

MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS P53 Y KI67: UTILIZACIÓN DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA EN EL CÁNCER DE COLON.

F. Padilla-Ávila¹, G. Carrillo-Ortega¹, R. Martínez-García¹, R.J. Luque-Barona², F. Rodríguez-Serrano³, E. Baeyens Cabrera¹

¹UCG Aparato Digestivo. ²UCG Anatomía Patológica. Complejo Hospitalario de Jaén

³Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

Resumen

Introducción: La carcinogénesis colorrectal es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales, genéticos y epigenéticos. Las células cancerígenas colónicas expresan diferentes marcadores inmunohistoquímicos entre los que están el p53 cuya función principal es detener el ciclo celular en caso de mutación y el Ki-67 estrictamente relacionado con la proliferación celular.

Objetivos:

-Determinar la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en células cancerígenas de colon.

- Ver la relación existente entre la proteína p53 y Ki-67 y el tamaño, y grado de infiltración del tumor.

- Valorar la respuesta al tratamiento del cáncer de colon según la expresión de marcadores inmunohistoquímicos.

Material y métodos: Se procedió a la revisión de todos los casos diagnosticados como cáncer de colon intervenidos quirúrgicamente en el "Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén" durante el año 2008.

Se encontró un total de 40 pacientes con diagnóstico de cáncer de colon. Se buscó el respectivo informe anatomopatológico para consignar el sexo y edad del paciente, grado de infiltración y metástasis ganglionar según la clasificación de Dukes, así como el tamaño, forma y localización del tumor; asimismo se excluyeron los tumores localizados en recto así como aquellos pacientes que no continuaron seguimiento en nuestro hospital por no tratarse de su hospital de referencia. Dicha evaluación permitió seleccionar un total de 23 casos.

Las piezas quirúrgicas se remitieron a Anatomía Patológica donde se realizó el procesamiento histológico de las muestras y la tinción inmunohistoquímica mediante el método EnVision.

Resultados: De los 23 pacientes seleccionados; 10 mujeres y 13 hombres; con media de edad 62,8 años. Tamaño promedio del tumor de 26,80 mm y la forma predominante la ulcero-vegetante (34,78%).

Observando el grado de infiltración y metástasis ganglionares pudimos clasificar a los pacientes en los

CORRESPONDENCIA

Francisca Padilla Ávila
C/ Doctor Fleming, nº 4
Vilches, 23220 (Jaén)
Tfno: 610779058

medicane@hotmail.com

diferentes estadios según la TNM, predominando el Estadio III B (39,13%; 9 pacientes); seguido del Estadio II A (30,43%).

La expresión de marcadores expresada en porcentaje de células positivas resultó con un máximo de 84,44% y mínima de 0% para p53 y máxima de 93,57% y mínima de 30,45% para Ki-67 respectivamente.

Conclusiones:

- El tamaño del tumor en los casos de cáncer de colon se relaciona con el grado de infiltración

- La mayoría de los pacientes en Estadio III presentan expresión para p53.

- La expresión de la proteína p53 mutada es directamente proporcional al tamaño del tumor y grado de infiltración

- La expresión de Ki-67 no se relaciona con el estadio tumoral

Palabras clave: Colon; Marcadores inmunohistoquímicos; Estadio.

Introducción

Carcinogénesis Colorrectal

La carcinogénesis colorrectal es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales, genéticos y epigenéticos¹. Aunque todavía se conoce poco sobre los mecanismos de control de la diferenciación celular y la homeostasis a lo largo de las criptas colónicas, se cree que las alteraciones que tienen lugar durante la transformación neoplásica ocurren en estadios iniciales del proceso de diferenciación, concretamente en el momento en el que las células deben decidir su destino en el tejido: continuar en el compartimiento proliferativo, o bien pasar hacia el compartimiento terminalmente diferenciado.

Atendiendo a su presentación, se conocen dos formas fundamentales de cáncer colorrectal: esporádico y hereditario. En la mayoría de los casos aparece de forma espontánea, y en un pequeño porcentaje (5-10%) aparece formando parte de síndromes gastrointestinales hereditarios autosómicos dominantes. Esto da a entender que existe un riesgo ambiental muy elevado que incide directamente sobre el desarrollo de este tipo de cáncer (Potter, 1999). Las formas hereditarias de CCR más conocidas son la FAP (Poliposis Adenomatosa Familiar) y el cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (HNPCC). Éstas son debidas a alteraciones genéticas transmitidas por la línea germinal que aumentan el riesgo a CCR.

La secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones que afectan a tres tipos diferentes de genes, que serían:

- los proto-oncogenes: Codifican para proteínas involucradas en crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Su función es regular positivamente la proliferación celular y su expresión descontrolada o la de sus formas mutadas (oncogenes) dan origen a la transformación maligna,

- los genes supresores tumorales: su actividad consiste en inhibir la proliferación celular, ya sea mediante una parada del ciclo celular o bien mediante la inducción de la apoptosis. Su pérdida de actividad desencadena carcinogénesis, y, salvo en raras ocasiones como ocurre con p53, para ello es necesaria la inactivación de los dos alelos del gen,

- los genes reparadores del DNA: son genes que codifican diferentes proteínas encargadas de la reparación del ADN, corrigen los posibles errores producidos en la replicación y reparan las alteraciones producidas por cualquier agente mutagénico.

Incidencia y Clasificación diagnóstica y pronóstica del CCR

La incidencia del cáncer colorrectal, el tumor más frecuente considerando la globalidad de hombres y mujeres (25.600 nuevos casos al año en España), está en aumento, con un incremento anual de hasta el 2,6%, constituye la primera causa de muerte oncológica cuando se analizan conjuntamente los casos en ambos sexos.

El cáncer de colon, y por extensión el colorrectal², se presenta en el 95% de los casos en individuos mayores de 50 años y la edad media en el momento del diagnóstico se sitúa hacia los 70 años. Los principales síntomas de comienzo son las alteraciones del ritmo intestinal durante las últimas semanas, el dolor abdominal y la rectorragia persistente sin síntomas anales.

Aunque existen diversas clasificaciones para la estadificación del cáncer colorrectal, la más extensamente utilizada, dada su sencillez y correspondencia con el pronóstico, es la clasificación original de Dukes, propuesta en 1932. Posteriormente ha habido numerosas modificaciones de esta clasificación, siendo la más importante y utilizada la propuesta por Astler y Coller en 1954.

Paralelamente, en el año 1954, fue introducida la clasificación TNM. Esta clasificación incluye los factores pronósticos más importantes: la profundidad de la invasión tumoral en la pared intestinal y el número de ganglios metastatizados hallados. Ésta ha sido comparada con las clasificaciones de Dukes, no detectándose diferencias entre ambas en cuanto a pronóstico.

Marcadores Inmunohistoquímicos

P53

El gen p53, también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica un factor de transcripción proteína nuclear de 43.7 KDa. Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. El gen p53 es un gen supresor tumoral que, por lo tanto, desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular. Una copia de p53 defectuosa podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer, de hecho alrededor del 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53³.

Ki-67

La proteína Ki-67 (también conocido como MKI-67) es un marcador que está estrictamente relacionado con la proliferación celular. Durante la interfase, el antígeno Ki-67 puede ser detectado exclusivamente en el núcleo de la célula, mientras que en la mitosis la mayoría de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. La proteína Ki-67 está presente en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y la mitosis), pero está ausente en las células en reposo (G0).

Material y métodos

Se procedió a la revisión de todos los casos diagnosticados como cáncer de colon intervenidos quirúrgicamente en el "Hospital Médico Quirúrgico de Jaén" durante el año 2008.

Se encontró un total de 40 pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer de colon, cuya pieza se hallara en este Hospital. Se buscó el respectivo informe anatomopatológico para poder consignar el sexo y edad del paciente, grado de infiltración y metástasis ganglionar según la clasificación de Dukes⁴, así como el tamaño, forma y localización del tumor; asimismo quedaron excluidos los tumores de localización en recto así como los pacientes que no continuaron seguimiento en nuestro hospital al hacerlo en su hospital de referencia. En los casos en que no se obtuvieran estos datos en el informe, se procedió a la revisión de las historias clínicas y las láminas histológicas respectivas para su reclasificación. Dicha evaluación permitió seleccionar un total de 23 casos.

