena”, momento en que se interrumpe el proceso, formándose numerosos fragmentos de distintos tamaños que terminan en el dideoxinucleótido concreto que lleva la mezcla.

Las cuatro mezclas así obtenidas se desnaturalizan con formamida (dil. Producto de PCR: formamida, 1: 4) a 95° durante 5 minutos y se cargan en un secuenciador automático “ALF express” (Farmacia LKB) que detecta la presencia de las cadenas marcadas con fluorocromos, por la emisión de luz que se produce al cruzar las mismas con un haz de láser, durante su migración electroforética.

Se emplearon geles de poliacrilamida (“Ready Mix Gel ALF™ Grade”, Farmacia LKB), en una concentración (T) de polímero -acrilamida+bisacrilamida- del 6% y una concentración (C) de bisacrilamida del 3% en un tampón TBE (10 mM Tris, 83 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA) con un 40% (peso/volumen) de urea, polimerizados con persulfato amónico al 10%.

El recorrido electroforético se realizó a 50° con 1500 V, 30 W, durante 2 horas.

Para las técnicas de inmunohistoquímica se utilizó el sistema automático de tinción TechMate 200 (Dako) precedido de una serie de pasos:

1. Preparación de los cortes de parafina:

Los cortes de parafina de 5 µm se recogieron en portas pretratados con 3-aminopropiltriethoxisilano (Dako ChenMate Capillary Gap Microscope) diluido al 2% en acetona. Los cortes se dejaron secar durante una noche a 55° C y posteriormente fueron desparafinados e hidratados.

2. Incubación en microondas:

Los cortes se incubaron en tampón de citrato sódico 10 mM, pH=6, en microondas a 750 vatios, durante 5 minutos. Tras la primera incubación, se repone en el Coplin el tampón evaporado y se realiza una segunda incubación de 5 minutos. Tras esta incubación se dejan enfriar los cortes durante 20 minutos en el mismo tampón.

3. Anticuerpo primario:

En todos los casos se realizó una incubación de una hora en cámara húmeda, con el anticuerpo primario:

* P53, monoclonal, clon D07, de Dako, diluido al 1: 50.

4. Lavado con tampón fosfato 0,01 M, pH=7,4 con ClNa 0,15 M (tampón fosfato salino -PBS-) durante cinco minutos.

5. Bloqueo de peroxidasa endógena:

Se incubó la sección tisular con el peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% durante 10 minutos. Se realizó este paso antes del Sistema EnVision (Dako), y no antes del anticuerpo primario como proponen las instrucciones, para evitar que el peróxido de hidrógeno pueda dañar los epitopos investigados.

6. Sistema EnVision (Dako):

Se incubó la preparación durante 30 minutos con EnVision+, (Dako) que se trata de un polímero de dextrano que lleva unidos anticuerpos anti-ratón y moléculas de peroxidasa.

7. Lavado con tampón fosfato salino (PBS) durante cinco minutos.

8. Revelado con diaminobencidina (DAB).

RESULTADOS

Estudio de biología molecular del gen supresor p53

Inicialmente la detección se realizó mediante PCR-SSCP a los exones 4, 5, 6, 7 y 8 y, si con esta técnica se sospechaba la existencia de una mutación, entonces se secuenciaba el exón.

En los resultados mediante PCR-SSCP se evidencian 15 muestras (31,3%) en los que se puede sospechar que alguno de los exones está dañado. Mientras que en la secuenciación, en 7 muestras (14,6%) del total.

La razón por la cual en 7 casos se detectó mediante PCR-SSCP una mutación para alguno de los exones de p53, pero que no se logró secuenciar, pudiera estar en que a veces las muestras no son totalmente puras y además de amplificar células tumorales se amplifican células normales que producen mucho “ruido de fondo” en la secuenciación y la enmascaran. Por ello, hemos decidido considerar p53 como dos variables, por un lado los casos donde mediante PCR-SSCP sospechamos que el oncogén está alterado, y por otro los casos que mediante secuenciación detectamos su

localización exacta.

