

## Acumulación de la Proteína p53 en Cáncer de Pulmón. Hospital Nacional Guillermo Almenara I. 1990 - 1997

MARITZA PURAY, YESENIA PALOMINO  
ASESORES: DRA. ROSA MELÉNDEZ, LIC. JOHN VICTORIO

### RESUMEN

**OBJETIVOS:** Determinar la frecuencia de acumulación de la proteína p53 en biopsias de pacientes con cáncer pulmonar y encontrar su correlación con la edad y sexo del paciente, y el grado de diferenciación del tumor. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se estudió retrospectivamente 201 biopsias pulmonares fijadas en formol e incluidas en parafina, las cuales correspondieron a 87 adenocarcinomas, 88 carcinomas epidermoides, 15 carcinomas de células grandes y 11 carcinomas de células pequeñas. Se empleó el método inmunohistoquímico estreptavidina-biotina-peroxidasa con el anticuerpo DO-7 y un pretratamiento con microondas para recuperar los antígenos. **RESULTADOS:** La frecuencia global de acumulación de p53 fue 59,7% y por tipo de tumor 63,2%, 55,7%, 73,3%, y 45,4%, respectivamente. **CONCLUSIONES:** La acumulación de proteína p53 se correlacionó inversamente con el grado de diferenciación del tumor, y no se correlacionó con el sexo ni la edad de los pacientes.

*Palabras claves:* Proteína p53; Biopsia; Neoplasmas Pulmonares.

### FREQUENCY OF p53 ACCUMULATION IN BIOPSIES OF PATIENT WITH LUNG CANCER. HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA, 1990 - 1998

#### SUMMARY

**OBJECTIVE:** To determine the frequency of p53 protein accumulation in biopsies of lung cancer patients and to find a correlation between p53 accumulation and patients' age and gender and the differentiation of the tumor. **MATERIAL AND METHOD:** 201 formalin fixed, paraffin embedded lung tissue sections corresponding to 87 adenocarcinomas, 88 squamous cell carcinomas, 15 large-cell carcinomas, and 11 small-cell carcinomas were retrospectively studied. We have used the labeled streptavidin biotin immunohistochemical method with antibody DO-7, and a microwave pretreatment to recover the antigens. **RESULTS:** The global frequency of p53 accumulation was 59,7% and the frequency regarding to tumor type was 63,2%, 55,7%, 73,3%, and 45,4%, respectively. **CONCLUSION:** The protein p53 inversely correlated with the degree of tumor differentiation, but there is no correlation between p53 and patients' gender neither age.

*Key words:* Protein p53; Biopsy; Lung Neoplasms.

\* Trabajo presentado como Tesis para optar el Título de Licenciado en Tecnología Médica en la Facultad de Medicina. UNMSM.

#### Correspondencia:

Lic. Yesenia Palomino Gutiérrez  
Urb: Ceres 1ª etapa F-17.  
Lima 3 - Perú.  
E-mail: ysnpg@yahoo.com

## INTRODUCCIÓN

El cáncer pulmonar es uno de los de mayor incidencia en nuestro medio. Entre los años 1990-1991 ocupó el tercer y quinto lugar de frecuencia en varones y mujeres, respectivamente (1). Histológicamente puede ser clasificado como epidermoide, adenocarcinoma, de células pequeñas y de células grandes; los dos primeros pueden ser caracterizados como bien, poco o medianamente diferenciados.

La decisión del manejo terapéutico del paciente se basa en el análisis de los marcadores pronósticos tradicionales (2,3); sin embargo, dichos factores tienen relativamente bajo valor predictivo, pudiendo traducirse en un tratamiento deficiente frente a una enfermedad agresiva, o toxicidad innecesaria de la terapia frente a un tumor de bajo riesgo. Actualmente se están estudiando marcadores biológicos como factores pronósticos más objetivos, entre ellos p53 (4), una fosfoproteína nuclear de 53Kd y 393 aminoácidos, de aparición y desaparición muy rápida (tiempo de vida media 6 a 20 min). Se encuentra en todas las especies vertebradas (5,6) y tiene la función de controlar la correcta duplicación del ADN o su reparación. En caso de daño al ADN, la concentración de p53 se incrementa y detiene el ciclo celular entre las fases G1 y S, dando

