

D. Quintela Senra^a,
J.J.B. López Sáez^b,
A. Senra Varela^c

La proteína p53 y el cáncer de mama. Revisión crítica

The p53 protein and breast cancer

SUMMARY

This is a critical review of the biological basis of the p53 protein in apoptosis, its importance in the experimental and human carcinogenesis and the laboratory procedures used for its determination in cancer patients.

The hyperexpression of p53 due to a mutation originates an excessive tissue accumulation, related to the long half life of mutated p53 which is approximately 60 times longer than wild p53. Clinicians talk of positivity of p53 as the presence of mutated p53. Perhaps the better known clinical aspect of p53 is its behavior in patients with breast cancer.

At this moment p53 can be considered a prognostic factor in breast cancer and it is recommended to include it in the routine immunohistochemistry studies of the clinical pathologist.

The laboratory procedures used in clinical practice to detect mutated p53 are: a) Molecular analyses, b) Immunohistochemical analysis, c) Serum determination by ELISA. The last is a new and promising procedure that opens great expectations.

It is useful to identify the bad prognostic cases among the favorable group of cases of breast cancer with N0 (negative axillary nodes).

Palabras clave:

p53. Pronóstico. Cáncer de mama.

Key words:

p53. Prognostic. Breast cancer.

^aBecario del Departamento de Medicina.

^bProfesor Titular.

^cDirector del Grupo de Investigación Oncológica. Cádiz.

Correspondencia:

Prof. A. Senra Varela.

Catedrático de la Facultad de Medicina de Cádiz.

Pintor Zuloaga, 4^o 3^o D. 11010 Cádiz.

INTRODUCCIÓN

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear, descubierta por Lane et al en 1979 por estudios en células transformadas por infección con SV40, en las cuales se precipitaba el antígeno T grande formando un complejo con una proteína celular de 53-kDa¹. Posteriormente esta fosfoproteína p53 se encontró asociada con la proteína E1b del adenovirus tipo 5² y con la proteína E6 de los papilomavirus tipo 16 y 18 que también están ligados a la proteína p53³; sugiriendo que estos virus ADN tenían como objetivo común en la célula la proteína p53.

Con anticuerpos contra la proteína p53 se observó que esta se acumula en el núcleo de varias líneas celulares transformadas: sarcoma murino inducido químicamente, leucemia inducida por virus, o fibroblastos transformados; pero esta proteína no se encuentra en diferentes tipos de células normales embrionarias y del adulto⁴. Su acumulación específica en el núcleo de muchas células tumorales o transformadas sugería que po-

día desempeñar un papel importante en la transformación celular⁴⁻⁶.

Oren y Levine (1983) con inmunoprecipitación de los polisomas durante la traducción les permitió aislar un fragmento de 300-bp que corresponde al ADNc de la p53 del ratón y posteriormente fue aislado y secuenciado⁷. Benchimole et al en 1985 han identificado el gen que está localizado en el brazo corto del cromosoma 17⁸. Nigro et al en 1989 determinaron que esta fosfoproteína contiene 393 aminoácidos⁹. En 1989 comenzó a surgir el interés por la p53 al aparecer publicaciones indicando que este gen está alterado en cánceres humanos^{5,6}.

LA p53 Y EL CICLO CELULAR

La p53 no es detectable en células normales por su corta vida media de 20 min, mientras la p53 mutada tiene una vida media de aproximadamente 24 h^{10,11}. La lo-

calización celular de la proteína p53 varía durante el ciclo celular: durante la fase G1 se encuentra en el citoplasma, luego entra en el núcleo en la transición G1/S allí permanece hasta el final de la fase G2/M¹². Como norma, en células transformadas o tumorales, la proteína p53 es estrictamente nuclear, pero se han observado algunas excepciones⁵.

