

9
Zej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DETECCION POR INMUNOHISTOQUIMICA DE LA
PROTEINA P53 EN CANCER COLORRECTAL DE
PACIENTES TRATADOS CON RADIO Y
QUIMIOTERAPIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

EMMA LOUISE ARRIOLA GODFREY



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado

Presidente:	Prof. Angelina Quintero Ruiz
Vocal:	Prof. Beatriz Albina Medina Jiménez
Secretario:	Prof. Saturnino de León Chapa
1er. Suplente:	Prof. Luis Ignacio Terrazas Valdéz
2do. Suplente:	Prof. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Sitio donde se desarrolló el tema:


Laboratorio de Investigación en Cáncer. Departamento de Biología. Facultad de Química. U. N. A. M.

Archivo del Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional, S. XXI., I. M. S. S.

Laboratorio de Inmunohistoquímica, Departamento de Patología Anatómica.

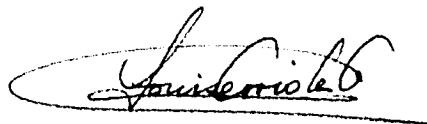
Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional S. XXI. I. M. S. S.

Asesor del tema:



Dra. Angelina Quintero Ruiz

Sustentante:



Emma Louise Arriola Godfrey

Le dedico este trabajo

A mi mamá y mi papá
por que son los mejores.

A Melissa
por ser una buena hermana

A mis abuelitas.

A Juan
Porque a tí te debo en gran parte
lo que soy hoy, gracias.

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Pedro Luna, al Dr. Santiago Pallán y a la Dra. Ivonne Quadra del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI por su valiosa ayuda en la realización de este proyecto, sin la cual no hubiera sido posible.

Agradezco a la M. en C. Josefina Villa por toda su ayuda brindada durante la realización de este proyecto. Gracias por todos los conocimientos sobre inmunohistoquímica y por todo tu apoyo.

Le doy las gracias también a la Dra. Angelina Quintero por el interés y confianza que puso en mi y a todo el equipo del laboratorio 202.

Agradezco también a toda mi familia y amigos por su apoyo y por estar siempre conmigo.

En especial quiero agradecer a Luz Elena por estar siempre cuando era necesario, tanto en las buenas como en las malas

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES	
EL CANCER Y LA IMPORTANCIA DE SU TRATAMIENTO.....	4
ONCOGENES ALTERADOS EN EL CANCER Y EN EL CANCER COLORRECTAL.....	8
SUPRESORES TUMORALES ALTERADOS EN CANCER Y EN CANCER COLORRECTAL.....	10
CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES DEL SUPRESOR TUMORAL P53.....	13
APOPTOSIS.....	26
APOPTOSIS INDUCIDA POR P53.....	30
METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	34
RESULTADOS.....	42
DISCUSION DE RESULTADOS.....	61
CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66

INTRODUCCION.

P53 es una proteína de 53 KDa de peso molecular, que fue descubierta en 1979 y que se pensó actuaba como oncogen, ahora se sabe que es un supresor tumoral(19,20). P53 es la proteína que se ha encontrado mutada más frecuentemente en la mayoría de los tumores humanos. Se han propuesto modelos en donde el papel de p53 es el de un guardian molecular para la integridad genómica de las células. Si el DNA de la célula es dañado, se induce la expresión de p53 que detiene el ciclo celular en la fase G1, una vez que el daño es reparado continúa dividiéndose; en caso de que el daño no sea reparable, p53 induce la apoptosis en la célula (19-22,28).

Se ha demostrado que cultivos de células tumorales deficientes del gen p53 son insensibles al efecto de fármacos y son resistentes a la radioterapia; por el contrario, estas células transfectadas con el gen p53 son sensibles al tratamiento.

El presente trabajo tiene el objetivo de conocer si los tumores humanos responden de manera similar a la observada en líneas celulares tumorales y si la alteración de la expresión de la proteína p53 influye en la respuesta de los pacientes hacia el tratamiento pre-operatorio de quimioterapia y radioterapia. El estudio anterior se plantea mediante la investigación de la expresión de p53 por inmunohistoquímica y la correlación de estos

resultados con la respuesta de los pacientes a tratamiento con radio y quimioterapia. Estos resultados podrían contribuir a indicar si p53 juega un papel determinante en la quimiosensibilidad o radiosensibilidad en los tumores de cáncer colorrectal humano.

La proteína p53 silvestre en la célula normal no se acumula, de modo que no es detectable por inmunohistoquímica. Sin embargo, mutaciones sin sentido en el gen p53, modifican su conformación e incrementan significativamente la vida media de la proteína, provocando su acumulación en los núcleos de las células, haciendo posible su detección por análisis inmunohistoquímico (28).

La hipótesis que se planteó al inicio de este trabajo fue que en los tumores provenientes de pacientes que respondieron positivamente a la radio y quimioterapia, contienen p53 normal y no se observará la tinción de p53. En cambio en los tumores de pacientes que no respondieron al tratamiento, se detectará una tinción positiva de p53, lo que nos indicará la presencia de la proteína p53 mutada.

Se seleccionaron bloques representativos de la biopsia y del tumor de un grupo de pacientes con cáncer colorrectal que fueron tratados con radio y quimioterapia y se analizó la presencia o ausencia de p53 por inmunohistoquímica, empleando un anticuerpo monoclonal contra p53. Los resultados que se obtuvieron al ser correlacionados con los datos de la regresión del tumor, nos permiten concluir que

los pacientes que presentan la proteína p53 normal tienen una regresión del tumor significativamente mayor que los pacientes que presentan la proteína mutada.

ANTECEDENTES.

EL CÁNCER Y LA IMPORTANCIA DE SU TRATAMIENTO.

En las últimas dos décadas, los avances en biología molecular han revolucionado la investigación en cáncer. Es aparente que una variedad de factores diferentes y al parecer no relacionados pueden causar cáncer. La mayoría de estos factores comparten la propiedad de causar daño o alteración del DNA celular (4). La proliferación celular está regulada principalmente por el ambiente celular y por su estado de diferenciación. El ambiente provee señales positivas, estimuladoras y señales negativas, inhibitorias. El balance entre estas señales regula el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de tejidos complejos y de organismos. La replicación fiel del genoma es un punto crítico para el buen funcionamiento y la sobrevivencia celular (9). La capacidad de ignorar estas señales es una propiedad fundamental de la célula cancerosa, en la que existe una desregulación de los mecanismos de control (4,7,17). Además, las células tumorales muchas veces, modifican su ambiente local de modo que se vuelve más favorable para la proliferación celular (9).

Ha sido propuesto que la tumorigénesis es un proceso multipasos en el cual se acumulan alteraciones genéticas, que involucran casi todos los caminos regulatorios conocidos, produciendo finalmente un fenotipo neoplásico (3,7,11,12,15,16). Es un proceso de

desregulación de las funciones genéticas, provocando primero una expansión clonal y heterogeneidad clonal de las células iniciadas y promovidas, seguido de una invasión tisular local y terminando en la formación de metástasis (2,6,7,10,15,16).

Es aceptado que la mayoría de los tumores crece a partir de una sola célula (clona). Conforme la clona se expande, su progenie sobrepasa a las células normales que la rodean, mientras que la masa tumoral adquiere una o más alteraciones genéticas. Así, el crecimiento tumoral está asociado con cambios somáticos adicionales numerosos e impredecibles que aparecen dentro de la masa clonal, haciendo este fenómeno biológico muy complejo para su estudio. En el momento en el que el tumor ha desarrollado malignidad "madura"; ha adquirido mucha heterogeneidad celular, con algunas poblaciones celulares coexistentes o con subpoblaciones que pueden haber sobrepasado la clona original volviéndose predominantes en la masa tumoral (14).

Se ha postulado que los mecanismos responsables de estos cambios celulares pueden ocurrir como una consecuencia de cambios cromosomales morfológicos. Estos cambios pueden incluir translocación (intercambio de material genético entre cromosomas), adiciones (ganancia de material genético extra), deleciones (pérdida de una porción de un cromosoma), y mutaciones puntuales (cambio en un solo par de bases en la molécula de DNA)(14).

Solamente células que tienen la habilidad o al menos el potencial de proliferar pueden generar tumores (9).

El cáncer colorrectal es una epidemia del siglo XX, ya que la incidencia en los últimos 50 años ha aumentado exageradamente y va a seguir incrementándose. Los programas de tamizaje a gran escala en países industrializados han mostrado que de la población en general, un 3-6% tiene una prueba de sangre oculta en heces positiva, lo que sería indicativo de una lesión en el cólon. De estos individuos, 30-50% probablemente va a desarrollar o tendrá una neoplasia; 67% a 75% de estos pacientes tendrán una neoplasia benigna (pólipo adenomatoso), y de 25% a 33% tendrá cáncer (14).

El tratamiento del cáncer convencional con cirugía, radiación y quimioterapia parece estar alcanzando una meseta en la respuesta tumoral y sobrevivencia de los pacientes en muchas de las malignidades más comunes en adultos (4).

Por otro lado, la sobrevivencia de pacientes tratados únicamente con cirugía en los ensayos de tratamiento actuales, sugiere que el manejo completo de los pacientes con cáncer colorrectal está en un estado de evolución dinámica. Por ejemplo, en 1966, la sobrevivencia a 5 años de pacientes con carcinomas confinados a la mucosa del colon (Cáncer Dukes A) se reportó como del 64% únicamente, mientras que la mayoría de los reportes publicados desde 1980 sugieren que del 80 al 99% de estos pacientes sobrevivirán 5 años (5).

Las técnicas de anestesia, cuidados de apoyo y el instrumental quirúrgico más modernos han reducido la morbilidad y mortalidad quirúrgica. Las imágenes por tomografía computarizada por resonancia magnética han mejorado la habilidad de valorar con precisión la enfermedad pre-operativamente. Los ensayos con antígeno carcinoembrionario en ocasiones permite un diagnóstico temprano de la enfermedad (5). Sin embargo, el conocimiento de los estudios moleculares puede conducir al mejoramiento de la sobrevivencia de pacientes con cáncer. Los medios por los cuales esto se podría llevar a cabo incluyen una estimación de riesgo mejorada (determinación de predisposición genética), quimioprevención primaria y secundaria, detección temprana de lesiones moleculares que preceden al cáncer detectable clínicamente (7). Identificar las alteraciones genéticas presentes en los tumores puede ser una herramienta molecular para mejorar la estimación del pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal. También sirven para obtener ventajas terapéuticas. Algunos agentes quimioterapéuticos podrían inactivar selectivamente productos de genes mutados (p.ej. ras); otros pueden ser obtenidos para imitar o restaurar la acción biológica normal de los genes supresores (p.ej. p53 o DCC)(7,16).

La carcinogénesis es un proceso endémico, y nadie está totalmente saludable desde una perspectiva genómica, ya que todo individuo está sujeto a sufrir posibles mutaciones ya sea endógenas o exógenas. Todos estamos en riesgo y aunque la progresión de

lesiones tempranas a lesiones tardías puede ser probabilística, en el presente, un epidemiólogo puede predecir con mucha exactitud, que 1 de cada 5 personas en la población entera de los Estados Unidos morirá eventualmente de una malignidad de última etapa si los índices de muerte actuales continúan (2).

En 1980 se consideraba que habrían 6.35 millones de casos nuevos de cáncer cada año en el mundo y estos datos se incrementarían considerando los aumentos demográficos y los riesgos probablemente hasta en un 60% en el año 2000 con respecto a 1975. Con estas perspectivas, se cree que ningún país podrá encarar los costos económicos y sociales que involucran el diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de un número de pacientes con cáncer que se incrementan continuamente, por lo que hay una necesidad axiomática para reducir su número (1).

ONCOGENES ALTERADOS EN EL CÁNCER Y EN CÁNCER COLORRECTAL.

Los oncogenes, son genes celulares normales (proto-oncogenes) cuya función alterada se puede correlacionar con anomalías cromosomales morfológicas, están en porciones del cromosoma donde están genes con función moduladora o reguladora. Actúan como "aceleradores" del crecimiento y división celular, llevando a cabo un efecto regulatorio "positivo". Cuando han sufrido una mutación somática, ésta es asociada con cambios malignos en ciertos tipos

de células (14) y se ha implicado en la génesis de tumores humanos (6).