tiempo para su reparación; si el daño es grave, induce la muerte celular programada o apoptosis en algunas células (7). Dicha función es crucial en la prevención del nacimiento de células con genomas aberrantes (entre ellas las de características malignas). Los carcinógenos pueden inducir alteraciones en el gen que codifica la proteína p53, tales como mutaciones puntuales o pequeñas deleciones que se traducen en una proteína mutada con características variables de acuerdo al tipo, lugar y sustitución en el gen. Así, p53 aumentaría su tiempo de vida media de 6 hasta 24 h y se acumularía por retroalimentación (8) o por estabilidad frente a las proteasas que normalmente la digieren. Puede también no cumplir su función normal e inclusive interferir con ésta y/o adquirir nuevas funciones favorables al desarrollo del tumor (8,9).

Por estos motivos, p53 ha sido ampliamente estudiado en diversos tipos de cáncer, pero es en el cáncer de mama donde se le ha encontrado mayor aplicación clínica, reportándose una relación entre la alteración de p53 y un pobre pronóstico de la enfermedad, así como falta de respuesta a la radioterapia y a algunos agentes quimioterápicos, en células con apoptosis dependiente de p53 (10,11). En cáncer de pulmón se han realizado varios estudios, algunos de los cuales se muestran en la Tabla N° 1.

**Tabla N° 1.-** Hallazgos de acumulación de proteína p53 en cáncer de pulmón.

Investigadores	Muestra	Positivos	Tipo	Hallazgos
Li Lung y col. (China) (12)	50	46%	Epidermoide 31% Adenocarcinoma 50% Cél. Grandes 100%	Correlación entre acumulación de p53 y estadio nodal.
Suarez y col. (España) (13)	104	57,5%	Epidermoide 58,9% Adenocarcinoma 52,5%	Positividad alta de p53 se correlacionó con mal pronóstico, recurrencia y corta sobrevida.
Pueblitz y col (EE.UU) (14)	26	46%		La acumulación de p53 en pre-neoplasias puede predecir la evolución a cáncer.
Quinlan y col (EE.UU.) (15)	114	42%		La acumulación de p53 se correlacionó con mal pronóstico, metástasis y corta sobrevida.

La acumulación de p53 se define como la sobreexpresión de la proteína detectable por métodos inmunohistoquímicos, ya sea causada por la existencia de proteínas mutadas o por interacción con determinados virus u otras proteínas, pudiendo también representar una acumulación fisiológica (5). Un método de detección ampliamente aplicado es la biotina marcada con Estreptavidina (LSAB) empleando el anticuerpo monoclonal DO-7, el cual reacciona con la proteína p53 normal o mutada; sin embargo, sólo se detecta la segunda puesto que la primera generalmente no se acumula.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de acumulación de p53 en células tumorales de pacientes con cáncer pulmonar de nuestro medio, correlacionando esta frecuencia con la edad y sexo del paciente, así como con el grado de diferenciación celular del tumor.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionó 201 casos de pacientes con cáncer pulmonar primario atendidos entre los años 1990-1997. Los datos fueron obtenidos del archivo del Departamento de Patología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

Se tomó los datos de edad, sexo, tipificación histológica y grado de diferenciación del tumor. Las biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina fueron cortadas en secciones de 3µm de espesor, luego se retiró la parafina, se hidrató y se les sometió a tratamiento de recuperación antigénica en horno microondas, sumergiendo los cortes en tampón citrato 0,1 M, pH 6 por 15 min. Posteriormente, las muestras fueron teñidas con el método estreptavidina-biotina-peroxidasa, sometiendo los cortes secuencialmente a: 1) Peróxido de hidrógeno al 3% por 10 min, 2) Bloqueo con proteínas inertes por 10 min, 3) Anticuerpo murino anti-p53 diluido 1/100 por 20 min, 4) Anticuerpo biotinilado anti-IgG por 10 min, 5) Complejo estreptavidina-peroxidasa por 10 min, 6) Revelado con adición de diaminobencidina (DAB) - peróxido de hidrógeno por tiempo suficiente hasta que se observó cambio de color en los controles (aproximadamente 2 min). Se lavó las láminas con agua destilada después de los pasos 1 y 6, y con PBS-Tritón después de los pasos 3, 4 y 5. Finalmente, se contracoloró con hematoxilina de Mayer, se deshidrató, aclaró y realizó el montaje con bálsamo de Canadá.

