

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS



**CORRELACIÓN DEL GRADO DE DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA CON LA EXPRESIÓN DE P53
EN CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LARINGE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA
PRESENTA:**

DRA. LIZBETH CASTRO PÁEZ

ASESORES:

**DRA. SARA PARRAGUIRRE MARTÍNEZ.
DR. ELIO GERMÁN RECINOS CARRERA.**

MÉXICO D. F. JULIO 2009



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.

Este trabajo de Tesis con No. PROT-01-42-2009, presentado por la alumna Lizbeth Castro Páez, se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dra. Sara Parraguirre Martínez, con fecha del 27 de Julio de 2009 para su impresión final.

TUTOR PRINCIPAL: DRA. SARA PARRAGUIRRE MARTÍNEZ

AUTORIZACIONES

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. Sara Parraguirre Martínez
Jefa de la División de Anatomía Patológica y Asesora Titular de Tesis

Dr. Elio Germán Recinos Carrera
Médico adscrito de la División de Anatomía Patológica y Asesor de Tesis

INDICE

Glosario	5 - 6
Relación de figuras y tablas	7 - 8
Resumen	9
1. introducción	10
2. Antecedentes	11 - 15
3. Justificación	15
4. Objetivos	16
5. Material y Métodos	16 - 18
6. Resultados	19 - 34
7. Discusión	35 - 37
8. Conclusiones	38
9. Bibliografía	39 - 40

GLOSARIO

- 1.- Biopsia. Muestra de tejido tomada de un ser vivo, con fines diagnósticos. ⁽¹⁾

- 2.- Carcinoma. Neoplasia maligna derivada de un tejido epitelial. ⁽²⁾

- 3.- Carcinoma epidermoide. Carcinoma con células que tienden a diferenciarse del mismo modo que las células de la epidermis, sufriendo queratinización. ⁽²⁾

- 4.- Célula. Unidad fundamental de los organismos vivos, de tamaño microscópico, capaz de reproducción independiente, formada por citoplasma y núcleo, rodeados por una membrana. ⁽¹⁾

- 5.- Grado de diferenciación histológica. El grado de diferenciación histológica de un tumor, se refiere al grado de anormalidad de las células cancerosas, comparadas con las células normales, describe hasta que punto las células neoplásicas son similares a las células normales del mismo tipo de tejido en apariencia y función. ⁽³⁾

- 7.- Inmunohistoquímica. Técnica que se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos, que permiten la identificación de productos celulares o marcadores de superficie para el diagnóstico de neoplasias. ⁽²⁾

- 9.- Laringe. Órgano tubular que comunica con la faringe y con la tráquea, forma parte del aparato de fonación de los mamíferos. ⁽¹⁾

- 10.- Mitosis. Proceso de división celular en el que previa duplicación del material genético, cada célula recibe una dotación completa de cromosomas. ⁽¹⁾

11.- Oncogén. Gen asociado al cáncer, que al activarse provoca aparición de enfermedad neoplásica. ⁽⁴⁾

12.- p53. Proteína sintetizada por el oncogén p53, actúa regulando el ciclo celular, deteniéndolo en la fase G1 ante situaciones de daño al ADN, permitiendo la reparación del mismo, en caso de no llevarse a cabo la reparación p53 induce apoptosis. ⁽⁵⁾

13.- Perlas córneas. Disposición concéntrica de células neoplásicas, con el citoplasma densamente eosinófilo, queratinizadas, que se observan en algunas neoplasias. ⁽⁶⁾

14- Pleomorfismo. Es la variación en el tamaño y forma tanto de las células como de sus núcleos ⁽²⁾

15.- Puentes intercelulares. Puente de conjunción entre dos células del estrato espinoso de la epidermis. ⁽⁶⁾

16.- Queratinización. Proceso por el que las células epiteliales forman queratina. ⁽⁶⁾

