

***“El gen supresor p53 como  
valor pronóstico en el  
carcinoma epidermoide de  
laringe: estudio molecular”***

---

*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 p53 actúa como un gen supresor, es decir, participa en la destrucción de las células transformadas, y, por el contrario, la mutación de sus alelos favorece la proliferación de las células transformadas.

Realizamos un estudio mediante biología molecular de 48 carcinomas epidermoides de laringe intervenidos de su patología entre 1991 y 1996, detectando dicha mutación en un 31,3% de los casos mediante PCR-SSCP y en un 14,6% mediante secuenciación.

Encontramos una relación estadísticamente significativa mediante el análisis estadístico de Log Rank entre la supervivencia y la existencia de mutación del gen supresor p53; evidenciándose una supervivencia menor en los carcinomas de laringe que presentan la lesión genómica.

En el presente estudio reflejamos la posible utilidad del gen supresor p53 para conocer el grado de agresividad de este tipo de tumores.

## PALABRAS CLAVE

p53, gen supresor, carcinoma epidermoide de laringe, pronóstico.

## INTRODUCCIÓN

El gen supresor p53, junto con el gen que confiere la susceptibilidad para el retinoblastoma, constituyen los dos genes supresores más importantes en relación con los tumores humanos.

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].

Tiene una naturaleza recesiva, por lo que la mutación de uno de los alelos del gen da lugar a la síntesis de un 50% de la proteína cuya función no está comprometida y, probablemente, la alteración del gen no es detectada. Si ambos genes se dañan, es decir, la mutación es homocigota, se sintetiza una proteína que no es activa, dando lugar a la alteración de la función celular. En los ratones p53 "knockout" existe una mutación de ambos alelos de p53; cuando nacen son ratones normales, pero en el 100% de los casos desarrollan en su vida adulta una gran variedad de tumores en un período de tiempo que pueden variar entre seis y nueve meses [1, 3, 4, 5, 6].

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 [1, 3, 4, 5, 7, 8, 9].

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, 7, 10].

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 [4, 5, 6, 11].

Más de la mitad (sobre un 60%) de los cánceres que se desarrollan en individuos adultos (incluyendo mama, colon, pulmón, próstata, ovario, testículo, piel, riñón, esófago, vejiga, etc.) sufren mutaciones del gen

p53 y expresan la proteína aberrante que codifica el gen dañado [1, 12].

A pesar de los avances que se han producido en los últimos años, actualmente no existe ninguna prueba perfecta para determinar el pronóstico de un paciente diagnosticado de carcinoma epidermoide de laringe. En el presente estudio reflejamos la posible utilidad del gen supresor p53 para conocer el grado de agresividad de este tipo de tumores.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes

Para realizar el estudio se consideraron un total de 48 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.

A estos 48 carcinomas epidermoides de laringe se les realizó un pormenorizado estudio epidemiológico y molecular del gen supresor p53.

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.

## MÉTODOS

El estudio de biología molecular del gen supresor p53 estuvo compuesto 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 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 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 "Hybaid" (Omnigene). Las condiciones de PCR fueron 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C 30 segun-

dos 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 electroforesis 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 compo-

nentes 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 desnaturalización 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 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.

## RESULTADOS

### Estudio epidemiológico

Respecto a los resultados epidemiológicos de este estudio vimos que:

- La edad media de los pacientes fue de 58,1 años, con un rango de edades de 40 a 80 años y

una desviación típica de 10,66.

- De los 48 casos sólo uno era mujer y el resto hombres.
- Los T1 fueron un total de 8 casos (16,6%), T2 fueron 19 (39,5%), T3 fueron 18 (37,5%) y los T4 un total de 3 (6,25%). Los T1-T2 tienen una frecuencia de 27 casos (56,25%) y los T3-T4 de 21 (43,75%).
- Observamos que en este trabajo los distintos estadios tumorales presentan una frecuencia muy similar ya que, 8 casos (16,66%) se encontraban en estadio I, 17 en estadio II (35,41%), 15 en estadio III (31,25%) y 8 en estadio IV (16,66%).
- Respecto a la evolución global de los pacientes: se encontraron vivos un total de 24 (50%), murieron por la enfermedad 20 (41,66%) y por otra causa 4 (8,33%).