Los controles fueron cortes de cáncer de pulmón y mamario con reacción positiva conocida. La reacción positiva se evidenció con una tinción intranuclear marrón. Se leyó 10 campos a 400 aumentos y se clasificó la reactividad como negativa (ausencia de núcleos teñidos), positiva 1+ (tinción de menos del 50%) y positiva 2+ (tinción de más del 50% de los núcleos). Los casos que presentaron menos de 10 núcleos dispersos teñidos y que persistían en la repetición se tomaron como indeterminados. En el análisis estadístico se empleó la prueba del Chi-cuadrado, aceptándose un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS

De los 201 casos estudiados, 120 (59,7%) presentaron tinción positiva para p53, 78 (38,8%) fueron negativos y 3 (1,5%) se catalogaron como indeterminados. Respecto al grado de positividad, 71 casos (59,2%) fueron 2+ y 49 (40,8%) fueron 1+.

La relación entre la frecuencia de acumulación y las características del tumor y del paciente se muestran en la Tabla N° 2. La tinción positiva fue marrón, intranuclear y heterogénea en intensidad, pero con distribución regular en la mayoría de los casos (Figuras N° 1 y 2), salvo 3 casos que presentaron un teñido de distribución irregular a manera de grumos (Figura N° 3).

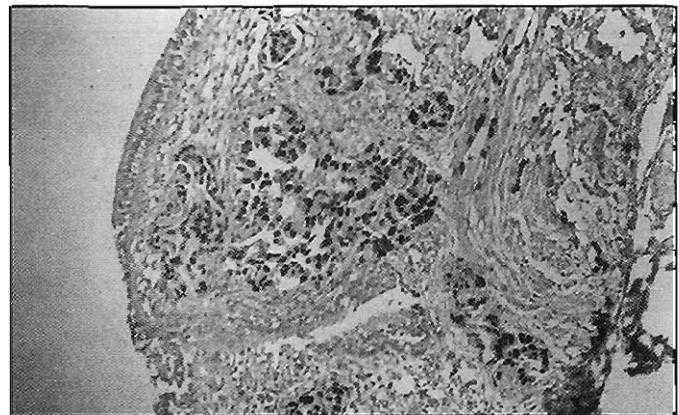
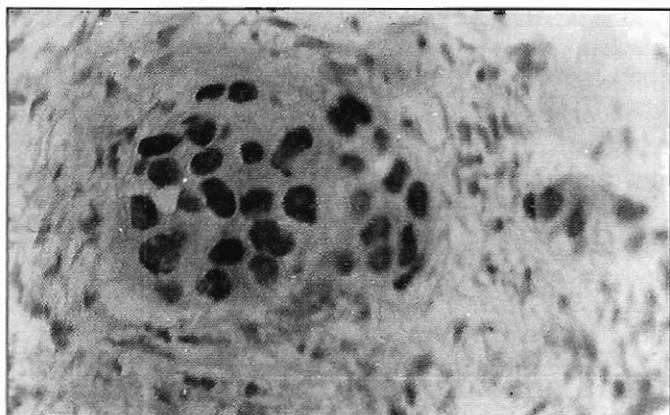
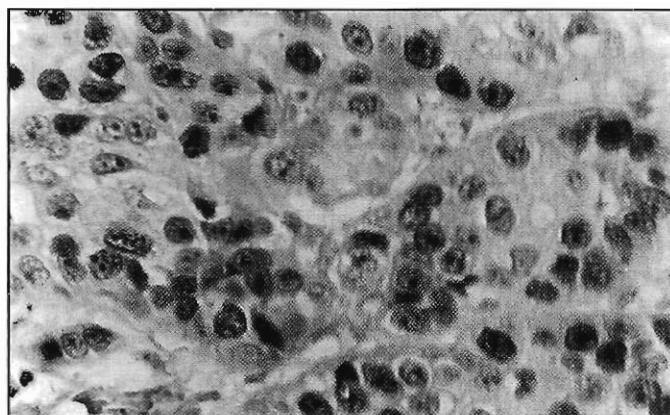


Fig. N° 1.- Tinción inmunohistoquímica intranuclear marrón y heterogénea. Obsérvese que sólo se teñieron los núcleos malignos (100X).