Mediante PCR-SSCP las mutaciones se detectan: cinco en el exón 4, cuatro en el exón 5, una en el exón 6, cuatro en el exón 7 y una en el exón 8 (Fig. 1).

Con la secuenciación se encuentran en total: seis deleciones (tres en el exón 4, una en el exón 5, otra en el exón 6 y otra en el exón 8) y observamos un cáncer en el que se produce una mutación puntual a nivel del triplete de bases CAT que se cambia por CGT a nivel del exón 5, este cambio conlleva la sustitución de una histidina por una arginina.

Estudio inmunohistoquímico de la proteína P53

Para valorar la inmunorreactividad de la proteína P53 se consideraron dos grupos, por un lado los casos positivos (donde existían más de un 10% de células tumorales positivas para la proteína) y, por otro lado, los casos negativos (donde el porcentaje era menor del 10%). De los 58 tumores, en 27 la proteína fue negativa (46,6%) y en 31 positiva (53,44%).

De los casos positivos para P53, la media fue de 23,03%, el rango de células varió entre un mínimo del 10% y un máximo de 89% y una desviación típica de 27,53. (Fig. 2)

Esta variable cuantitativa también se transforma en cualitativa (en los casos de inmunorreactividad para la proteína) y se considera una inmunorreactividad leve cuando el valor es menor de 25, moderada entre 25 y 50 y alta mayor de 50. Los casos de positividad leve para la proteína P53 fueron 9 (15,5%), moderada 6 (10,3%) y alta 16 (27,6%) (Fig. 3).

Relación entre el oncogén p53 y la proteína P53

Mediante la prueba de t de Student para muestras independientes no encontramos una relación entre la proteína P53 y el oncogén p53 valorado mediante PCR-SSCP con un valor de $p=0,379$.

Tampoco encontramos relación secuenciando el oncogén ($p=0,389$).

DISCUSIÓN

El gen supresor p53 codifica la síntesis de la fosfo-proteína nativa P53 cuya vida media es corta (entre los seis y 20 minutos). Cuando el gen muta, teóricamente se sintetiza una proteína anómala que, entre otras características, tiene una estructura más estable y su vida media se prolonga hasta seis horas. La proteína mutada se acumula y puede ser detectada mediante técnicas de inmunohistoquímica. Pero esta idea no debe de ser totalmente cierta.

En el diseño inicial del trabajo se decidió valorar los carcinomas epidermoides de laringe mediante inmunohistoquímica, pero decidimos modificar la idea original y ampliar el estudio utilizando también las técnicas de biología molecular y lo cierto es que, en la mayoría de los artículos más recientes realizados en otros órganos, se dirigen también en esta dirección y nuestro interés radica en poder contrastar los distintos resultados obtenidos.

En nuestro trabajo no encontramos una relación entre el gen y la proteína, es decir, existen ocasiones en las que el gen está mutado y la proteína no se detecta mediante inmunohistoquímica porque, en principio, es normal y, viceversa, se puede detectar la proteína lesionada y el gen estar sano. ¿Qué explicaciones tenemos para este dato que, en principio, podría resultar contradictorio?

Destacar que los distintos autores en las localizaciones O.R.L. tampoco encuentran una relación entre ambas variables:

- En laringe Kropveld y cols. [14], no hallan una correlación entre la proteína y el gen supresor.
- Tampoco van Heerden y cols. [15], en carcinomas epidermoides de cavidad oral encuentran una relación entre ambas, ni Ries y cols. [16] en orofaringe
- Y el trabajo ya comentado de Mineta y cols. [17] en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello también coinciden con nuestras conclusiones.

En la tabla 1 representamos los resultados obtenidos en otras localizaciones.