### 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.

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.

## Análisis estadístico de la supervivencia

En último término, es el tiempo de supervivencia lo que nos indica la evolución de los pacientes y lo que nos permite establecer los factores pronóstico.

Se utilizó la regresión de Cox para analizar y al trazar la curva de supervivencia para nuestro trabajo que nos permite obtener la proporción de supervivientes. Observamos que la muestra presentó una media de supervivencia de 67 meses, con un error estándar de la media de 6 y un intervalo de confianza del 95% que varió entre 56 y 77 (Fig. 1).

## Supervivencia y el gen supresor p53 mediante PCR-SSCP

En aquellos casos en los que se sospecha la existencia de una mutación a nivel del gen supresor tuvieron un tiempo de supervivencia medio de 48 meses, mientras que en aquellos cánceres que no se detectó, el tiempo de supervivencia fue de 80 meses. Encontramos una relación estadísticamente significativa entre ambas variables mediante el contraste estadístico de Log Rank con un valor de  $p=0,0406$  (Tabla 2 y fig. 2).

## Supervivencia y el gen supresor p53 mediante secuenciación

Al secuenciar el gen supresor, en aquellos casos en los que se encuentra la mutación tienen un tiempo de supervivencia medio de 36 meses y en los que no se encuentra de 78. El valor de "p" mediante el contraste estadístico de Log Rank es de 0,0064, lo que evidencia una mayor "fuerza" en la significación estadística respecto a los casos de carcinoma con mutación detectada mediante PCR-SSCP (Tabla 3 y fig. 3).

## DISCUSIÓN

El gen supresor p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, en el locus 13.1 (17p13.1). Se caracteriza por tener una naturaleza recesiva y por estar formado por once exones, aunque la mayoría de las mutaciones tienen lugar en los exones 4, 5, 6, 7 y 8 [1, 2].

Su función primordial es la de "suprimir" las células transformadas ya que a través de la síntesis de la proteína P53 es capaz de detectar el daño en el ADN celular y enlentecer el ciclo celular para repararlo; cuando no consigue repararlo, induce la apoptosis celular. Así cuando el gen supresor sufre una mutación homocigota, favorece el desarrollo de líneas celulares cuyo genoma está dañado, resultando inestables genéticamente y pudiendo dar lugar a cepas que se multiplican sin control: el cáncer [4, 5].

En nuestro trabajo estudiamos p53 mediante dos métodos: uno indirecto, PCR-SSCP ("Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism") y otro directo, específicamente la secuenciación del exón al que previamente se le realizó PCR-SSCP y donde se sospechaba la existencia de una mutación. Obviamente, hemos valorado p53 con ambos métodos porque, a pesar de señalar en las preparaciones la zona donde se encuentra el tumor, no es infrecuente que también se amplifiquen otras células que no son cancerígenas y que disminuyen la sensibilidad de la secuenciación. Por el contrario, mediante SSCP tras la amplificación y la desnaturalización, tenemos una hebra de ADN que se une complementariamente a una sonda que la señala a nivel de un gel a través del cual ha migrado; cuando varía su configuración, el recorrido a lo largo del gel también cambia. Al visualizar las cadenas de ADN con las sondas se observa que su localización no es la esperada y se intuye indirectamente que el exón pueda haber mutado. Evidentemente, hay que ser cuidadosos a la hora de considerar el método utilizado en la bibliografía que se revisa.

Las técnicas de biología molecular se realizaron a un total de 48 de los 58 carcinomas epidermoides de laringe y mediante PCR-SSCP se observaron 15 (31,3%) en los que el tumor podría haber mutado y de estos 15 se confirmó la mutación en siete casos mediante secuenciación (14,6%).

Considerando los resultados obtenidos por otros autores, sólo encontramos dos artículos que hagan referencia a la **laringe**. Kropveld y cols. [13] obtuvieron mediante PCR-SSCP un 36% de mutaciones para p53 y Sarkar y cols. [14] obtienen un valor del 31,1% mediante PCR-SSCP. Unos valores prácticamente muy similares al nuestro.

En otras localizaciones de la esfera O.R.L., como en la **cavidad oral**, encontramos cuatro trabajos (van Heerden y cols. [15], Pekkola-Heino y cols. [16], Koh y cols. [17], Yook y cols. [18]) que obtienen mediante PCR-SSCP un porcentaje de mutaciones del 25%, 68,7%, 38% y 36%, respectivamente.

