

Original

Expresión de p53 en 63 carcinomas gástricos consecutivos

M. Medina Pérez, F. Oliva Mompeán, J.L. Guerrero Guerra y A. Reyes López

Hospital de la Merced, Osuna (España).

SUMMARY

Background: The p53 protein is an important determinant in neoplasms and regulates the growth of cells in culture, but the practical implications of this phenomenon have yet to be fully elucidated. The goal of this study was to determine the value of p53 expression as a marker of tumor progression and the prognosis of gastric carcinoma. Materials and methods: The immunohistochemical overexpression of p53 (D07) was analyzed in 63 consecutive gastric carcinomas (62 endoscopic biopsies and 37 resection specimens from 63 different patients). The relation between the histological type and the evolution of the disease were studied. Results: There was strong expression of p53 in 26 of 37 resection specimens (70%), and 64% of the endoscopy biopsies (40/62). No significant correlation was found between p53 accumulation and histological type and differentiation grade. Conclusions: The gastric carcinomas frequently showed p53 overexpression, there was no relation to the others parameters (histological type, infiltration, differentiation grade), and there was no independent prognostic variable. The correlation between the endoscopy biopsies and gastrectomy specimens was very good. Rev Esp Patol 2000; 33(1): 17-23.

Key words: p53 - Gastric carcinoma - Immunohistochemistry - Prognosis - Neoplasm

RESUMEN

Planteamiento: La p53 es una proteína implicada de manera importante en el desarrollo de muchas neoplasias, interviniendo en el crecimiento celular, aunque su verdadera función aún tiene que ser más investigada. La idea de este estudio fue valorar la expresión de p53 como marcador de progresión tumoral y factor pronóstico en el carcinoma gástrico. Materiales y métodos: Hemos determinado la expresión inmunohistoquímica de p53 (clon D07) en 63 carcinomas gástricos consecutivos (62 biopsias endoscópicas y 37 especímenes de resección), relacionándolo con los parámetros histológicos y la evolución. Resultados: El 70% de las piezas quirúrgicas (26/37) y el 64% de las biopsias endoscópicas (40/62) muestran manifiesta o intensa expresión de p53, sin relación claramente significativa con el tipo histológico o el grado de diferenciación. Conclusiones: Los carcinomas gástricos frecuentemente expresan p53, siendo independiente de otros parámetros (tipo histológico, infiltración, grado de diferenciación), y no constituyen una variable pronóstica independiente. Existe una buena correlación entre la expresión de p53 en las biopsias endoscópicas y las piezas quirúrgicas. Rev Esp Patol 2000; 33(1): 17-23.

Palabras clave: p53 - Carcinoma gástrico - Inmunohistoquímica - Pronóstico - Neoplasia

INTRODUCCIÓN

El gen supresor p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, y codifica una fosfoproteína de 393 ami-

noácidos. Su inactivación por mutaciones (1) parece ser muy importante en el desarrollo de muchos cánceres humanos, originando una proteína anómala de mayor vida media (p53 mutante) que la nativa (p53 salvaje).

Parece que, al menos en gran medida, hay bastante relación entre las mutaciones y la expresión inmunohistoquímica de p53 (2). Muchos autores han investigado su importancia en relación con el cáncer gástrico (3, 6), con resultados dispares. Nosotros hemos estudiado la expresión nuclear de p53 por inmunoperoxidasa de todos los casos de carcinoma gástrico con confirmación histológica de nuestro hospital, tanto en las biopsias endoscópicas como en las correspondientes piezas quirúrgicas disponibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han revisado todos los carcinomas gástricos con diagnóstico histológico consecutivos existentes en nuestro archivo (01/09/93 hasta 01/09/98), incluyendo las biopsias endoscópicas y las piezas quirúrgicas, en su caso. El número total de enfermos diferentes ha sido 63, de los que 37 tenían biopsia y pieza, y los 26 restantes sólo biopsia. El número total de biopsias gástricas para el mismo periodo fue de 1440. El hospital atiende a una población de unos 150.000 habitantes, eminentemente rural. Se estudiaron las características macroscópicas, la histología (clasificación de Lauren), la expresión de p53 y la evolución clínica.