Existen oncogenes como c-myc, c-fos, c-Ha-ras, y c-Ki-ras que se encuentran mutados en la mayoría de los tumores; y otros como c-abl, c-fos, c-fms y c-myb que no se encuentran mutados tan frecuentemente (8).

C-erb-B y C-erb-A se han asociado con gliomas, cáncer de mama y cáncer de células escamosas. C-src, c-myc, c-fos y c-ki-ras se han relacionado con cáncer de colon (6,13). C-abl se ha encontrado mutado en leucemia mielogénica crónica y C-myc en linfoma de Burkitt, cáncer de pulmón, neuroblastoma, leucemia y cáncer de mama (6,13); mientras que L-myc en carcinoma de pulmón y N-myc en neuroblastoma y cáncer de pulmón. C-myb se ha encontrado alterado en leucemia mielogénica aguda. N-ras se ha asociado con leucemia mielocítica aguda y con neuroblastoma y H-ras con cáncer de vejiga. (6,13).

En cáncer colorrectal, se requieren mutaciones en al menos 4 ó 5 genes para la transformación maligna de acuerdo a lo reportado por diferentes autores (15,16). Los tumores colorrectales aparentemente ocurren como un resultado de activación mutacional de oncogenes acoplada con la inactivación de genes supresores tumorales (6,10,15,16).

Las mutaciones en ras pueden ser uno de los eventos iniciadores en un grupo de tumores colorrectales. Y probablemente los adenomas con la mutación en ras son más susceptibles a la progresión que adenomas sin ésta mutación. Ras se encuentra mutado en el 58% de adenomas de más de 1 cm y en el 48% de los carcinomas colorrectales (15,16).

C-myc está expresado a niveles elevados en la mayoría de los carcinomas colorrectales; especialmente los que derivan del colon descendente (16).

SUPRESORES TUMORALES ALTERADOS EN CÁNCER Y EN CÁNCER COLORRECTAL.

Históricamente hay tres líneas de evidencia -hibridos celulares, cáncer familiar y pérdida de la heterozigocidad en tumores- que han dado soporte a la idea de que la transformación neoplásica puede involucrar alteraciones en genes cuyos productos regulan negativamente la proliferación celular (17).

El daño al DNA puede resultar en la inactivación de genes supresores del crecimiento y se cree que la pérdida total de la función en estos genes resulta sólo si ambas copias están dañadas, siendo una característica recesiva (7,10). Sin embargo, en algunos casos, genes supresores tumorales mutantes aparentemente ejercen un efecto fenotípico aún cuando están presentes en estado

heterocigoto; así que, probablemente algunos genes supresores tumorales no son recesivos a nivel celular (16).

El mecanismo bioquímico preciso mediante el cual cualquiera de los productos de genes supresores tumorales regulan el comportamiento celular es desconocido (17). El análisis molecular de los genes supresores tumorales parece mostrar que sus productos proteicos están involucrados en adhesión celular, transducción de señales, transcripción, traducción y control del ciclo celular (18). Por ejemplo, el producto del gen DCC (gen deletado en carcinomas colorrectales) codifica una molécula de superficie celular relacionada a moléculas de adhesión celular que se piensa regulan el comportamiento celular mediante interacciones con otras células. Por otro lado, la observación de que p53 normal puede suprimir la transformación en ensayos de cooperación oncogénica con ras y c-myc o adenovirus E1A sugiere que una de las funciones de p53 normal puede ser inhibir la expresión o función de c-myc (17).

Se han identificado muchos supresores tumorales mutados en diferentes tumores, por ejemplo: se han observado mutaciones en p53 en varios tipos de tumores sólidos humanos, incluyendo los de cerebro, mama, pulmón, vejiga y tejido blando (16), además de leucemia mielógena crónica. NF1 (Proteína activadora de GTPasa asociada a la Neurofibromatosis tipo I), APC (gen asociado a la poliposis adenomatosa familiar), RB-1 con retinoblastoma y osteosarcoma, WT1 (factor de transcripción asociado con tumor de

Wilms). También, PTP (proteína tipo receptor tirosin-fosfatasa) se ha asociado con carcinoma de células renales y carcinoma de pulmón; los genes DCC (delecionado en cáncer colorrectal) y MCC (mutado en cáncer colorrectal) con carcinoma colorrectal y el nm23 (cinasa de nucleósido difosfato) con metástasis en cáncer colorrectal y de mama (18).

En el cáncer colorrectal, las deleciones en el brazo corto del cromosoma 17 (17p) son comunes y ocurren en más del 75% de los carcinomas. Se relacionan con la transición de un adenoma benigno a un carcinoma maligno (15,16,26,38). Un gen p53 mutado en un carcinoma colorrectal puede proveer una ventaja de crecimiento selectiva promoviendo la progresión del tumor aún en la presencia de un alelo normal de p53 (15).

En el síndrome de Gardner, que está asociado con mutaciones en el gen apc (5q), se desarrollan miles de pólipos colorrectales a edad temprana, y hay una transformación maligna de algunos de los pólipos en casi el 100% de las personas afectadas a la edad de 40 años. La lesión en apc entonces predispone las células que están proliferando anormalmente en los pólipos al camino hacia cáncer de colon (7).

Se han encontrado deleciones alélicas en el cromosoma 5q en casi un 40% de carcinomas y en algunos adenomas que no tenían poliposis adenomatosa familiar (10,11,15). Se ha localizado en el cromosoma

5q21 un gen candidato a supresor tumoral, el cual ha sido recientemente identificado como mcc por mutado en cáncer colorrectal (15).

Las pérdidas alélicas en el cromosoma 18q también son comunes. Ocurren en aproximadamente el 75% de los carcinomas colorrectales. Se pueden observar deleciones en 47% de adenomas avanzados pero solo en 11-13% en adenomas más tempranos (10,15,16). Cho y Vogelstein (15) identificaron un gen candidato para supresor tumoral en el cromosoma 18q que aparentemente está alterado en cáncer colorrectal. Se localiza en la posición 18q21.3. Se ha denominado el gen dcc, por "deleted in colorectal carcinomas". Las alteraciones en este gen, probablemente interfieren con el mantenimiento de controles críticos y juega un papel importante en la patogénesis de la neoplásia colorrectal humana (15).

CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES DEL SUPRESOR TUMORAL P53.

Aunque no todos los tumores humanos tienen mutaciones en p53, este gen es el más frecuentemente mutado de todos los genes supresores tumorales y oncogenes (19-22).

La proteína p53 fue descubierta en 1979, formando un complejo con el antígeno T del SV40 en células de roedor transformadas-SV40 y clasificada inicialmente como un antígeno tumoral (19,20,30).

Mediante más estudios en los últimos años se ha demostrado que el gen p53 silvestre se comporta como un regulador de crecimiento negativo o gen supresor tumoral y que en los estudios que se realizaron previamente habían utilizado formas mutantes de p53 ya que efectivamente algunas mutantes de p53 son oncogénicas (20). La introducción del gen p53 normal a líneas celulares tumorales con muy bajos niveles de p53 o con proteínas mutantes suprime el crecimiento, lo que sugiere que p53 controla la entrada al ciclo celular (17,19,21,29).

El gen p53 humano tiene aproximadamente 20 kb de DNA genómico, contiene 11 exones y ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13)(20,24). El RNA mensajero que se transcribe del gen p53 tiene aproximadamente 3.0 kb, encontrándose en células normales a concentraciones máximas en células germinales no diferenciadas, células esplénicas y otros tipos de células que están proliferando rápidamente. Por lo tanto, el estado proliferativo de la célula se correlaciona con los niveles de mRNA de p53.

El gen p53 codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos que pesa 53 Kd (17,21,24). La proteína de p53 tiene algunas regiones que están altamente conservadas a través de la evolución vertebrada, lo que indica un alto grado de importancia funcional, estas regiones conservadas se encuentran en cinco secuencias de aminoácidos bastante espaciadas que se han denominado los dominios

I al V. Las secuencias que se encuentran entre estos dominios conservados están mucho menos conservadas. Las mutaciones en p53 asociadas con tumores humanos tienden a darse en los dominios conservados II al V (20,24).

El análisis de secuencia de aminoácidos muestra que el extremo amino terminal de p53 es altamente ácido mientras que hacia el carboxi terminal es muy básico. La región media de la proteína es hidrofóbica, particularmente en los dominios altamente conservados del II al V, sugiriendo un importante papel conformacional. De hecho, mutaciones puntuales en los dominios hidrofóbicos altamente conservados confieren una conformación alterada de la proteína.

La proteína p53 es capaz de formar un complejo con el antígeno T del SV40 formando oligómeros que estabilizan a p53 incrementando su tiempo de vida media hasta 100 veces o más comparado con controles normales (19). La capacidad de unirse al antígeno T la tienen solo la p53 silvestre y algunas formas mutantes. Oncoproteínas de otros virus tumorales de DNA también forman complejos con p53. Por ejemplo, las oncoproteínas E1B 55K de adenovirus aparentemente inactivan a p53 por unión y estabilización; y por otro lado, las proteínas E6 de papiloma virus oncogénicos, detienen la función de p53 facilitando su degradación (28). También se ha observado que se asocia con la proteína MDM2 que se ha encontrado sobre-expresada en sarcomas e inactiva la actividad supresora tumoral de p53 (25).

Además de su habilidad de interaccionar con proteínas heterologas, p53 se agrega con sí misma para formar oligómeros; forma tetrámeros y múltiplos de tetrámeros. La formación de estos oligómeros ocurre muy rápidamente y es independiente de la conformación. Las proteínas p53 mutantes con conformación alterada pueden auto-agregarse y formar complejos con la proteína p53 silvestre. La agregación de proteínas mutantes y silvestres puede ser no funcional o anormal debido a la conformación mutante que se adquiere por las proteínas en el complejo mezclado. La región de p53 asociada con la oligomerización se ha localizado en la región carboxi terminal (20), y es a través de ésta región que p53 se une al DNA.

Los estudios llevados a cabo por Baker y cols (20) han demostrado que más del 75% de carcinomas de colon tienen pérdidas cromosómicas 17p y el 86% de estos tumores tienen una mutación en el alelo p53 restante. Las mutaciones fueron encontradas raramente en estadios tempranos del tumor y fueron asociadas generalmente con la transición de crecimiento benigno a crecimiento maligno. El gen p53 silvestre es un supresor tumoral que inhibe el crecimiento de tumores colorrectales y su pérdida puede ser un evento genético clave que finalmente conduce a la malignidad. Existe una fracción de tumores en los cuales no se han encontrado mutaciones en p53 o pérdidas alélicas. Y existen algunas clases de tumores en los cuales se han observado muy pocas o ninguna mutación en p53.

El tipo de eventos que alteran la estructura de p53 y su expresión incluyen mutaciones puntuales en regiones altamente conservadas, deleciones amplias y una pérdida parcial o completa de la expresión de mRNA de p53 (19). La gran mayoría de las mutaciones se han encontrado en los exones 5 al 8 entre los codones 130 al 290. Los eventos mutacionales observados más comúnmente en el gen p53 en los tumores humanos son transiciones C:G a T:A y G:C a A:T, que son mutaciones espontáneas. Existe otra clase de mutación, la transversión de G:C a T:A que ocurre frecuentemente en cáncer de pulmón y en carcinoma hepatocelular (20,24).

Más del 90% de las mutaciones en p53 son mutaciones sin sentido que cambian la identidad de un aminoácido. Al cambiar los aminoácidos de ésta forma, se puede alterar la conformación e incrementar la estabilidad de la proteína p53 (22,23).

Aparentemente, la sobre-expresión de la forma mutante de la proteína es suficiente para sobrepasar a la p53 silvestre endógena de una manera negativa dominante formando complejos con la proteína tipo silvestre inactivandola funcionalmente. Se ha demostrado que las formas mutantes de p53 más no las silvestres son capaces de cooperar con ras para transformar células (20).

Por ejemplo, en un trabajo en el que emplearon fibroblastos de embrión de rata, cuando adicionaron clonas de p53 silvestre a la p53 mutante más ras en el ensayo de transformación, hubo una

supresión activa de la transformación por el p53 silvestre medido por el número de focos transformados. Los focos nuevos que aparecieron en la presencia de p53 silvestre, mostraron haber perdido la expresión de la proteína silvestre o un cambio de la proteína silvestre a la forma mutante. Este junto con otros estudios *in vitro* e *in vivo* hicieron que los investigadores postularan que el gen p53 es un supresor tumoral y no un oncogen.