En **orofaringe**, Ries y cols. [19], también mediante PCR-SSCP, obtuvieron un resultado sensiblemente inferior para la mutación del gen supresor con un total del 9,6% de los casos considerados.

Los autores que estudiaron conjuntamente los carcinomas epidermoides de **cabeza y cuello** (Ah-See y cols. [2], Field y cols. [4], Boyle y cols. [20] y Mineta y cols. [21]) obtuvieron un 31%, 32%, 43% y 18% de mutaciones, respectivamente (todos realizaron sus trabajos considerando como método PCR-SSCP, excepto Boyle y cols. [20] que también secuenciaron las mutaciones). Estos autores estudian la lesión del gen *p53* tanto en lesiones pre-malignas (displasias o carcinomas "in situ") como el tumor primario y llegan a la conclusión de que la mutación del gen también tiene lugar en las lesiones iniciales del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

De las siete mutaciones secuenciadas en nuestro trabajo, seis se correspondieron con deleciones y una fue una translocación de una base de adenina por otra de guanina. Sin embargo, los autores que secuenciaron las mutaciones en carcinoma de cabeza y cuello (Boyle y cols. [20] y Kiuru y cols. [22]) encuentran fundamentalmente translocaciones, más que deleciones, inserciones u otra alteración grande del genoma. Boyle y cols. [20] encontraron un 64% de translocaciones y Kiuru y cols. [22] un 40% y asocian estos casos a carcinógenos externos como el tabaco.

Respecto a los resultados de mutaciones del gen supresor *p53* en **otros órganos** del cuerpo humano existe cierta variabilidad que va desde un mínimo del 18% de casos mutados en vejiga y mama, a un máximo del 72% en uno de los artículos sobre esófago, aunque hay que destacar que este último estudio fue realizado en una población relativamente seleccionada como es la hindú donde el consumo de bétel es muy elevado (Tabla 4).

Resumiendo, el porcentaje medio de mutaciones mediante PCR-SSCP para la tabla 4 arroja un valor del 41%, es decir, algo superior al obtenido en nuestro trabajo.

Otra cuestión destacada son los datos obtenidos mediante secuenciación. Resaltar, en primer lugar, que sólo una minoría de los trabajos revisados completan su estudio con esta técnica y que este hecho es bastante criticable puesto que la secuenciación nos permite

contrastar y corroborar la existencia de alteraciones en el genoma que sólo pudimos intuir mediante PCR-SSCP. En segundo lugar, el porcentaje de secuenciados en los que se encontró la mutación exacta para *p53* es muy bajo (rondan unos porcentajes del 35% de mutaciones mediante PCR-SSCP y sólo detectan el 5% de lesiones con secuenciación). Contrastando estos resultados con los nuestros, vemos que en laringes mediante PCR-SSCP el valor es del 31,3% y al secuenciar, del 14,6% (muchísimo más alto que para otras casuísticas) (Tabla 4).

El motivo para tal diferencia creo que es evidente y se basa en la técnica. Por un lado, la Unidad de Medicina Molecular de la I.N.G.O. es un laboratorio de reciente creación con un aparataje nuevo y dotado del material más moderno. Por otro lado, destacar el encomiable trabajo realizado en dicha unidad con un elevado nivel de meticulosidad, hasta el punto que la mínima duda sobre el método llevaba a la repetición de la secuenciación. Estos resultados permiten tener la elevada seguridad de que allí donde indirectamente se pensó que existía una mutación, con la secuencia de los distintos exones se localizaba y, cuando no era así, se evidenciaba un elevado ruido de fondo, es decir bases nucleares de genoma sano que interferiría en la secuenciación.

Como hemos visto en los resultados encontramos una relación entre el gen supresor *p53* y la evolución de los pacientes. Tanto los cánceres estudiados mediante PCR-SSCP, como mediante secuenciación dieron lugar a relaciones estadísticamente significativas con la supervivencia. Además, hay que tener en cuenta que aquellos casos en los que mediante secuenciación se logra encontrar el punto exacto del daño genómico, tienen un relación más intensa con la supervivencia que mediante PCR-SSCP, con un valor de  $p=0,0064$ .