Las razones que nosotros pensamos influyen decisivamente en la ausencia de relación entre ambas variables pueden ser:

1. Las técnicas de inmunohistoquímica tienden a estar cada vez más perfeccionadas y, en ocasio-

nes, se observa que la inmunotinción no sólo es positiva para la proteína mutada, también se tiñe la proteína sana de, por ejemplo, la capa basal del epitelio. Entonces surgiría una situación en la que el gen supresor está sano, pero gracias al perfeccionamiento de la técnica (sistemas de recuperación de antígenos más efectivos) se detecta la proteína aunque esta no esté mutada.

2. Otra idea posible es el hecho de que las enzimas que degradan la proteína P53 pueden estar alteradas, así se acumula proteína sana que es detectada mediante inmunohistoquímica.

3. Puede surgir una mutación del gen supresor (mutación dominante positiva) que dé lugar a una proteína mutada que actúa de dos formas:

- Como mutante estructural, sería el caso en el que existiría una correlación entre la lesión del gen y la transcripción de una proteína cuya estructura molecular está alterada y no es capaz de realizar su función biológica.

- Como mutante de contacto, sería una situación en la que no existe relación porque el gen está mutado, pero la estructura de la proteína es normal, aunque no es capaz de unirse al ADN nuclear.

4. También pueden existir mutaciones dominantes negativas del gen, en las que muta un alelo, pero no el otro. En esta situación se producen dos tipos de proteína: una proteína mutada y otra nativa. Si la concentración de proteína nativa es mayor que la mutada, no existe una relación entre la lesión del gen y la proteína.

5. Otra situación es cuando surgen las mutaciones nulas, es decir se lesiona el gen, pero no se produce proteína (ni mutada, ni biológicamente activa).

6. También puede suceder que el gen esté bien, pero que otros genes que actúan sobre él estén alterados y, o bien se da lugar a una producción excesiva o una síntesis anómala de la proteína nativa (en ambas situaciones se acumularía y se detectaría mediante inmunohistoquímica). Surgiría así una situación en la que el gen es normal, pero existe positividad para la proteína.

Actualmente no está claro cual es la razón que nos lleva a tener un gen sano/mutado que no se relaciona con una proteína nativa/lesionada, pero la mayoría de los autores coinciden en que tampoco encuentran una asociación clara entre ambas y observan una relación

entre el gen y la supervivencia del paciente y no entre la proteína y la supervivencia.

BIBLIOGRAFIA:

1. Levine, A.; Perry, M.; Chang, A.; Silver, A.; Dittmer, D.; Wu, M.; Welsh, D. "The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis". *Rev Cancer* 69: 409-416, 1994.
2. Ah-See, K.; Cooke, T.; Pickford, I.; Soutar, D.; Balmain, A. "An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers". *Cancer Res* 54: 1617-1621, 1994.
3. Abraldes, M. "Estudio inmunofenotípico y molecular de los melanomas de la úvea". Tesis Doctoral, 218 ps. Santiago de Compostela, 1996.
4. Gándara Porres, I.; González Barón, M. "Bases moleculares del cáncer. Aplicaciones diagnósticas". *Medicine* 6: 3473-3479, 1995.
5. Benito, M. "Genes supresores". *Rev Cancer* 9: 110-114, 1995.
6. Levine, A. "Tumor supressor genes". *Bioessays* 12: 60-66, 1990.
7. Field, J.; Pavelic, Z.; Spandidos, D.; Stambrook, P.; Jones, A. "The role of P53 tumor supressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck". *Arch Otorrinolaryngol Head Neck Sur* 119: 1118-1123, 1993.
8. Allred, C.; Clark, G.; Elledge, R. "Association of P53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer". *J Natl Cancer Inst* 85: 200-206, 1993.
9. Kirchner, J. A.; Carter, D. "The larynx in diagnostic surgical pathology". 2nd ed., p. 893-916. Ed: Sternberg. New York, 1994.
10. Watling, D.; Gown, A.; Coltrera, M. "Overexpression of P53 in head and neck cancer". *Head Neck* 14: 437-444, 1992.
11. Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A. "Molecular cell biology". 3rd ed., p. 1344. Ed. Scientific American Books. New York, 1995.
12. Earl Raley, H. "Important advances in oncology".