Las proteínas mutantes se pueden dividir en dos clases mayores: 1)mutantes con pérdida de función que han perdido su habilidad de suprimir la transformación y que son débilmente transformantes o no transformantes; y 2)mutantes oncogénicas dominantes que, además de perder su función supresora tumoral pueden participar activamente en la transformación de células.

Muchos estudios han demostrado que la sobre-expresión de p53 silvestre en células tumorales tiene uno de los siguientes resultados: 1)supresión de la proliferación celular; 2)inducción de apoptosis; o 3) inducción de diferenciación.

La capacidad de p53 silvestre para llevar a cabo un efecto antiproliferativo se correlaciona con el estado conformacional silvestre y con un nivel elevado de fosforilación. Michalovitz y cols. (20) descubrieron una proteína p53 mutante sensible a temperatura (p53Val135) y después observaron que ésta misma proteína podía cambiar su conformación de tipo silvestre a bajas

temperaturas a tipo mutante a temperaturas elevadas. El cambio de conformación de la p53 sensible a temperatura de silvestre a mutante se acompaña con un cambio en la actividad de ser una proteína supresora de crecimiento a una promotora de crecimiento (20).

Existe evidencia reciente de que la p53 normal puede ser un activador transcripcional porque se ha identificado un dominio de activación en el dominio N-terminal ácido de la proteína, en los codones 20-42. Aunque parece que solo se requieren los primeros 73 aminoácidos para ésta activación transcripcional, dos mutaciones en los aminoácidos 135 y 215 encontrados en tumores destruyen la activación transcripcional (21,28). Estos resultados implican que p53 puede activar la expresión de genes que suprimen la proliferación celular. Se han identificado algunos blancos celulares candidatos que pueden inhibir el crecimiento celular y que son regulados por p53 (26). Algunos de estos genes pueden ser secuencias características de células inactivas (22).

El primer gen de mamífero que mostró regulación por p53 fue el gen de la creatina cinasa específica de músculo (MCK). La forma en que p53 regula la transcripción es variada en muchos diferentes genes celulares. El gen MCK es regulado positivamente por la unión directa al elemento de respuesta de p53 en la región promotora del gen MCK. La p53 mutante derivada de tumores no se une al elemento de respuesta ni es capaz de actuar a nivel de transcripción. Cuando

hubo coexpresión de p53 mutante y silvestre en la célula transfectada, hubo un efecto activo dominante negativo en la activación transcripcional por la p53 mutante que aparentemente se relaciona con la inhabilidad de los hetero-oligómeros mezclados de mutante y silvestre de unirse al DNA. Muy recientemente se ha descubierto la capacidad de p53 de regular positivamente al gen GADD45 de respuesta a daño de DNA y actualmente se está investigando a fondo su mecanismo (20). Existe un gen que ha sido descrito recientemente, WAF1/Cipl, que es regulado positivamente por p53, y su producto proteico detiene a las células a la mitad del ciclo celular mediante una inhibición de las cinasas dependientes de ciclinas en la fase G1 (22,27).

Por otro lado, se ha demostrado que los genes tardíos de la fase G1 del ciclo celular B-myb (proto-oncogén) y DNA polimerasa alfa son reprimidos; aunque no está claro si p53 ejerce un efecto represor directo sobre la síntesis de mRNA o un efecto indirecto debido a su bloqueo del ciclo celular. Se ha mostrado también que p53 silvestre puede regular negativamente una amplia variedad de promotores celulares y virales, incluyendo a los de c-fos, beta actina, c-jun, IL-6, hsc70, Rb, MDR (gen de resistencia multidrogas), el virus de sarcoma de Rous, HIV, HSV-1, SV40, y a citomegalovirus. No está claro si p53 reprime a los genes de la misma manera en que los activa, uniéndose a una secuencia de DNA específica (20).

Las mutaciones sin sentido de p53 también pueden alterar indirectamente la unión a DNA específica de secuencia y la actividad de factor de transcripción de p53 (22,23).

Existe evidencia de que además de su actividad regulatoria transcripcional, p53 también puede tener la capacidad de afectar la replicación de DNA en algunas situaciones. Se ha sugerido recientemente que p53 puede interactuar directamente con componentes del aparato celular de replicación de DNA. Sin embargo, se requiere más investigación para decidir si p53 afecta la habilidad de las células para dividirse por su interacción con la replicación de DNA (20).

Un mecanismo de acción de la proteína mutante cuya conformación se encuentra alterada puede ser el convertir la p53 silvestre coexistente en mutante y prevenir su actividad como supresor de crecimiento, cuando en la célula existe un alelo mutante y un alelo silvestre. La habilidad de la p53 mutante de actuar como promotor de crecimiento, sugiere que puede ser capaz de actuar sobre un grupo diferente de blancos celulares, al igual que lo hace p53 silvestre para afectar al crecimiento celular (20).

Se ha demostrado que p53 no es esencial para la división celular, la diferenciación celular o para el desarrollo embrionario normal; ya que se observó que ratones deficientes de p53 son capaces de desarrollarse normalmente. Sin embargo, estos ratones tienen una

susceptibilidad aumentada a desarrollar tumores de muchos tipos, lo que sugiere que p53 juega un papel protector global que previene a la célula de progresión tumoral (20).

Se ha observado que células que son tratadas con luz ultravioleta o con fármacos que mimetizan la acción de la luz UV, hay un incremento rápido en los niveles de la proteína p53 dado en gran parte por una estabilidad aumentada de la proteína. Se observaron aumentos similares en respuesta a reactivos que dañan al DNA como irradiación gamma y actinomicina D. La exposición a los agentes que dañan el DNA causa una detención temporal en la fase G1 del ciclo celular en células con p53 silvestre pero no en células con la p53 mutante. Lo anterior sugiere entonces un papel para p53 en el control del ciclo celular después de un daño en el DNA. Se han llevado a cabo modelos en los que p53 actúa como un especie de guardián molecular para la integridad genómica (Fig. 1). Si el DNA es dañado, p53 se induce, estabiliza o activa y detiene el ciclo celular hasta que el daño es reparado antes de dividirse, previniendo una replicación de DNA dañado. Si el daño no puede ser reparado, p53 puede iniciar la muerte celular programada (apoptosis)(28). De este modo, en ausencia de la función monitora de p53, se pueden acumular mutaciones y re-arreglos cromosómicos que conducen a más alteraciones en oncogénos y genes supresores tumorales y a progresión maligna. Se ha sugerido entonces que la pérdida de p53 contribuye al rompimiento cromosómico y a la inestabilidad genómica, ya que la pérdida resulta en un fracaso en

la detención del ciclo celular en condiciones de crecimiento subóptimas para poder mantener la integridad cromosómica (19-22).

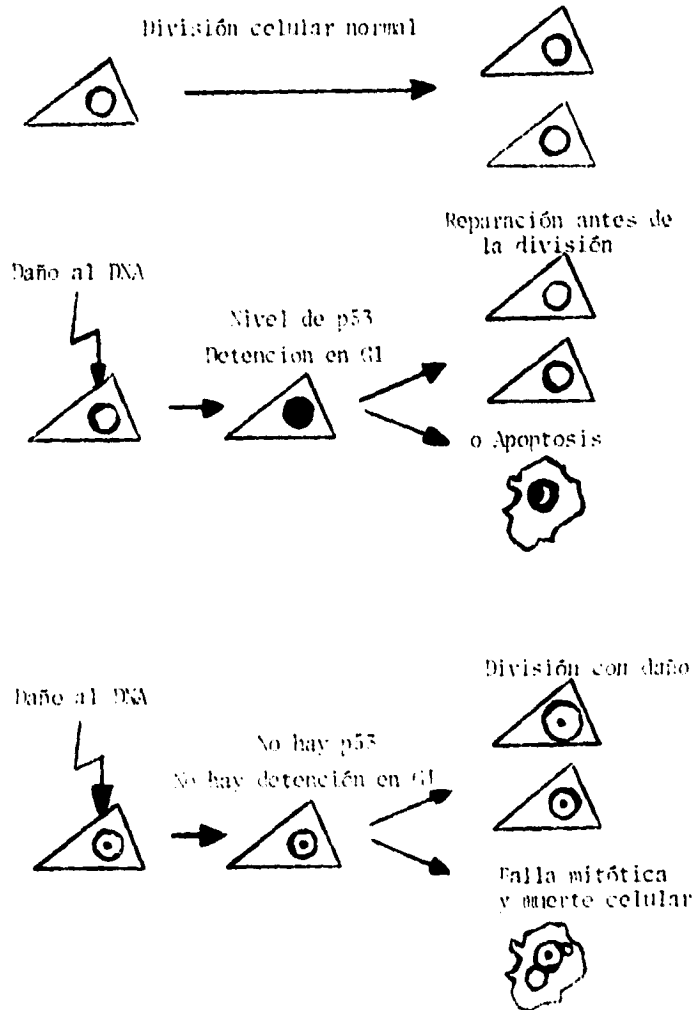


FIGURA NO. 1

Tomada de Lane D.P., 1992 (25)

Los puntos de control del ciclo celular contribuyen aparentemente a incrementar la sobrevivencia celular y a disminuir cambios genéticos hereditarios anormales después de la exposición a agentes que dañan el DNA. Se ha demostrado una relación muy cercana entre la expresión de la proteína p53 silvestre y la detención del ciclo celular en la fase G1 tras un daño genético (48,51). Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Kuerbitz y cols (48) se estableció la correlación entre la presencia del gen p53 silvestre y la detención en G1 del ciclo celular. Células carentes de genes p53 endógenos que fueron transfectadas con genes p53 tipo silvestre, adquirieron la capacidad de detenerse en la fase G1 después de ser irradiadas, y células con genes p53 silvestres endógenos que fueron transfectadas con genes p53 mutantes perdieron esta capacidad (48-50).

Se ha demostrado en estudios *in vivo* la inducción de la expresión de p53 por radiación UV, proporcionando datos que apoyan un papel para p53 en la detección o respuesta a estrés celular genotóxico (49).

A últimas fechas, la proteína p53 ha sido detectada mediante técnicas inmunohistoquímicas que emplean anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen secuencias de la proteína tanto silvestre como mutada en la mayoría de los casos. Sin embargo, los niveles de la proteína p53 silvestre no son detectables por inmunohistoquímica ya que tiene una vida media muy corta; por otro

lado, la proteína mutante es más estable por lo que tiene una vida media mucho mayor y se acumula en el núcleo de las células lo que hace que sus niveles sean detectables por estas técnicas. La especificidad de la inmunotinción de p53 en citopatología diagnóstica es muy alta. Aunque en algunos casos la sensibilidad se ha encontrado baja, se ha observado una especificidad del 100% (28).

Algunos investigadores han encontrado que la acumulación de p53 tiene un valor pronóstico negativo estadísticamente significativo en cáncer de pulmón (30); aunque en otros estudios se ha encontrado importancia considerable en la iniciación de tumores por p53 pero la falta de correlaciones positivas entre la presencia de p53 mutada y la sobrevida de los pacientes sugiere que p53 es de poca significancia una vez que el tumor se ha desarrollado (31).

En cáncer de mama, en estudios realizados por Thor y cols. por inmunohistoquímica, se ha observado que la acumulación es un marcador independiente de la disminución del nivel de sobrevida. También se han encontrado resultados que sugieren una correlación entre la acumulación de la proteína p53 y mutación en el gen p53 (33,34). Sin embargo, Ostrowsky y cols. obtuvieron resultados que no indican correlación con valor clínico (32). Isola y cols. entre otros sugieren que la expresión de la proteína p53 puede ser un marcador de carcinomas de mama más agresivos (32,35,37).

La expresión de p53 aumentada parece estar asociada a grados mayores de displasia en adenomas de colon y con degeneración maligna del epitelio del intestino grueso (38). Se ha encontrado una asociación con la aparición de comportamiento infiltrativo pero no con el grado de progresión tumoral (39). Se ha observado además, una mayor sobre expresión en carcinomas que en adenomas. En tumores colorrectales, Scott, Sagar y cols. no encontraron correlación entre la sobre expresión de p53 y el grado de diferenciación del tumor, estadio de Dukes, o sobrevida del paciente (40); aunque en otros estudios realizados por Remvikos y cols. y Starzynska y cols. entre otros, se ha encontrado que un contenido aumentado de la proteína p53, determinado por inmunohistoquímica, en estos tumores correlaciona con una sobrevida disminuida (41-46).

APOPTOSIS.

Durante el desarrollo celular, un gran número de células mueren por un proceso no patológico al que se conoce como muerte celular programada. Los datos en un estudio llevado a cabo por Schwartz y cols. sugieren que existe más de un mecanismo de muerte celular empleado durante el desarrollo, pero el más conocido y mejor descrito es la apoptosis (53).

La muerte celular por apoptosis es el mediador de varios procesos fisiológicos y patológicos importantes y aparentemente está

intrínsecamente programada. En la apoptosis, hay activación selectiva de una endonucleasa endógena que parece ser la responsable del rompimiento extenso de la cromatina además de los cambios morfológicos nucleares mayores (43). Los posibles mecanismos de señalización intracelulares de iniciación de apoptosis incluyen la entrada de iones calcio y la expresión alterada de oncogénes como c-fos y c-myc (52,54).

La apoptosis se define como una forma de muerte celular programada que complementa la proliferación celular en la homeostasis de tejido normal.

La apoptosis involucra una condensación rápida de la célula con la formación de cuerpos apoptóticos envueltos por una membrana que contienen organelos bien preservados, que son fagocitados y digeridos por células residentes cercanas. No hay inflamación asociada.

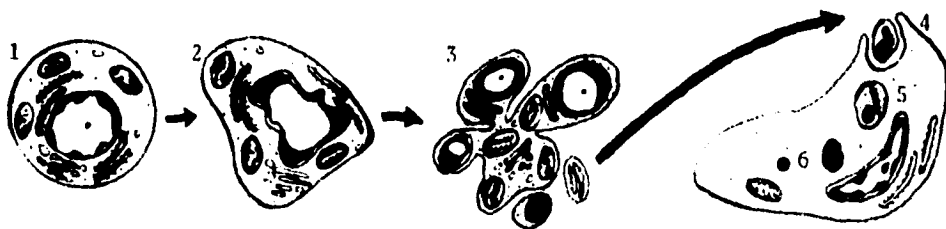


Figura No. 2

Tomada de Kerr, J.F. y cols, 1994 (61)

En la figura 2, se observa la secuencia de cambios ultraestructurales que sufren las células en la apoptosis. En el paso 1 se observa una célula normal. La apoptosis temprana 2 se caracteriza por una compactación y marginación de cromatina nuclear, condensación del citoplasma, y una deformación nuclear y del contorno celular. En una etapa más avanzada 3, el núcleo se fragmenta y protuberancias que se formaron en la superficie celular se separan para producir cuerpos apoptóticos, que 4 son fagocitados por células cercanas y en los pasos 5 y 6 son degradados dentro de los lisosomas.

Hay un rompimiento de la doble hélice en las regiones eslabón entre nucleosomas, conduciendo a la formación de fragmentos que son múltiples de unidades que contienen 180-200 pares de bases. Estos fragmentos son detectados por electroforesis en gel de agarosa donde se evidencia una escalera característica de DNA.



Figura No. 3

Tomada de Kerr, J.F. y cols, 1991 (63)

En la figura no. 3 se muestra una electroforesis en gel de agarosa de DNA extraído de cultivos de células P-815 murinas, teñido con bromuro de etidio; fotografiado bajo iluminación UV. En la línea 1 se muestran los marcadores de masa molecular; en la 2 se muestra el control (DNA no degradado); en la 3 se colocó el DNA de un cultivo que muestra apoptosis morfológicamente típica donde se observa claramente la escalera de DNA; en la 4 se puso el DNA de un cultivo que muestra necrosis masiva y se observa un barrido de DNA.

Se ha propuesto que el rompimiento de DNA nuclear en una etapa temprana del proceso apoptótico puede servir como una función protectora en prevenir la transferencia de material genético en un estado potencialmente activo (transcripcionalmente) de las células que se están muriendo a los núcleos de las células vecinas cuando los cuerpos apoptóticos son fagocitados (52).

La apoptosis ocurre espontáneamente en tumores malignos, afecta característicamente a células dispersas y no a grupos de células colindantes, y está incrementada en tumores que están respondiendo a radiación, quimioterapia citotóxica, calentamiento y tratamiento hormonal.

Mucho del interés actual del proceso de apoptosis nace del descubrimiento de que puede ser regulado por ciertos proto-oncogénos y por el supresor tumoral p53. En algunas situaciones se ha visto involucrada la expresión de c-myc en la iniciación de la

apoptosis, y el bcl-2 ha surgido como un nuevo tipo de proto-oncogén que inhibe la apoptosis en lugar de estimular la mitosis.

APOPTOSIS INDUCIDA POR P53.

La apoptosis puede ser iniciada por varios agentes y puede ser un resultado de la expresión del gen oncosupresor p53. Los resultados de estudios llevados a cabo en timocitos por Clarke y cols. han demostrado que p53 ejerce un efecto significativo y dependiente de la dosis de los agentes que dañan al DNA en la iniciación de apoptosis, pero solamente cuando es inducida por agentes que causan el rompimiento de las hebras de DNA (55).

En líneas celulares derivadas de tumores p53 negativos transfectadas con p53 silvestre, la inducción del gen ha causado apoptosis extensa, en lugar de una detención del crecimiento.

Las células mutadas en p53 pueden estar caracterizadas por una ventaja de sobrevivencia, ya que son resistentes a quimio y radioterapia, lo que les permite acumular más cambios genéticos (56).

Evidencia convincente se ha proporcionado que involucra al gen p53 en la inducción de apoptosis por radiación. Timocitos que carecen de p53 son resistentes a los efectos letales de la radiación pero

adquieren su propensión normal a sufrir apoptosis después de tratamiento con glucocorticoides.

Una variedad de fármacos anticancerígenos han mostrado que inducen apoptosis extensa en poblaciones celulares normales que están proliferando rápidamente, tejidos linfoides y en tumores. Así, la apoptosis aumentada es responsable de muchos de los efectos adversos que provoca la quimioterapia (por afectar células normales) y de la regresión tumoral (61).

Se han obtenido resultados de estudios *in vivo* que proporcionan evidencia de que la apoptosis dependiente de p53 que ocurre en respuesta a eventos oncogénicos es un regulador crítico de tumorigénesis (58).

La respuesta terapéutica de tumores definidos genéticamente que expresan o que están desprovistos del gen supresor tumoral p53, fue comparada en ratones inmunocomprometidos. Los tumores que expresaban el gen p53 tuvieron una proporción elevada de células apoptóticas y presentaron una regresión típica después del tratamiento con radiación gamma o con adriamicina. En contraste, tumores deficientes de p53 tratados con el mismo régimen continuaron creciendo y tuvieron pocas células apoptóticas. Mutaciones adquiridas en p53 han sido asociadas tanto con resistencia al tratamiento como recurrencia en tumores que expresaban p53. Estos resultados, establecen que defectos en la

apoptosis, causados por la inactivación de p53, pueden producir tumores resistentes al tratamiento y sugieren que la condición de p53 puede ser un determinante importante en la respuesta del tumor a la terapia (59).

En otro trabajo *in vitro* realizado por Fujiwara y cols., el gen silvestre de p53 se transfectó a cultivos celulares de cáncer de pulmón que tenían una delección homocigótica de p53, y se demostró que se aumentó marcadamente la sensibilidad celular de estas células al cisplatino. Las células tratadas sufrieron apoptosis con fragmentación específica del DNA. Se implantaron tumores de la misma línea celular a ratones nulos (no presentan el gen p53) que habían sido inyectados directamente con adenovirus-p53, seguido de administración de cisplatino, induciéndose destrucción apoptótica masiva de los tumores (60).

Se ha propuesto que p53 es un switch genético que activa genes mediadores de la apoptosis. Aunque los resultados que se han obtenido indican que probablemente p53 reprime los genes necesarios para la sobrevivencia celular o es un componente de la maquinaria enzimática para el rompimiento apoptótico o reparación del DNA. En un estudio, Caelles y Heimberg probaron si la apoptosis mediada por p53 es dependiente de la transcripción de genes blanco de p53 y la síntesis de nuevas proteínas, pero se encontró que cuando se agregaba un inhibidor de la transcripción como actinomycin D o un inhibidor de la síntesis de proteínas como cicloheximida, la

apoptosis se seguía llevando a cabo; lo que indica que la inducción y mantenimiento del programa apoptótico depende de la actividad de p53 y no de la síntesis de RNA o proteínas nuevas (57).

Tomando como base las características de p53 en la apoptosis de la célula y con base en los estudios de transfección en líneas celulares; y dado que existe controversia en los datos de la literatura en relación a la expresión de p53 y el pronóstico de los pacientes (40-46). Nosotros nos planteamos la posibilidad de investigar si existe una correlación entre la expresión de la proteína p53 y la respuesta que tuvieron los pacientes con cáncer colorrectal al tratamiento pre-operatorio con radioterapia y quimioterapia.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL.

MATERIAL Y EQUIPO.

Microtomo

Microscopio de luz

Estufa

Cámara de humedad

Micropipetas de 5 μ l a 500 μ l

Cajas de tinción

Vasos de Coplin

Rejillas para laminillas

Vasos de precipitados

Embudos de vidrio

Probetas

Matraces

Porta y Cubreobjetos

REACTIVOS.

Anticuerpo primario: anti-p53 monoclonal de ratón clona PAb1801

(Biogenex)

Dilución 1:40

1 μ l Anticuerpo concentrado

39 μ l PBS

Anticuerpo secundario biotinilado de caballo (Oncogene Science)

50 μ l Anticuerpo concentrado

1 ml PBS

Suero bloqueador (Oncogene Science)

50 μ l Suero concentrado

1 ml PBS

Reactivos Complejo Avidina Biotina (ABC) (Oncogene Science)

50 μ l Reactivo A

1 ml PBS

Mezclar bien

50 μ l Reactivo B

Dejar reposando 30 min antes de utilizarse

Solución de Poli-L-Lisina (1:10)

10 ml solución de Poli-L-Lisina 0.1% p/v (Sigma)

90 ml agua destilada

Filtrar

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

8.0 g Cloruro de Sodio

1.3 g Fosfato de Sodio dibasico

4.0 g Fosfato de Sodio monobasico

1.0 L Agua Destilada

Ajustar el pH a 7.4

Filtrar

Solución Bloqueadora de Peroxidasas No. 1

20 ml Peróxido de Hidrógeno 30%

80 ml Metanol

Solución Bloqueadora de Peroxidasas No. 2

20 ml Peróxido de Hidrógeno 30%

80 ml PBS

Solución Recuperadora de Antígenos

10 ml "Antigen Retrieval" (Biogenex)

30 ml Agua Destilada

Xilol

Alcohol Absoluto

Alcohol 96°

Alcohol al 70%

Solución Cromógena de Diaminobencidina (DAB) al 0.01%

0.1 mg Tetraclorhidrato de Diaminobencidina (Sigma)

1.0 ml PBS

20 μ l Peróxido de Hidrógeno 0.3%

Hematoxilina de Harris (Sigma)

Filtrar antes de utilizar

Solución de Carbonato de Litio

Poner en el fondo de una caja de tinción una cama delgada de Carbonato de Litio y llenarla de agua destilada.

Resina Sintética (Sigma)

PREPARACION DE LAS LAMINILLAS.

1. Se lavan muy bien los portaobjetos con jabón y agua.
2. Se enjuagan con alcohol para desengrasarlos.

3. Se secan perfectamente individualmente con gasa.
4. Se coloca la solución de poli-L-lisina en una caja de tinción.
5. Se ponen todas los portaobjetos en rejillas.
6. Se mete la rejilla en la solución de poli-L-lisina durante 5 minutos.
7. Se secan en la estufa a 57°C durante una hora.
8. Se dejan toda la noche fuera, a temperatura ambiente.
9. Se guardan todas las laminillas en las cajas originales.
10. Se corta con el microtomo secciones del bloque de parafina de 3 a 4 μm de espesor.
11. Se adhiere una sección de tejido por laminilla que previamente ha sido identificada.
12. Se dejan escurrir y secar perfectamente las laminillas.
13. Se desparafinan los tejidos adheridos a las laminillas en la estufa a 57°C durante una hora.