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Tabla de recolección de la información.....	19 – 21
Gráfico 1. Carcinomas epidermoides de laringe, distribución por sexo.....	22
Gráfico 2. Grado de diferenciación de los carcinomas epidermoides de laringe..... (expresado en número de casos).	22
Gráfico 3. Grado de diferenciación de los carcinomas epidermoides de laringe..... (expresado en porcentajes).	23
Figura 1. Carcinoma epidermoide bien diferenciado.....	23
Figura 2. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado.....	24
Figura 3. Carcinoma epidermoide poco diferenciado.....	24
Gráfico 4. Expresión nuclear de p53 (expresado en número de casos).....	25
Gráfico 5. Expresión nuclear de p53 (expresado en porcentajes).....	25
Figura 4. Expresión nuclear débil (+) de p53 (valorado por inmunohistoquímica).....	26
Figura 5. Expresión nuclear moderada (++) de p53.....	26
Figura 6. Expresión nuclear intensa (+++) de p53.....	27
Figura 7. Expresión nuclear negativa (-) de p53.....	27
Gráfico 6. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides bien diferenciados..... (expresado en número de casos).	28
Gráfico 7. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides bien diferenciados..... (expresado en porcentajes).	28
Gráfico 8. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides moderadamente diferenciados..... (expresado en número de casos).	29
Gráfico 9. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides moderadamente diferenciados..... (expresado en porcentajes).	29
Gráfico 10. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides poco diferenciados..... (expresado en número de casos).	30

Gráfico 11. Expresión de p53 en carcinomas epidermoides poco diferenciados.....	30
(expresado en porcentajes).	
Tablas 2 – 10. Análisis estadístico. Prueba de chi cuadrada	31 – 34
Gráfico 12. Representación del grado de variabilidad en la expresión de p53 para carcinomas epidermoides bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados.....	34

RESUMEN

El objetivo de este estudio es investigar si existe correlación entre el grado de diferenciación histológica de los carcinomas epidermoides de laringe y el grado de expresión de p53 detectado por inmunohistoquímica.

Se analizaron al microscopio 55 biopsias de carcinomas epidermoides de laringe, obtenidas de los archivos de Anatomía patológica del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en el periodo comprendido entre 2003 – 2007.

Tomando en cuenta los criterios de gradificación de Broder, los carcinomas epidermoides fueron clasificados como bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados.

De los 55 casos estudiados, 49 (87.27%) resultaron positivos para la expresión de p53 y 7 casos (14.58%) fueron negativos, de los casos positivos la inmunorreacción fue débil en 7 casos (12.72%), de los cuales 2 fueron carcinomas epidermoides bien diferenciados y 5 carcinomas epidermoides moderadamente diferenciados, la expresión de p53 resultó moderada en 20 casos (41.66%), de los cuales 8 fueron carcinomas epidermoides bien diferenciados, 10 carcinomas epidermoides moderadamente diferenciados y 2 carcinomas epidermoides poco diferenciados, en 21 casos (43.75%) la inmunorreacción de p53 resultó intensa, de estos casos 10 fueron carcinomas epidermoides bien diferenciados, 7 moderadamente diferenciados y 4 poco diferenciados.

Se realizó prueba de chi cuadrada (prueba de asociación para variables ordinales de Spearman r_s), sin encontrarse correlación entre el grado de diferenciación histológica y la expresión de p53.

1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 130,000 nuevos casos de cáncer de laringe son registrados en el mundo, afectando predominantemente a hombres. Cerca de dos terceras partes de estos tumores aparecen en la glotis y una tercera parte involucra la región supraglótica. Los carcinomas epidermoides son el tipo histológico más común. ⁽⁷⁾

La enfermedad ocurre predominantemente en pacientes de 50 a 70 años, y en países en desarrollo muchos casos son diagnosticados durante la quinta década de la vida.

