

11212

37



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

"Expresión de Bcl-2 y p-53 en carcinoma
basocelular y carcinoma espinocelular"

T E S I S

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN:

D E R M A T O L O G I A

P R E S E N T A:

DR. LUCIO SERGIO ROJAS TORRES



DIRECTOR: DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE

ASESOR TECNICO:

D.F.B. CELEDONIO GOMEZ RUIZ

MEXICO. D. F.

2000

235979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Villarreal

HOSPITAL GENERAL
DR. MANUEL GEA GONZALEZ
DIRECCION DE
INVESTIGACION
DRA. MARIA DE LOS DOLORES SAAVEDRA ONTIVEROS
Directora de Investigación.

HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"
DIRECCION DE ENSEÑANZA

[Signature]
DR. HECTOR VILLARREAL VELARDE
Director de Enseñanza.

[Signature]
DRA. MARIA TERESA VELASCO JIMENEZ
Subdirectora de Enseñanza.

[Signature]
DR. LUCIANO DOMINGUEZ SOTO
Jefe del Departamento de Dermatología.

[Signature]
DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE
Directora de tesis.

Antecedentes:

La muerte celular es un proceso dinámico en todo ser vivo. La homeostasis es mantenida por un balance entre la proliferación y la muerte celular.(1)

Existen 2 formas distintas de muerte celular: necrosis y apoptosis.

La necrosis es una forma de muerte celular pasiva que puede ser resultado de un daño celular agudo. En este caso, las células tienden a hincharse y se lisan.(1)

La apoptosis, por otro lado, es un proceso activo y fisiológico. Es una muerte celular programada y por lo tanto una forma de regulación de las poblaciones celulares. Es un proceso genéticamente programado que se ha denominado "suicidio celular"(2).

Se caracteriza porque el núcleo se colapsa y la cromatina se condensa y forma masas granulares en la periferia. El ADN se fragmenta. Se pierden las uniones intercelulares y desaparece el contacto con las células vecinas, hay condensación citoplásmica. El núcleo se fragmenta y estos fragmentos son englobados por la membrana citoplásmica, formando varios cuerpos apoptóticos que después serán fagocitados por las células vecinas. No hay reacción inflamatoria(3).

En la piel, los queratinocitos, las células de Langerhans y los macrófagos pueden fagocitar células apoptóticas(2).

En la apoptosis hay delección de células en forma aislada, contracción nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, pero como ya se mencionó la membrana se conserva, los organelos se mantienen intactos y existe compactación de la cromatina en bandas densas uniformes.(3)

Por otro lado, se ha demostrado que una falla en este proceso puede estar envuelta en la patogénesis de una variedad de enfermedades humanas incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, etc.

Apoptosis y oncogenes.

Los genes supresores de tumores alcanzan su efecto oncogénico por inactivación mutacional de ambos alelos normales. En contraste los oncogenes se derivan de los protooncogenes por mutaciones que conducen a una activación funcional aberrante. Es probable que requieran mutaciones de múltiples genes supresores y/u oncogenes para la génesis de la mayor parte de las neoplasias humanas(4).

Un gen supresor de tumor bien definido es el p-53 que se encuentra en cromosoma 17p. Este está con frecuencia mutado en un amplio rango de tipos de cánceres humanos y el porcentaje de mutación varía ampliamente con el tipo de cáncer(2).

Son genes inhibidores de la apoptosis la familia bcl, a la cual pertenecen bcl-2, bcl-x, bax, mcl-1, bad y otros como el gen ras y bag-1.

Y los genes que favorecen la apoptosis son c-myc, p-53 y un receptor de superficie celular de la familia del factor de necrosis tumoral llamado Fas que

promueve la apoptosis cuando se une con su ligando a través de la activación de proteasas.

El protooncogen Bcl-2, que originalmente fue clonado de la translocación 14:18 presente en muchos linfomas humanos de células B, está involucrado en la tumorigénesis por bloqueo de la apoptosis, pues previene la muerte de células neoplásicas y favorece su transformación maligna por supervivencia celular prolongada más que por proliferación celular incrementada.

Entre las causas de muerte celular que pueden ser bloqueadas por Bcl-2 están: La RUV, los rayos x y gamma, los virus, agentes quimioterápicos, FNT γ , el gen p-53, entre otros(2)

Marco de referencia.

La apoptosis puede encontrarse en una amplia variedad de tumores de piel benignos y malignos incluyendo carcinoma de células basales, carcinoma de células espinosas, pilomatrixoma, queratoacantoma y carcinoma de células de Merkel(1).