North (1991) describía el cáncer como una enfermedad del ciclo celular¹³. Varias observaciones sugieren que la proteína p53 es imprescindible para la progresión del ciclo celular normal. El bloqueo de los ciclos celulares tiene lugar entre G1 y la fase S, exactamente al final de G1 cerca del punto de restricción (R-point, punto R). La p53 no inhibe el paso G0 a G1, pero sí el paso de G1 a la fase S. Kastan et al (1991) demostraron que la pérdida de la actividad supresora tumoral de la p53 se asocia con una incapacidad para detener la transición desde G1 a S en el ciclo celular en las células que han acumulado daño del ADN¹⁴. Kern et al (1991) y Schärer e Iggo (1992) han demostrado que la p53 normal, pero no la mutante, se liga al ADN y actúa como un activador transcripcional^{15,16}. Milner y Metcalf (1991) han resaltado que la p53 mutada parece actuar de un modo negativo dominante, formando complejos con la p53 normal que bloquea su función normal¹⁷.

Donehower et al (1992) consiguieron ratones transgénicos, con deleciones de los dos alelos de p53, lo cual generó muchas sorpresas ya que estos ratones p53⁻/p53⁻ son completamente viables y fértiles, y no se han observado malformaciones embrionarias. El rasgo fenotípico mayor es que aparece cáncer con gran frecuencia y precocidad: en el 75 % de los animales a los 6 meses y en el 100 % a los 10 meses. Los animales que son heterocigóticos p53⁺/p53⁻ los ratones también desarrollan cáncer, pero sólo el 30 % de los animales y después de los 15 meses. La p53 no es esencial en la función celular normal, pero su inactivación es un factor esencial en el desarrollo de algunos tipos de neoplasia¹⁸.

LA p53, EL DAÑO DEL ADN Y LA ESTABILIDAD GENÉTICA

Maltzman et al (1984) demostraron que la irradiación UV de células normales del ratón induce estabilización de la p53 *in vivo*¹⁹ y Kastan et al (1991) confirmaron estos resultados con el uso de radiaciones gamma que también producen el mismo efecto y que la acumulación de p53 produce un bloqueo transitorio del ciclo celular en la fase G1, justo antes de iniciar la duplicación del ADN¹⁴. Se cree que este bloqueo de la división celular, a

continuación del daño del ADN, da tiempo a la célula para inducir una respuesta para reparar las lesiones. Se observó que las células con expresión de una p53 mutada no presentan este fenómeno, estas células no dejan de dividirse después del daño del ADN^{5,6,12}.

Estos estudios conducen a la conclusión de que la p53 ayuda a preservar la integridad genética de la célula, la p53 actuaría como una especie de "semáforo" que induciría una detención de la división celular para dar tiempo a la célula para reparar el daño del ADN. Por esta cualidad, la p53 fue denominada por Lane (1992) guardián del genoma humano¹². Si la célula no es capaz de reparar el daño del ADN se supone que la p53 induciría la muerte celular por apoptosis. Las células tumorales que contienen p53 mutada no son capaces de mantener su integridad genética, porque no reciben la señal de detención de la división celular, dando por resultado una célula cuyo genoma es menos estable y que acumulará varias mutaciones dando lugar a clones con mayor malignidad.

Investigando las diferencias entre la p53 natural y la p53 mutada, se descubrió un gen que es específicamente inducido por la p53 natural: el gen *WAF 1*, el cual codifica la proteína p21. La sobreexpresión de la proteína p21 en varios tipos celulares induce detención del crecimiento en la fase G1 que es dependiente de la p53 natural. Esta proteína p21 también ha sido identificada por diferentes grupos como siendo capaz de asociarse específicamente con la cinasa ciclín-dependiente (cdk2) e inhibir la actividad cinasa de los complejos cdk2-ciclina. La inducción de lesiones del ADN en células con p53 natural causa sobreexpresión de *WAF1* → ARN → proteína; pero esto no se observa en presencia de p53 mutada²⁰.

Usando anticuerpos específicos para la proteína p21 se podría demostrar que la expresión de esta proteína es responsable de la pérdida de actividad del complejo cdk2-ciclín E. Este resultado es una buena demostración de que la p53 interviene en un estadio final de la fase G1, en el momento de la transición G1/S^{5,6,20}.