- 1st ed., p. 98. Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.
13. Levine, A.; Momand, J.; Finlay, C. "The P53 tumor suppressor gene". *Nature* 351: 453-456, 1991.
 14. Kropveld, A.; Slootweg, P. J.; Blankenstein, M. A.; Terhaard, C. H.; Hordijk, G. J. "Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer". *Laryngoscope* 108: 1548-52, 1998.
 15. van Heerden, W. F.; van Rensburg, E. J.; Hemmer, J.; Raubenheimer, E. J.; Engelbrecht, S. "Correlation between p53 gene mutation, p53 protein labeling and PCA expression in oral squamous cell carcinomas". *Anticancer Res* 18: 237-40, 1998.
 16. Ries, J. C.; Schreiner, D.; Steininger, H.; Girod, S. C. "p53 mutation and detection of p53 protein expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma". *Anticancer Res* 18: 2031-6, 1998.
 17. Mineta, H.; Borg, A.; Dictor, M.; Wahlberg, P.; Akervall, J.; Wennerberg, J. "p53 mutation, but not p53 overexpression, correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma". *Br J Cancer* 78: 1084-90, 1998.
 18. Coggi, G.; Bosari, S.; Roncalli, M.; Graziani, D.; Bossi, P.; Viale, G.; Buffa, R.; Ferrero, S.; Piazza, M.; Blandamura, S.; Segalin, A.; Bonavina, L.; Peracchia, A. "p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma". *Cancer* 79: 425-432, 1997.
 19. Gaur, D.; Arora, S.; Mathur, M.; Nath, N.; Chattopadhyaya, TK.; Ralhan, R. "High prevalence of p53 gene alterations and protein overexpression in human esophageal cancer: correlation with dietary risk factors in India". *Clin Cancer Res* 3: 2129-36, 1997.
 20. Oyasu, R.; Nan, L.; Szumel, R.; Kawamata, H.; Hirohashi, S. "p53 gene mutations in human urothelial carcinomas: Analysis by immunohistochemistry and Single-Strand Conformation Polymorphism". *Mod Pathol* 8: 170-175, 1995.
 21. Hallak, R.; Mueller, J.; Lotter, O.; Gansauge S.; Gansauge F.; el-Deen Jumma, M.; Montenarh, M.; Safi, F.; Beger, H. "p53 alterations, protein expression and autoantibodies in human colorectal carcinoma: A comparative study". *Int J Oncol* 12: 785-91, 1998.
 22. Tomizawa, Y.; Adachi, J.; Kohno, T.; Yamaguchi, N.; Saito, R.; Yokota, J. "Identification and characterization of families with aggregation of lung cancer". *Jpn J Clin Oncol* 28: 192-5, 1998.
 23. Park, C. K.; Lee, J. D. "Immunohistochemical and SSCP analysis of p53 in malignant lymphomas". *J Korean Med Sci* 13: 361-8, 1998.
 24. Wen, W. H.; Reles, A.; Runnebaum, I. B.; Sullivan-Halley, J.; Bernstein, L.; Jones, L. A.; Felix, J. C.; Kreienberg, R.; el-Naggar, A.; Press, M. F. "p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival". *Int J Gynecol Pathol* 18: 29-41, 1999.

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.- Amplificación de fragmentos del exón 4 a nivel del gen supresor p53 mediante técnicas de PCR-SSCP en gel de agarosa en fragmentos de ADN desnaturalizado.



Figura 2.- A mayor aumento se objetiva que la intensidad de la inmunotinción para P53 varía de unas células tumorales a otras. Contraste con hematoxilina (400x).