Mediante PCR-SSCP, el tiempo de supervivencia medio para los cánceres en los que no se sospechaba la existencia de una mutación fue de 80 meses, mientras que en los que sí se detectaba fue de 48 meses, mucho menor. La diferencia entre ambos grupos es importante (32 meses) y viene a ser corroborada mediante los distintos estudios estadísticos.

Pero al contrastar los datos obtenidos mediante la secuenciación, vemos que en los tumores sin mutación el tiempo de supervivencia fue de 78 meses, mucho mayor que en los que se secuencia la lesión genómica (36 meses). Así, la diferencia en el tiempo de supervivencia entre ambos grupos aumenta, respecto a PCR-SSCP, de 32 meses a 42. También se evidencia el aumento de la significación estadística.

Tras realizar la pertinente revisión bibliográfica que nos permita contrastar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, hemos de destacar que la

gran mayoría de los artículos (tabla 5) también encuentran una relación entre la mutación del gen supresor *p53* y la supervivencia/pronóstico tumoral; pero, señalar que algunos autores no reflejan con exactitud la prueba estadística utilizada, que a la hora de realizar un estudio nos permite confirmar (no exclusivamente sospechar) la tendencia de los datos obtenidos.

Como sabemos, la pérdida de actividad del gen supresor *p53* debido a su mutación, conlleva la ausencia de funciones básicas del comportamiento molecular de la célula como son: la apoptosis celular, el reconocimiento del ADN dañado, promoción de la transcripción de otros genes que inhiben la proliferación celular, etc. El resultado son células con su ADN inestable y que proliferan sin ningún control y es que *p53* juega un papel muy importante en la etiología, progresión y pronóstico de muchos cánceres.

## BIBLIOGRAFIA:

- 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.
- Ah-See, K.; Cooke, T.; Pickford, I.; Soutar, D.; Balmain, A. "An allelotype of P53 tumor suppressor gene in squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers". *Cancer Res* 54: 1617-1621, 1994.
- Levine, A. "Tumor supressor genes". *Bioessays* 12: 60-66, 1990.
- 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.
- 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.
- Levine, A.; Momand, J.; Finlay, C. "The P53 tumor supressor gene". *Nature* 351: 453-456, 1991.
- Gándara Porres, I.; González Barón, M. "Bases moleculares del cáncer. Aplicaciones diagnósticas". *Medicine* 6: 3473-3479, 1995.
- Benito, M. "Genes supresores". *Rev Cancer* 9: 110-114, 1995.
- Lane, D.; Benchimol, S. "p53: oncogen or anti-oncogen?" *Genes Dev* 4: 1-8, 1990.
- Kirchner, J. A.; Carter, D. "The larynx in diagnostic surgical pathology". 2nd ed., p. 893-916. Ed. Sternberg. New York, 1994.
- Earl Ruley, H. "Important advances in oncology". 1st ed., p. 98. Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.
- Nawroz, H.; van der Riet, P.; Hruban, R.; Koch, W.; Ruppert, M.; Sidransky, D. "Allelotype of head and neck squamous cell-carcinoma". *Cancer Res* 54: 1152-1155, 1994.
- 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.
- Sarkar, F. H.; Sakr, W. A.; Li, Y. W.; Jacobs, J.; Crissman, J. D. "Tumor suppressor p53 gene mutation in squamous cell carcinoma of the larynx". *Diagn Mol Pathol* 5: 201-5, 1996.
- 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.
- Pekkola-Heino, K.; Servomaa, K.; Kiuru, A.; Grenman, R. "Increased radiosensitivity is associated with p53 mutations in cell lines derived from oral cavity carcinoma". *Acta Otolaryngol (Stockh)* 116: 341-344, 1996.
- Koh, J. Y.; Cho, N. P.; Kong, G.; Lee, J. D.; Yoon, K. "p53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis". *Br J Cancer* 78: 354-9, 1998.
- Yook, J. I.; Kim, J. "Expression of p21WAF1/CiP1 is unrelated to p53 tumor suppressor gene status in oral squamous cell carcinomas". *Oral Oncol* 34: 198-203, 1998.
- 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.
- Boyle, J.; Hakim, J.; Koch, W.; van der Riet, P.; Hruban, R.; Roa, A.; Correo, R.; Eby, Y.; Ruppert, M.; Sidransky, D. "The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer". *Cancer Res* 53: 4477-4480, 1993.