LA p53 Y LA DIFERENCIACIÓN

La p53 tiene un papel controvertido en el desarrollo embrionario precoz y durante la diferenciación. La p53 disminuye en la fase del desarrollo máximo, durante la parte media de la gestación que es la fase de máximo progreso en la diferenciación^{5,6}. Los estudios de Donehower et al (1992) con ratones transgénicos observaron un desarrollo embrionario normal en ratones p53⁻/p53⁻¹⁸.

LA p53 COMO GEN: ESTRUCTURA Y CONSERVACIÓN

La proteína p53 puede ser dividida en tres regiones: *a)* aminoterminal que contiene un gran número de residuos básicos y hay un gran número de prolinas; *b)* carboxiterminal que es muy hidrofílico y contiene muchos residuos cargados, y *c)* la región central de la proteína que contiene varias regiones muy hidrofóbicas y pocos aminoácidos cargados. La proteína p53 de diversas procedencias muestra una homología no uniformemente distribuida y hay cinco bloques bien conservados durante la evolución: cuatro bloques están en la región central y el restante se encuentra localizado en el aminoterminal. La presencia de cuatro bloques en la región central muestra la gran importancia de la misma; es la región de contacto con el ADN⁵.

ONCOGÉN O ANTIONCOGÉN

Los experimentos que muestran que la p53 y el oncogén activado *H-RAS* podían cooperar para producir focos transformados llevó a clasificar la p53 como un oncogén nuclear durante algún tiempo; pero sólo la p53 mutada coopera con el oncogén activado *H-RAS* y no lo hace la p53 natural^{5,6}. Otros estudios sugirieron que la p53 pertenece a los genes supresores de tumores, generalmente considerados como reguladores negativos del crecimiento celular, con las siguientes características: *a)* pérdida de la función, ocurriendo por inactivación de los dos alelos del gen; *b)* la reintroducción del gen supresor en el tumor puede abolir el poder carcinógeno de aquella célula, y *c)* son genes recesivos y están implicados en cánceres hereditarios⁵.

LA PROTEÍNA p53 Y LOS CÁNCERES HUMANOS

La proteína p53 está inactivada en muchos cánceres humanos. El análisis genético del cáncer colorrectal revela una tasa muy alta de pérdida heterocigótica del brazo corto del cromosoma 17, que contiene el gen de la proteína p53. El análisis con la PCR y la secuenciación del alelo restante de p53 muestra que éste contiene a menudo una "point mutation" (Baker et al, 1989)²¹.

Los cánceres hereditarios han merecido especial atención referente a la p53. El síndrome de Li-Fraumeni que se presenta con un amplio espectro de tumores malignos: osteosarcomas, cánceres de mama, sarcomas

de partes blandas y leucemias que aparecen a edades tempranas, en el 50 % de los individuos antes de los 30 años y en el 90 % antes de los 70 años. Se han observado mutaciones en la p53 que afectan a toda la línea germinal en varias familias con este síndrome²²⁻²⁴.

Lemoine (1994) señala que la mutación de la p53 caracteriza una forma altamente agresiva de cáncer de mama, asociada con un pobre pronóstico tanto en los casos con ganglios axilares positivos o negativos²⁵.

En el cáncer de próstata que tanta homología tiene con el de mama, Voeller et al (1994) observaron una baja tasa de mutación de la p53²⁶.

Por todas estas razones se considera a la p53 como un gen supresor del cáncer y que junto con el oncogén *RB* son los genes supresores por excelencia. La p53 tiene aspectos particulares: las mutaciones (> 95 %) son "point mutations" que producen una proteína mutante que en todos los casos ha perdido su actividad transactivacional⁶.

Se considera que hay tres clases de mutaciones de p53: *a)* mutaciones nulas que inactivan totalmente la p53; pero no interfieren en la transformación; *b)* mutaciones dominantes negativas con una p53 totalmente inactiva que todavía es capaz de interferir con la p53 natural, y *c)* mutaciones dominantes positivas donde la función normal de la p53 está alterada y la p53 mutante adquiere una actividad oncogénica que está directamente implicada en la transformación maligna^{5,6}.

