

Sobreexpresión de la proteína P53 en el epitelio ectocervical de pacientes con displasias en el hospital Víctor Lazarte Echegaray, Trujillo, 2012

Sobreexpresion of the protein P53 in epithelium ectocervical of patients whit displasias hospital Víctor Lazarte Echegaray, Trujillo.

Deivid Afiler-Horna¹, Willian Blas-Cerdán¹, Marcos Capristán-Díaz², Gina Zavaleta-Espejo¹, Mirtha Afiler-Horna³, Julio Chávez-Milla⁴.

emerson.afiler@gmail.com¹

¹ Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo-Perú. ² Hospital Víctor Lazarte Echegaray, Trujillo-Perú. ³ Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo-Perú. ⁴ Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas-Perú

RESUMEN

Se determinó la sobreexpresión de la proteína P53 en biopsias de displasias cervicales de pacientes del hospital Víctor Lazarte Echegaray. Para ello se estudiaron cuarenta biopsias del epitelio ectocervical con diagnóstico de displasia cervical de las cuales veintiún muestras corresponden a displasia leve, doce a displasia moderada y siete a displasia severa, utilizando el método inmunohistoquímico estreptavidina-biotina-peroxidasa con el anticuerpo monoclonal anti-P53, considerando casos positivos, si la inmunoreacción presentó un color marrón pardo. El 60% de los casos estudiados mostraron sobreexpresión inmunohistoquímica para P53, de las cuales el 50 %, el 29.17 % y el 20.83 % correspondieron a displasias severas, displasias moderadas y displasias severas respectivamente; y una hiperexpresión en 33.33% casos. Se concluye con la sobreexpresión de P53 en las biopsias analizadas y una relación inversa con respecto al grado de diferenciación displásica.

Palabras clave: P53, cuello uterino, displasias.

ABSTRACT

Overexpression of the P53 protein was determined in biopsies of cervical dysplasia of patients from the Hospital Victor Lazarte Echegaray. For this purpose, forty biopsies of the ectocervical epithelium with a diagnosis of cervical dysplasia were studied, of which twenty-one samples correspond to mild dysplasia, twelve to moderate dysplasia and seven to severe dysplasia, using the immunohistochemical method streptavidin-biotin-peroxidase with the anti-P53 monoclonal antibody. Considering positive cases, if the immunoreaction presented a brown-brown color 60% of the cases studied showed immunohistochemical overexpression for P53, of which 50%, 29.17% and 20.83% corresponded to severe dysplasias, moderate dysplasias and severe dysplasias respectively; And a hyperexpression in 33.33% of cases. It concludes with the overexpression of P53 in the biopsies analyzed and an inverse relation with respect to the degree of dysplastic differentiation.

Keywords: P53, cervical dysplasia.

RECIBIDO: MAYO DE 2016

ACEPTADO: ENERO , 2017

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es la séptima causa de mortalidad mundial, ocurriendo en el continente africano y asiático tasas promedios de 21.7 y 13.7 por 100 mil mujeres respectivamente. En el Perú, según los registros poblacionales de cáncer de cuello uterino, se reportó en Lima, durante los años 2004-2005, una tasa de incidencia del 19.6 casos por 100000 mujeres; en Arequipa 35.2 y en Trujillo 43.9 y se estima que fallecieron 1,646 pacientes por esta causa.¹

La displasia cervical (DC) se manifiesta con cambios morfológicos celulares y/o nucleares, que pueden ser graduales, clasificándolos en leve, moderada o severa.² La lesión se inicia en la zona de transformación del epitelio ectocervical escamoso estratificado no queratinizado a endocervical columnar simple.³ En algunas mujeres la infección persistente, asociada al Virus del Papiloma Humano (HPV), puede transformar estas células metaplásicas inmaduras en células atípicas; y con el paso del tiempo, el epitelio displásico puede regresar al normal, mantenerse como displasia o progresar a un cáncer cervical invasivo.⁴

El proceso de transformación, de células normales a células cancerosas, presenta una cascada de alteraciones genéticas; así como, la pérdida del control de los mecanismos de replicación, reparación del ADN y segregación del material genético, causados por un oncogén que produce una proteína capaz de provocarlo⁷; y un gen supresor de tumor, que codifica proteínas que intervienen en condiciones normales en el control del ciclo celular.^{5,6,7}