Los pacientes diagnosticados de cáncer de colon, generalmente tras la realización de colonoscopia con toma de biopsia, se someten a un estudio de extensión que consiste en la realización de TAC abdominal y/o RNM pélvica. Una vez realizado éste y dependiendo además de otros factores como son edad, situación clínica, patología asociada, etc, se seleccionan los pacientes candidatos a cirugía.

Una vez obtenida la pieza quirúrgica se introduce en un recipiente con formol al 4% y se remite al servicio de Anatomía Patológica. Esta muestra es identificada y se procede a su inclusión en parafina. Tras esto se realizan cortes con micrótopo. Tras esto se montan los cortes en portas y se procede a realizar técnicas de tinción histológica. En nuestro caso, se utilizó la tinción con hematoxilina-eosina.

Para evaluar la expresión de la proteína p53 y Ki-67 se procedió a realizar técnicas de inmunohistoquímica. Para ello se utiliza un corte histológico de los casos de cáncer colorrectal problema, recogido en una lámina portaobjetos provistos de una superficie adherente de poli-L-lisina, que evita que el tejido se desprenda durante el proceso de inmunotinción. Después, el corte histológico es desparafinado e hidratado con agua destilada y se procede a la recuperación antigénica del tejido en un horno microondas y un tampón citrato al 2% durante 10 minutos, a una temperatura estandarizada. Este paso permite la liberación de los antígenos tisulares del tumor fijado en formol y su visualización al final de la inmunotinción.

La tinción inmunohistoquímica se realiza de forma automatizada por el Método En Vision que consiste en tras la recuperación antigénica, bloquear la peroxidada endógena del tejido, añadir el anticuerpo primario, seguido de un molécula polimérica, cuya unión se pone de manifiesto con el uso de un cromógeno, que finalmente da una tinción marrón-dorado a las estructuras positivas (**Figuras 1 y 2**).

La expresión de los marcadores la vamos a realizar mediante un índice de marcaje para p53 y Ki-67 expresado en porcentaje (%). Para ello vamos a proceder al recuento de células teñidas en comparación con las células totales. Como mínimo vamos a medir 150 células en imágenes histológicas captadas con cámara fotográfica, usando el programa de análisis de imagen ImageJ (NIH).

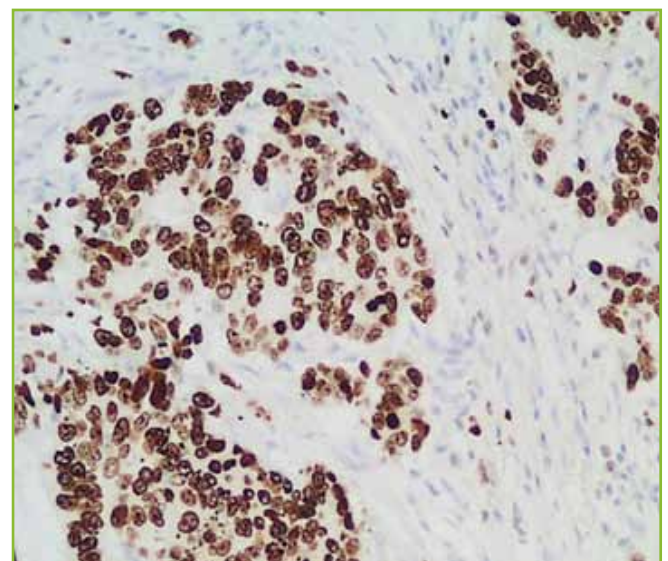


Figura 1

Ki67 +

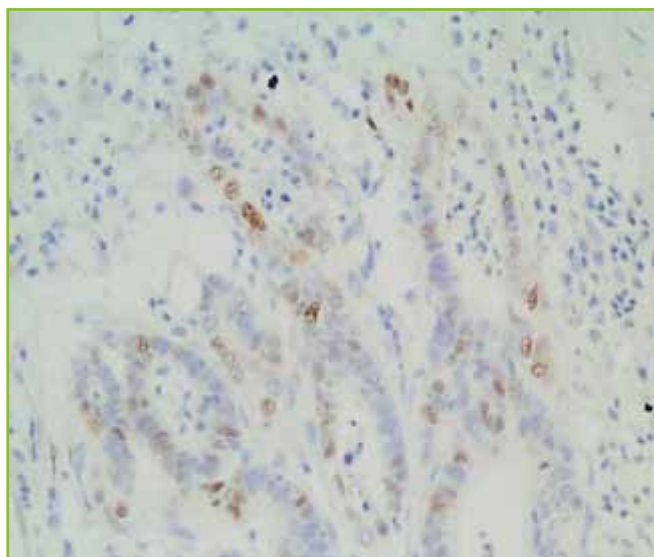


Figura 2

p53 +

Resultados

1. Caracterización de los pacientes estudio

De los 23 pacientes seleccionados contamos con 10 mujeres y 13 hombres. Sus edades estaban comprendidas entre 37 y 85 años; siendo la media de edad 62,8 años.

En cuanto a la localización del tumor podemos hablar de 3 grupos principalmente; 10 pacientes presentaron el tumor en colon derecho⁵ (43,47%); 10 en colon izquierdo (43,47%) y 3 en sigma (13,04%). Cabe destacar que un paciente de este último grupo presentó 2 tumores sincrónicos uno en sigma y otro en colon transverso.

De los 23 casos estudiados pudimos observar que el tamaño promedio fue de 26,80 mm; siendo el de mayor tamaño de 73mm y el de menor de 7,5mm; y en cuanto a su forma la predominante fue la ulcero-vegetante (34,78%), seguida de la excrecente (21,73%), polipoidea e infiltrante (13,04% en cada caso) y por último la vegetante y la ulcerada por separado, siendo éstas del 8,69% respectivamente.

2. Estadíaje Tumoral

Observando el grado de infiltración y metástasis ganglionares pudimos clasificar a los pacientes en los diferentes estadios según la TNM, predominando el Estadio III B (39,13%; 9 pacientes); seguido del Estadio II A (30,43%; 7 pacientes); luego Estadio I y Estadio III C (13,04%; 3 pacientes en cada estadio respectivamente); por último con Estadio 0 (4,34%; que se correspondió con un solo paciente).

3. Expresión de marcadores

En la **tabla 1** se recogen los valores de expresión de los marcadores tumorales que fue contabilizado en cada uno

Tabla 1. Porcentaje de expresión de p53 y ki67

	P53 (%)	Ki67
P1	2,24	66,84
P2	84,44	93,10
P3	0	65,38
P4	0	44,26
P5	74,46	65,07
P6	10,98	30,45
P7	62,4	79,75
P8	77,25	51,84
P9	38,04	87,97
P10	0	74,41
P11	2,6	67,11
P12	0	55,94
P13	16,21	32,24
P14	3,34	85,06
P15	27,08	61,38
P16	0	50,76
P17	46,13	76,11
P18	81,70	81,25
P19	0	41,64
P20	8,19	62,16
P21	68,15	64,66
P22	0	47,18
P23	0	38,01

Tabla 2. Relación entre estadio tumoral y expresión de p53 y ki 67

Pacientes	Estadio(TNM)	P53 (%)	Ki67 (%)
P1	IIIB	2,24	66,84
P2	I	84,44	93,10
P3	0	0	65,38
P4	IIA	0	44,26
P5	I	74,46	65,07
P6	IIIB	10,98	30,45
P7	IIIB	62,4	79,75
P8	IIIC	77,25	51,84
P9	IIIC	38,04	87,97
P10	IIA	0	74,41
P11	IIIB	2,6	67,11
P12	IIA	0	55,94
P13	IIA	16,21	32,24
P14	IIIB	3,34	85,06
P15	I	27,08	61,38
P16	IIIB	0	50,76
P17	IIIB	46,13	76,11
P18	IIIB	81,70	81,25
P19	IIA	0	41,64
P20	IIA	8,19	62,16
P21	IIIB	68,15	64,66
P22	IIIC	0	47,18
P23	IIA	0	38,01

de los 23 pacientes. Los valores se expresan como el porcentaje de células positivas para el marcador correspondiente.

Según esta tabla los valores de expresión oscilaron para:

- P53: Máxima de 84,44% y mínima de 0%
- Ki-67: Máxima de 93,57% y mínima de 30,45%

Por último, estudiamos la relación entre el estadio tumoral y la expresión de los marcadores en cada uno de los casos (tabla 2 y figura 3).

Si nos fijamos en esta tabla podemos ver cómo todos los pacientes con Estadio III, independientemente del subestadio que corresponda en cada caso, excepto 2 pacientes, presentan expresión para p53⁶.

Con respecto al Ki-67 vemos que se expresa en mayor o menor medida en todos los pacientes sin distinción del estadio tumoral.

En función a nuestros datos, podemos determinar que de todos los pacientes, el 65,21% expresan la proteína p53 mutada mientras que 34,79% no. En cuanto a Ki-67 según nuestro estudio el 100% de los pacientes expresan dicha proteína.

En cuanto a la necesidad de tratamiento postquirúrgico, ninguno de los pacientes requirió RT, aunque hay que considerar que no hemos incluido a pacientes con cáncer rectal. Por otro lado, 7 de los 23 los pacientes fueron tratados con QT postoperatoria.

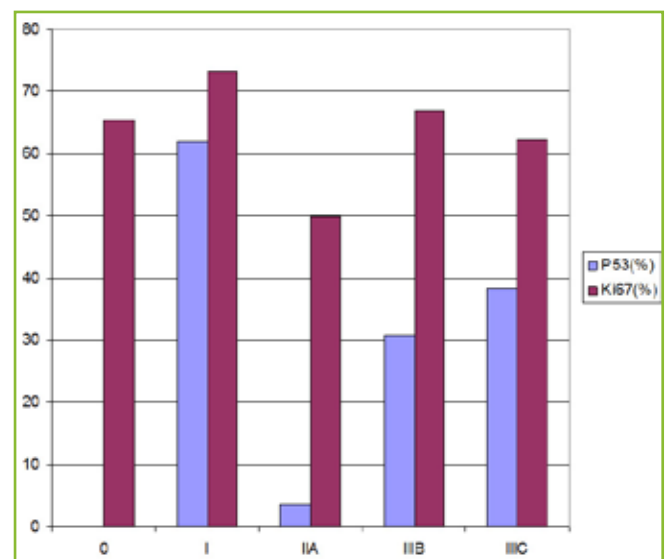


Figura 3

Expresión de marcadores y estadiaje tumoral.

Durante el año de seguimiento pudimos apreciar que a pesar de los tratamientos postquirúrgicos, 1 paciente presentó una recidiva loco regional, 1 paciente desarrolló un adenocarcinoma de novo a 20 cm de ano (cirugía previa hemicolectomía derecha), 1 desarrolló un adenocarcinoma de vías respiratorias altas, 3 no tenemos seguimiento por consulta y los otros 17 continúan vivos y recibiendo sus correspondientes ciclos de QT y acudiendo a sus revisiones programadas.

El carcinoma de colon es el segundo tumor más frecuente en el mundo occidental tras el carcinoma de mama en la mujer y el de pulmón en el varón. Macroscópicamente los carcinomas colónicos se clasifican en tipo poliposo, ulceroso, infiltrante, o combinaciones de éstos.

El éxito del tratamiento se basa en una resección quirúrgica con intención curativa seguida o no de tratamiento adyuvante con quimio o radioterapia. Dicho tratamiento se decide en función del estadio tumoral, que sigue siendo el factor pronóstico más importante en este tipo de tumor. Sin embargo, se sabe que los pacientes en el mismo estadio muestran pronósticos⁷ muy distintos, con una supervivencia entre 40-60% a los 5 años para los pacientes en estadio II, lo que ha llevado a buscar nuevos factores pronósticos que permitan definir subgrupos de pacientes dentro del mismo estadio susceptibles de recibir tratamientos distintos.

Para ello se están utilizando los marcadores inmunohistoquímicos como son p53 y Ki-67. Destacaremos que en nuestro estudio hay un porcentaje elevado de pacientes que muestran un estadio I en el que hay una alta expresión de p53, concretamente el 62,8%. Esto es debido a que son pacientes diagnosticados de forma precoz mediante la realización de un screening, y cabe esperar que si este tumor se hubiese dejado evolucionar hubiera sido muy agresivo, de ahí la necesidad de buscar nuevos métodos que nos ayuden a diferenciar dentro del mismo estadio tumores con diferente grado de agresividad.

Si analizamos la vinculación entre el tamaño del tumor y la expresión de la proteína p53 mutada podemos observar que existe dependencia entre ésta y el tamaño promedio del tumor, existiendo una relación directamente proporcional. Si nos remitimos nuevamente a la literatura, diversos estudios señalan un rango de positividad para p53 mutada en cáncer de colon que va de 47 a 80% con una media de 63,5%.

La proteína p53 tiene el papel de suprimir el crecimiento de tumores, evitando la propagación de células con daños genéticos. Este "guardián del genoma" es uno de los blancos principales de los carcinógenos durante la transformación neoplásica. En los seres humanos la alteración genética que más se asocia al cáncer, independiente del sitio o tejido de origen, es la mutación del gen p53.

Sabemos que la progresión de los adenomas a cáncer de colon está supeditada a la acumulación de defectos genéticos que involucran la activación de protooncogenes⁸, la inactivación de genes supresores de tumores. La alteración de la proteína p53 es uno de los defectos más comúnmente observados, encontrándose una correlación significativa con el estadiaje de Dukes.

En cuanto al Ki-67, debemos comentar que actualmente existen varios estudios que intentan establecer una relación implicativa entre cáncer de colon y positividad del marcador. Sin embargo, la mayoría de los datos existentes acerca de Ki-67 fueron obtenidos sobre todo a partir de pacientes de cáncer de mama y de próstata, por lo que no disponemos de resultados comparables con nuestro estudio.

Conclusiones

Como conclusiones, podemos deducir que el tamaño del tumor en los casos de cáncer de colon de la población estudiada está en relación directa con el grado de infiltración de la neoplasia. La mayoría de los pacientes en Estadio III presentan expresión para p53, independientemente del subestadio al que pertenezcan, y que la expresión de la proteína p53 mutada es directamente proporcional al tamaño del tumor y grado de infiltración, a excepción de 3 pacientes con estadio tumoral I que presentan un nivel elevado de p53. Por el contrario, la expresión de Ki-67 aparece en porcentajes variables en todos los pacientes, sin que se aprecie relación alguna con el estadio tumoral. Por ello, este marcador no nos parece útil para el estudio del diagnóstico y pronóstico de pacientes afectados de cáncer de colon. Decir que al tratarse de un estudio retrospectivo en el que el número de pacientes incluidos es pequeño, puede llevar a sesgos y a la falta de algunos datos que pudieran ser de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marchal J.A, Boulaiz H, Peran M, Prados J.C, Campos J, González F.J, Rodríguez-Serrano F, Melguizo C, Vélez C, Carrillo E, Hita F, Ortíz R, Martínez-Amat A, Caba O, Ventura C, Aránega A. Therapeutic Potential of Differentiation in Cancer and Normal Stem Cell. In: Saitama H. (ed), New cell differentiation research topics. Nova Biomedical, Inc. pp 7-78, 2008. ISBN 978-1-60021-937-5.
2. Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Tepper JE. Cancer of the colon. Vincent T DeVita Jr, Samuel Hellman, Steven A Rosenberg. Principles and Practice of Oncology. 7ª ed. Philadelphia: Lippincot William and Wilkins; 2005. p1061-1109.
3. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2-the affair that never ends Carcinogenesis. 2002 Apr;23(4):541-7.
4. Plawski A., Nowakowska D., Podralska M., Lipinski D., Steffen J. y Slomski R. The AAPC case, with an early onset of colorectal cancer International journal of Colorectal Disease. 2004; 22(4).
5. Rossant, J. Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19, 111-118
6. Wood R.D., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T. Human DNA Repair Genes. *Science* 2001; 5507 (291): 1284-1289.
7. Rex D.K. *Am J Gastroenterol* 2004 Apr;99(4):574-7.
8. Zhou X.P., Woodford-Richens K., Lehtonen R., Kurose K., Aldred M., Hampel H., Launonen V., Virta S., Pilarski R., Salovaara R., Bodmer W.F., Conrad B.A., Dunlop M., Hodgson S.V., Iwama T., Jarvinen H., Kellokumpu I., Kim J.C., Leggett B., Markie D., 104 Mecklin J.P., Neale K., Phillips R., Piris J., Rozen P., Houlston R.S., Aaltonen L.A., Tomlinson I.P.M., Eng C. Germline mutations in BMP1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 704-711.