Horak et al (1991) comunicaron la existencia de sobreexpresión de la proteína p53 en > 50 % de los cánceres de mama²⁷.

¿MUTACIONES O VARIACIONES?

Hay que saber si los cambios son deletéreos e inactivan la p53 funcionalmente. Hay varias observaciones para probar que son verdaderas mutaciones adquiridas: *a)* las mutaciones están presentes sólo en el tejido tumoral y ausentes en los tejidos normales del mismo enfermo; *b)* el análisis secuencial del gen *p53* de muchos tejidos normales muestra que hay pocos polimorfismos en el gen humano p53; *c)* estas alteraciones se encuentran sólo en los bloques altamente conservados de la p53, y *d)* el análisis de las propiedades de varias p53 mutantes, frecuentemente encontradas en cánceres humanos, muestra que han perdido su actividad transactivacional. Sin embargo, un estudio más reciente de más de 20 mutantes indica que algunas de las mutaciones de baja frecuencia no alteran ninguna de las propieda-

des de la proteína p53 (transactivación o inhibición del crecimiento).

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DE LA p53

Hay dos ejemplos de alteraciones en la p53 que no implican una alteración directa del propio gen de la p53: *a)* el gen *MDM2* está amplificado en los sarcomas humanos y el *MDM2* es capaz de inactivar la función transactivadora de la p53; este fenómeno se confirmó en sarcomas humanos y en el 10 % de los tumores cerebrales (glioblastomas y astrocitomas), y *b)* algo controvertido es el antagonismo entre la infección por HPV (papiloma virus humano) y la función de la p53 por medio de la proteína E6^{5,6}.

LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS DEL GEN DE LA p53

Análisis molecular

La PCR seguida de análisis secuencial de las bases permiten el estudio directo de la naturaleza de la mutación en el gen, pero la mutación de un solo nucleótido de los 23.000 que conforman el gen, complica el hallazgo de la mutación en un caso concreto. Pero para ser efectiva esta técnica requiere ser desarrollada más ampliamente.

Análisis inmunohistoquímico

Una de las propiedades más significativas de las proteínas p53 mutantes es el alargamiento de su vida media. En las células normales, la p53 es indetectable por tener una vida media extremadamente corta (15-20 min). En células transformadas, la proteína p53 mutada es mucho más estable, con una vida media de 24 h y se acumula en el núcleo^{10,11}. Esta acumulación nuclear de la p53 mutada permite su detección por métodos histoquímicos. Este procedimiento se ha empleado en diversos tipos de cáncer con una buena correlación entre el análisis molecular (presencia de una mutación) y el análisis inmunohistoquímico (sobreexpresión de la proteína mutante).

La ventaja de este procedimiento es que puede ser realizado de un modo rutinario en los laboratorios de histología, pero tiene el inconveniente de que algunas mutaciones pueden abolir la expresión de la p53 ("non-

sense mutations", inserciones, deleciones, mutaciones de señal), no producen la proteína y como consecuencia dan un resultado negativo (5-10 % de los casos). Por otra parte, los tumores pueden sobreexpresar la p53 en la completa ausencia de mutaciones en cualquier parte del gen. Esta hiperexpresión es específica de las células tumorales y no afecta a los tejidos normales, sería una alteración desconocida de la p53. Los problemas de evaluación de la hiperexpresión de p53 en los tumores malignos han sido revisados por Dowell et al (1994)²⁸.

Se han desarrollado nuevos anticuerpos monoclonales frente a p53 humana que pueden utilizarse incluso para realizar estudios histoquímicos con tejidos antiguos incluidos en parafina⁵.

Análisis serológico

Ya Davidoff en 1992 observó que el 23 % de las enfermas con cáncer de mama tenían anticuerpos anti-p53 circulantes en su suero, si había sobreexpresión de la p53, y no había anticuerpos anti-p53 circulantes en los casos con p53 normal o baja²⁹.