De los especímenes de resección, se seleccionó un bloque por tumor para estudio inmunohistoquímico, procurando que incluyese neoplasia y borde con epitelio gástrico no tumoral, así como suficiente pared gástrica en profundidad. De éstos y de los bloques de biopsias endoscópicas se cortaron secciones a 3 μ , montándose sobre portaobjetos silanizados manualmente. Se desparafinaron en estufa durante media hora, y después fueron hidratados. Previo desenmascaramiento antigénico (7), se incubaron con anticuerpo anti-p53 (clon D07, Dako, 1:300 en PBS), durante una hora a temperatura ambiente, prosiguiendo normalmente con el método de estrepavidina peroxidasa (LSAB, Dako). Como cromógeno se usó DAB líquida (Concepta), controlando el revelado con microscopio y, a continuación, lavado, aclarado y montaje con DPX.

La expresión de p53 fue valorada como negativa o positiva (color marrón nítido): 0, ninguna; 1, positividad evidente en <2% de los núcleos; 2, positividad manifiesta en el 40% a 50% de los núcleos; 3, positividad en >90% de los núcleos. Se valoraron antes de conocer la historia clínica de cada caso.

La evolución de los pacientes fue estudiada a través del servicio de documentación del hospital.

RESULTADOS

Características macroscópicas

De todos los 63 casos, sólo 37 pudieron ser resecados con fines curativos. La mayoría de ellos estaban localizados en la región antral. El tipo macroscópico predominante fue el III de Borrmann (ulcerado e infiltrante) (Fig. 1). Hubo tres pacientes con carcinomas gástricos múltiples (2 de 2 y 1 con 4 tumores polipoides), tres de linitis plástica pangástrica (Fig. 2), uno sobre adenoma polipoide, y otro sobre boca anastomótica (Billroth-II). El diámetro medio fue de 7 cm, aunque hubo casos que ocuparon todo el estómago. Sólo hubo tres casos de carcinoma precoz, dos de ellos pertenecientes al tipo III (excavado con úlcera profunda circunscrita), y otro polipoide.



Figura 1. Fotografía macroscópica de un carcinoma tipo III. Véanse los bordes elevados y el fondo ulcerado.

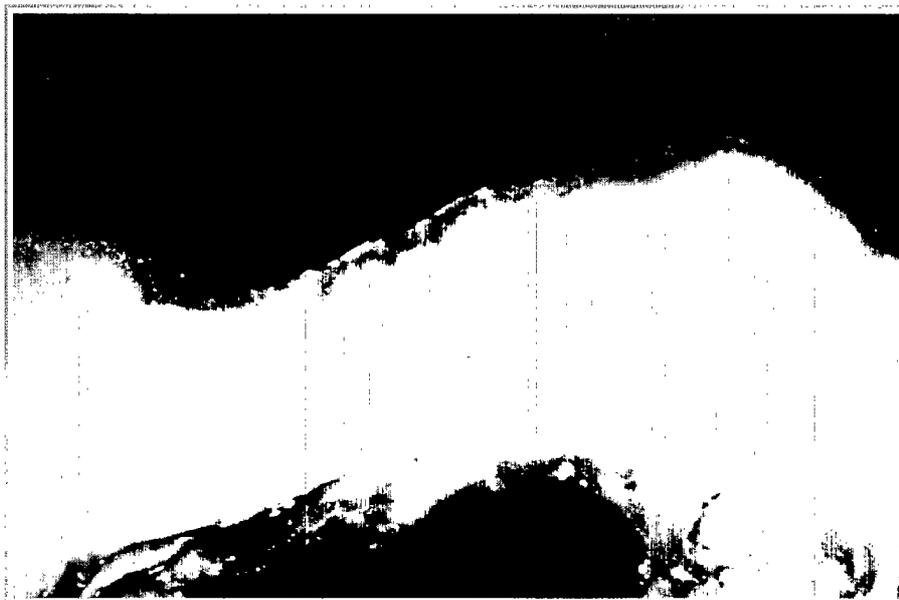


Figura 2. Superficie de corte de un carcinoma difuso. Obsérvese el grosor de la pared, que se encuentra infiltrada en su totalidad (linitis plástica).

Características histológicas

La mayoría correspondía al tipo intestinal de Lauren (n=45), y bastantes menos al tipo difuso (n=12), tres se consideraron mixtos y otros tantos eran imprecisos (biopsia endoscópica). Sólo tres casos cumplían criterios de carcinomas intramucosos, y el resto de los intervenidos fueron carcinomas avanzados, con infiltración hasta la serosa (n=34). Entre éstos, se documentaron ganglios metastásicos en 22, y es probable que en algunos más las estaciones ganglionares fueran borradas por la infiltración del tejido adiposo. A éstos habría que añadir los considerados inoperables (n=6) y los irreseccables explorados con laparotomía (n=15). De cuatro casos no disponíamos del estadio (perdidos o intervenidos fuera). El 85% de los carcinomas de tipo intestinal eran moderadamente o poco diferenciados. Todos los difusos eran carcinomas avanzados, y tres de ellos originaron engrosamiento intenso de la pared gástrica (linitis plástica), como muestra la Fig. 2. Un caso correspondió a la variante de carcinoma gástrico con estroma linfoide (8), y estaba originado sobre la boca anastomótica que quedó tras una intervención de úlcera péptica años antes.

Expresión de p53

Del total de 63 casos, se encontró expresión de p53 nuclear en 50 de las biopsias endoscópicas (50 de 62). En

uno no se pudo estudiar al estar el bloque de inclusión agotado. El grado de expresión fue considerado con valor 1 en 10 casos, valor 2 en 17 casos y como 3 en 23 casos. En cuanto a las piezas, se encontró expresión en 27 de los 37 especímenes de resección (valor 1 en 1, valor 2 en 6, valor 3 en 20). La valoración comparada con la pieza quirúrgica fue equivalente en 35 de los 37 casos de los que dispusimos de ambas, y sólo en un caso la expresión fue mayor en las piezas que en la biopsia previa.

El grado de expresión fue independiente del grado de diferenciación (Figs. 3 y 4), siendo, además, bastante homogénea en cada sección histológica estudiada. Nunca encontramos expresión en el epitelio foveolar no neoplásico, con una nítida diferencia entre ambos (Fig. 5). De los 12 casos del tipo difuso dispusimos de pieza en nueve, y de ellos, cuatro expresaron p53 tanto en la biopsia como en la pieza quirúrgica (Figs. 6 y 7), y en cinco no hubo expresión. La expresión en las células (casos difusos) y en las glándulas (casos intestinales) infiltrantes era tan fuerte en profundidad como en las porciones más cercanas al epitelio. El caso de carcinoma con estroma linfoide mostró intensa expresión de p53 en el componente epitelial, no así en la población linfoide.

En cuanto al grado de infiltración, los tres carcinomas intramucosos mostraron expresión nuclear de grado 3 (Fig. 8). En uno de ellos, además, ésta era evidente en el epitelio displásico vecino.



Figura 3. Adenocarcinoma bien diferenciado de tipo intestinal con intensa expresión de p53 sólo en los núcleos neoplásicos (original, inmunoperoxidasa $\times 100$).



Figura 4. Adenocarcinoma moderadamente diferenciado infiltrando la pared gástrica con expresión máxima de p53 (original, inmunoperoxidasa $\times 100$).

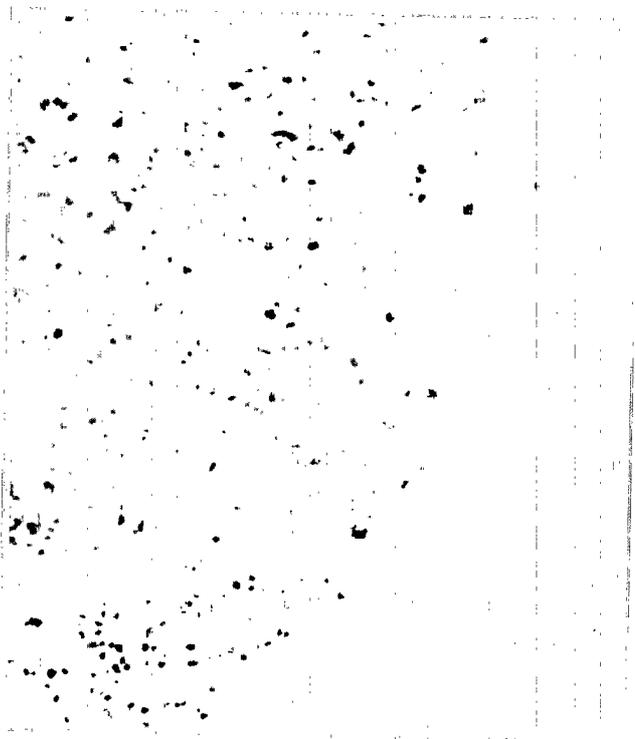


Figura 5. Adenocarcinoma poco diferenciado con expresión de grado 3. Véanse los núcleos no marcados del epitelio foveolar vecino (original, inmunoperoxidasa $\times 100$).



Figura 6. Adenocarcinoma difuso. Véanse las células en anillo de sello fuertemente marcadas con p53 (biopsia endoscópica) (original, inmunoperoxidasa $\times 100$).

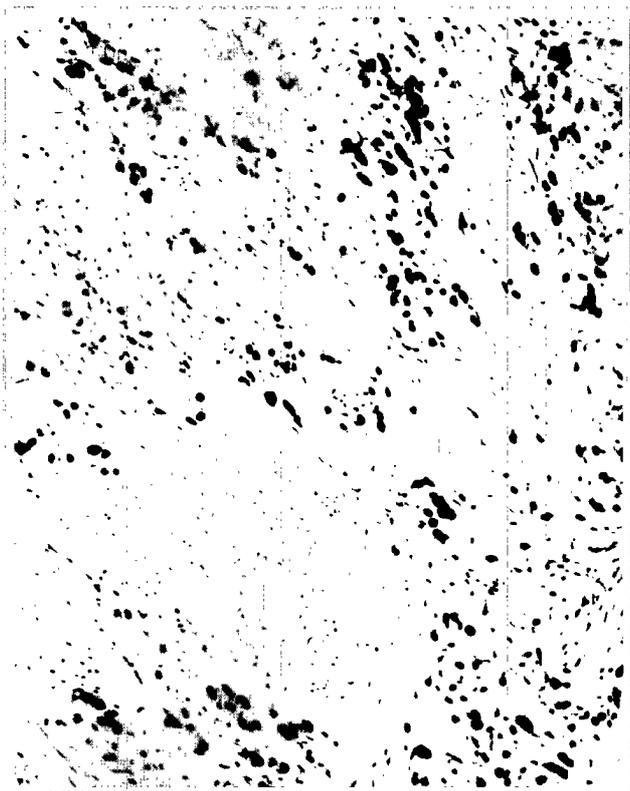


Figura 7. Expresión de p53 en la pieza quirúrgica del mismo caso que la Fig. 6. Véanse las células sueltas infiltrando la capa muscular, fuertemente marcadas con p53 (original, inmunoperoxidasa $\times 100$).



Figura 8. Carcinoma intramucoso de tipo intestinal. Se ven las glándulas malignas fuertemente marcadas, sin sobrepasar la mucosa (original, inmunoperoxidasa $\times 100$).