La expresión de Bcl-2 se ha observado en el carcinoma de células basales y este tipo de crecimiento neoplásico está posiblemente relacionado con una conducta tumoral menos agresiva. Hay controversia con respecto a estos reportes, ya que aunque por un lado se ha demostrado una alta expresión del mismo, también se ha encontrado una alta tasa de muerte celular mediada por apoptosis(5).

En contraste con el carcinoma de células basales, en el de células espinosas el Bcl-2 es detectable sólo en las células basales y se pueden observar un gran número de células apoptóticas, mucho mayor que en el carcinoma de células basales.

La proliferación celular está aumentada(1).

El gen supresor de tumor p-53 está implicado en la reparación del daño al ADN inducido por la radiación ultravioleta y en la inducción de la apoptosis causada por esta. Una de las alteraciones genéticas más tempranas en las lesiones precancerosas cutáneas ocurre en p-53. La exposición repetida a la luz UV induce mutaciones genéticas, fomentando la progresión a carcinoma espinocelular. Además existen reportes de que este gen también se expresa en otras neoplasias malignas de piel como el carcinoma de células basales, y melanoma(1).

Planteamiento del problema.

¿ Es la expresión de Bcl-2 mayor en el carcinoma basocelular que en el espinocelular, el cual es más agresivo?

¿ Es la expresión de p-53 mayor en el carcinoma espinocelular que en el de células basales, el cual es menos agresivo?

Justificación.

En los Estados Unidos solamente, aproximadamente 400,000 a 500,000 personas desarrollan cáncer de piel no melanoma cada año. De estos, el carcinoma basocelular es el tumor más frecuente y por otro lado una quinta parte corresponde a carcinoma espinocelular. La incidencia del cáncer de piel está aumentando y es un problema de salud. Se puede presentar prácticamente en todas las personas, pero es menos común en aquellas con piel oscura.. Es principalmente en piel expuesta al sol y es ampliamente aceptado que la radiación UV es el principal factor etiológico. La probabilidad de desarrollar un cáncer de piel no melanoma es directamente proporcional con la exposición solar acumulada y disminuye directamente con la pigmentación de la piel.

El comportamiento de estos dos tumores es diferente. En el caso del carcinoma espinocelular, el tamaño y lo avanzado del tumor puede correlacionarse con el pronóstico(8). El grosor y la profundidad de la invasión pueden ser predictores útiles de potencial metastásico. La incidencia de metástasis varía en rangos que van del 1 al 20%(7,8). Su crecimiento puede ser muy lento con bajo riesgo de metástasis o por otro lado puede tener un crecimiento rápido con una elevada capacidad de metástasis

Por otro lado, la historia natural del carcinoma basocelular es de un lento crecimiento con invasión progresiva y destrucción de tejidos adyacentes. Las metástasis son muy raras van del 0.0028 al 0.1 % (9,10)

El conocer la expresión de Bcl-2 en estos tumores puede ayudar a determinar su comportamiento proliferativo y en cierta medida su capacidad de apoptosis

Objetivo.

Conocer el grado de expresión de Bcl-2 y p-53 en dos tipos de cáncer de piel, uno altamente proliferativo(el espinocelular) y otro menos proliferativo(el carcinoma de células basales).

Hipótesis.

Si la expresión de Bcl-2 está relacionada más con supresión de apoptosis que con proliferación celular y la expresión de p-53 es inductora de apoptosis, así como de proliferación celular, entonces el carcinoma basocelular presentará una mayor expresión de Bcl-2 y menor de p-53 que el espinocelular.

Diseño.

Estudio experimental, comparativo, transversal, prospectivo.

Material y método

Universo: Pacientes que acuden al servicio de Dermatología con el diagnóstico de cáncer de piel.

Muestra: Biopsias de piel en pacientes que acudieron al servicio de Dermatología del Hospital Manuel Gea González en el año 2000 con el diagnóstico de carcinoma basocelular y carcinoma espinocelular.

Tamaño de la muestra: 22 casos divididos en dos grupos: 11 con diagnóstico de carcinoma basocelular y 11 con diagnóstico de carcinoma espinocelular.

Criterios de Inclusión:

- Biopsias con diagnóstico histológico de Carcinoma basocelular nodular pigmentado o espinocelular bien diferenciado.

Criterios de exclusión:

- Biopsias de piel con otros diagnósticos.
- Biopsias de piel de carcinoma basocelular y espinocelular pero con muestras insuficientes para realizar diagnóstico histológico.

VARIABLES:

- Independientes: Tipo de carcinoma basocelular y espinocelular.

