

Valor pronóstico de la determinación inmunohistoquímica de proteína p53 en el carcinoma pulmonar no microcítico.

B. SUÁREZ-ALIAGA*, J.A. LÓPEZ-G. ASEÑO*, J. SANZ-ESPONERA*, A. TORRES**, M. MAESTRO***, Y F. COGOLLUDO*.

* Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario San Carlos. Martín Lago s/n. Madrid 28040. ** Servicio de Cirugía Torácica. Hospital Universitario de San Carlos. *** Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario San Carlos.

SUMMARY

Prognostic value of the immunohistochemical detection of p53 protein in non small cell lung carcinoma.

p53 gene alterations are associated with a worse prognosis in a large number of human tumors, including lung carcinoma. We examine the immunohistochemical detection of p53 protein in non small cell lung carcinomas (NSCLC) and we analyze the prognostic value of p53 expression on survival and recurrence interval. We discuss the method of gradation of this expression according to prognostic value and its relationship with molecular biology technics. 104 cases of NSCLC with histological study (53.84% epidermoid carcinomas, 38.46% adenocarcinomas and 7.69% large cell carcinomas) and stage TNM (47.11% at stage I, 6.73% at II, 26.92% IIIA, 13.46% IIIB and 5.78% IV). Immunohistochemical analysis was performed using the indirect immunoperoxidase method with microwave pretreatment. The pattern of nuclear staining was scored as follows: 1° negative-positive, 2° low (<10% stained neoplastic cells) moderate (10-50%) and high (>50%), 3° low expresser group (<10%)-high expresser group (>10%). Statistical analysis was performed (Kaplan-Meier method) to study its relationship with survival and recurrence interval. We found overexpression of p53 protein in 57.5% of our cases, 20.1% showed low staining, 20.15% moderate and 17.3% high. We detected p53 expression in all TNM stages and all histological types. We demonstrated a correlation between expression of p53 protein and early death and a short recurrence interval ($p < 0,05$). This relationship was stronger when we established low expresser group vs. high expresser group ($p < 0,02$). p53 expression was an independent unfavorable prognostic factor on survival. 1) Immunohistochemical expression of p53 protein has prognostic value on survival and recurrence interval, moreover it's an independent prognostic factor. 2) This correlation is stronger when we establish high versus low expresser group. 3) Immunohistochemical study of p53 protein expression is useful in the protocols of prognostic factors in NSCLC and this expression allows the prediction of molecular alterations with prognostic value.

Key words: p53. Lung carcinoma. Prognostic. Immunohistochemistry.

INTRODUCCION

Los genes tumorales supresores o anti-oncogenes son necesarios para el control del crecimiento celular normal. Su ausencia o neutralización favorece la transformación tumoral de las células (1). El gen tumoral supresor p53, localizado en el cromosoma 17, codifica una fosfoproteína nuclear de 53 kDa con la característica de un factor de transcripción. Las alteraciones de este gen han sido descritas en un gran número de tumo-

res humanos (2), incluido el carcinoma de pulmón (2,3). La proteína p53 normal no se acumula en las células porque tiene una vida media muy corta. Algunas mutaciones del gen (mutaciones "missense") aumentan significativamente su vida media lo que provoca su acumulación nuclear (4). Esta acumulación es la que permite su detección por técnicas de inmunohistoquímica (1). El valor pronóstico de estas determinaciones permanece discutido en la bibliografía (5-8). En nuestro estudio examinamos la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en 104 carcinomas pulmonares no microcíticos y analizamos su carga pronóstica en relación con la supervivencia y el intervalo libre de recidi-

Correspondencia: Begoña Suárez Aliaga.. Travesía de José Luis Arrese nº 7, 3º C. Madrid 28017. Telf.: 551 21 01