En este momento, las laminillas están listas para que se realice la inmunohistoquímica.

TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA POR EL COMPLEJO AVIDINA BIOTINA (ABC).

1. Pasar las laminillas por el tren de rehidratación:

Xilol 5 minutos, 2 veces

Alcohol absoluto 2 minutos, 2 veces

Alcohol 96° 2 minutos, 2 veces.

IMPORTANTE: A partir de este momento nunca dejar secar el tejido

2. Colocar las laminillas en un vaso de Coplin con agua destilada, enjuagandolas.
3. Inactivar las peroxidasas endógenas colocando las laminillas en la solución bloqueadora de peroxidasas No. 1, durante 20 min.
4. Poner en una solución de alcohol al 70% durante 2 minutos.
5. Lavar las laminillas con PBS durante 5 minutos, 3 veces.
6. Recuperar antígenos poniendo las laminillas en una solución recuperadora de antígenos "Antigen Retrieval" que previamente fue calentada a ebullición, durante 5 minutos y cambiarla por otra solución fresca que haya sido llevada a ebullición recientemente y dejarla nuevamente durante 5 minutos.
7. Lavar las laminillas con PBS durante 5 minutos, 3 veces.
8. Secar cada laminilla con gasa, procurando no tocar el tejido y colocar aproximadamente 100 μ l de suero normal sobre el tejido. Colocar las laminillas en la cámara húmeda e incubar durante 20 minutos.
9. Escurrir el suero normal de cada laminilla en un vaso de precipitados pequeño, colocar sobre el tejido aproximadamente 100 μ l del anticuerpo primario, colocarlas en la cámara húmeda e incubar toda la noche.
10. Escurrir el anticuerpo primario de cada laminilla en el mismo vaso de pp y meter a lavar las laminillas con PBS durante 5 min 3 veces.
11. Inactivar nuevamente las peroxidasas endógenas colocando las laminillas en la solución bloqueadora de peroxidasas No. 2, incubar durante 30 minutos.

12. Lavar las laminillas con PBS durante 5 minutos, 3 veces.
13. Secar cada laminilla y colocar sobre el tejido aproximadamente 100 μ l de anticuerpo biotinilado, colocarlas en la cámara húmeda e incubar durante 35 minutos.
14. Escurrir el anticuerpo biotinilado en el vaso de precipitados y lavar las laminillas con PBS durante 5 minutos, 3 veces.
15. Secar cada laminilla y colocar sobre el tejido aproximadamente 100 μ l del complejo avidina biotina (ABC), colocarlas en la cámara húmeda e incubar durante 1 hora.
16. Escurrir el ABC en el vaso de precipitados y lavar las laminillas con PBS durante 5 minutos, 3 veces.
17. Secar cada laminilla y colocar sobre el tejido aproximadamente 100 μ l de la solución cromógena, colocarlas en la cámara húmeda e incubar durante 5-7 minutos.
18. Meter cada laminilla a un vaso con agua, enjuagando e inactivando la DAB.
19. Colocar las laminillas en una rejilla y colocarlas en agua. Lavar con agua durante aproximadamente 10 minutos, cambiándola varias veces para que no queden restos de DAB.
20. Contrastar, metiendo la rejilla en una caja de tinción con Hematoxilina de Harris, durante 30 segundos.
21. Enjuagar muy bien con agua corriente, hasta que no salga el agua rosada y luego lavar durante 5 minutos.
22. Colocar y sacar la rejilla 3 veces rápidas en una solución de Carbonato de Litio.
23. Enjuagar las laminillas en agua durante aproximadamente 5 min.

24. Pasar la rejilla por el tren de deshidratación:

Alcohol 96° 2 minutos, 2 veces

Alcohol absoluto 2 minutos, 2 veces

Xilol 5 minutos, 2 veces.

25. Montar las laminillas con resina sintética e identificarlas correctamente.

26. Secar las laminillas a la estufa a 56°C durante aproximadamente 10 minutos.

27. Observar al microscopio de luz.

VALORACION DE LA TINCION DE P53.

Para valorar las laminillas, se observaron con un aumento de 400 veces al microscopio de luz y se contaron los núcleos tenidos de las glándulas presentes en el tejido (36).

De acuerdo con el número de núcleos tenidos en el tejido de cada laminilla, se les asignaron los siguientes valores:

(-) Ningún núcleo positivo en células neoplásicas.

(+) 25% o menos, positividad nuclear en células neoplásicas.

(++) Entre 25 y 50% positividad nuclear en células neoplásicas

(+++) Entre 50 y 75% positividad nuclear en células neoplásicas

(++++) Más del 75% positividad nuclear en células neoplásicas.

TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Para analizar los resultados estadísticamente, se utilizó el paquete computacional de estadística PAQUEST, desarrollado en la Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría, SS, México, DF.

Con el objeto de llevar a cabo el análisis de la correlación entre la expresión de la proteína p53 en los tumores con la respuesta de los pacientes al tratamiento con radio y quimioterapia, se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney (62).

Para correlacionar entre la expresión de la proteína p53 mutada con los datos clínicos, se tomaron en cuenta parámetros tales como grado de diferenciación, localización, estadio de Dukes, estado actual del paciente, sexo y edad, se empleo la prueba estadística Chi cuadrada de Pearson para una muestra (36,37).

RESULTADOS.

El presente trabajo es un estudio retrospectivo, para el cual se seleccionó una muestra de 26 pacientes con cáncer de recto que recibieron tratamiento de radio y quimioterapia preoperatoria.

La población de tumores que recolectamos fue bastante homogénea ya que todos fueron adenocarcinomas de recto que en su mayoría fueron moderadamente diferenciados. La localización de los tumores fue preferentemente en el tercio medio o tercio inferior del recto. En cuanto al estadio de Dukes, obtuvimos 7 tumores etapa B1, 4 etapa B2, 2 etapa B3, 5 etapa C2, 2 etapa C3 y únicamente un tumor etapa D. De aquí podemos observar que fue un grupo heterogéneo en cuanto al estadio de Dukes pero esto refleja la condición en que llega la mayoría de los pacientes al hospital y no es posible adquirir una muestra más homogénea ya que el número de pacientes que se han tratado no es tan grande. En cuanto al sexo, no existe una diferencia significativa, ya que aproximadamente el 50% de los tumores provinieron de individuos femeninos y la otra mitad de masculinos. La edad promedio de los pacientes fue de 52 años y la mayoría de los pacientes no ha presentado recurrencia aunque hubieron 6 casos que presentaron metástasis y un paciente que murió.

El estudio se llevo a cabo con tejidos embebidos en bloques de parafina. Se seleccionaron los bloques representativos del tumor tanto de la biopsia como de la pieza quirúrgica con base a la morfología del tejido mediante la observación de las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina (HYE).

Habiendo seleccionado los bloques para cada caso, se procedió a cortar los tejidos con microtomo, obteniendo secciones de 3-4 um de espesor que se adhirieron a las laminillas previamente identificadas con el número de caso y preparadas con poli-L-lisina.

La detección de p53 se llevó a cabo utilizando la técnica inmunohistoquímica del complejo Avidina Biotina (ABC), para lo cual fue necesario montar la técnica para poder establecer las condiciones óptimas de trabajo para la detección de la proteína p53. Para la estandarización de la técnica se empleó un tejido proveniente de una biopsia de un adenocarcinoma de colon que se conocía sobre-expresaba p53.

Se intentó determinar la concentración óptima para el anticuerpo anti-P53, que se iba a emplear perteneciente a la clona 1801 de Oncogene Science, para lo cual se probaron una serie de diluciones y se observó una precipitación que dió una tinción inespecífica. Por lo anterior, se decidió cambiar de anticuerpo y empleamos el anti-p53 clona 1801 de Biogenex. Con este último anticuerpo se estableció que la dilución óptima fue de 1:40, incubando toda la

noche a temperatura ambiente en la cámara húmeda.

Debido a que los tejidos tumorales no siempre se encuentran en condiciones óptimas porque han sido fijados en una solución de formol durante más de 24 horas, previo a su almacenamiento en forma de bloques de parafina, es necesario desenmascarar los antígenos. Esto se lleva a cabo tratando los tejidos enzimáticamente con una solución de tripsina, sin embargo con este tratamiento no obtuvimos resultados favorables ya que por ser p53 un antígeno nuclear es muy difícil desenmascararlo. Como se ha reportado en la literatura, hay soluciones como el "Antigen Retrieval" que se utilizan para desenmascarar antígenos en tejidos que no fueron fijados en condiciones óptimas (47). Probamos entonces con la solución "Antigen Retrieval" de Biogenex con una dilución 1:4 calentándola a ebullición y manteniendo las laminillas en ésta solución 2 veces de 5 minutos cada una. Con este tratamiento, obtuvimos una tinción de p53 muy específica sin tinción de fondo. Por lo anterior, decidimos utilizar este tratamiento para las muestras problema.

El tejido utilizado anteriormente fue el mismo que se empleó como control positivo en el procesamiento de las muestras problema.

Las laminillas con el tejido montado se dividieron en grupos de diez y se trabajaron junto con un testigo positivo y con un testigo negativo (al que no se le hizo reaccionar con el anticuerpo primario sino con PBS).

Con el objeto de llevar a cabo el trabajo de la manera más objetiva, se realizó la inmunohistoquímica a "ciegas", ya que no se conocían previamente los datos clínicos de los pacientes ni la respuesta que habían tenido al tratamiento pre-operatorio.

En el desarrollo de la técnica existen varios pasos críticos que es necesario observar y llevar a cabo muy cuidadosamente ya que influyen mucho en la apariencia limpia de la tinción y en la especificidad de la misma.

Se realizan dos pasos en los que se inactivan las peroxidasas endógenas que se encuentran en niveles muy altos en algunas de las células como eritrocitos y que podrían reaccionar con el sustrato dando una tinción totalmente inespecífica.

Durante todo el procedimiento son muy importantes los lavados con PBS para que la preparación quede limpia y que al observarla no haya objetos que puedan confundirse con núcleos teñidos positivamente.

Es importante que al dar el tratamiento con el "Antigen Retrieval", se filtre la solución previamente para evitar la presencia de partículas en la solución, especialmente si ésta se reutiliza.

Los tiempos de incubación también son muy importantes ya que deben ser los óptimos para que se lleve a cabo la reacción por completo.

Con el objeto de bloquear todos los sitios que pudieran unirse al anticuerpo primario que no fueran específicos y que pudieran contribuir a dar una tinción inespecífica, es necesario tratar el tejido con suero normal, el cual se coloca sobre el tejido antes del anticuerpo primario.

El anticuerpo primario que se utilizó, clona 1801, es un monoclonal contra p53 y reconoce un determinante de p53 estable a la desnaturalización en tejido fijado en formol embebido en parafina. Reacciona con un epítipo localizado cerca del amino terminal de todas las formas conocidas de p53.

El anticuerpo secundario que es el biotinilado sirve como un enlace entre el anticuerpo primario y el complejo avidina-biotina (ABC), aumentando de este modo la especificidad y sensibilidad del método.

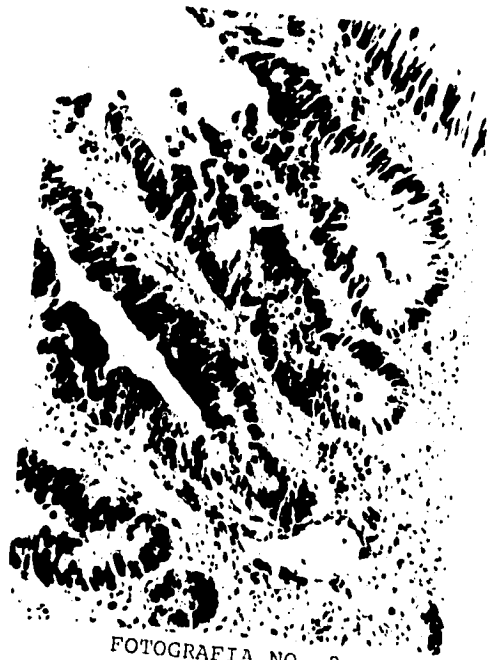
El ABC se hace reaccionar al final, se une al anticuerpo biotinilado y es el que lleva unida la enzima que va a actuar sobre el sustrato y el cromógeno (diaminobencidina (DAB)) para revelar la reacción. Esta debe ser monitoreada para evitar tinción de fondo.