21. 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.
22. Kiuru, A.; Servomaa, K.; Grenman, R.; Pulkkinen, J.; Rytömaa, T. "p53 mutations in human head and neck cancer cell lines". *Acta Otolaryngol (Stockh)* 529: 237-240, 1997.
23. 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.
24. He, Y.; Shang, X. "The relationship between p53 mutation and esophageal cancer biological behavior". *Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih* 10: 1-4, 1998.
25. 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.
26. 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.
27. Iacopetta, B.; Grieu, F.; Powell, B.; Soong, R.; McCaul, K.; Seshadri, R. "Analysis of p53 gene mutation by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism provides independent prognostic information in node-negative breast cancer". *Clin Cancer Res* 4: 1597-602, 1998.
28. 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.
29. Lleonart, M. E.; García-Foncillas, J.; Sánchez-Prieto, R.; Martín P.; Moreno A.; Salas C.; Ramón y Cajal, S. "Microsatellite instability and p53 mutations in sporadic right and left colon carcinoma: different clinical and molecular implications". *Cancer* 83: 889-95, 1998.
30. Murata, M.; Tagawa, M.; Kimura, H.; Kakisawa, K.; Shirasawa, H.; Fujisawa, T. "Correlation of the mutation of p53 gene and the polymorphism at codon 72 in smoking-related non-small cell lung cancer patients". *Int J Oncol* 12: 577-81, 1998.
31. Huang, C.; Taki, T.; Adachi, M.; Konishi, T.; Higashiyama, M.; Miyake, M. "Mutations in exon 7 and 8 of p53 as poor prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer". *Oncogene* 16: 2469-77, 1998.
32. 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.
33. Yano, M.; Asahara, T.; Dohi, K.; Mizuno, T.; Iwamoto, K. S.; Seyama, T. "Close correlation between a p53 or hMSH2 gene mutation in the tumor and survival of hepatocellular carcinoma patients". *Int J Oncol* 14: 447-51, 1999.
34. Sessa, F.; Solcia, E.; Capella, C.; Bonato, M.; Scarpa, A.; Zamboni, G. "Intraductal papillary-mucinous tumours represent a distinct group of pancreatic neoplasms: an investigation of tumour cell differentiation and K-ras, p53 and c-erbB-2 abnormalities in 26 patients". *Virchows Arch* 425: 357-67, 1994.
35. Park, C. K.; Lee, J. D. "Immunohistochemical and SSCP analysis of p53 in malignant lymphomas". *J Korean Med Sci* 13: 361-8, 1998.
36. 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.
37. Russo, A.; Migliavacca, M.; Bazan, V.; Maturi, N.; Morello, V.; Dardanoni, G.; Modica, G.; Bazan, P.; Albanese, I.; La Farina, M.; Tomasino, R. M. "Prognostic significance of proliferative activity, DNA-ploidy, p53 and Ki-ras point mutations in colorectal liver metastases". *Cell Prolif* 31: 139-53, 1998.
38. Oshiro, Y.; Chaturvedi, V.; Hayden, D.; Nazeer, T.; Johnson, M.; Johnston, D. A.; Ordonez, N. G.; Ayala, A. G.; Czerniak, B. "Altered p53 is associated with aggressive behavior of chondrosarcoma: a long term follow-up study". *Cancer* 83: 2324-34, 1998.

## TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.- Secuencia de bases de los cebadores o “primers” utilizados.

CEBADORES O “PRIMERS”	
4 5' ATCTACAGTCCCCCTTGCC 3' 5' TGACTTGCACGGTCAGTTGC 3'	5 5' TTCCTCTTCCTACAGTACTC 3' 5' GCTGGAGAGACGACAGGGCT 3'
6 5' GCCTCTGATTCTCACTGATTG 3' 5' GGTTAAGGGTGGTTGTCAGT 3'	7 5' GTGTTATCTCCTAGGTTGGC 3' 5' CTGTGCCCCAGCCTCTGCTT 3'
8 5' CTGCCTCTTGCTTCTCTTTT 3' 5' TTATCACCTTTCCTTGCCTC 3'	

Figura 1.- Función de supervivencia según la regresión de Cox.