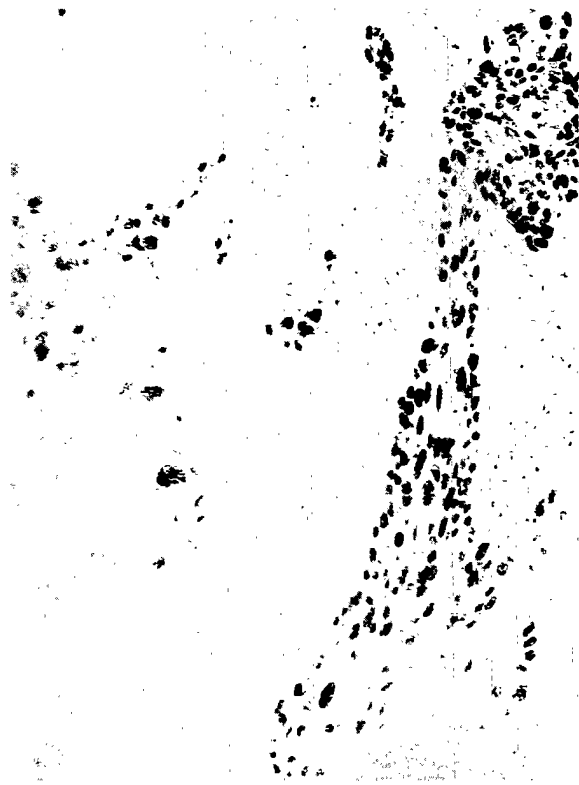


Figura 1. Detección inmunohistoquímica de la proteína p53 en un caso de carcinoma epidermoide de pulmón considerado de alta expresión (20x).

va. Se discute el sistema de gradación de la técnica de acuerdo a su importancia pronóstica y a su relación con técnicas de biología molecular.

MATERIAL Y METODOS

El análisis se realizó en muestras quirúrgicas de 104 pacientes diagnosticados de carcinoma pulmonar no microcítico en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario San Carlos entre los años 1989 y 1992. El seguimiento clínico fue de 3 a 5 años. El estadiaje TNM se basó en el sistema internacional de estadiaje para tumores pulmonares (9). La clasificación histológica se estableció de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (10).

Las muestras se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina. El análisis inmunohistoquímico se realizó por el método de inmunoperoxidasa indirecta con un pretratamiento del tejido en horno microondas de dos períodos de 7 minutos a 750 vatios, con un intervalo entre ellos de 2 minutos y con los cortes sumergidos en Buffer citrato. Se incubaron toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-p53, DO7 (Novocastra) a 4°C a dilución 1:100. Este anticuerpo reconoce tanto la proteína p53 mutante como la salvaje. El anticuerpo secundario correspondía a inmunoglobulinas de conejo anti-ratón, RAM-DAKO p-161 a dilución 1:20. El revelado de la reacción se realizó con una solución de

diaminobencidina en TRIS 0,2M y 30 microlitros de peróxido de hidrógeno. Para los controles negativos, se añadió PBS en lugar del anticuerpo primario. Para los controles positivos se usaron casos de carcinoma de colon con reacción positiva conocida.

En nuestro trabajo no se observó tinción citoplásmica en ninguna muestra. El patrón de expresión nuclear fue valorado de tres formas para conseguir un estudio estadístico completo (tabla I). En primer lugar, se hizo una valoración estableciendo 4 grados: negativo (0), débil (<10% de las células neoplásicas teñidas), moderado (10-50%) e intenso (>50%). En segundo lugar, se valoró negatividad (0% de células tumorales teñidas) frente a positividad (>0%). Por último, se establecieron dos nuevos grupos definidos como "grupo de baja expresión" (<10% de células tumorales teñidas) y "grupo de alta expresión" (>10%).

Análisis estadístico: Se utilizó el test de chi cuadrado con la corrección de Yates para establecer la correlación entre parámetros clinicopatológicos y expresión de la proteína p53. La probabilidad de supervivencia o recurrencia se calculó por el método de Kaplan-Meier. El modelo proporcional de Cox fue utilizado para identificar cuales de estos factores eran significativos en la supervivencia e intervalo libre de recidiva de estos pacientes.

RESULTADOS

La distribución por sexos fue de 91 correspondientes al sexo masculino y 13 al femenino. El rango de edad era de 32 a 83 años (media de 61,83). El estadiaje TNM fue del 47,11% en estadio I, 6,73% en el II, 26,92% en el IIIA, 13,46% en el IIIB y 5,78% en el IV. El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma epidermoide con 56 casos (53,84%), seguido por 40 casos de adenocarcinoma (38,46%) y 8 carcinomas indiferenciados de célula grande (7,69%).