La incidencia y el tipo de mutación difieren en cada neoplasia; debido a su función en las reparaciones genéticas y en la respuesta de las células dañadas. Éste gen, actúa como controlador del ciclo celular, iniciador de apoptosis, preservador de la estabilidad genética y como promotor de la diferenciación celular.⁹

La inactivación del gen *p53* es muy importante para el desarrollo del carcinoma cervical, inducida por la oncoproteína E6 de los serotipos HPV-16 o HPV-18, o debido a mutaciones. Cada serotipo de HPV tendrá un efecto diferente en la célula afectada según la proteína que codifique.¹⁰ Estos trastornos suelen asociarse con un patrón inmunohistoquímico de sobreexpresión en P53, que se puede advertir en la progresión de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) a carcinoma invasor.¹¹

El gen supresor alterado con mayor frecuencia en neoplasias es el *p53*, que está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, región uno, banda tres, subbanda uno (17p¹⁰); y presenta 11 exones, siendo el primero no codificante; produciendo un transcrito de ARNm cuyo producto codificado es una fosfoproteína nuclear de vida media corta involucrada en el control del ciclo celular.^{2,8} Mutaciones en el gen *p53* se traducen en una proteína P53 de vida media prolongada,^{13,14} la cual llega a ser detectada en el núcleo de la célula por inmunohistoquímica, mientras que el tipo salvaje tiene una vida media muy corta y no es detectable en células normales.^{8,15} Una variedad de tumores humanos que involucran al gen *p53* mutado, mantienen pronóstico negativo de aquellos tumores del mismo tipo que contienen el gen del tipo salvaje, como por ejemplo en cánceres de mama, de riñón y colo-rectal.¹⁶

Una serie de técnicas de biología molecular, permiten establecer la presencia de mutaciones puntuales en el ADN, cuya aplicación en los tumores y lesiones preneoplásicas ha aportado valiosa información en el conocimiento de la progresión desde una célula genéticamente alterada hasta el desarrollo de una neoplasia.¹⁵ En las técnicas de inmunohistoquímica, se utilizan marcadores enzimáticos como fosfatasa alcalina o la peroxidasa capaces de tornar de color un sustrato incoloro, tales como diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos secundarios como biotina o proteína A.⁷

Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas, permiten una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz. Los anticuerpos monoclonales se ha permitido aumentar la especificidad y sensibilidad de esta técnica.¹⁷ Por otro lado es importante señalar que la actividad proliferativa de un tumor se mide mediante la expresión inmunohistoquímica del antígeno asociado a proliferación celular.¹⁸

El gen *p53* cumple función supresora de anomalías celulares participando en la regulación de apoptosis de células viejas y defectuosas, de manera que un defecto en este gen podría dar lugar a presencia de células inmortales y es así que consideramos de vital importancia investigar por métodos inmunohistoquímicos la sobreexpresión de P53 en lesiones pre neoplásicas de carcinoma de cuello uterino, la misma que está relacionada con la evolución de las lesiones pre-cancerosas.

Por lo tanto la investigación tuvo como objetivo determinar la sobreexpresión de la proteína P53 en el epitelio ectocervical de pacientes con displasias entre 18 a 78 años de edad en el hospital Víctor Lazarte Echegaray durante Febrero-Mayo del 2012, así como establecer la frecuencia de casos con sobreexpresión de la proteína P53 en los distintos grados de displasia y el porcentaje de hiperexpresión de la proteína P53.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de las biopsias:

Las cuarenta biopsias de displasia del cuello uterino de pacientes, proporcionados por el departamento de patología del hospital Víctor Lazarte Echegaray (base de datos del Servicio de Anatomía Patológica) fueron seleccionadas según los casos con diagnóstico de displasia leve, moderada o severa de epitelio ectocervical de cuello uterino en mujeres de 18 a 75 años de edad.

Obtención de la muestra:

Se trabajó con 40 biopsias ectocervical incluidas en tacos de parafina, cuyo diagnóstico correspondió a lesiones displásicas ectocervicales, diagnosticados entre los meses Febrero a Mayo de 2012 en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Víctor Lazarte Echegaray.

Coloración inmunohistoquímica.

El estudio inmunohistoquímico de la proteína P53 se realizó en el laboratorio del área de inmunohistoquímica y coloraciones especiales del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Víctor Lazarte Echegaray.

Tratamiento de las biopsias previo a la coloración.

Utilizando un micrótopo se realizaron cortes histológicos de 5 micras de espesor de los tejidos incluidos en bloques de parafina, correspondiente a cada caso en estudio. Los cortes obtenidos de biopsias fueron tratados con el fijador poly-1-lisina posteriormente fueron depositados sobre láminas porta objeto. Luego sometidos a los procesos de desparafinación e hidratación de los tejidos.