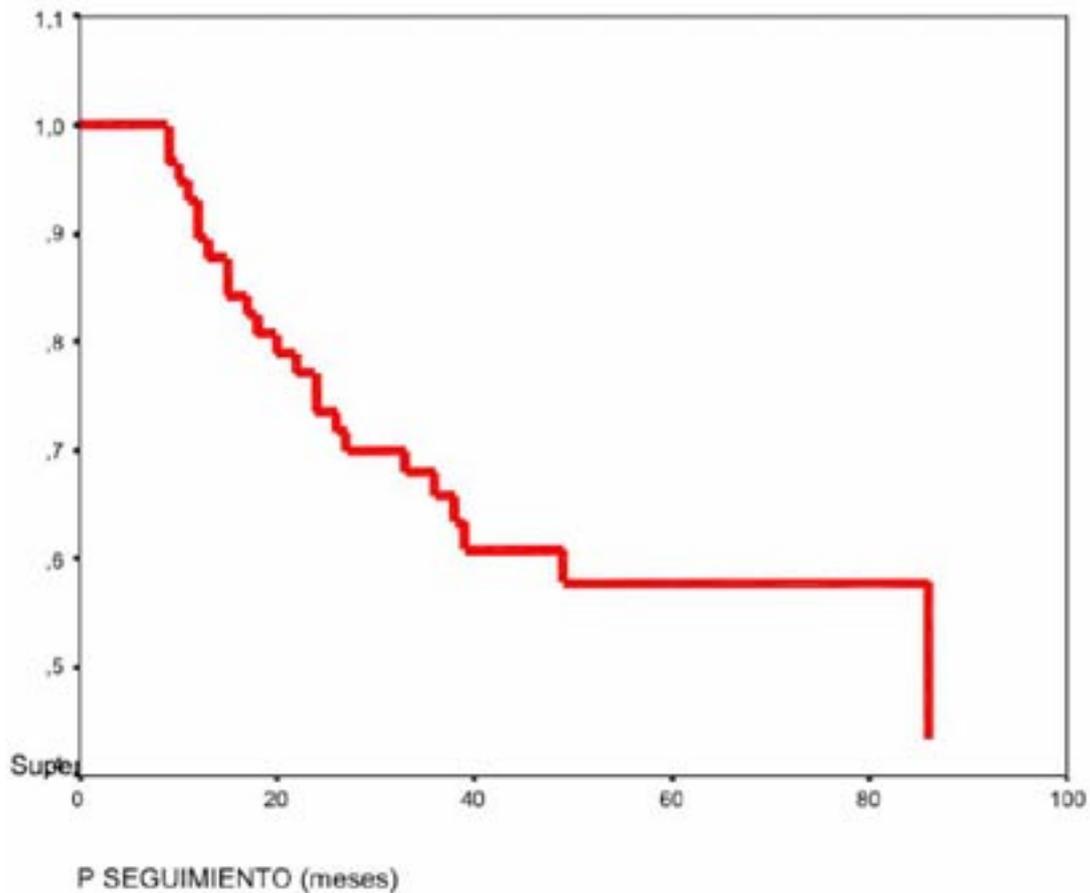


Tabla 2.- Tabla según supervivencia y existencia o no mutación en el oncogén p53 mediante PCR-SSCP.

	Nº CASOS	MUERTOS	CENSURADOS	T. DE SUPERVIVENCIA
NO MUTACIÓN	33	8	25	80
SI MUTACIÓN	15	8	7	48

Figura 2.- Función de supervivencia y existencia o no mutación en el oncogén p53 mediante PCR-SSCP.