- Dependientes: Expresión de Bcl-2 y p-53.

Parámetros de medición.

Independientes: A partir de laminillas se evaluarán las características citológicas para establecer los diagnósticos carcinoma basocelular y espinocelular

Dependientes: Se realizará la técnica de inmunohistoquímica para detectar la expresión de Bcl-2 y p-53 en las laminillas con la escala de: Negativo(-), débilmente positivo(+), moderadamente positivo(++) y fuertemente positivo(+++).

Procedimiento de captación de la información.

- a) Realización de biopsia a pacientes con sospecha clínica de Carcinoma basocelular o espinocelular:
 - Asepsia y antisepsia.
 - Aplicación intralesional de xilocaína al 2% como anestésico.
 - Con un sacabocado(punch) se toma un fragmento de piel y posteriormente se coloca en un frasco con formol, para después incluirla en bloques parafina.
 - Se realiza hemostasia y posteriormente se hace cierre con sutura no absorbible, para retirar los puntos de 7 a 15 días después.
 - De los bloques de parafina se realizarán dos cortes de cada uno que se colocarán en laminillas preparadas con Silano para evitar que se desprenda el tejido durante la realización de la técnica de inmunohistoquímica.
 - Una vez que se tengan los 2 cortes que se mencionan se procederá a la técnica siguiente
 - a) Desparafinización(Con Xilol y alcohol).
 - b) Recuperación antigénica(citrato de sodio 0.1 M, pH 6 = en olla de presión para horno de microondas) por 20 minutos.
 - c) Bloqueador de peroxidases(H₂O₂ 3%) por 5 minutos.
 - d) Bloqueador de sitios inespecíficos(suero normal de caballo) 10-20 minutos.
 - e) Colocación de anticuerpos primarios DO-7(p-53) y 124(Bcl-2) durante 30 minutos.
 - f) Colocación de anticuerpo secundario biotinilado(Dako) por 20 minutos.
 - g) Colocación de complejo enzimático(estreptavidina conjugado con peroxidasa, Dako) por 20 minutos..
 - h) DAB(Dako) por 5 minutos.
 - i) Contratinción con hematoxilina de Meyer.
- Una vez obtenida la técnica de inmunohistoquímica, las muestras se evaluarán para la inmunexpresión de Bcl-2 y p-53 en un microscopio de

campo claro en un aumento de 10x y 40x. La cantidad de expresión será evaluada de acuerdo a una ordinal semicuantitativa donde (-)= Negativa, (+)=Levemente positivo, (++)= Moderadamente positivo (+++)= Intensamente positivo.

- Serán valorados estos resultados por dos observadores expertos.

HOJA DE CAPTURA DE DATOS.

(Anexo).

RECURSOS MATERIALES:

- Guantes.
- Cubrebocas.
- Gasas.
- Punch(sacabocado).
- Jeringas.
- Anestesia(Xilocaína c/s epinefrina).
- Hojas de bisturí.
- Sutura.
- Mangos de bisturí No 3
- Tijeras para tejido.
- Tijeras para sutura.
- Portagujas.
- Cubreobjetos.
- Microscopio.

Reactivos para inmunohistoquímica

- Citrato de sodio(tri-sodio citrato 2-hidrato). Para recuperación de antígenos.
- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- K₂HPO₄ (Fosfato dibásico de potasio)
- KHPO₄ (Fosfato monobásico de potasio)
- NaCl.
- Hematoxilina de Harris.
- Pap-pen(marcador hidrofóbico)DAKO.
- Hidróxido de amonio.

Anticuerpos.

- a) Anticuerpo monoclonal proteína p-53(clona DO-7) Marca DAKO.
- b) Anticuerpo monoclonal Bcl-2(Clona 124). Marca DAKO.
- c) Sistema de detección LSAB+ Anticuerpo biotilnado y estreptavidina

- conjugada con peroxidasa)
d) Cromógeno Peroxidase substrate Kit DAB. SK4100 Vector laboratorios.

VALIDACIÓN DE DATOS .

Para el análisis de estos resultados se realizará estadística descriptiva .
Para la prueba de la hipótesis se realizará la prueba de Chi cuadrada.
Se realizará la prueba t de análisis estadístico para determinar diferencias entre los dos observadores con un intervalo de confianza de 95%.

CONSIDERACIONES ETICAS.

La toma de biopsia en los pacientes que acuden al servicio de Dermatología y que se sospecha carcinoma basocelular o espinocelular es un procedimiento que se realiza de rutina, por lo que no se hará ningún otro procedimiento adicional al ser incluido en este protocolo.

“Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud”

RESULTADOS

Son los que se presentan a continuación en las dos tablas siguientes:

TABLA 1.- EXPRESION DE Bcl-2

Niveles de BCL2	CBC		CEC	
	Fi	%	Fi	%
OBSERVADOR 1				
Negativo	1	9.09	2	18.18
Levemente positivo	2	18.18	8	72.73
Moderadamente positivo	6	54.55	1	9.09
Intensamente positivo	2	18.18	0	0.00
Total	11	100.00	11	100.00
OBSERVADOR 2				
Negativo	1	9.09	4	36.36
Levemente positivo	6	54.55	6	54.55
Moderadamente positivo	3	27.27	1	9.09
Intensamente positivo	1	9.09	0	0.00
Total	11	100.00	11	100.00

La expresión de Bcl-2 fue mayor en el carcinoma basocelular con un Riesgo Relativo(RR) de 4.4 IC 95%(1.26- 15.68).

La prueba de chi cuadrada fue de 6.47 con una $p = 0.01$ lo cual fue estadísticamente significativo.

TABLA 2.-EXPRESION DE p-53

Niveles de P53	CBC		CEC	
	Fi	%	Fi	%
OBSERVADOR 1				
Negativo	1	9.09	0	0.00
Levemente positivo	8	72.73	4	36.36
Moderadamente positivo	2	18.18	1	9.09
Intensamente positivo	0	0.00	6	54.55
Total	11	100.00	11	100.00
OBSERVADOR 2				
Negativo	1	9.09	1	9.09
Levemente positivo	7	63.64	3	27.27
Moderadamente positivo	3	27.27	2	18.18
Intensamente positivo	0	0.00	5	45.45
Total	11	100.00	11	100.00

En cuanto a la expresión de p-53 fue mayor en el carcinoma espinocelular, aunque en este caso se determinó un Riesgo Relativo (RR) de 2.33 IC 95% (0.97-5.59).

La prueba de chi cuadrada fue de 2.0 con una $p = 0.11$ la cual no es estadísticamente significativa pero sí hay una fuerte asociación.

Se realizó una prueba de t de análisis estadístico para determinar diferencias entre los dos observadores a intervalos de confianza a 95% no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los puntajes de los dos observadores con p que va de 0.2201 a 0.7133

DISCUSION.

De acuerdo con los reportes previos, la expresión de Bcl-2 se ha demostrado en varios tumores de piel, tanto benignos, como malignos. En el caso del carcinoma basocelular la controversia se presenta por el hecho de por un lado se ha demostrado una expresión elevada, sin embargo existen casos en los que hay una tasa elevada de apoptosis.

En este estudio en el carcinoma basocelular Bcl-2 se expresó en el 91% de los casos, y fue mayor que el carcinoma espinocelular, concordando con algunos reportes e inclusive mayor con respecto a otros(1,6).

Aunque es obvio que la expresión de Bcl-2 no es la única que regula la apoptosis, esto de alguna manera ayuda a explicar el comportamiento tumoral menos agresivo del carcinoma basocelular, siendo el daño más bien por aumento en la sobrevivencia celular más que por proliferación celular.

De acuerdo al análisis estadístico la expresión de Bcl-2 en el carcinoma basocelular fue estadísticamente significativa..

En el caso de la expresión de p-53, los reportes indican que se expresa en una variedad de tumores benignos y malignos. Es indicadora de proliferación celular y es inductora de apoptosis(2). Su expresión es mayor en los tumores malignos.

En nuestro estudio la expresión de p-53 en el carcinoma espinocelular fue también superior al 90% de los casos y fue mayor que el carcinoma basocelular, sin embargo en este caso, aunque hubo una fuerte asociación, no fue estadísticamente significativo.

La mayor expresión de p-53 está asociada sin duda a una mayor proliferación celular, así como inducción de apoptosis, lo cual se traduce en un comportamiento tumoral más agresivo.

Se ha demostrado también que esta expresión será de mayor intensidad en aquellos sitios donde mayor atipia exista, lo cual quedó demostrada también en este estudio.

CONCLUSIONES.

Es indudable que la regulación de la proliferación celular y de la apoptosis depende de muchos factores. Entre ellos se encuentran los oncogenes y los genes supresores de tumores. Cuando se activan los primeros y se alteran o dejan de funcionar los segundos se puede llegar a estados patológicos como el desarrollo de tumores malignos.

En el caso de este estudio, se trabajó con una mínima parte de toda esta amplia vía.