Tabla I. Modos de valorar la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53.

	% de células neoplásicas con expresión de la proteína.
1.- En grados	- Negativa (0%) - Débil (<10%) - Moderada (10-50%) - Intensa (>50%)
2.- Negativo-Positivo	- Negativo (0%) - Positivo (>0%)
3.- Grupos "Baja"- "Alta"expresión	- Baja expresión (<10%) - Alta expresión (>10%)

Análisis inmunohistoquímico.

Se observó expresión de proteína p53 en 60 de los 104 casos (57,5%), de los cuales 21 (20,1%) presentaron tinción débil, 21 (20,15%) moderada y 18 (17,3%) intensa. En todos ellos la localización inmunohistoquímica de la proteína p53 se limitó al núcleo de las células neoplásicas (fig.1). Con respecto al tipo histológico, la expresión de la proteína se detectó en 33 (58,9%) carcinomas epidermoides, 21 (52,5%) adenocarcinomas y 6 (75%) CCG. Se detectó expresión de proteína en todos los estadios TNM con una frecuencia del 48,5% para el estadio I, el 50% para el II, el 57,8% para el IIIA, el 76,9% el IIIB y el 50% para el IV.

Relación entre supervivencia y expresión de proteína p53.

La primera fase del estudio consistió en comparar estos dos parámetros cuando consideramos la expresión de la proteína p53 en grados. En este caso, la

acumulación de p53 se correlacionó de forma estadísticamente significativa con una menor supervivencia ($p < 0,05$) (fig. 2A). Si estudiamos su expresión comparando el total de casos positivos frente a negativos esta correlación se pierde. Por último, al establecer dos nuevos grupos, "grupo de baja expresión" y "grupo de alta expresión", la correlación alcanza mayor significación ($p < 0,02$) (fig. 2B).

Relación entre intervalo libre de enfermedad y expresión de p53.

No se encontró relación entre tiempo de recidiva menor y expresión de proteína p53 cuando ésta se valoró en grados. Resultados similares a éstos se obtienen cuando la expresión de p53 se consideró como positividad frente a negatividad. Por último, cuando consideramos la expresión de p53 como "grupos de baja y alta expresión" se observó una relación significativa con recurrencia tumoral ($p < 0,05$) (fig. 3).

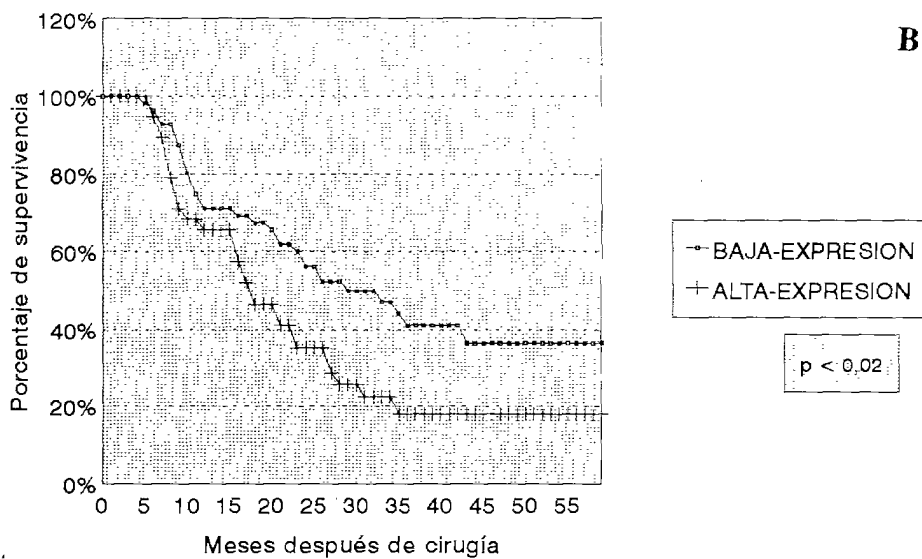
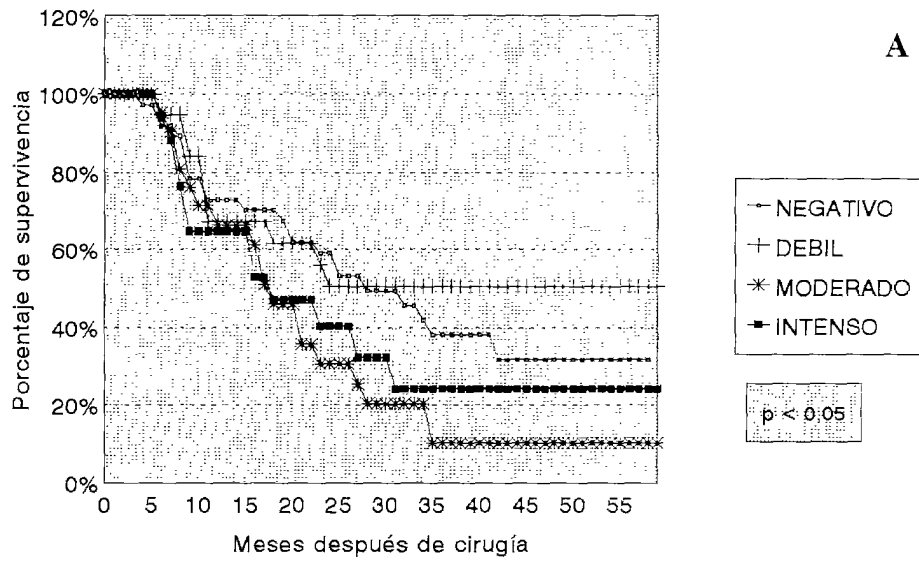