Coloración y Detección inmunohistoquímica (IHQ) de la proteína P53.

Para la inmunoreacción de la proteína P53 en los cortes histológicos antes tratados pasaron por el protocolo determinado para complejo Biotina-Streptavidina-Peroxidasa. Cada caso fue sometido a un pool de anticuerpos marca Dako aplicando el método de Biotina-Streptavidina-Peroxidasa (protocolo Dako) y el anticuerpo monoclonal primario específico para anti-P53. La inmunoreacción fue revelada con diaminobenzidina.

Demostración de Inmunotinción.

El patrón de distribución que determinó la presencia de la proteína P53 fue granular, de color pardo rojizo y de localización intranuclear, teniendo como referencia controles positivos conocidos y trabajados simultáneamente con los casos del estudio. Se consideró como caso negativo aquel que presentó al menos dos células marcadas.

Observación de láminas de IHQ para determinación de acumulación de la proteína P53.

La observación de láminas se realizó utilizando un microscopio óptico de marca Olympus modelo CX21, se observó a 100 y 400 aumentos. Se tuvo en cuenta la coloración monoclonal con anticuerpo anti-P53, clasificándola con “+” para la presencia de la proteína P53 acumulada y con “-” cuando no exista presencia de la misma o presentó menos de 2 células con el núcleo coloreado. Estas clasificaciones fueron redactadas en la lista de cotejos integrada.

Observación de las láminas Hematoxilina–Eosina (H-E)

La observación de láminas se realizó utilizando un microscopio óptico de marca Olympus modelo CX21, se observó a 100 y 400 aumentos. Para la observación de este tipo de coloración se siguió el esquema según Zavala.²⁷

Procesamiento estadístico de datos

Los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje y figuras, utilizando Excel Profesional 2010.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra que el 52.50 % de los casos, corresponde a displasias leves, el 30.00 % corresponde a displasias moderadas; y el 17.50 % corresponde a displasias severas del total de casos estudiados. Además, se aprecia que en displasias leves se encontraron doce casos positivos para sobreexpresión de la proteína P53 representando un 50.00 % del total de casos positivos analizados, para displasias moderadas se observa siete casos positivos para sobreexpresión de la misma, representado en 29.17%; del mismo modo en displasias severas, se reporta cinco casos positivos para la sobreexpresión, representado en 20.83 % del total de casos positivos analizados.

En la Tabla 2 se indica el porcentaje de casos positivos y negativos de sobreexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias leves; de veintinueve casos analizados de displasia leve, el 57.14 % representado por doce casos, mostró positivo al inmunomarcaje.

En la Tabla 3 se observa el porcentaje de casos positivos y negativos de sobreexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias moderadas; de doce casos analizados de displasia moderada, el 58.33 % representado por siete casos, arrojó positivo al inmunomarcaje.

En la Tabla 4 se indica porcentaje de casos positivos y negativos de la sobreexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias severas; de siete casos analizados de displasia moderada, el 71.43 %, representado por cinco casos, arrojó positivo al inmunomarcaje.

La Tabla 5 muestra el porcentaje de casos positivos con hiperexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias; observando un 33.00 % del total de positivos para hiperexpresión representados en ocho casos.

DISCUSIÓN

Se encontró un 60% con sobreexpresión de P53 (P53+) del total de casos de displasia (Tabla 1), lo cual difiere con los resultados hallados por Guerrero y Castilla⁸ quienes, en un estudio de displasias encontraron 27.27% de casos con sobreexpresión de P53. Sin embargo, se muestran similares a los reportados para mutación del gen *p53*; y la sobreexpresión inmunohistoquímica de la proteína P53, la cual no supera el 60% y 50% según lo citado por Roa.^{15,19}

La tendencia respecto a la incidencia de casos con P53+ se mantiene según el grado de displasia (Tabla 5), esto refleja una relación inversa obteniendo mayor número de casos con displasia leve (DL) frente a, los de displasia moderada (DM) y éstos a su vez son mayores a los casos de displasia severa (DS); es así que Guerrero y Castilla⁸, obtuvieron porcentajes de 53.33>40.00>6.67 (DL>DM>DS) respectivamente. Astudillo¹⁹ halló una tendencia totalmente inversa (DS>DM>DL), ello puede atribuirse al criterio usado para determinar la proteína P53+ la cual consideró como tal, si presentaba inmunoreacción citoplasmática o nuclear, así como al criterio de selección de la muestra. El incremento de P53+ descrito por Roa¹⁵, se relaciona a los grados más leves

de displasia, reduciéndose en estados más avanzados. Así mismo, se reportan que los carcinomas bien diferenciados tienen menor probabilidad de expresar acumulación de P53 que otros grados menores, esto podría ser un factor más por el cual los tumores bien diferenciados son en general menos agresivos.²⁰

La proteína en estado salvaje del gen *p53*, tiene una alta tasa de recambio que le confiere una vida media muy corta de (20–30 min), lo que significa que el nivel de degradación es mayor al de su formación²¹, esto determina que en condiciones normales no pueda ser detectada inmunohistoquímicamente. Sin embargo, al mutar el gen se produce una proteína defectuosa, que no puede ser degradada, acumulándose por tener una vida media larga mayor a seis horas, permitiendo de esta manera su inmunodetección¹⁵. Los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica no pueden discriminar entre P53 mutante y P53 salvaje, por lo tanto, toda proteína P53 detectable inmunohistoquímicamente es considerada mutante, como se observa claramente en el grupo de 24 displasias inmunoreactivas analizadas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que un incremento de la P53 tipo salvaje puede ocurrir en el proceso de reparación del ADN, facilitando su detección inmunohistoquímica.⁸

Los resultados encontrados (Tablas 2 al 4) son diferentes a los establecidos por Guerrero y Castilla⁸, con valores inferiores a 50% para P53+ en cada tipo de displasia evaluada, así mismo consideran que en casos de displasias con ausencia de inmunoreacción, es necesario considerar y discutir la posibilidad de una coloración falso negativo, la cual podría significar en algunos casos un gen *p53* mutado con inmunoreacción negativa. Esto se puede explicar cómo una delección que permite la ausencia de producción de la proteína P53 o por una mutación puntual que no pueda estabilizar suficientemente a la proteína y sea necesario un mecanismo adicional así como un estado transformado o avanzado de agresividad del tumor, eventos requeridos para una coloración P53 positiva.¹⁵ En relación a la presencia de una P53 mutada, algo similar podría ocurrir en la interpretación del falso positivo, inmunoreacción que puede confundirse como una consecuencia de la interrupción de los eventos de degradación de la *p53*.⁸

Es importante mencionar, que la oncoproteína E6 de los HPV de riesgo elevado, se liga a la proteína de tipo salvaje *p53* promoviendo su degradación e inhibiendo la estabilidad y activación, lo que normalmente debería ocurrir, en respuesta a la expresión del oncogén HPV-E7, el mismo que permite la pérdida de la función normal del anti-oncogén y consecuentemente favorece la carcinogénesis cervical.^{8,22}

Cuando el ADN está dañado, *p53* se activa para mantener la integridad de su secuencia, bien deteniendo ciclo celular mientras el daño es reparado, o alternativamente, dirigiendo la célula hacia la apoptosis. El *p53* detecta la presencia de daño celular mediante dos quinasas relacionadas, Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) y Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related (ATR), que detectan diferentes tipos de lesiones en el ADN, pero ambos activan vías de señalización similares, fosforilando diversas proteínas implicadas en la reparación del ADN. La fosforilación de P53 la libera de su asociación con Mdm2, por lo que su vida media aumenta y puede ejercer su función de factor transcripcional, aumentando la expresión de genes importantes para la reparación del daño en el ADN, para inhibir la progresión a través del ciclo celular (*p21*) y para promover la apoptosis en caso necesario (BAX).¹²

Hay que tener en cuenta que no siempre se observa inmunomarcaje para la proteína P53 en cáncer de cuello (CC), y la experiencia muestra que en este sentido, ha sido similar a la de otros investigadores; sin embargo algunos consideran que la presencia de P53 se incrementa con los grados de NIC y con el mal pronóstico, por lo que han planteado que esta proteína debería detectarse en el CC.²³

Tabla 1. Porcentaje de casos con displasias y sobreexpresión de proteína P53 en el epitelio ectocervical de pacientes con displasias en el hospital Víctor Lazarte Echegaray, 2012.

| Grados de Displasia | N° de casos | % | N° de casos P53(+) | % |
|----------------------------|--------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| Leve | 21 | 52.50 | 12 | 50.00 |
| Moderada | 12 | 30.00 | 7 | 29.17 |
| Severa | 7 | 17.50 | 5 | 20.83 |
| Total | 40 | 100.00 | 24 | 100.00 |

Tabla 2. Porcentaje de casos positivos y negativos de sobreexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias leves en el hospital Víctor Lazarte Echegaray. 2012

| Displasia Cervical Leve | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------|
| Marcaje | N° de casos | % |
| P53(+) | 12 | 57.14 |
| P53(-) | 9 | 42.86 |
| Total | 21 | 100 |

Tabla 3. Porcentaje de casos positivos y negativos de sobreexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias moderadas en el hospital Víctor Lazarte Echegaray. 2012

| Marcaje | Displasia Cervical Moderada | |
|--------------|-----------------------------|------------|
| | Nº de casos | % |
| P53(+) | 7 | 58.33 |
| P53(-) | 5 | 41.67 |
| Total | 12 | 100 |

Tabla 4: Porcentaje de casos positivos y negativos de la sobreexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias severas en el hospital Víctor Lazarte Echegaray.2012

| Marcaje | Displasia Cervical Severa | |
|--------------|---------------------------|------------|
| | Nº de casos | % |
| P53(+) | 5 | 71.43 |
| P53(-) | 2 | 28.57 |
| Total | 7 | 100 |

Tabla 5: Porcentaje de casos positivos con hiperexpresión de la proteína P53 en epitelio ectocervical de pacientes con displasias en el hospital Víctor Lazarte Echegaray.2012

| Grados de Displasia | Nº de casos P53(+) | Nº de casos con Hiperexpresión | % |
|---------------------|--------------------|--------------------------------|------------|
| Leve | 12 | 2 | 25 |
| Moderada | 7 | 3 | 37.5 |
| Severa | 5 | 3 | 37.5 |
| Total | 24 | 8 | 100 |

Se obtuvo mayor incidencia de P53+ en displasias severas. La especulación del falso negativo y falso positivo obliga a realizar estudios más profundos utilizando técnicas moleculares altamente específicas para mutaciones de *p53*, se debe tener en cuenta, que los resultados obtenidos pudieron ser afectados por diferentes factores como, la técnica utilizada, la manipulación de la muestra, el tipo de material empleado, calidad de los reactivos, el tiempo de fijación y coloración.^{24,25}

Un dato importante que no está consignado en las investigaciones de diferentes autores, es aclarar si los procedimientos inmunohistoquímicos fueron realizados manualmente o con equipos automatizados; este último reduce riesgos de errores.²⁶

CONCLUSIONES

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se logró detectar la sobreexpresión de la proteína P53 en el 60% de las biopsias de epitelio ectocervical con displasia.

Las displasias de grado leve mostraron mayor tendencia a la sobreexpresión de la proteína P53 de todas las biopsias analizadas.

La hiperexpresión de P53 mostró un 20% del total de biopsias analizadas.

La detección inmunohistoquímica de P53 sugiere su relación con los procesos tempranos de la carcinogénesis de cuello uterino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas [Internet]. Lima, Perú. Cáncer de cuello uterino. Guía práctica clínica: INEN. 2011. [Citado el 10 de mayo del 2011]. Disponible en:http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/normas_tecnicas/2011/25042011_CANCER_CUELLO_UTERINO_19_04_11.pdf.
2. Sanfilippo J, Ramírez D, Larios H, Moreno M. Cáncer cérvico uterino: Seminario, el ejercicio actual de la medicina [Internet]. 2007. [Citado el 2 de enero del 2011]. Disponible en:
http://www.facmed.unam.mx/eventos/seam2k1/2007/sep_01_ponencia.html.
3. Gómez F, González P. Patología benigna y lesiones premalignas de cérvix: Clases de residentes, Servicio de obstetricia y ginecología hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. [Internet]. 2007. [Citado el 6 de junio del 2012]. Disponible en:
http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/cr07.patologia_benigna_cervix.pdf.
4. Warren J, Gullett H, King V. Cervical cancer screening and updated pap guidelines: Prim. Care Clin. Office Pract. 2009; 36, 131-149.

5. Núñez V. Significado biológico de la expresión del gen “h-mam” en cáncer de mama humano. [Tesis]. Madrid. Facultad de farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2002.
6. Guerrero I, Cuellar L, Taxa L, Mejía R, Álvarez M, Mariátegui J, et al. Genes reguladores de apoptosis y proliferación celular en mujeres VIH positivo y cáncer de cuello uterino: *Acta Cancerología*. 2005; 33(1), 28-34.
7. King M. Cáncer y oncogenes. [Internet]. 2012. [Citado el 23 de diciembre del 2013]. Disponible en: <http://www.Themedicalbiochemistrypage.org>, LLC.
8. Guerrero I, Castilla F. Sobreexpresión de la proteína p53 en la displasia cervical estudio inmunohistoquímico en 55 casos del hospital regional de apoyo de Ica: *Acta Cancerológica*. 2003; 32(1), 18-21.
9. Díez A, Pérez P, Martín D. Marcadores tumorales de valor pronóstico en adenocarcinomas de colon y recto: *Gastroenterología Integrada* 2. 2001; (4), 207-221.
10. Toledo C, García C. Papiloma virus y cáncer cervical: *Revista de Investigación Clínica*. 1996; 48(1), 59-68.
11. Melo A, Montenegro H, Hooper T, Capurro V, Roa S, Roa E. Tipificación del virus papiloma humano (HPV) en lesiones pre neoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX región-Chile: *Rev. Méd. Chile*. 2003; 131(12), 1382-1390.
12. López M, Anzola M, Salazar C, Aguirre M, De Pancorbo M. p53, un gen supresor tumoral – Revisión. *Gaceta Médica de Bilbao*. 2001; 98(1), 21-27.
13. Pérez R, Palomo G, Baena C, Córdoba D, Alonso R, Escolar P. Valor pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el cáncer de mama: *Rev. Española de Patología*. 2002; 35(3), 315-324.
14. Gómez L, Fernández G, Jordán J. La proteína P53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia: *Rev. Neuro*. 2004; 39(3), 243-250.
15. Roa E, Melo A, Roa S, Araya O, Villaseca H, De Aretxabala U. Mutación del gen p53 en el cáncer de la vesícula biliar: *Rev. Méd. Chile*. 2000; 128(3), 251-258.
16. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. 2010 Jan 7. DOI: 10.3322/caac.20073.
17. Chuaqui B, González S. Manual de patología general: Técnicas diagnósticas en histopatología. Chile. 2da edición. Universidad Católica De Chile. 2002.
18. Morelva T, Llombart B. Detección inmunohistoquímica de la proteína L1 de Virus Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo en citologías y biopsias de cuello uterino: *Rev. Española de Patología*. 2005; 38(1), 8-13.
19. Astudillo De la V. Estudio génico-molecular de la apoptosis en lesiones pre-malignas y malignas del cérvix uterino. [Tesis]. México DF. Instituto politécnico nacional. 2007.

20. Puray M, Palomino Y. Acumulación de la proteína p53 en cáncer de pulmón. Hospital Nacional Guillermo Almenara I. 1990 – 1997: Anales de la facultad de medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1999.
21. Chuaire N, Sánchez C, Ramírez C. P53 y su papel en el epitelio superficial del ovario: Revisión Invest. Clínic. 2008; 49(4), 561-593.
22. Alameda F, Baro T, Mariñoso M, Manresa J, Costa C, Espinet E, et al. Carcinoma escamoso invasor de cérvix uterino: Rev. Mex. Patol. Clin. 2007; 54(4), 150-158.
23. García J, Molina J, Blasco E. Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical: Revisión Invest. Clínic. 2009; 50(2), 241-250.
24. Lardoeyt F, Lantigua C. Experiencias técnicas en el uso de la prueba inmunihistoquímica para el diagnóstico del síndrome de frágil X: Invest. Biomed. Cuba 2003; 23(4), 259-265.
25. Morelva T, Llombart A. Medición inmunohistoquímica de la actividad proliferativa en carcinoma epidermoide de cuello uterino [Internet]. V Congreso virtual de patología. España, Universidad de Valencia. 2005. [Citado el 10 de Agosto 2013]. Disponible en: www.conganat.org/7congreso/pdf/160.pdf.
26. Vallmanya Ll, Laborda R, Lloreta T, Cortadellas Á, Placer S, Gelabert M. Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y ciclina D1 en el cáncer de vejiga superficial. Estudio en un soporte de tissue microarray: Actas Urol. Esp. 2006, 30(8), 754-762.
27. Zavala R. Cáncer Cervicouterino blog [Internet]. Nov 2013. [Citado el 20 de Diciembre 2013]. Disponible en: [www. http://informaciondeprevencionvph.blogspot.com/](http://informaciondeprevencionvph.blogspot.com/).