Se conoció la expresión de Bcl-2 y p-53 en el carcinoma basocelular y en el espinocelular y se demostró que Bcl-2 fue mayor en el carcinoma basocelular (estadísticamente significativo) con respecto al otro.

En el caso de la expresión de p-53, esta fue mayor en el carcinoma epinocelular pero, aunque hubo asociación, no fue estadísticamente significativo.

Estos resultados, a mi manera de ver, ayudan, aunque en una mínima parte, a conocer el comportamiento tumoral de dichos tumores.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. **Eur J Dermatol.** 1999; 9: 413-26.
- 2.-Serrano A. Apoptosis y dermatologia. **Dermatologia Rev Mex.**1999; 43(5):213-8.
- 3.-Negrin D. Apoptosis y piel. **Dermatología Venezolana** 1997;35:89-98.
- 4.- Bookstein R, AllredDC. Recessive oncogenes, **Cancer** 1993;71 1179-86.
- 5.-Nuñez G, Clarke M. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. **Trends in Cell Biology.** 1994; 4: 399-403
- 6.-Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. **Cancer.** 1994; 74: 1720-24.
- 7.-Dinehart SM, Pollack SV. Metastases from squamous cell carcinoma of the skin and the lip. An analysis of twenty-seven cases. **J Am Acad Dermatol.** 1989; 21: 241.
- 8.-North JH Jr et al Advanced cutaneous squamous cell carcinoma of the trunk and extremity: Analysis of prognostic factors. **J Surg Oncol .** 1997; 64: 212.
- 9.-Von Domarus H, Stevens PJ. Metastatic basal cell carcinoma **J Am Acad Dermatol.** 1984; 10 1043.

10.-Paver K ET AL. The incidence of basal cell carcinoma and their metastases in Australia and New Zealand. **Australas J Dermatol.** 1973; 14: 53

A N E X O(captura de datos) .

CARCINOMA ESPINOCELULAR

Caso	Bcl-2	p-53

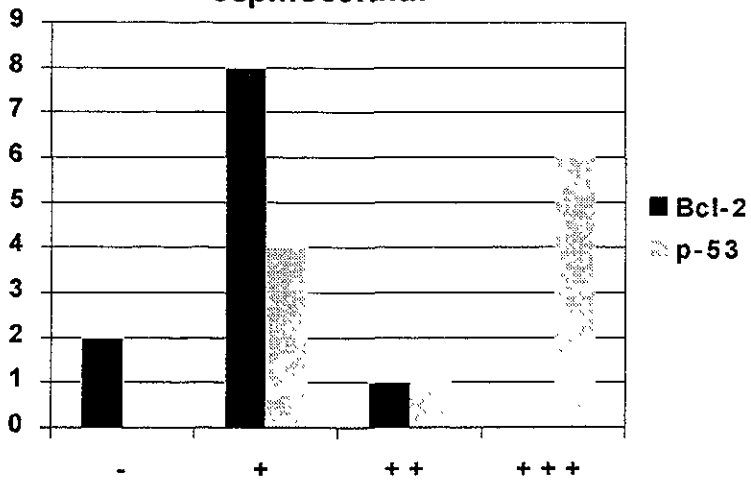
(-) Negativo.

(+) Levemente positivo.

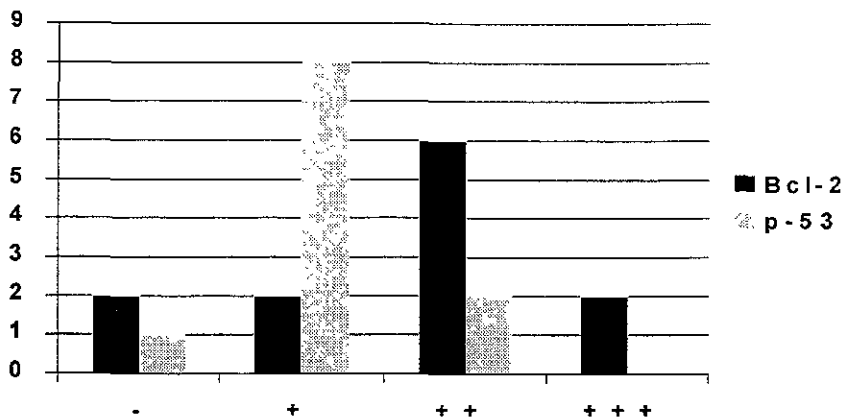
(++) Moderadamente positivo.

(+++) Intensamente positivo.

Gráfica 1.-Carcinoma
espinocelular



Gráfica 2.-Carcinoma basocelular



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA