

Comunicación corta

Expresión de p53, proteína bcl-2 y ki-67 en carcinomas basocelulares.

Expression of p53, bcl-2 protein and Ki67 in basal cell tumours.

Di Martino Ortiz B, Rodriguez Masi M, Knopfelmacher O, Bolla L

Cátedra de Dermatología. Hospital de Clínicas. Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Asunción.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la expresión de las proteínas p53, bcl-2 y Ki-67 en distintas variantes histológicas del carcinoma basocelular. **Diseño del estudio:** Estudio piloto de variables inmunohistoquímicas (p53, Bcl-2 y ki67) en 20 carcinomas basocelulares diagnosticados y tratados a lo largo de un periodo de 9 meses. **Resultados:** La inmunotinción fue positiva en el 35% de los casos para la proteína p53 y en el 70% para la proteína Bcl-2. La expresión proteica de Ki-67 osciló entre un mínimo de 0% y un máximo de 60%. **Conclusiones:** Podríamos concluir que el índice de proliferación celular medido con el anticuerpo Ki-67 es negativa en las formas nodulares y positiva en las no nodulares, la expresión de la proteína Bcl-2 es débilmente positiva en las variantes no nodulares y por último la expresión de p53 mutado si bien se ve en ambos grupos, tiene mayor expresión en las formas no nodulares. Se necesitarían estudios con mayor volumen de pacientes y grupo control para que estos resultados sean estadísticamente significativos.

Palabras clave: Inmunohistoquímica, carcinoma basocelular, p53, Bcl-2, Ki-67.

ABSTRACT

Objective: To determine the expression of p53, bcl-2 and Ki-67 proteins, in different histological variants of basal cell carcinomas. **Study design:** Pilot study of immunohistochemical variables (p53, Bcl-2 and Ki-67) in 20 basal cell carcinomas, diagnosed and treated over a period of 9 months. **Results:** Immunostaining was positive in 35% of cases for p53 protein and in 70% for bcl-2 protein. Ki-67 protein expression varied between a minimum of 0% and a maximum of 60%. **Conclusions:** We could conclude that the rate of cell proliferation measured by Ki-67 antibody is negative in nodular forms and positive in non nodular, the expression of Bcl-2 protein is weakly positive in non nodular variants, and finally the expression of mutated p53 is seen in both groups, but is higher in not nodular forms. More studies would be necessary with more important number of patients and control group for these results been statistically significant.

Key words: Immunohistochemistry, basal cell carcinoma, p53, Bcl-2, Ki-67.

* *Autor correspondiente:* **Dra. Beatriz Dimartino.** Cátedra de Dermatología. Hospital de Clínicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Asunción. E-mail: bmdo@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El carcinoma basocelular constituye el 70% de las malignidades de la piel. Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas para su diagnóstico cuantifican la cinética celular, preservan la arquitectura tisular y las reacciones intertisulares (1). Se fundamentan en la base molecular del cáncer (inactivación de genes supresores como el p53 y alteraciones genéticas localizadas en los genes que regulan la apoptosis como el Bcl-2) y en la biología del crecimiento tumoral (dependientes de la cinética tumoral como la proteína Ki-67). El gen p53 codifica una fosfoproteína que regula la replicación del ADN, la proliferación celular y la muerte celular (2). En las células expuestas a agentes mutágenos, aunque una mutación aislada no es capaz de transformar las células, el hecho de no existir la proteína p53 normal predispone a las células a mutaciones adicionales y, al final, a la transformación maligna. Además de las mutaciones, la función normal del gen p53 puede alterarse por unión a oncoproteínas virales ó del mismo individuo (3-5). La proteína Bcl-2 presenta una distribución citoplasmática puntiforme, con ubicación intramitocondrial. El mecanismo por el cual este gen evita la apoptosis no está aclarado. Se piensa que su sobreexpresión confiere un mayor patrón de crecimiento, a la vez que sobrevengan mutaciones que afectan a proto-oncogenes y genes supresores. La proteína Ki-67 está presente en todas las fases activas del ciclo celular, de forma que identifica las células que estén proliferando, siendo los tumores con un alto índice de Ki67 los que tienen un peor pronóstico (6). El objetivo de este estudio es determinar la sobreexpresión de la proteína p53, Bcl-2 y el grado de proliferación tumoral mediante la proteína nuclear Ki-67 en los carcinomas basocelulares, ya que las variantes poco agresivas tienen bajo índice de proliferación celular y nula a escasa expresión del gen p53 mutado a diferencia de las variantes agresivas, y al contrario la expresión de Bcl-2 es solo débilmente positiva en variantes agresivas de éstos tumores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio piloto sobre variables inmunohistoquímicas en el carcinoma basocelular tomando como población de referencia 20 casos de enfermos diagnosticados y tratados de dicho tumor desde abril a diciembre de 2008 en la Cátedra de Dermatología del Hospital de Clínicas. Los criterios de inclusión en el estudio fueron: pacientes de la Cátedra de Dermatología con biopsias cutáneas con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma basocelular en la pieza quirúrgica, disposición de las preparaciones histológicas e historias clínicas. Las 20 muestras representan variantes clínico-histológicas agresivas y no agresivas de carcinomas basocelulares. Se seleccionó una de las preparaciones de cada caso, de forma que tuviera una cantidad de tumor adecuada frente a la población celular normal. Se buscaron los bloques tumorales conservados en parafina, y dentro de cada uno de ellos se marcó una zona con una población tumoral de al menos el 20 % frente a la población de referencia no tumoral, evitando las zonas de necrosis y hemorragias. Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron sobre secciones tratadas previamente a la inmunotinción con solución tamponada de citrato pH6 para facilitar el acceso de los anticuerpos a los antígenos tisulares. Se utilizó estufa de alta temperatura durante 10 minutos en solución de desenmascaramiento antigénico. Posteriormente se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario diluido (1:50 para p-53 y Ki-67 y 1:20 para Bcl-2), durante 30 minutos. El método utilizado para la detección fue el de estreptoavidina-biotina marcada con peroxidasa (LSAB +, Dako®) Cromógeno del revelado fue diaminobencidina (DAB). Antes de proceder a la cuantificación de los resultados de inmunohistoquímica, se valoró en todos los casos la calidad de la técnica, por medio de controles externos, y se seleccionaron las áreas con más positividad, evitando mediciones en áreas periféricas, zonas desvitalizadas, con necrosis o artefactos. Para cuantificar los parámetros estudiados en todos los casos se utilizaron como control positivo otros tumores positivos conocidos (linfomas ganglionares y metástasis ganglionar por carcinoma) y como control negativo el tejido no tumoral adyacente al tumor. La valoración fue realizada de la siguiente manera según las diferentes variables: Expresión proteica del gen supresor p53: (-): Ninguna célula tumoral se teñía. (+): Alguna célula tumoral se teñía. Los casos positivos se cuantificaron en tanto por ciento (%). Expresión proteica del gen regulador de la apoptosis Bcl-2: 0-5% células positivas=(-), 6-25%=1+, 26-50%=2+, 51-75%=3+, >75%=4+. "Alta" positividad agrupó 3+ o 4+ mientras "Baja" positividad a los que han tenido tinción de 1 + o 2 +.

Marcador de proliferación tumoral Ki-67: Se utilizó el método de Simpson para cuantificar el número de células tumorales en cuatro campos consecutivos de gran aumento (x 40). Se hizo una estimación del número de células tumorales Ki67 positivas por cada 100 células tumorales. (-): Ninguna célula tumoral se teñía. (+): Alguna célula tumoral se teñía. Los casos positivos se cuantificaron en tanto por ciento (%).

RESULTADOS

De los 20 cánceres basocelulares estudiados, el 35% de los mismos expresó la proteína p53 (7 casos). De los 7 casos positivos, 5 representan al grupo de carcinomas nodulares y 2 al grupo de carcinomas no-nodulares, observándose que en este último grupo la expresión de p53 mutado fue superior (20%). En 13 casos (65%) la tinción se consideró negativa. En cuanto a la expresión proteica del gen regulador de la apoptosis Bcl-2, el 70% de los carcinomas basocelulares estudiados en nuestra serie presentó expresión de esta proteína (14 casos). Su expresión fue débilmente positiva en las variantes agresivas como en la variante infiltrante del carcinoma basocelular. En las formas infiltrantes la positividad no superó 1+. Los valores de la expresión proteica de Ki-67 oscilaron entre negativos y un máximo de 60 %, dándose este mayor porcentaje en las variantes no nodulares (Figura 1). Los resultados se representan en la **tabla 1**.

Tabla 1.- IINMUNOHISTOQUIMICA EN CARCINOMAS BASOCELULARES. n=20

Inmunomarcador	CBC nodulares		CBC nodulares			
	Negativos	Positivos - Valor	Negativos	Positivos - Valor		
Ki-67	10	0	9	1	60%	
p-53	5	5	1-10%	8	2	20%
Bcl-2	2	8	1+ a 4+	4	6	1+

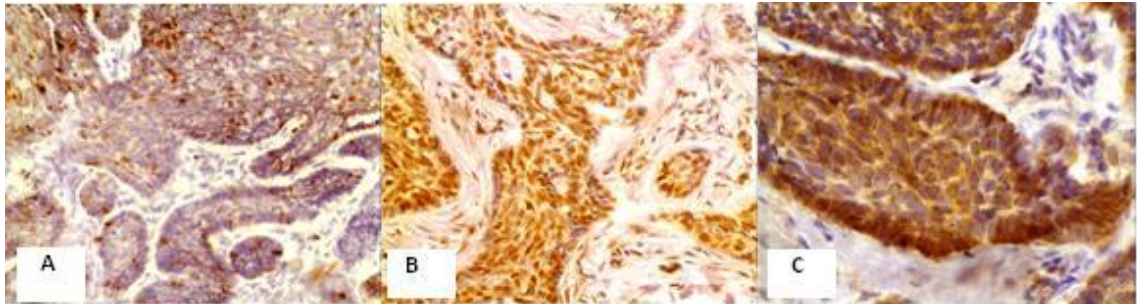


Figura 1.- A. Ki-67. Tinción nuclear positiva en las células tumorales. **B. P53.** Tinción nuclear positiva. La positividad es muy intensa en las áreas infiltrantes. **C. Bcl-2.** Tinción citoplasmática positiva.

DISCUSIÓN

Hasta el momento actual, se han publicado escasos trabajos dirigidos al estudio de las variables inmunohistoquímicas en el carcinoma basocelular. En los últimos años se ha producido un incremento notable de la incidencia de cáncer de piel, existiendo una relación directa entre este aumento y la exposición reiterada al componente ultravioleta de la luz solar. El gen p53, "el guardián del genoma", es la primera diana implicada en el desarrollo tumoral. La acumulación de mutaciones inducidas por la radiación UV en p53 no reparadas, hace que las células sean resistentes a los mecanismos de apoptosis y puedan llegar a malignizarse. En el cáncer humano las alteraciones moleculares del gen p53 son el acontecimiento genético más comúnmente encontrado.

En los 20 cánceres basocelulares estudiados el 35% de los mismos expresó la proteína p53. Para muchos autores los pacientes con lesiones cutáneas benignas con expresión de p53 aberrante deberán ser sometidos a revisiones periódicas (7). En cuanto a la expresión proteica del gen regulador de la apoptosis Bcl-2, el 70% de los 20 carcinomas basocelulares estudiados en nuestra serie presentaron la expresión de esta proteína. Recordemos que su expresión es débilmente positiva en variantes agresivas como en la variante infiltrante del carcinoma basocelular. En nuestras formas infiltrantes la positividad no superó 1+. Se ha demostrado en muchos tumores, entre ellos los tumores de cabeza y cuello, que la actividad proliferativa se correlaciona con su progresión y pronóstico (9, 10), y que existe una fuerte correlación entre el alto o bajo índice de Ki-67 y el alto o bajo grado de diferenciación tumoral (11). En los resultados de nuestro estudio el factor de proliferación tumoral Ki-67 fue positivo en 5% de casos y negativo en 95%. El caso positivo correspondió a una forma infiltrante mostrando positividad de 60%, considerada alta con relación al pronóstico, comportamiento biológico agresivo y diferenciación tumoral. Todos los demás casos fueron negativos. En definitiva, y como se puede apreciar en base a los datos del estudio que aportamos y en consonancia con la mayoría de las series publicadas, donde los resultados son en la mayoría de las veces dispares, podríamos concluir que el índice de proliferación celular medido con el anticuerpo Ki-67 es negativo en las formas nodulares y positivo en las no nodulares, la expresión de la proteína Bcl-2 es débilmente positiva en las variantes no nodulares y por último la expresión de p53 mutado si bien se ve en ambos grupos, tiene mayor expresión en las formas no nodulares. Se necesitarían estudios con mayor volumen de pacientes y grupo control para que estos resultados sean estadísticamente significativos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Asunción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Garcia R, Coltrera MB, Gown AM. Analysis of proliferative grade with anti PCNA7 cyclin monoclonal antibodies in fixed embedded tissues. *Am J Pathol* 1989; 134:733-9
- 2 Harris C, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Eng J Med* 1993; 329:1318-27
- 3 Harris C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res* 1991; 51:5023-44
- 4 Werness B, Levine A, Howley P. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76-9
- 5 Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53 associated protein in human sarcoma. *Nature* 1992; 358:80-3
- 6 Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of cell proliferation-associated nuclear antigen. That is defined by monoclonal antibody Ki 67. *Am J Pathol* 1991; 138:867-73
- 7 García Montesinos B, Val Bernal JF, Saiz Bustillo R. Estudio inmunohistoquímico del carcinoma epidermoide de labio. *Med Oral, Patol Oral y Cir Buc* 2005; 10 (5)
- 8 Li Ma MD, Adam Ronai PD. Expression of p53 and Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the Head and Neck: An immunohistochemical study. *Appl Immunohistochemi* 1998; 6:77-83
- 9 Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA et al. Tumor suppressor P53 is a regulator of bcl-2 and box gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9:1799-1805
- 10 Tubiana M, Conroli A. Proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long term survival. *Radiother Oncol* 1989; 15:1-18
- 11 Lorz M, Meyer-Breiting E. Determination of cell proliferation using monoclonal antibodies studies of 21 squamous cell carcinoma of the head and neck area. *Laryngol Rhinol Otol* 1988; 67:539-42