Generalmente en el cáncer de pulmón, con una tasa alta de mutaciones de p53 hay una buena correlación entre la presencia de anticuerpos circulantes y la de alteraciones de la p53, la frecuencia de estos anticuerpos anti-p53 es alta (24 %). La seropositividad es muy baja en el cáncer de próstata o en los mesoteliomas con valores de p53 mutada muy bajos. En estudios multifactoriales se demostró una correlación muy buena entre la presencia de anticuerpos anti-p53, sobreexpresión de la proteína mutada en el tumor y la presencia de una mutación en el gen. Un análisis detallado de estos anticuerpos indica que reconocen tanto la p53 normal como la mutada^{5,6}.

Regidor et al (1996) en 61 casos recidivantes de cáncer de mama observaron la presencia de autoanticuerpos p53 en el 14,5 % de los casos; pero concluyen que este parámetro no puede utilizarse como un factor pronóstico, ya que el intervalo libre de enfermedad no difiere entre los casos positivos y los negativos³⁰. Mayerhofer et al (1999) en un estudio en casos de cáncer de vulva, encuentran los autoanticuerpos en el 10 % de las enfermas y no había ninguna correlación con el pronóstico³¹.

El análisis serológico tiene las siguientes ventajas: *a)* simplicidad del análisis por la técnica ELISA³²; *b)* no se necesita tejido tumoral; *c)* la posibilidad de seguir la suerte de los anticuerpos durante el tratamiento del enfermo, y *d)* determinarla en enfermas con metástasis inasequibles.

El Laboratorio CALBIOCHEM, Oncogene Research Product, desarrolló una técnica de ELISA para la determinación de la p53 mutada, basándose en que la p53 natural y la mutada pueden distinguirse sobre la base de la reactividad diferencial con anticuerpos monoclonales¹⁰. El test ELISA es un ensayo inmunoenzimático en sándwich que emplea anticuerpos monoclonales del ratón y policlonales del cobaya. Los anticuerpos monoclonales son específicos para la mayoría de las proteínas p53 mutadas. No presenta reacciones cruzadas con otras proteínas plasmáticas o celulares. Tiene una gran sensibilidad y permite detectar pequeñas cantidades (0,05 ng/ml) de p53 mutada³³. Es una técnica que necesita más trabajos de investigación para su homologación clínica; pero es muy prometedora³⁴. El Grupo de Investigación Oncológica hemos realizado estudios con esta técnica en enfermas de cáncer de mama en remisión clínica prolongada y en enfermas con una recidiva en actividad clínica y los resultados son coherentes con todo lo publicado hasta la fecha sobre p53 en el cáncer de mama³⁵.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LA p53 MUTADA

Es posible correlacionar las alteraciones del gen *p53* con parámetros diagnósticos o pronósticos y aplicarlos para escoger un plan terapéutico. Los casos de cáncer de mama con p53 negativa, es decir, con ausencia de p53 mutada tienen mejor pronóstico. Y la presencia de p53 positiva significa la presencia de proteína mutada, la cual se sobreexpresa —acumula— en los tejidos por tener una vida media más larga que la natural.

El cáncer de mama tiene una expresividad clínica y un pronóstico diferente en cada país y del mismo modo la p53 mutada en el cáncer de mama varía de un país a otro. Meng et al (1999) observaron que 178 enfermas españolas de cáncer de mama con ganglios axilares negativos, 59 % presentaban una o varias mutaciones; frecuencia que es muy diferente de la observada en poblaciones de Estados Unidos y norte de Europa³⁶.

Cattoreti et al (1988) ya observaron una sobreexpresión de la p53 en enfermas con cáncer de mama de mal pronóstico (RE negativos y grado III)³⁷. Thor et al (1992) y Barnes et al (1993) concluyeron que la alteración del gen *p53* podía ser considerada como un nuevo marcador pronóstico del cáncer de mama, independiente, asociado con una corta supervivencia^{38,39}.

Allred et al (1993) presentaron los resultados más prometedores para la clínica, al analizar una serie de 700 casos de cáncer de mama N0 (ganglios axilares ne-

gativos) y el 52 % (362/700) de las enfermas tenían una alteración de la p53 (histoquímica). Estas mismas enfermas con mutaciones de la p53 tenían un intervalo libre de enfermedad más corto que los casos con p53 normal. Si se puede confirmar en estudios posteriores este trabajo sentaría las bases de un uso clínico importante en unos casos de cáncer de mama que son muy interesantes clínicamente; estos casos son curables en la mayoría de las ocasiones y puede extremarse la vigilancia en los casos con p53 mutada. Aún es muy pronto para poder decir que pueda convertirse en un marcador que nos permita decidir dar o no quimioterapia adyuvante⁴⁰. Allred et al (1992) habían realizado un análisis multivariable de 544 cánceres de mama congelados de enfermas con ganglios axilares negativos y encontraron que la acumulación de p53, determinada por métodos histoquímicos, es un significativo factor pronóstico adverso para el intervalo libre de enfermedad⁴¹.

Pharoah et al (1999) en un estudio de metaanálisis del valor pronóstico de la p53 mutada comprobaron que en tres series de casos con p53 positiva y ganglios axilares negativos el riesgo combinado es 1,7 (1,2-2,3) y en otras tres series con ganglios axilares positivos el riesgo combinado es 2,6 (1,7-3,9)⁴².

Un hallazgo interesante referente a la p53: algunos agentes antitumorales tales como las radiaciones ionizantes actúan induciendo la apoptosis en las células tumorales y las células con p53 mutada son totalmente resistentes a las radiaciones terapéuticas, es decir, no entran en apoptosis⁴³.

Nishimura et al (1999) concluyen que en el cáncer de mama la apoptosis puede reflejar el comportamiento biológico, principalmente un mayor grado de agresividad biológica y de pronóstico desfavorable⁴⁴.

El problema aún no resuelto es la posibilidad de emplear la p53 para predecir la respuesta a la quimioterapia y creemos que es un problema que requiere más trabajos de investigación. Colleoni et al (1999) en un trabajo, que incluye pocos casos y su significación es limitada, observaron respuesta terapéutica en 12 de 14 casos con p53 positiva y en 31 de 59 casos con p53 negativa⁴⁵.

RESUMEN

Es una revisión crítica de las bases biológicas de la proteína p53 en la apoptosis, su importancia en la carcinogénesis experimental y humana y los procedimientos técnicos de laboratorio que pueden emplearse para su determinación en los enfermos de cáncer.

La hiperexpresión de p53 por la presencia de una mutación origina una acumulación excesiva en los tejidos, relacionada con la vida media de la proteína mutada que es aproximadamente unas 60 veces más larga que la proteína natural. Los clínicos hablan de positividad de la p53 como la presencia de p53 mutada. Quizás, uno de los aspectos mejor estudiados de esta proteína es su comportamiento en el cáncer de mama.

Actualmente puede ser considerada un factor pronóstico del cáncer de mama y es recomendable incluirla entre las determinaciones inmunohistoquímicas a realizar en la pieza por el anatomopatólogo clínico.

Los procedimientos empleados para investigar la p53 son: a) análisis molecular; b) análisis inmunohistoquímico, y c) análisis serológico. El último es un nuevo y prometedor procedimiento serológico para detectar la p53 mutada en sangre periférica que abre importantes expectativas.

Es útil para identificar los casos de mal pronóstico entre el grupo favorable con NO (ganglios axilares negativos).