El cáncer de la región supraglótica y subglótica tiene alta tendencia para involucrar órganos adyacentes como la hipofaringe por infiltración y los ganglios linfáticos cervicales por diseminación linfática. ⁽⁷⁾

La fosfoproteína codificada por el gen supresor p53 está compuesta por un total de 393 aminoácidos, tiene un peso molecular de 53 kilodaltons y en su forma biológicamente activa regula de forma negativa la proliferación celular.

Se sugiere que el mecanismo por el cual actúa la proteína p53 es reconociendo el ADN celular dañado. Esto aumenta la síntesis de la proteína, que actúa deteniendo el ciclo celular y permite reparar el daño infringido sobre el ADN. Cuando no se consigue reparar la lesión del ADN, la proteína es capaz de desencadenar apoptosis. Por el contrario, si el gen ha mutado, la proteína mutada no es operativa y la célula continúa a través del ciclo celular con su defecto a nivel del ADN. Esta situación favorece que surjan clonas de células inestables genéticamente, las cuales darán lugar a cáncer. ⁽⁸⁾

En este estudio se analizan histológicamente 55 biopsias de carcinomas epidermoides de laringe para investigar la correlación entre el grado de diferenciación histológica con la expresión de p53 por medio de inmunohistoquímica, lo cual nos permite conocer la posible utilidad de esta proteína en la identificación del grado de agresividad de este tipo de neoplasias.

2. ANTECEDENTES

Los tumores malignos de cabeza y cuello representan el 17.6% del total (108,04) de las neoplasias malignas reportadas en el registro histopatológico de las neoplasias en México (RHNM) en el año 2002. ⁽⁹⁾

El cáncer de laringe es el más frecuente, con una relación hombre mujer de 4.21 y 1.0 respectivamente.

El carcinoma epidermoide representa del 85 al 90% de los casos, con una mortalidad de 1.71%⁽⁹⁾ Esta neoplasia se presenta durante la quinta década de la vida, pero se han registrado casos en pacientes jóvenes. ⁽¹⁰⁾

Dentro de los factores de riesgo se encuentran: alcoholismo, tabaquismo, antecedentes personales y familiares de carcinoma laríngeo y presencia de virus del papiloma humano. ⁽¹¹⁾

Se ha observado que el tabaquismo más el consumo de 1.5 litros de vino al día, incrementa 34 veces el riesgo de desarrollo de cáncer laríngeo. ⁽¹²⁾

Clínicamente se manifiesta por disfonía, disfagia, tos, hemoptisis, disnea, estridor y obstrucción de la vía aérea. ⁽¹¹⁾

De acuerdo al sitio de localización, los carcinomas laríngeos han sido divididos en cuatro tipos:

1.- Glóticos. Representan 60 a 65% de los casos, se originan de las cuerdas vocales verdaderas y el tercio anterior de la glotis es la localización más común.

2.- Supraglóticos. Constituyen 30 a 35% de los casos, involucran la cuerda vocal falsa, el ventrículo y la superficie laríngea o lingual de la epiglotis.

3.-Transglóticos. Representan menos del 5% de los casos. Este término es aplicado a carcinomas que atraviesan el ventrículo laríngeo, los cuales presentan mayor incidencia de involucro a ganglios linfáticos (52%).

4.- Infraglóticos o subglóticos. Constituyen menos del 5% de los casos. Bajo esta categoría están incluidos carcinomas que involucran la cuerda vocal verdadera, con extensión subglótica mayor a 1 cm, así como tumores totalmente confinados al área subglótica. ⁽¹⁰⁾

El sitio más común de metástasis para el carcinoma laríngeo, son los ganglios linfáticos regionales, seguidos por el pulmón; el involucro de la vena yugular y la glándula tiroides son resultado de extensión directa, lo cual se observa cuando existe involucro ganglionar extenso e indica una alta probabilidad de diseminación sistémica. ⁽¹⁰⁾

Macroscópicamente, los carcinomas laríngeos se describen como una masa protuberante, rosa o gris, frecuentemente ulcerada. Al estudio histológico, más del 90% son epidermoides, los cuales se clasifican en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados, en base al grado de diferenciación histológica, pleomorfismo celular y actividad mitótica.