Por último, se contrastan y se aclaran las preparaciones con hematoxilina de Harris para poder observar bien definidos los núcleos y el citoplasma de las células.

En la figura 4, se observan muestras de algunos de los tejidos tratados por inmunohistoquímica. En la fotografía 1 se muestra un tejido que presentó una tinción positiva para p53 que fue valorada con muy alta tinción (++++), ya que se observan más del 75% de los núcleos neoplásicos positivos. Esta se observó con un aumento de 40X. En la fotografía no. 2 se observa la misma preparación que la anterior, con un aumento de 400X. En la cuál podemos ver claramente la mayoría de los núcleos teñidos con la diaminobencidina. En la fotografía 3 se muestra un tejido observado a una amplificación de 160 veces, que mostró muy pocas glándulas neoplásicas; aquí podemos distinguir glándulas normales que no presentan tinción para p53, a diferencia de las glándulas neoplásicas que son claramente positivas y en las cuales se observan muchos núcleos teñidos. Por último, en la fotografía no. 4 se observa un tejido en el que se obtuvo una tinción débil y se valoró con (++) ya que presentó entre 25 y 50% de núcleos de células neoplásicas positivas para p53; ésta preparación se observó con un aumento de 400X.



FOTOGRAFIA NO. 1



FOTOGRAFIA NO. 2



FOTOGRAFIA NO. 3



FOTOGRAFIA NO. 4

Figura No. 4

Después de observar las preparaciones al microscopio de luz, se valoró cada laminilla, de acuerdo a los siguientes criterios:

Tinción	Porcentaje de núcleos teñidos en células neoplásicas
Negativa (-)	0%
Muy débil (+)	25% o menos
Débil (++)	Entre 25 y 50%
Mediana (+++)	Entre 50 y 75%
Intensa (++++)	Más del 75%

En la tabla no. 1, se presentan los resultados de la valoración obtenida de las biopsias, piezas quirúrgicas y además se analizaron en algunos casos, ganglios que presentaban metástasis y donde p53 se expresó al igual que en la pieza quirúrgica.

Obtenidos los resultados de la inmunohistoquímica se procedió a recolectar los datos clínicos de los pacientes como son edad, sexo, grado de diferenciación, localización del tumor, tratamiento quirúrgico que se aplicó al paciente, estadio de Dukes de la pieza quirúrgica, recurrencia y muerte del paciente, así como tumor residual después del tratamiento con quimio y radioterapia preoperatorios. Los datos que se obtuvieron se presentan en la tabla no. 2.

TABLA 1

**RESULTADOS DE LA DETECCION DE P53 POR
INMUNOHISTOQUIMICA EN TUMORES RECTALES
DE PACIENTES TRATADOS CON RT Y QT.**

NO. PACIENTE	EXPRESION	DE	P53
	BIOPSIA	QUIRURGICO	GANGLIO MET.
1	NEG	NEG	N/P
2	NEG	NEG	N/P
3	+ DEBIL	NO NEOPLASIA	N/P
4	N/B	++++	N/P
5	++	+++	N/P
6	NEG	NEG	N/P
7	+ DEBIL	NEG	N/P
8	N/B	NEG	N/P
9	N/B	+ FOCAL	N/P
10	++	++	N/P
11	N/B	+	N/P
12	N/B	+++	N/P
13	NEG	NEG	NEG
14	++++	+++	+++
15	N/B	NEG	N/P
16	N/B	NEG	N/P
17	NEG	NEG	N/P
18	N/B	++	N/P
19	NEG	+	N/P
20	NEG	NEG	N/P
21	NEG	N/B	N/P
22	NO NEOPLASIA	NEG	N/P
23	+ DEBIL	NEG	N/P
24	+	++	+ DEBIL
25	+ DEBIL	N/B	N/P
26	N/B	+++	++

NB = NO HAY BLOQUE

NP = NO PRESENTA GANGLIO METASTASICO

**+ = 25% O MENOS DE POSITIVIDAD NUCLEAR EN CELULAS
NEOPLASICAS**

++ = ENTRE 25 Y 50% DE POSITIVIDAD NUCLEAR

+++ = ENTRE 50 Y 75% DE POSITIVIDAD NUCLEAR

++++ = MAS DEL 75% DE POSITIVIDAD NUCLEAR

NEG = 0% DE POSITIVIDAD NUCLEAR

TABLA 2

**DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES
TRATADOS CON RT Y QT PREOPERATORIA**

NO PACIENTE	EDAD	SEXO	GRADO DE DIF DEL ADENOC	LOCALIZACION EN RECTO	CIRUGIA	ESTADIO DE DUMES	RECURRENCIA	MUERTE	TUMOR RESIDUAL
1	52	F	POCO	TERCIO INF	RAP	NEGATIVA	SI	NO	10%
2	61	F	MODERADO	TERCIO INF	RAP	NEGATIVA	NO	NO	0%
3	35	F	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAB	NEGATIVA	NO	NO	0%
4	22	M	BIEN	TERCIO MEDIO	RAB	C2	NO	NO	60%
5	44	M	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAB	B1	NO	NO	10%
6	63	F	POCO	TERCIO MEDIO	EXP	B1	NO	NO	60%
7	62	F	BIEN	TERCIO INF	RAP	B1	NO	NO	25%
8	58	M	MODERADO	TERCIO INF	RAP	B1	NO	NO	15%
9	61	M	MODERADO	TERCIO INF	EXT	B3	NO	NO	42%
10	54	F	MODERADO	TERCIO SUP	RAB	B1	NO	NO	50%
11	53	M	MODERADO	TERCIO INF	RAP	C3	NO	NO	10%
12	65	F	MODERADO	TERCIO INF	RAP	B1	NO	NO	50%
13	60	F	MODERADO	TERCIO MEDIO	EXP	C2	NO	NO	20%
14	55	M	MODERADO	TERCIO INF	RAB	C2	SI	SI	40%
15	18	F	POCO	TERCIO INF	EXP	C3	SI	NO	80%
16	29	F	MODERADO	TERCIO INF	RAB	D	SI	NO	46%
17	54	M	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAP	B2	SI	NO	25%
18	62	F	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAB	C2	NO	NO	90%
19	52	M	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAP	B2	SI	NO	25%
20	53	F	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAB	B1	NO	NO	25%
21	63	M	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAB	NEGATIVO	NO	NO	0%
22	54	M	?	TERCIO INF	RAP	?	NO	NO	?
23	65	M	POCO	TERCIO MEDIO	EXT	B2	NO	NO	75%
24	46	F	MODERADO	TERCIO INF	RAP	B3	NO	NO	75%
25	70	M	MODERADO	TERCIO MEDIO	RAB	B2	SI	NO	>75%
26	47	F	POCO	TERCIO INF	EXP	C2	NO	NO	60%

RAP = Resección abdominoperineal
 EXP = Excenteración posterior
 ? = No se conoce el dato

RAB = Resección anterior baja
 EXT = Excenteración total

Para correlacionar la expresión de la proteína p53 con la respuesta de los pacientes al tratamiento pre-operatorio, se agruparon los datos de la siguiente manera: 1) Tumores que tiñeron positivamente; dentro de este grupo se incluyen los tumores que presentaron desde una tinción positiva muy débil hasta los tumores con una tinción positiva intensa que indica la presencia de la proteína p53 mutada y 2) Tumores que no presentaron tinción y que por lo tanto presentan la proteína normal. Dentro de este grupo de tumores están incluidos aquellos que no expresan la proteína p53, porque no contienen ningún alelo de p53, y que probablemente son los pacientes que no presentaron una disminución muy grande del tamaño del tumor.

En la tabla no. 3 se muestran los datos de los casos que tiñeron positivamente para p53 indicando la presencia de p53 mutada, en correlación al tumor residual de cada paciente después del tratamiento. La disminución promedio de los tumores fue del 49.8%, lo que nos indica un tumor residual promedio del 50.2%.

En la tabla no. 4 se presentan los datos de los casos que no tiñeron y que por lo tanto tienen p53 normal así como los porcentajes de los tumores residuales. Obteniéndose una disminución promedio del tumor del 74.6%, o sea, un tumor residual promedio de 25.4%.

TABLA 3**DETECCION POSITIVA DE P53 (PRESENCIA DE P53 MUTADA)
EN TUMORES DE PACIENTES TRATADOS CON RT Y QT**

NO. DE CASO	P53 DETERMINADO	TUMOR RESIDUAL
5	+++	10%
10	++	50%
12	+++	50%
14	++++	40%
18	++	90%
24	++	75%
26	+++	60%
9	+ FOCAL	42%
11	+	10%
19	+	25%
23	+ DEBIL	75%
25	+ DEBIL	>75%
	PROMEDIO	50.2%

TABLA 4
DETECCION NEGATIVA DE P53 (PRESENCIA DE P53 NORMAL)
EN TUMORES DE PACIENTES TRATADOS CON RT Y QT

NO. DE CASO	P53 DETERMINADO	TUMOR RESIDUAL
1	-	10%
2	-	0%
3	-	0%
6	-	60%
7	-	25%
8	-	15%
13	-	20%
15	-	80%
16	-	45%
17	-	25%
20	-	25%
21	-	0%
PROMEDIO		25.4%

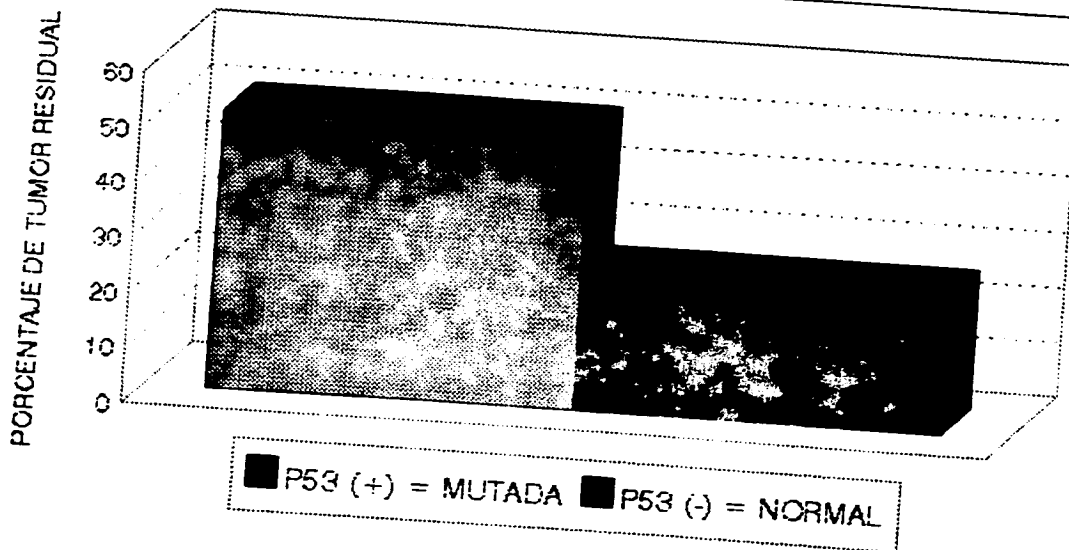
En la gráfica no. 1, se observan los datos de la diferencia que existe entre la presencia de la proteína normal o la mutada y su correlación con el tumor residual.

A estos datos se les aplicó la prueba estadística U de Mann-Whitney (62) para demostrar que la diferencia entre ambos grupos de datos es estadísticamente significativa.