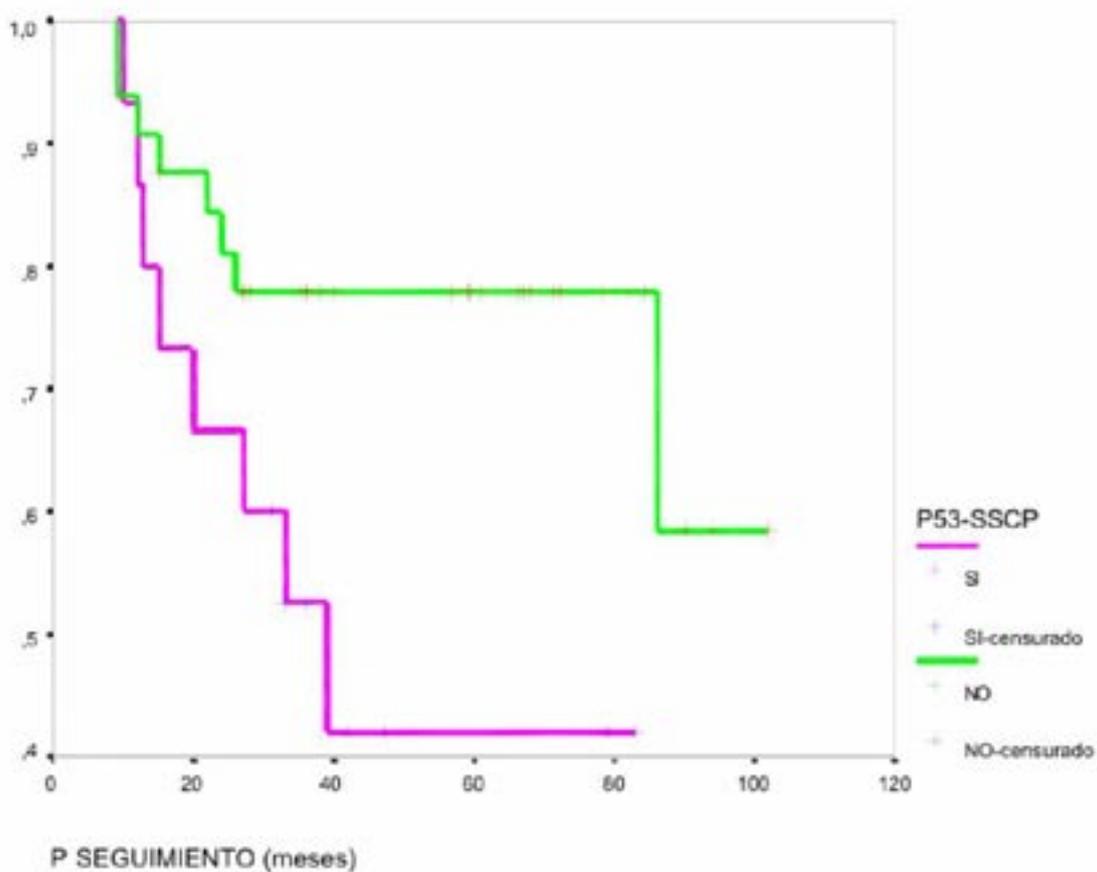


Tabla 3.- Tabla según supervivencia y existencia o no mutación en el oncogén p53 mediante secuenciación.

	Nº CASOS	MUERTOS	CENSURADOS	T. DE SUPERVIVENCIA
NO MUTACIÓN	41	11	30	78
SI MUTACIÓN	7	5	2	36

Figura 3.- Función de supervivencia y existencia o no mutación en el oncogén p53 mediante secuenciación.

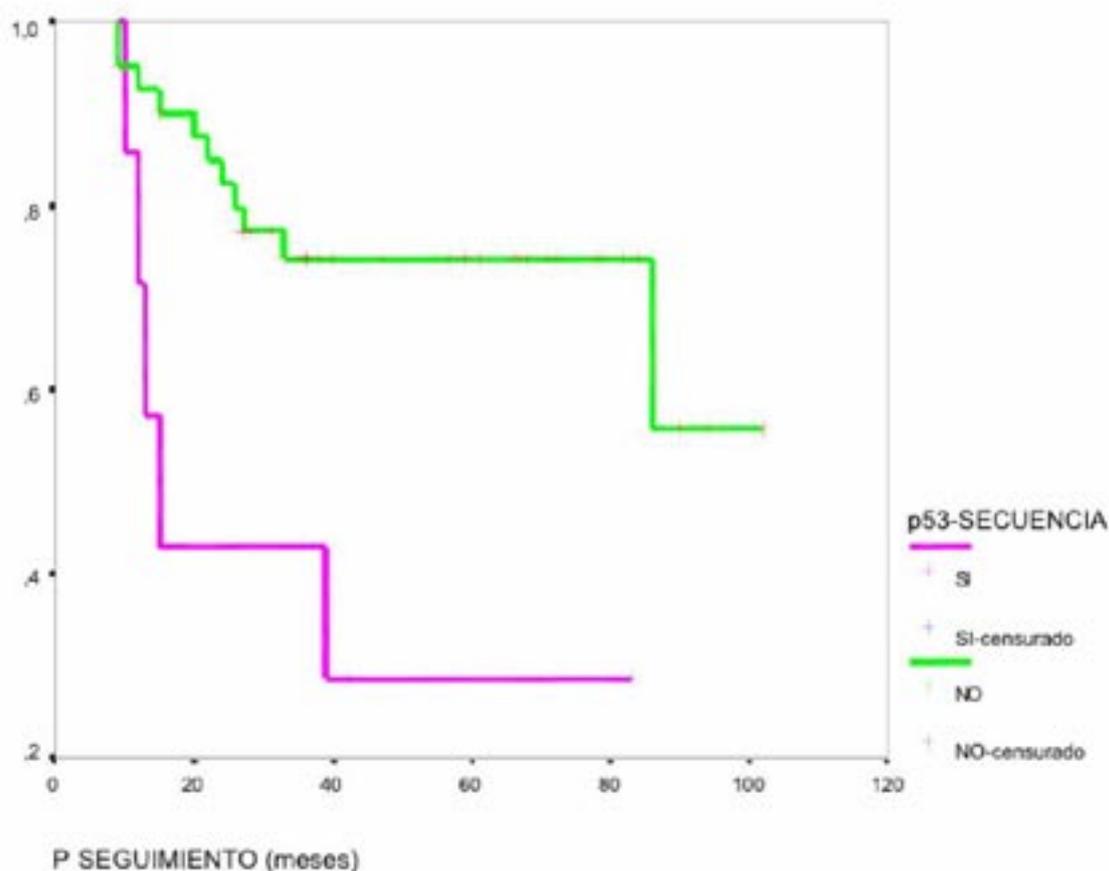


Tabla 4.- Resultados obtenidos por otros autores en cánceres de otros órganos sobre el índice de mutaciones del gen supresor p53.

AUTOR	LOCALIZACIÓN	PCR-SSCP	SECUENCIACIÓN
Coggi y cols. 1997, [23]	esófago	57%	no
He y cols. 1998, [24]	esófago	36,7%	6,6%
Gaur y cols. 1997, [25]	esófago	72%	no
Oyasu y cols. 1995, [26]	vejiga	18,3%	no
Iacopetta y cols. 1998, [27]	mama	18%	no
Hallak y cols. 1998, [28]	colon-recto	35%	5,83%
Lleonart y cols. 1998, [29]	colon	42%	no
Murata y cols. 1998, [30]	pulmón	31%	no
Huang y cols. 1998, [31]	pulmón	36,8%	4%
Tomizawa y cols. 1998 [32]	pulmón	48%	no
Yano y cols. 1999, [33]	hígado	34%	no
Sessa y cols. 1994, [34]	páncreas	58%	no
Park y cols. 1998, [35]	ganglios linfáticos	19,35%	no
Wen y cols. 1999, [36]	ovario	57%	no
<b>Pérez-Carro</b>	laringe	31,3%	14,6%

Tabla 5.- Relación entre la supervivencia y la mutación de p53 según las distintas localizaciones.

AUTOR	LOCALIZACIÓN	RELACIÓN P53/ SUPERVIVENCIA
Coggi y cols. 1997, [23]	esófago	no
He y cols. 1998, [24]	esófago	sí
Tomizawa y cols. 1998, [32]	pulmón	sí
Huang y cols. 1998, [31]	pulmón	sí
Yano y cols. 1999, [33]	hígado	sí
Sessa y cols. 1994, [34]	páncreas	sí
Wen y cols. 1999, [37]	ovario	sí
Iacopetta y cols. 1998, [28]	mama	sí
Oshiro y cols. 1998, [38]	hueso	sí
Mineta y cols. 1998, [21]	cabeza y cuello	sí
<b>Pérez-Carro</b>	laringe	sí