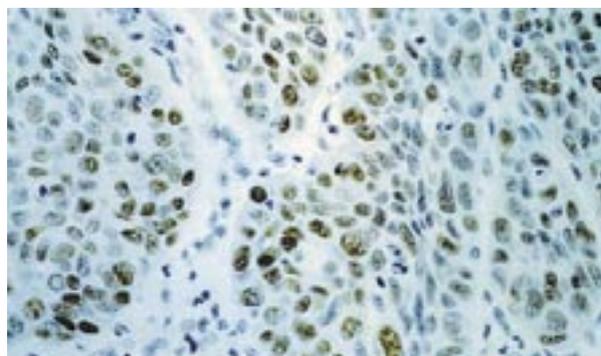


Figura 3.- Diagrama según inmunorreactividad positiva para la proteína P53.

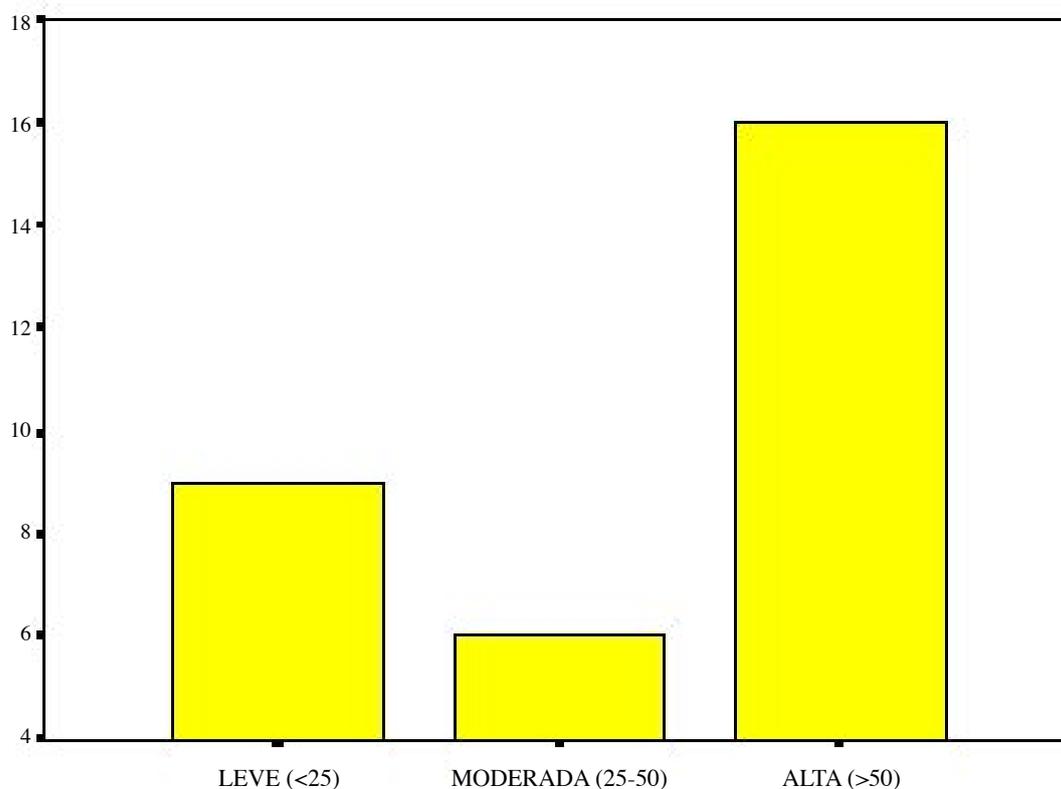


Tabla 1.- Relación entre el gen supresor p53 y la proteína P53.

AUTOR	LOCALIZACIÓN	CORRELACIÓN p53/P53
Coggi y cols. 1997, [18]	esófago	no
Gaur y cols. 1997, [19]	esófago	no
Oyasu y cols. 1995, [20]	vejiga	no
Hallak y cols. 1998, [21]	colon-recto	no
Tomizawa y cols. 1998, [22]	pulmón	sí
Park y cols. 1998, [23]	ganglios linfáticos	no
Wen y cols. 1999, [24]	ovario	sí
Pérez-Carro	laringe	no