Correlación clínica

De los 63 casos, la distribución etaria fue la siguiente: 5 casos de entre 30 y 40 años, 4 entre 41 y 50, 4 entre 51 y 60, 25 entre 61 y 70, 20 entre 71 y 80, y 5 casos entre 81 y 90 años. Cuarenta y dos eran varones y 21 mujeres. De todos ellos, 42 habían fallecido, 13 continúan vivos, y 9 se han perdido, si bien la mayoría de los que están vivos tienen menos de dos años de evolución, y los que están perdidos eran, en su mayoría, casos inoperables o irreseccables. Dado el alto índice de expresión de p53 en todos los carcinomas, no encontramos diferencias entre ellos con respecto a la mortalidad; sólo existían algunos casos (más difusos que intestinales) que no la expresaban, pero sin significación.

DISCUSIÓN

A pesar de que la incidencia de carcinoma gástrico en muchos países industrializados ha caído, sigue siendo

una importante causa de muerte (9). Nosotros hemos comprobado que a los tres años del diagnóstico la mayoría ya han fallecido. A la hora de valorar la expresión de p53, importa mucho el rango que aceptemos como positivo. Así, por ejemplo, en el trabajo de Hurlimann y Saraga (10) se consideran positivos incluso los casos que sólo presentaron algún núcleo ocasional, mientras que Mönig y cols. (11) desestimaron los que mostraban una expresión inferior al 20% de los núcleos. Además, ellos no especifican si utilizaron técnicas de desenmascaramiento antigénico, que pueden tener mucha influencia. Es lógico pensar que de esta forma no se pueden comparar los resultados y que, de hecho, las diferencias se deban, al menos en parte, a la metodología. En el estudio de Sanz Esponera (6) se concluye que los carcinomas con expresión de p53 (D07) tienen peor pronóstico, aunque el único factor pronóstico independiente es el estadio. Sanz encontró un alto porcentaje de expresión en displasias graves (25%), carcinoma precoz y avanzado. Dicho trabajo incluía bastantes carcinomas no invasores, lo que contrasta con nuestra serie, donde eran

franca minoría, y los tres mostraban intensa expresión de p53. Además, sólo vimos un caso de displasia moderada-grave, marcado, en los márgenes de un carcinoma precoz. Al igual que lo comunicado por otros autores, las zonas de metaplasia enteroide y las no neoplásicas no se marcaron.

Gabbert y cols. (12) estudiaron a 418 pacientes intervenidos de carcinoma gástrico; sin encontrar que la expresión de p53 fuera significativa para la supervivencia. Los autores suponen que los casos negativos puedan corresponder a tumores con títulos normales de p53 salvaje, tumores que han perdido ambos alelos, o tumores que expresan una proteína p53 mutante no reconocida por el clon D01 utilizado en su estudio. Si esto fuese posible, es decir, que las formas mutadas pudieran contener diferentes epitopos no reconocibles, habría que poner en cuestión los casos negativos. En otro trabajo clásico, Martin y cols. (3) encontraron una intensa expresión de p53 en el 57% de los carcinomas gástricos estudiados usando un anticuerpo policlonal (CM1), con relación significativa con el estadio más avanzado y con un peor pronóstico. Lim y cols. (5) encontraron una intensa expresión inmunohistoquímica de p53 (D07) en el 23% de los casos de su serie, y mutaciones para la misma en el 28%, con buena concordancia entre ellas. Además consideraron que las mutaciones, pero no la determinación inmunohistoquímica, tenían valor de mal pronóstico como indicador independiente.

Seruca y cols. (13) estudiaron la expresión de p53 (PAb 1801) así como la pérdida de alelos y la presencia de mutaciones en 30 carcinomas gástricos consecutivos. Sólo encontraron acumulación inmunohistoquímica de p53 en cuatro casos, que parecen pocos; pérdida alélica (pYnz22.1) en nueve, y mutaciones en tres de los nueve casos estudiados, concluyendo que el nivel de éstas sería inferior que el detectado en el carcinoma de colon.