REFERENCIAS

1. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3.
2. Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ. Adenovirus E1b-58 kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28: 387-94.
3. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
4. Crawford L. The 53,000 dalton cellular protein and its role in transformation. *Int Rev Ex Pathol* 1983; 25: 1-50.
5. Sosis T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. En Cowell JK. *Molecular Genetics of Cancer*. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd, 1995; 135-178.
6. Yarnold JR, Straton M, Mc Millan TJ. *Molecular Biology for Oncologists*. Londres: Chapman & Hall, 1993.
7. Oren M, Levine A. Molecular cloning of a cADN specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 56-9.
8. Benchimole S, Lamb P, Crawford D et al. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somatic Cell Mol Genet* 1985; 11: 505-9.
9. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
10. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9: 1595-602.
11. Lane DP, Benchimol S. p53: Oncogene or antioncogene? *Gene and Dev* 1990; 4: 1-8.
12. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
13. North G. Cell Cycle-Starting and stopping. *Nature* 1991; 351: 604-5.
14. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D et al. Participation of p53 protein in the cellular response to ADN damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-11.
15. Kern S, Kinzler K, Bruskin A et al. Identification of p53 as a sequence specific ADN protein. *Science* 1991; 252: 1708-11.
16. Scharer E, Iggo R. Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast. *Nucleic Acids* 1992; 20: 1539-45.
17. Milner J, Metcalf EA. Cotraslation of activated mutant p53 with wild drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; 65: 765-74.
18. Donehower LA, Harvey M, Slage BL et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992; 356: 215-21.
19. Maltzmann W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells *Mol Cell Biol* 1984; 4: 1689-94.
20. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF 1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
21. Baker SJ, Fearon ER, Nigro J et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-21.
22. Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? 1969; 71: 747-52.
23. Li FP, Fraumeni JF. Familial breast cancer, soft-tissue sarcomas, and other neoplasms [carta]. *Ann Int Med* 1975; 83: 833-4.
24. Li FP, Fraumeni JF. Prospective study of a family cancer syndrome. *JAMA* 1982; 247: 2692-4.
25. Lemoine NR. Molecular biology of breast cancer. *Ann Oncol* 1994; 5 (Suppl S4): 31-7.
26. Voeller JH, Sugars LY, Pretlow T, Gelman E. p53 oncogene mutations in human prostate cancer specimens. *J Urol* 1994; 151: 492-5.
27. Horak E, Smith K, Bromley L et al. Mutant p53, EGF receptor and c-erbB2 expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 6: 482-90.
28. Dowell SP, Wilson POG, Derias NW, Lane DP, Hall PA. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 1994; 54: 2914-8.
29. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 76: 2420-4.
30. Regidor PA, Regidor M, Callies R, Schindler AE. Detection of p53 auto-antibodies in the sera of breast cancer patients with a new recurrence using an ELISA assay. Does a correlation with the recurrence free interval exist? *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17: 192-9.

31. Mayerhofer K, Hefler L, Schindl M et al. p53 antibody response in patients with vulvar cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 2323-6.
32. Crowther JR. ELISA. Theory and Practice. Vol 42. *Methods in Molecular Biology*. Totova: Humana Press, 1995.
33. Calbiochem. Oncogen Research Products. p53 mutant selective quantitative. ELISA. Cambridge: Bioscience, 1996.
34. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9: 1595-602.
35. Quintela Senra D. Perfil endocrinometabólico del cáncer de mama. Cádiz, 2000.
36. Meng L, Lin L, Fresno M, Morales AR, Nadji M. Frequency and pattern of p53 gene mutation in a cohort of Spanish women with node-negative breast cancer. *Int J Oncol* 1999; 15: 555-8.
37. Cattoreti G, Rilke F, Andreola S et al. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41: 178-83.
38. Thor AD, Moore Dhii, Edgerton SM et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *JNCI* 1992; 84: 845-55.
39. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Human Pathology* 1993; 24: 469-76.
40. Allred DC, Clark GM, Elledge R et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *JNCI* 1993; 85: 200-6.
41. Allred DC, Clark GM, Brown RW et al. Mutation of p53 is associated with increased proliferation and early recurrence in node-negative breast cancer [resumen]. *Proceedings of the ASCO*, 1992; 11: 55.
42. Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999; 80: 1968-73.
43. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW et al. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-9.
44. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, et al. Apoptosis in breast cancer and its relationship to clinicopathological characteristics and prognosis. *J Surg Oncol* 1999; 71: 226-34.
45. Colleoni M, Orvieto E, Nole F, et al. Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 574-9.