**Fig. Nº 2.-** Distribución regular de la tinción: la coloración marrón se distribuye regularmente en todo el núcleo (400X).



**Fig. Nº 3.-** Distribución irregular de la tinción a manera de grumos. Obsérvese que los nucleolos no presentan positividad para p53 (400X).

**Tabla Nº 2.-** Acumulación de p53 y características del tumor y del paciente (Hospital Nacional Guillermo Almirante I. 1990 - 1997).

Características	Tinción	Total	Positivo		Negativo		Indeterminado		Signif. estad.*
			%	n	%	n	%	n	
<b>Del Tumor</b>									
<i>Tipo Histopatológico</i>									
Adenocarcinoma		87	63,2	55	34,5	30	2,3	2	NS
Carcinoma Epidermoide		88	55,7	49	44,3	39	0	0	
Carcinoma de Cél. Grandes		15	73,3	11	20,0	3	6,7	1	
Carcinoma de Cél. Pequeñas		11	45,4	5	54,6	6	0	0	
<i>Grado de Diferenciación</i>									
Bien diferenciado		31	38,7	12	61,3	19	0	0	S
Medianamente diferenciado		83	66,3	55	33,7	28	0	0	
Poco diferenciado		87	60,9	53	35,7	31	3,4	3	
<b>Del Paciente</b>									
<i>Sexo</i>									
Masculino		141	61,0	86	37,6	53	1,4	2	NS
Femenino		60	56,7	34	41,7	25	1,6	1	
<i>Edad</i>									
< 49 años		26	53,8	14	46,2	12	0	0	NS
50-59 años		39	28,9	23	38,5	15	26	1	
60-69 años		66	63,7	42	34,8	23	1,5	1	
>70 años		70	58,6	41	40,0	28	1,4	1	

\* Para el análisis estadístico no se consideró los casos indeterminados.

## DISCUSIÓN

La frecuencia global de acumulación de p53 obtenida en este estudio coincide con la de Suárez y col. (13) en España, pero difiere de los valores hallados por Quinlan y col. en EE. UU. (15) y Li Lung y col. en China (12). Estas diferencias podrían reflejar la variabilidad en la frecuencia de acumulación de acuerdo al país donde se realiza el estudio, sin embargo, debido a las diferencias en las técnicas, calidad de la muestra y material empleado, no es posible confirmar, con los datos disponibles, fehacientemente esta hipótesis. Encontramos que los resultados varían según el tipo histopatológico: para el carcinoma epidermoide se acercan a los encontrados por Suárez y col., pero difieren con los obtenidos por Li Lung y col. Mientras que en el caso del adenocarcinoma guardan relación con Suárez y col. y Li Lung y col., pero difieren de Pueblitz y col. (14). En el caso del cáncer de células pequeñas y de células grandes sólo se estudió 15 y 11 casos, respectivamente, cifra que disminuyó la confiabilidad de los cálculos. Las variaciones de frecuencia de acumulación entre el carcinoma epidermoide y el adenocarcinoma pueden deberse a la diferencia en los carcinógenos que las inducen: el adenocarcinoma está más relacionado con la lesión tuberculosa y el carcinoma epidermoide con el hábito de fumar. Se ha demostrado que el benzopireno, presente en el humo del tabaco, produce mutaciones específicas de p53.

Los carcinomas bien diferenciados tienen menor probabilidad de expresar acumulación de p53 que los otros grados, diferencia que se ha mostrado estadísticamente significativa. Esto podría ser un factor más por el cual los tumores bien diferenciados son en general menos agresivos.

El análisis de la frecuencia de acumulación de p53 según edad y sexo de los pacientes no mostró ninguna correlación estadísticamente significativa.

El anticuerpo primario DO-7 es más sensible que otros anticuerpos empleados para la detección de p53 y es capaz de reaccionar con el tipo normal así como con el mutado (16). En nuestro estudio no se encontró ninguna célula normal positiva, lo que sirvió como un control negativo interno.