Ikeda y cols. (14) han estudiado la relación entre apoptosis y la progresión del carcinoma gástrico sobre un total de 88 estómagos resecaos. Considerando tres grupos (pequeños, precoces y avanzados) no encontraron relación estadística significativa entre el índice de apoptosis (TUNEL) y la expresión nuclear de p53 (BP 53), sugiriendo que la progresión del cáncer gástrico está definida por un incremento gradual de la actividad proliferativa, con ocurrencia de la apoptosis de forma constante, y que ésta sería inducida independientemente de la vía del gen de la p53.

Ioachim y cols. (15) encontraron expresión de p53 (D07) en el 42% de sus casos (22/52), asociada con la necrosis y la permeación vascular, así como con la actividad proliferativa de PCNA, pero no con el estadio.

En nuestro estudio, si consideramos los grupos con expresión de grado 2 y 3 (manifiesta y masiva) en las piezas quirúrgicas, englobamos a 26 pacientes (26/37), lo que significa un 70%. Si nos referimos a las biopsias endoscópicas, también se alcanza una cifra cercana, casi el 65%, con buena correlación entre ambas. Destacan además la alta mortalidad de nuestros pacientes, probablemente debida a un estadio avanzado en casi todos ellos, y los pocos carcinomas precoces que tenemos, que, además, expresaban p53 de forma intensa. La incidencia es el doble en hombres que en mujeres. No hemos encontrado relación significativa con el tipo histológico, la profundidad de la infiltración o el grado de diferenciación, y parece claro que la historia natural del carcinoma gástrico en nuestra comarca es hacia la invasión y diseminación (carcinoma gástrico avanzado) en poco tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53 mutations in human cancers*. Science 1991; 253: 49-53.
- Hurlimann J, Chaubert P, Benhattar J. *p53 gene alterations and p53 protein accumulation in infiltrating ductal breast carcinomas. Correlation between immunohistochemical and molecular biology techniques*. Mod Pathol 1994; 7: 423-428.
- Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. *p53 expression and prognosis in gastric carcinoma*. Int J Cancer 1992; 50: 859-862.
- Fukunaga M, Monden T, Nakanishi H y cols. *Immunohistochemical study of p53 in gastric carcinoma*. Am J Clin Pathol 1994; 101: 177-180.
- Lim BHG, Soong R, Griou F y cols. *p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma*. Int J Cancer (Pred Oncol) 1996; 69: 200-204.
- Sanz Esponera J. *Significación pronóstica de la expresión de p53 en el carcinoma gástrico*. An R Acad Nac Med (Madr) 1994; 111(3): 477-483.
- Medina M. *Combinación de microondas y presión en inmunohistoquímica*. Rev Esp Patol 1997; 30(1): 57-58.
- Medina M, García G, Muñoz JL. *Carcinoma gástrico con estroma linfoide asociado a Billroth II*. Rev Esp Enf Digest 1997; 89(12): 936-937.
- Fuchs CH, Mayer RJ. *Gastric carcinoma*. N Engl J Med 1995; 333(1): 32-41.
- Hurlimann J, Saraga EP. *Expression of p53 protein in gastric carcinomas. Association with histologic type and prognosis*. Am J Surg Pathol 1994; 18(12): 1247-1253.

11. Mönig SP, Eidt S, Zirbes TK y cols. *p53 expression in gastric cancer. Clinicopathological correlation and prognostic significance.* Dig Dis Sci 1997; 42(12): 2463-2467.
12. Gabbert HE, Müller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. *The relationship of p53 expression of prognosis of 418 patients with gastric carcinoma.* Cancer 1995; 76: 720-726.
13. Seruca R, David L, Holm R y cols. *p53 mutations in gastric carcinomas.* Br J Cancer 1992; 65: 708-710.
14. Ikeda M, Shomori K, Endo K y cols. *Frequent occurrence of apoptosis is an early event in the oncogenesis of human gastric carcinoma.* Virchows Arch 1998; 432: 43-47.
15. Ioachim E, Goussia A, Stefanou GD, Agnantis NJ. *Expression of p53 protein in gastric cancer: An immunohistochemical study with correlation to proliferative activity.* Anticancer Research 1997; 17: 513-517.