Figura 2. Curvas de probabilidad de supervivencia para casos de carcinoma pulmonar no microcítico en función de la expresión de proteína p53. A) Curvas cuando la expresión de la proteína se estudia en grados como negativo (0% de células teñidas), débil (<10%), moderado (10%-50%), e intensa (>50%). B) Curvas cuando se establecen grupos de "baja expresión" (<10% de células teñidas) y "alta expresión" (>10%).

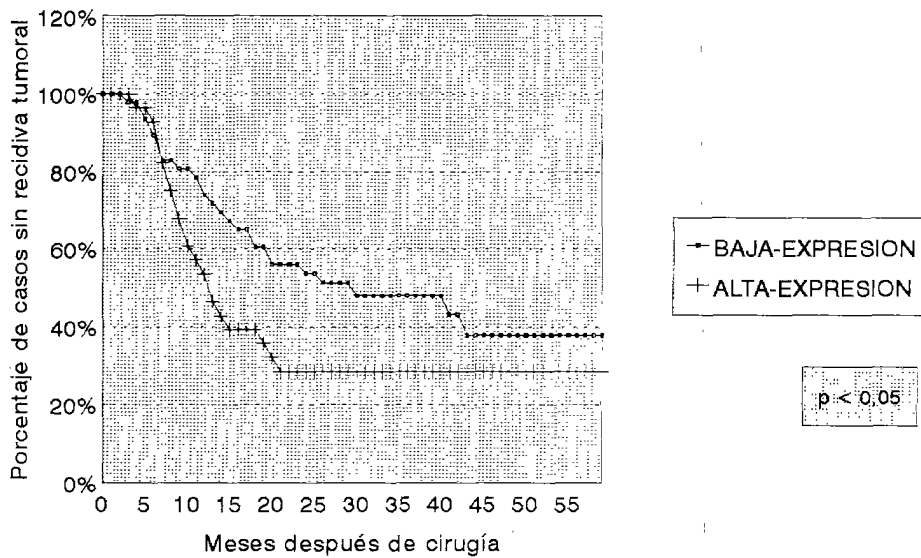


Figura 3. Curvas de intervalo libre de recidiva para los mismos casos de carcinomas pulmonares en función de la expresión de p53. Se demuestra significación estadística al considerar los grupos de "alta y baja expresión".

DISCUSION

La elevada incidencia de carcinoma pulmonar en todos los países hace necesario la introducción de nuevas técnicas y parámetros que se sumen a los factores pronósticos clásicos (tanto clínicos como histológicos) para la evaluación rutinaria de los pacientes con este tipo de neoplasia. De estos nuevos parámetros, son los biológicos los que están adquiriendo una especial relevancia en un intento de clarificar los mecanismos implicados en la iniciación y progresión tumoral. Nosotros hemos centrado nuestro trabajo en la expresión inmunohistoquímica de la proteína producto del gen tumoral supresor p53.

El gen p53, localizado en el cromosoma 17, codifica una fosfoproteína nuclear de 53 kDa con la característica de un factor de transcripción que regula el crecimiento celular. Las alteraciones de este gen han sido descritas en un gran número de tumores humanos (2), incluido el carcinoma de pulmón (2,3). Son múltiples las alteraciones que se han definido en este gen, entre las que se encuentran delecciones, mutaciones "splicing", mutaciones "nonsense" y mutaciones "missense". La proteína p53 normal tiene una vida media corta por lo que no es detectable mediante técnicas de inmunohistoquímica, sin embargo, hay mecanismos que prolongan su vida media. Entre ellos hay mecanismos no mutacionales (12) como la inactivación de alguna vía enzimática responsable de la degradación de p53 (13), estabilización de la proteína p53 normal mediante la formación de complejos con oncoproteínas celulares (14), modificación post-translacional por daño inducido al ADN confiriendo una vida media más larga a la proteína (15), expresión alterada del gen p53 por reguladores celulares transcripcionales y acumulación fisiológica al final de la fase G1 y S del ciclo celular (16). Hay otros mecanismos en los que sí se produce

alteración genética y dentro de ellos son las mutaciones "missense" los que se asocian a una acumulación nuclear más intensa (4).

El uso de anticuerpos anti-p53 mediante técnicas de inmunohistoquímica permite detectar dicha proteína (1). Cuando revisamos la literatura son muchos los anticuerpos anti-p53 utilizados en los distintos trabajos, nosotros elegimos el anticuerpo DO7 (Novocastra) basándonos en un estudio realizado por Baas sobre expresión de p53 en carcinomas de colon analizando 6 anticuerpos (Bp53-12, 1801, DO7, CM1 y Signet). En este trabajo se demuestra que el anticuerpo monoclonal DO7 es el que ofrece mejores resultados, con una sensibilidad del 67%, especificidad del 90%, valor predictivo positivo del 86% y valor predictivo negativo del 75% (17).

El método de valoración de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 es variable según los distintos autores, y estos métodos influyen al establecer su relación con la supervivencia y recidiva tumoral. Algunos autores consideran negatividad (0% de expresión) frente a positividad (>0%) (5) ya que la proteína normal no se acumula en las células, por tanto, cualquier expresión de la misma sería anómala. Otros establecen valoraciones en grados de forma muy similar a las establecidas por nosotros (6,11,18,19). Por último, algunos sólo consideran positividad en aquellos casos con "intensa tinción nuclear" (8). Se ha observado que las células con mutaciones del gen p53 muestran diferentes niveles de expresión de la proteína y que el nivel de expresión depende del tipo de mutación (11). Se ha intentado establecer asociación entre los resultados obtenidos por medio de técnicas de inmunohistoquímica y los obtenidos por biología molecular. En el estudio realizado por Bodner et al en líneas celulares que compara los resultados de estos dos tipos de técnicas en 33 casos de carcinoma pulmonar,

comprobó que en los casos con mutaciones "missense" en los exones 5-8 la expresión inmunohistoquímica era alta (>10% de células neoplásicas teñidas), por otro lado, los casos con tinción nula o débil (<10%) correspondieron a mutaciones "missense" fuera de los exones 5-8, deleciones, mutaciones splicing y mutaciones "nonsense".

Se han escrito numerosos trabajos acerca de la carga pronóstica de las alteraciones de este gen en el carcinoma de pulmón no microcítico. Sin embargo, los resultados son variables e incluso contradictorios (5-6,18,20-23). Mc Laren (23) estudió 125 tumores pulmonares primarios con un panel de 5 anticuerpos anti-p53 (Pab240, Pab421, Pab1801, CM-1 Y C19), en su trabajo, no demostró diferencia en la supervivencia considerando positividad y negatividad para ningún grupo de tumores. Otros autores observan una amplia variedad de patrones de sobreexpresión inmunohistoquímica de p53, pero consideran que son los niveles altos los que se asocian con peor pronóstico en carcinomas de pulmón (18), carcinomas de mama, próstata y endometrio (24).