En cuanto a los tres casos con resultado indeterminado, estos presentaron 4, 4 y 6 células teñidas de disposición aislada, respectivamente. Esto tal vez se debe a que la inmunotinción detectó proteína sobreexpresada

fisiológicamente. Para dilucidar si la inmunotinción es el resultados de genes alterados es necesario un estudio de biología molecular, tal como hibridación *in situ* y secuenciación. De otro lado, observamos tres casos de tinción distribuida irregularmente a manera de grupos, semejante al patrón de tinción con hematoxilina, los cuales correspondieron a adenocarcinomas. Creemos que en estos casos la inmunotinción detectó p53 en estrecha interacción con el ADN, y no con el ARN, puesto que no tiñó los nucleolos.

La presencia de acumulación de p53 no debe ser interpretada definitivamente como mutación del gen que la codifica, y aún cuando fuera una mutación, no todas están relacionadas con el cáncer. El campo de estudio de p53 es amplio y su posible papel en la génesis y evolución del cáncer le han merecido numerosas investigaciones, muchas con resultados contradictorios, aún cuando se acepta consensualmente que p53 está alterada en más del 50% de los cánceres humanos.

## CONCLUSIONES

Encontramos sobreexpresión de la proteína p53 en el 59,7% de las biopsias de cáncer de pulmón, y los carcinomas bien diferenciados presentaron acumulación de p53 con menor frecuencia que los carcinomas con otros grados de diferenciación. Por otro lado, la edad y el sexo del paciente no influyeron en la posibilidad de presentar acumulación de p53.

## AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a los profesores Ricardo Neyra y Eduardo Sedano, así como a Isabel Escalante y Sonia De la Cruz, y en especial a nuestros asesores por su invaluable apoyo en la realización del presente trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Solidoro A. Cáncer en el Perú: Mito y Realidad. Gestión Médica 1996 feb; 12-25.
- 2) Humphrey EW, Ward BH, Perri RT. Cáncer de Pulmón. En: OPS. Oncología Clínica. 2ed. Washington DC, 1996. p 249-65.
- 3) Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura H, Nakayama H. Implications of staging in lung cancer. Chest 1997; 112(Suppl): 242S-8S.

- 4) **Fujino M, Dosaka-Akita H, Harada M, Hiroumi H, Kinoshita I, Akie K, Kawakami Y.** Prognostic significance of p53 and *ras*, p21 expression in non small cell lung cancer. *Cancer* 1995; 76: 2457-63.
- 5) **Guinni BA, Padua RA.** p53: a role in the initiation and progression of leukaemia? *Cancer J* 1997 may; 4: 8.
- 6) **Mountain F.** New Prognostic factors in lung cancer. Biologics prophets of cancer cell agression. *Chest* 1995; 108: 246-53.
- 7) **Puig L.** Antioncogenes, proteínas supresoras y ciclo celular. Implicaciones en dermatología. *Piel* 1995; 10: 14-16.
- 8) **Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP.** Crystal structure of a p53 tumor suppressor-ADN complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994 July; 265: 346-55.
- 9) **Greenblatt M S, Bennett W P, Hollstein M.** Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
- 10) **Berg J, Norberg T, Sjogreg S, Lindgeng A, Holmberg L.** Complete sequencing of the gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Med* 1995 oct; 10: 1.
- 11) **Andersen TI, Borrensen A.** Alterations of their p53 gene as a potential pronostic marker in breast carcinomas. Advantages of using constant denaturant gel electrophoresis in mutation detection. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4(3): 203-11.
- 12) **Li Lung M, Wong PM, Skaanild MT, Fok CL, Wahkitlan, Wing WY.** p53 Mutations in non-small cell lung carcinomas in Hong Kong. *Chest* 1996; 109: 718-26.
- 13) **Suarez Aliaga, López G, Sanz Esponera, Torres, Maestro M, Cogolludo F.** Valor pronóstico de la determinación inmunohistoquímica de p53 en el cáncer pulmonar no microcítico. *Patología* 1996; 29: 309-14.
- 14) **Pueblitz S.** Expresión de p53 en el carcinoma bronquioalveolar y la hiperplasia alveolar atípica del pulmón. *Patología (México)* 1997; 35: 221-5.
- 15) **Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM.** Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognostic human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4828- 31.
- 16) **Linden MD, Nathason D, Zarbo R.** Evaluation of anti-p53 antibody staining. Quality control and technical considerations. *Applied Immun* 1994; 2(3): 218-24.