La mayor parte de los carcinomas glóticos, son bien diferenciados o moderadamente diferenciados, mientras que un alto porcentaje de aquellos localizados en la región subglótica, son moderadamente diferenciados o poco diferenciados. ⁽¹⁰⁾

Se han descrito las siguientes variantes histológicas del carcinoma epidermoide:

- 1.- Carcinoma papilar. Presenta un patrón exofítico de crecimiento.
- 2.- Carcinoma verrugoso. Su aspecto es polipoide e histológicamente bien diferenciado.
- 3.- Carcinoma de células pequeñas (neuroendocrino). Histológicamente es idéntico a su contraparte pulmonar, es positivo para marcadores neuroendocrinos. Puede ser puro o asociado con otros patrones histológicos, el pronóstico es malo.
- 4.- Carcinoma basaloide. Se caracteriza por áreas típicas de carcinoma epidermoide invasor o in situ, asociadas con nidos de células pequeñas, con núcleos hiper cromáticos, citoplasma escaso, necrosis, hialinización prominente y empalizada periférica. El comportamiento es extremadamente agresivo.
- 5.- Carcinoma parecido a linfoepitelioma. Con frecuencia se acompaña de metástasis a ganglios linfáticos cervicales. El curso clínico es agresivo.
- 6.- Adenocarcinoma de tipo glándulas no salivales. Es una neoplasia muy rara, la mayor parte de los casos reportados, se originan en la región supraglótica o infraglótica.

7.-Carcinoma sarcomatoide. Presenta configuración polipoide, generalmente simula un pólipo laríngeo, con mayor frecuencia se localiza en la región supraglótica. Histológicamente, presenta un elemento de carcinoma epidermoide (con frecuencia in situ) y un componente pleomorfo parecido a sarcoma, el cual representa la mayor parte de la lesión.

Factores de significado pronóstico para el carcinoma epidermoide:

1.- Estadío clínico y localización. Las tasas de supervivencia a los 5 años, son las siguientes:

Neoplasias Glóticas: 80%

Estadio I: 90%, estadio II: 85%, estadio III: 60%, estadio IV: <5%

Neoplasias Supraglóticas: 65%

Estadio I: 85%, estadio II: 75%, estadio III: 45%, estadio IV: <5%

Neoplasias Transglóticas: 50%

Neoplasias Subglóticas: 40%

2.-Grado histológico. Este parámetro, está relacionado con el estadio clínico del tumor y se ha demostrado que es un factor pronóstico independiente.

3.-Ganglios linfáticos. En pacientes con metástasis a ganglios linfáticos, el pronóstico está afectado por el número de ganglios involucrados, el tamaño y la presencia o ausencia de extensión extra ganglionar.

4.- Expresión de p53. Se ha detectado expresión de p53 en aproximadamente 50 a 60% de los casos. ⁽¹⁰⁾

El tratamiento médico, incluye radioterapia o quimioterapia y el quirúrgico puede ser conservador o radical. Después del tratamiento los pacientes son valorados cada 4 a 6 semanas, después del primer año cada 2 meses, en el tercer año cada 3 meses y se espacian gradualmente hasta llegar a controles anuales. Se considera que los pacientes están curados después de permanecer libres de enfermedad por 5 años. La mayoría de las recurrencias se presentan en los dos primeros años.