Al aplicar la prueba estadística obtuvimos un valor Z de $U=2.09$ y una $P=0.018$, lo que nos indica que efectivamente la diferencia observada en el tumor residual entre los casos con p53 normal y los casos con p53 mutada es significativa. Lo anterior nos permite concluir entonces que la respuesta al tratamiento pre-operatorio es significativamente mejor en pacientes que presentan la proteína p53 normal que en los pacientes que presentan p53 mutada. Como se mencionó en los antecedentes, en células que presentan p53 normal, el tratamiento induce la sobre-expresión de la proteína y ésta induce apoptosis de las células reduciendo así significativamente el tamaño del tumor. En cambio, en los tumores que presentan la p53 mutada, no es posible que se induzca la apoptosis por el tratamiento ya que p53 mutada no actúa en apoptosis, produciéndose una reducción del tumor mucho menor que cuando existe p53 normal (59,60,61).

GRAFICA NO. 1

CORRELACION DE LA DETECCION DE P53 Y EL PORCENTAJE DE TUMOR RESIDUAL.



Determinada la expresión de p53, se investigó la posible correlación entre la expresión de la proteína p53 y los datos clínicos de los pacientes, tales como: grado de diferenciación celular, estadio Dukes, recurrencia, muerte, sexo, edad y localización. Los datos de la tabla no. 5 muestran la relación entre el número de casos con p53 mutada (detección positiva) y el número de casos con p53 normal (detección negativa) para cada parámetro clínico.

Para saber si existe una diferencia significativa, se realizó la prueba estadística de chi-cuadrada para una muestra (36,37).

De éstos datos podemos concluir, que no existe correlación entre la expresión de la proteína p53 normal o mutada y el grado de diferenciación, localización, estadio de Dukes, recurrencia, muerte de los pacientes, sexo y edad promedio. Lo anterior concuerda con trabajos que han sido realizados previamente en cáncer colorrectal por Purdie y cols en 1992 entre otros (39,40).

Sin embargo, en el caso en el que hubo una diferencia significativa fue en relación al estadio de Dukes 0, que indica ausencia de tumor después del tratamiento (20).

TABLA 5

CORRELACION DE LOS DATOS CLINICOS CON LA EXPRESION DE P53 EN TUMORES RECTALES DE PACIENTES TRATADOS CON RT Y QT.

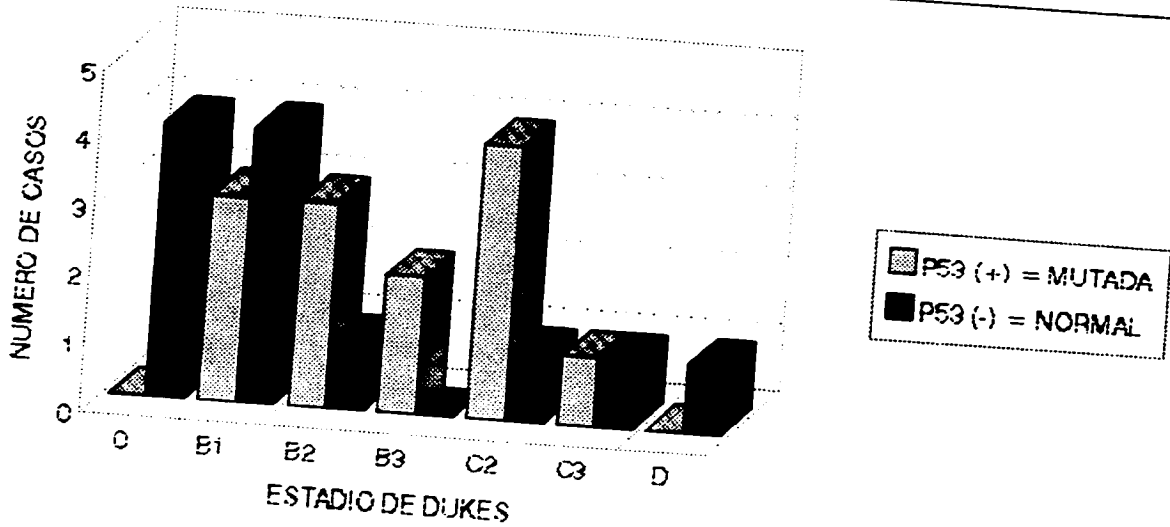
DATOS	CLINICOS	P53 (+) / P53 (-)	X2	P
GRADO DE DIFERENCIACION	POCO	1 / 4	1.8	0.18
	MODERADO	10 / 8	0.22	0.64
	BIEN	1 / 1	0	N.S.
LOCALIZACION	TERCIO SUPERIOR	1 / 0	1	0.32
	TERCIO MEDIO	6 / 7	0.07	0.78
	TERCIO INFERIOR	6 / 6	0	N.S.
ESTADIO DE DUKES	O	0 / 4	4	0.045
	B1	3 / 4	0.14	0.70
	B2	3 / 1	1	0.32
	B3	2 / 0	2	0.16
	C2	4 / 1	1.8	0.18
	C3	1 / 1	0	N.S.
	D	0 / 1	1	0.32
ESTADO ACTUAL	RECURRENCIA	3 / 4	0.14	0.70
	NO RECURRENCIA	10 / 9	0.05	0.82
SEXO	F	5 / 9	1.14	0.28
	M	6 / 4	1.3	0.25
EDAD PROMEDIO	AÑOS	53.5 / 51	0.06	0.81

Por otro lado, se analizaron los datos de la expresión de p53 en relación con el estadio de Dukes de la pieza quirúrgica y se graficaron para poder comparar su correlación, (Gráfica 2). De éstos resultados podemos observar que existe una tendencia en los tumores con p53 normal a ser menos invasivos, que los que presentaron p53 mutada tendiendo éstos a ser más invasivos, como se ha reportado previamente (20).

Es claro de este estudio, que aún cuando se trata de una muestra relativamente pequeña de tumores, existen diferencias significativas entre los tumores que presentan p53 normal o mutada, sin embargo sería deseable poder ampliar este estudio con un número mayor de muestras.

GRAFICA NO. 2

CORRELACION DE LA EXPRESION DE P53 CON EL ESTADIO DE DUKES DEL TUMOR



DISCUSION DE RESULTADOS.

Al buscar una correlación entre la expresión de la proteína p53 y los datos clínicos de los pacientes, no se encontraron diferencias significativas entre los datos obtenidos para p53 mutada y los obtenidos para p53 normal. Lo anterior concuerda con trabajos previos como el realizado por Scott y cols. en los que no se ha encontrado correlación entre la expresión de p53 y el grado del tumor, estadio de Dukes, o sobrevida del paciente (40); aunque contradictoriamente en otros estudios como los realizados por Remvikos y cols (41) se ha encontrado que un contenido aumentado de la proteína p53 determinada por inmunohistoquímica correlaciona con una sobrevida disminuida (41-46).

I) En el grupo de tumores que detectamos la presencia de p53 por inmunohistoquímica, o sea, la existencia de proteína mutada pudimos observar que el tumor residual tuvo un promedio de 50.2%; aunque algunos de los tumores prácticamente no tuvieron regresión como en el caso no.18 en el cual el tumor residual fue del 90%, indicándonos que el paciente presenta una resistencia muy grande a la radio y quimioterapia. Por otro lado, hay casos como el del paciente no.5 en el que hubo un tumor residual del 10% probablemente debido a que el tratamiento indujo apoptosis en el tumor mediante mecanismos independientes a p53 o a que el tumor

sufrió necrosis por el efecto tóxico de los agentes terapéuticos (61).

II) Por otro lado, en el grupo de tumores que no detectamos la proteína p53 por inmunohistoquímica, tenemos dos posibilidades: a) tumores que presentan la proteína p53 normal, y que pudo ser inducida como consecuencia de la quimio y la radioterapia, provocando apoptosis en el tumor y por lo tanto una reducción mayor de los tumores, lo cual se observa en la mayoría de los casos que presentan un tumor residual por debajo del 45%; b) tumores que no presenten la proteína p53 porque esté ausente el gen por pérdida de los dos alelos. En estos casos lo que se esperaría sería que prácticamente no hubiera regresión del tumor o que fuera muy pequeña. Probablemente es el caso de la paciente no. 15, que presentó un tumor residual muy grande. Estos datos concuerdan con los datos clínicos de la paciente ya que se trata de un tumor muy agresivo (etapa Dukes C3), es una paciente muy joven (18 años) que además presenta recurrencia pélvica.

Los resultados expuestos anteriormente nos indican entonces que si existe una correlación entre la expresión de la proteína p53 en el tejido tumoral y la respuesta de los pacientes al tratamiento medida en función de la regresión del tumor, después de aplicada la radio y quimioterapia. Existe entonces una respuesta significativamente mayor ($p=0.018$) al tratamiento en pacientes que presentan la proteína p53 normal que aquellos pacientes que

expresan la proteína mutada.

En la literatura no se han reportado estudios *in vivo*, ni en cáncer colorrectal ni en otros tumores, relacionando los parámetros que se determinaron en este trabajo. Solamente existe un trabajo realizado en carcinoma mamario por Rasbridge y cols (64) en el que se investigaron los efectos de la quimioterapia en relación a la expresión de p53 y la apoptosis. Sin embargo, en este estudio no pudieron correlacionar el índice apoptótico de los tejidos con el patrón de tinción de p53 (64).

Con este trabajo se cumplió el principal objetivo que se propuso y la hipótesis planteada fue correcta. Sería conveniente continuar este trabajo a más largo plazo llevando a cabo este estudio con un número mayor de muestras de tumores de pacientes que hayan sido tratados pre-operatoriamente.

También sería necesario excluir del grupo de tumores que no presentaron tinción, los que no tienen el gen que expresa la proteína por pérdida de ambos alelos.

Lo anterior se puede hacer mediante la extracción de DNA a partir de los tejidos de los bloques de parafina y la amplificación del DNA por PCR (65), seguida de hibridación en "dot blot" (66) o identificación por "Southern blot" (66) del gen p53 con sondas específicas marcadas radioactivamente. De este modo se podría

confirmar la presencia de p53 identificando su gen y afirmar que los tumores que no presentaron tinción para p53 pero que tuvieron un tumor residual muy grande fue porque carecen por completo de la proteína p53.

CONCLUSIONES.

Con la realización del presente trabajo se logró estandarizar una técnica inmunohistoquímica para la detección de p53 en tejido de tumores colorrectales provenientes de bloques de parafina.

Con la muestra de pacientes estudiada pudimos observar una diferencia significativa estadísticamente entre la presencia de la proteína p53 normal y p53 mutada, y la respuesta de los pacientes a la quimioterapia y la radioterapia. Se puede concluir entonces que la presencia de p53 normal en el tejido tumoral lo hace más sensible al tratamiento con agentes químicos y con radiación, provocando una regresión del tumor del doble que cuando está presente la proteína p53 mutada. Lo anterior nos indica que existe una correlación entre la forma en la que se encuentra p53 en el tumor, y la sensibilidad o la resistencia que presente este último a la quimioterapia y a la radioterapia.

También se investigó la correlación entre los resultados que se obtuvieron en la detección de p53 y los diferentes datos clínicos del paciente como son: sexo, edad, recurrencia, muerte, grado de diferenciación celular, localización y estadio Dukes, pero no pudimos obtener ninguna correlación estadísticamente significativa, lo que concuerda con los escasos datos que se han reportado previamente en la literatura por Scott y cols entre otros (40).

BIBLIOGRAFIA.

(1) Muir, C.S.; "Epidemiology, Basic Science, and the Prevention of Cancer: Implications for the future"; Cancer Research; 50; 6441-6448; (1990).

(2) Sporn, M.B.; "Carcinogenesis and Cancer: Different Perspectives on the Same Disease"; Cancer Research; 51; 6215-6218; (1991).

(3) Martin, S.P.; Pike, M.C.; Ross, R.K.; Jones, P.A.; Henderson, B.E.; "Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer"; Cancer Research; 50; 7415-7421; (1990).

(4) Doyle, L.A.; "Overview of Normal and Cancer Cell Biology"; Comprehensive Textbook of Oncology; Chapter 1; Second edition; Williams & Wilkins; USA (1991).

(5) Douglass, H.O.; "Adjuvant Therapy of Colorectal Cancer"; Comprehensive Textbook of Oncology; Chapter 92; Second edition; Williams & Wilkins; USA; (1991)

(6) Bishop, J.M.; "The molecular genetics of Cancer"; Science; Vol. 235; 305-311 (1987).

(7) Carbone, D.P.; "Oncogenes and Tumor Suppressor Genes"; Hospital Practice; 77-85; (1993).

(8) Slamon, D.J.; De Kernion, J.B.; Verma, I.M.; Cline, M.J.; "Expression of Cellular Oncogenes in Human Malignancies"; Science; Vol. 224; 256-262; (1984).

(9) Clement, A.; Campisi, J.; "Cell Cycle Regulation and Growth Control"; Comprehensive Textbook of Oncology; Chapter 2; Second edition; Williams & Wilkins; USA; (1991).

(10) Vogelstein, B.; Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; Kern, S.E.; Preisinger, A.C.; Leppert M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A.M.; Bos, J.L.; "Genetic Alterations during Colorectal-Tumor development"; The New England Journal of Medicine; Vol 319 No. 9; (1988).

(11) Milson, J.W.; "Pathogenesis of Colorectal Cancer"; Surgical Clinics of North America; Vol. 73; No. 1; 1-11; (1993).

(12) Hackford, A.W.; "Biochemical Markers for Colorectal Cancer: Diagnostic and Therapeutic Implications"; Surgical Clinics of North America; Vol. 73; No. 1; 85-102; (1993).

- (13) Needleman, S.W.; "Retroviral & Cellular Oncogenes"; Comprehensive Textbook of Oncology; Chapter 8; Second edition; Williams & Wilkins; USA (1991).
- (14) Herrera,L; Luna,P; Villarreal,J.R; Brown,M; Sorrentino,J; Khalek,Y; "Perspectives in Colorectal Cancer"; Journal of Surgical Oncology. Supplement 2:92-103 (1991).
- (15)Cho, K.R; Vogelstein,B;"Genetic Alterations in the Adenoma-Carcinoma Sequence" Cancer Supplement; Vol 70; No 6; pp 1727-1730; (1992).
- (16) Fearon, E.R; Vogelstein, B; "A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis"; Cell Vol 61; 759-767; (1990).
- (17) Marshall,C.J; "Tumor Suppressor Genes"; Cell; Vol 64; 313-326; (1991).
- (18) Bryant, P.J; "Towards the cellular functions of tumour suppressors"; Trends in Cell Biology; Vol 3; 31-35; (1993).
- (19) Levine, A.J; "The Road to the Discovery of the p53 protein"; Int J Cancer; 56; 775-776; (1994).
- (20) Donehower , L. A; Bradley, A; "The tumor suppressor p53"; Biochimica et Biophysica Acta; 1155; 181-205; (1993).
- (21) Koshland, D.E; "Molecule of the Year"; Science; Vol 262; pp 1953; (1993).
- (22) Culotta, E; Koshland, D.E; "p53 sweeps through Cancer Research"; Science; Vol 262; 1958-1961; (1993).
- (23) Harris, C.C; "p53: At the Crossroads of Molecular Carcinogenesis and Risk Assessment"; Science; Vol 262; pp 1980-1981; (1993).
- (24) Greenblatt, M.S; Bennett, W.P; Hollstein, M; Harris, C.C; "Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis"; Cancer Research; 54; 4855-4878; (1994).
- (25) Lane, D.P; "p53, guardian of the genome"; Nature; Vol 358; pp 15-16; (1992).
- (26) Vogelstein, B; Kinzler, K.W; "X-rays strike p53 again"; Nature; Vol 370; pp 174-175; (1994).
- (27) White, E; "p53, guardian of Rb"; Nature; Vol 371; pp 21-22; (1994).

(28) Dowell, S.P; Wilson, P.O; Derias, N.W; Lane, D.P; Hall, P.A; "Clinical Utility of the Immunocytochemical Detection of p53 Protein in Cytological Specimens"; Cancer Research; 54; 2914-2918; (1994).

(29) Wadayama, B; Toguchida, J; Yamaguchi, T; Sasaki, M.S; Kotoura, Y; Yamamuro, T; "p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas";

(30) Quinlan, D.C.; Davidson, A.G.; Summers, C.L.; Warden, H.E.; Doshi, H.M.; "Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer"; Cancer Research; 52; 4828-4831; (1992).

(31) Mc Laren, R; Kuzu, I; Dunnill, M; Harris, A; Lane, D; Gatter, K.C; "The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung"; BrJCancer; 66; 735-738; (1992).

(32) Ostrowski, J.L; Sawan, A; Henry, L; Wright, C; Henry, J.A; Hennessy, C; Lennard, T.J.W; Angus, B; Horne, C.H.W; "p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study"; Journal of Pathology; vol 164; 75-81; (1991).

(33) Callahan, R; "p53 mutations, another Breast Cancer Prognostic Factor;" Jour Nat Can Ins; Vol 84; No. 11; 826-827; (1992).

(34) Thor, A.D; Moore, D.H; Edgerton, S.M; Kawasaki, E.S; Reihsaus, E; Lynch, H.T; Marcus, J.N; Schwartz, L; Chen, L.C; Mayall, B.H; Smith, H.S; "Accumulation of p53 Tumor Suppressor Gene Protein: An Independent Marker of Prognosis in Breast Cancers"; Jour Nat Can Ins; Vol 84; No 11; 845-855; (1992).

(35) Isola, J; Visakorpi, T; Holli, K; Kallioniemi, O; "Association of Overexpression of Tumor Suppressor Protein p53 with Rapid Cell Proliferation and Poor Prognosis in Node-Negative Breast Cancer Patients"; J Natl Cancer Inst; Vol 84; No 14; 1109-1114; (1992).

(36) Jacquemier, J; Moles, J.P; Penault-Llorca, F; Adelaide, J; Torrente, M; Viens, P; Birnbaum, D; Theillet, C; "p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results"; Br J Cancer; 69; 846-852; (1994).

(37) Faille, A; De Cremoux, P; Extra, J.M; Linares, G; Espie, M; Bourstyn, E; De Rocquancourt, A; Giacchetti, S; Marty, M; Calvo, F; "p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers"; Br J Cancer; Vol 69; No 6; 1145-1150; (1994).

(38) Van den Berg, F.M; Tigges, A.J; Schipper, M.E; Den Hartog-Jager, F; Kroes, WG; Walboomers, J.M; "Expression of the Nuclear Oncogene p53 in Colon Tumours"; Journal of Pathology; vol 157; 193-199; (1989).

(39) Purdie, C.A; O'Grady, J; Piris, J; Wyllie, A.H; Bird, C.C; "p53 Expression in Colorectal Tumors" American Journal of Pathology; Vol 138; No 4; (1992).

(40) Scott, N; Sagar, P; Stewart, J; Blair, G.E; Dixon, M.F; Quirke, P; "p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance"; Br J Cancer; 63; 317-319; (1991).

(41) Remvikos, Y; Tominaga, O; Hammel, P; Laurent-Puig, P; Salmon, R.J; Dutrillaux, B; Thomas, G; "Increased p53 protein content of colorectal tumours correlates with poor survival"

(42) Starzynska, T; Bromley, M; Ghosh, A; Stern, P.L; "Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma"; British Journal of Cancer; 66; 558-562; (1992).

(43) Yamaguchi, A; Kurosaka, Y; Fushida, S; Kanno, M; Yonemura, Y; Miwa, K; Miyazaki, I; "Expression of p53 Protein in Colorectal Cancer and its Relationship to Short Term Prognosis"; Cancer; Vol 70; No 12; 2778-2784; (1992).

(44) Auvinen, A; Isola, J; Visakorpi, T; Koivula, T; Virtanen, S; Hakama, M; "Overexpression of p53 and long-term survival in colon carcinoma"; Br J Cancer; Vol 70; No 2; 297-300; (1994).

(45) Zeng, Z; Sarkis, A.S; Zhang, Z; Klimstra, D.S; Charytonowicz, E; Guillem, J.G; Cordon-Cardo, C; Cohen, A.M; "p53 Nuclear Overexpression: An Independent Predictor of Survival in Lymph Node-Positive Colorectal Cancer Patients"; Journal of Clinical Oncology; Vol 12; No 10; 2043-2050; (1994).

(46) Joypaul, V; Hopwood, D; Newman, E.L; Qureshi, S; Grant, A; Ogston, S.A; Lane, D.P; Cuschieri, A; "The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma"; Br J Cancer; Vol 69; No 6; 943-946; (1994).

(47) Van den Berg, F.M; Baas, I.O; Polak, M.M; Offerhaus, J.A; "Detection of p53 Overexpression in Routinely Paraffin-Embedded Tissue of Human Carcinomas using a Novel Target Unmasking Fluid"; Am J Path; Vol 142; No 2; 381-385; (1993).

(48) Kuerbitz, S.J; Plunkett, B.S; Walsh, W.V; Kastan, M.B; "Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation"; Proc Natl Acad Sci USA; Vol 84; 7491-7495; (1992).

- (49) Hall, P.A; McKee, P.H; Menage, H; Dover, R; Lane, D.P; "High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin"; *Oncogene*; 8; 203-207; (1993).
- (50) Zhan, Q; Bao, I; Kastan, M.B; Fornace, A.J; "The p53-dependent gamma-ray response of GADD45"; *Cancer Research*; 54; 2755-2760; (1994).
- (51) Kastan, M.B; Onyekwere, O; Sidransky, D; Vogelstein, B; Craig, R; "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage"; *Cancer Research*; 51; 6304-6311; (1991).
- (52) Arends, M.J; Morris, R.G; Wyllie, A.H; "Apoptosis. The Role of the Endonuclease" *Am J Path*; Vol 136, No 3; 593-608; (1990).
- (53) Schwartz, L.M; Smith, S.W; Jones, M.E; Osborne, B.A; "Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?"; *Cell Biology*; Vol 90; 980-984; (1993).
- (54) Arends, M.J; McGregor, A.H; Toft, N.J; Brown, E.J; Wyllie, A.H; "Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated Ha-ras oncogenes and is associated with endonuclease availability"
- (55) Clarke, A.R; Purdie, C.A; Harrison, D.J; Morris, R.G; Bird, C.C; Hooper, M.L; Wyllie, A.H; "Thymocyte apoptosis induced by p53 dependent and independent pathways"; *Nature*; Vol 362; 849-852; (1993).
- (56) Merrit, A.J; Potten, C.S; Kemp, C.J; Hickman, J.A; Balmain, A; Lane, D.P; Hall, P.A; "The Role of p53 in Spontaneous and Radiation-induced Apoptosis in the Gastrointestinal Tract of Normal and p53-deficient Mice"; *Cancer Research*; 54; 614-617; (1994).
- (57) Caelles, C; Heimberg, A; Karin, M; "p53-Dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes"; *Nature*; Vol 370; 220-223; (1994).
- (58) Symonds, H; Krall, L; Remington, L; Saenz-Robles, M; Lowe, S; Jacks, T; Van Dyke, T; "p53-Dependent Apoptosis Suppresses Tumor Growth and Progression *in vivo*"; *Cell*; Vol 78; 703-711; (1994).
- (59) Lowe, S.W; Bodis, S; McClatchey, A; Remington, L; Rulley, H.E; Fisher, D.E; Housman, D.E; Jacks, T; "p53 Status and the Efficacy of Cancer Therapy *in vivo*"; *Science*; Vol 266; 807-810; (1994).
- (60) Fujiwara, T; Grimm, E.A; Mukhopadhyay, T; Zhang, W.W; Owen-Schaub, L.B; Roth, J.A; "Induction of Chemosensitivity in Human Lung Cancer Cells *in vivo* by Adenovirus-mediated Transfer of the Wild-Type p53 Gene"

- (61) Kerr, J.F.R; Winterford, C.M; Harmon, B.V; "Apoptosis; Its significance in cancer and cancer therapy"; Cancer; Vol 73; No. 8; 2013-2023; (1994).
- (62) Zar, J.H; "Biostatistical Analysis"; 2nd Edition; Prentice Hall, Inc; New Jersey, USA; 138-145; (1984).
- (63) Tomei, L.D; Cope, F.O; "Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death"; Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 2; pp 13; USA; (1991).
- (64) Rasbridge, S.A; Gillett, C.E; Seymour, A.M; Patel, K; Richards, M.A; Rubens,R.D; Millis, R.R; "The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma"; BrJCancer; Vol 70; No 2; 335-341; (1994).
- (65) Mullis, K.B; "The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction"; Scientific American (April); 46-55; (1990).
- (66) Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T; "Molecular Cloning"; No. 1; Second edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press; USA; 9.14-9.59; (1989).