En este trabajo, demostramos que la acumulación nuclear de la proteína p53 en el carcinoma pulmonar no microcítico es un fuerte indicador de una peor evolución. En lo que respecta a la supervivencia, cuando la sobreexpresión se valora en grados, se obtiene un valor de $p < 0,05$. Si establecemos dos nuevos grupos, tal y como lo han hecho otros autores (11), "grupo de baja expresión" y "grupo de alta expresión", la relación es más significativa ($p < 0,02$). Sin embargo, al comparar expresión positiva o negativa, la correlación se pierde. Por último, el análisis multivariante de Cox revela que la expresión de p53 es un factor pronóstico independiente desfavorable ($p = 0,04$) en nuestros "grupos de baja y alta expresión".

Encontramos una relación significativa entre expresión de p53 y recurrencia tumoral ($p < 0,05$) cuando analizamos la expresión de p53 como "grupo de baja expresión" o "grupo de alta expresión". Sin embargo, no encontramos asociación entre expresión de p53 en los casos originales negativos y positivos e intervalo libre de recidiva.

El hecho de que al incluir los casos débilmente teñidos como negativos la correlación sea mayor en lo que respecta a la supervivencia y se haga significativa en cuanto al tiempo de recidiva tumoral se explica porque la sobreexpresión de la proteína ha sido descrita en ausencia de mutación (12-16, 22) y son sólo aquellos casos con alta expresión nuclear los que reflejan alteraciones genéticas asociadas a transformación neoplásica. Este hallazgo induce a pensar que los eventos moleculares diferentes de las mutaciones "missense" en los exones 5-8 tienen menor importancia biológica, al menos, en lo que respecta al pronóstico de los pacientes con este tipo de neoplasias.

En resumen, 1) Nuestros resultados demuestran

que la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 tiene carga pronóstica tanto en la supervivencia como en el tiempo libre de recidiva, incluso se destaca como factor pronóstico independiente en el análisis multivariante de Cox. 2) Esta correlación es mayor cuando la expresión de la proteína se detecta en más del 10% de células neoplásicas. 3) El estudio inmunohistoquímico de la expresión de la proteína p53 es, por tanto, de utilidad en el protocolo de estudio de factores pronósticos del carcinoma pulmonar no microcítico y su expresión permite predecir los cambios moleculares con importancia biológica.

RESUMEN

Las alteraciones del gen p53 se asocian con un peor pronóstico en un gran número de tumores humanos, incluido el carcinoma pulmonar. Examinamos la expresión inmunohistoquímica de proteína p53 en carcinomas pulmonares no microcíticos y analizamos su carga pronóstica en relación con la supervivencia y el intervalo libre de recidiva. Se discute el sistema de gradación de esta expresión de acuerdo a su importancia pronóstica y a su relación con técnicas de biología molecular. Se estudian 104 casos de carcinoma pulmonar no microcítico con estudio histológico (53,84% de carcinomas epidermoides, 38,46% adenocarcinomas y 7,69% carcinomas indiferenciados de célula grande) y estadiaje TNM (47,11% en estadio I, 6,73% en el II, 26,92% en el IIIA, 13,46% en el IIIB y 5,78% en el IV). El análisis inmunohistoquímico se realizó por el método de inmunoperoxidasa indirecta con un pretratamiento del tejido en horno microondas. El patrón de tinción nuclear se valoró: 1º Negativo-positivo, 2º Débil (<10% de células teñidas), moderado (10-50%) e intenso (>50%). 3º Grupo de baja expresión (<10%), grupo de alta expresión (>10%). Se realizó análisis estadístico (método de Kaplan-Meier) para estudiar su relación con la supervivencia y el intervalo libre de recidiva.

Se observó expresión de proteína p53 en el 57,5% de los casos, 20,1% mostraron tinción débil, 20,15% moderada y 17,3% intensa. Se detectó expresión en todos los estadios TNM y en todos los tipos histológicos. Se demostró correlación con la supervivencia e intervalo libre de enfermedad ($p < 0,05$). Esta relación fue mayor cuando establecimos grupos de baja y alta expresión ($p < 0,02$). La expresión de proteína p53 fue factor pronóstico independiente en la supervivencia. En conclusión, 1) La expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 tiene valor pronóstico tanto en la supervivencia como en el intervalo libre de recidiva, incluso se destaca como factor pronóstico independiente. 2) Esta correlación es mayor cuando establecemos grupo de alta frente a grupo de baja expresión. 3) El estudio inmunohistoquímico de la expresión de la proteína p53 es de utilidad en el protocolo de estudio de factores pronósticos del carcinoma pulmonar no microcítico y su

expresión permite predecir los cambios moleculares con importancia biológica.

Palabras clave: p53. Carcinoma de pulmón. Pronóstico. Inmunohistoquímica.

BIBLIOGRAFIA

1. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris A. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *The Lancet* 1990; 335: 675-679.
2. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-494.
3. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhager DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, Reissmann P, Slamon DJ, Holmes EC, Minna JD. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1990; 5: 1603-1610.
4. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
5. Quinlan D, Davidson A, Summers C, Warden H, Doshi H. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Research* 1992; 52: 4828-4831.
6. Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, Linoila RI. Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 2496-2503.
7. Harpole DH, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res* 1995; 55: 51-56.
8. Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella F, Pellegrini S, Pepe S, Macchiarini P, Chella A, Angeletti CA, Callahan R, Bistochi M, Squartini F. p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res* 1993; 53: 2846-2851.
9. Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986; 89: 225S-233S.
10. World Health Organization. The World Health Organization. Histological typing of lung tumors. *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 123-136.
11. Bodner S, Minna J, Jensen S, D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Fedorko J, Buchhagen D. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 1992; 7: 743-749.
12. Bennett W, Colby T, Travis W, Borkowski A, Jones R, Lane D, Metcalf R, Samet J, Takeshima Y, Vähäkangas K, Soini Y, Pääkkö P, Welsh J, Trump B, Harris C. p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 1993; 53: 4817-4822.
13. Lehman T, Bennett W, Metcalf R, Reddel R, Welsh J, Ecker J, Modali R, Ullrich S, Romano J, Appella E, Testa J, Gerwin B, Harris C. p53 mutations, ras mutations and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 4090-4096.
14. Momand J, Zambetti G, Olson D, George D, Levine A. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69: 1237-1245.
15. Hall P, Mc Kee P, Menage H, Dover R, Lane D. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8: 203-207.
16. Shaulsky G, Ben-Ze'ev A, Rotter V. Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 1990; 5: 1707-1711.
17. Baas I, Mulder R, Offerhaus J, Vogelstein B, Hamilton S. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *Journal of Pathol* 1994; 172: 5-12.
18. Westra W, Offerhaus J, Goodman S, Slebos R, Polak M, Baas I, Rodenhuis S, Hruban R. Overexpression of the p53 tumor suppressor gene product in primary lung adenocarcinomas is associated with cigarette smoking. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 213-220.
19. Rusch V, Klimstra D, Linkov I, Dmitrovsky E. Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia, and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 1995; 55: 1365-1372.
20. Mitsudomi T, Steinberg S, Nau M, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie H, Linoila R, Mulshine J, Minna J, Gazdar A. p53 gene mutations in non-small cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* 1992; 7: 171-180.
21. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, Hibi K, Suyama M, Niimi T, Shimokata K, Yamakawa K, Nakamura Y, Ueda R. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1-4.
22. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, Piantadosi S, Rusch V, Nowak JA, McIntire D, Slamon D, Gazdar A, Minna J. p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. A preliminary report of LCSG 871. *Chest* 1994; 106: 377s-381s.
23. Mc Laren R, Kuzu I, Dunnill M, Harris A, Lane D, Gatter KC. The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1992; 66: 735-738.
24. Bur ME, Perlman C, Edelmann L, Fey E, Rose PG. p53 expression of neoplasms of the uterine corpus. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 81-87.