⁽¹¹⁾

De 357 pacientes tratados en el Hospital de Oncología Centro Médico Nacional Siglo XXI, 68 se presentaron en etapas avanzadas T3 y T4. ⁽¹³⁾

La oncogénesis, resulta de la pérdida del equilibrio entre los factores que favorecen el crecimiento celular y los que favorecen la muerte celular. En este equilibrio juegan un papel fundamental los oncogenes, los cuales son genes que en condiciones normales codifican proteínas que intervienen en el control del ciclo celular. ⁽¹⁴⁾

Los oncogenes supresores, son un grupo de oncogenes que intervienen en forma negativa en el control de la proliferación celular, entre ellos se encuentra el p53, que actúa inhibiendo el crecimiento celular y su pérdida de función se asocia a crecimiento tumoral. El oncogen p53, situado en el brazo corto del cromosoma 17, sintetiza la proteína p53, que actúa regulando el ciclo celular, deteniéndolo en el paso de la fase G1 a la fase S. Lane propone que p53 actúa como vigilante del genoma celular, deteniendo la proliferación celular en la fase G1 ante situaciones de daño al ADN, para permitir la reparación del mismo. En caso de no llevarse a cabo esta reparación, p53 induce apoptosis, de manera que la pérdida de función de p53 permite la replicación de células con alteraciones cromosómicas, favoreciendo el crecimiento tumoral. ⁽¹⁵⁾

La proteína p53 fue descrita por Lane y Crawford en 1979 como una proteína de 53 kilodaltons, de origen no vírico, presente en células transformadas por el virus SV40 (virus simiano 40), además se encontró presente en células normales, como timocitos y células embrionarias, aunque en niveles menores comparados con aquellos encontrados en células transformadas.

A principios de los años 80, se consideró a p53 como una fosfoproteína de localización nuclear, de vida media muy corta (20 min), en células no transformadas. Los niveles elevados de p53 que se encuentran en células transformadas, parecen responder a un aumento en su estabilidad, con un alargamiento de su vida media, que puede ser mayor a 20 hrs. Este aumento en la estabilidad, puede deberse a mutaciones en la proteína o ser secundario a la formación de complejos con proteínas víricas. ⁽¹⁶⁾

El 85% de las mutaciones de p53, son de tipo missense, en las que un aminoácido es substituido por otro, lo que condiciona alteración en la conformación de la proteína y acumulación nuclear de la misma, permitiendo su detección por técnicas de inmunohistoquímica, el 15% restante

corresponde a mutaciones del tipo frame shift o nonsense, que producen una proteína inestable o ausente lo cual las hace indetectables por inmunohistoquímica. ⁽¹⁵⁾

En algunos casos la positividad de p53 ocurre sin mutaciones detectables y viceversa, las mutaciones pueden ocurrir sin niveles detectables de proteína p53.

La tinción de inmunohistoquímica para p53 requiere información adecuada del antígeno, diferentes anticuerpos parecen reconocer diferentes epitopes. Un grupo de anticuerpos (PAb 1801, DO1, DO7, BP53.12 y 421) han mostrado reconocer p53 nuclear, pero sólo BP53.12 Y 421 reconocen p53 citoplasmático. PAb 1801 y DO7 se han recomendado para huso de rutina. ⁽¹⁶⁾

El gen p53, está involucrado en el control del ciclo celular y en la regulación de la muerte celular programada y podría tener un impacto sobre el comportamiento biológico de los tumores. ⁽¹⁷⁾

En estudios recientes, la expresión de p53 en carcinomas epidermoides laríngeos, ha sido reportada del 38 al 79% de las muestras analizadas ⁽¹⁸⁾

3. JUSTIFICACION

La mayor expresión de p53 en carcinomas epidermoides de laringe poco diferenciados, en comparación con una menor expresión de esta proteína en los carcinomas epidermoides bien diferenciados, puede sugerir un comportamiento biológico más agresivo en las neoplasias poco diferenciadas, por lo que sería de importancia para el clínico informar la expresión de p53 en el reporte histopatológico de todos los carcinomas laríngeos.

Existen varios estudios reportados en la literatura acerca de la expresión de p53 en carcinomas epidermoides de laringe ⁽¹⁹⁾, sin embargo no se ha llevado a cabo este tipo de estudio en población mexicana, por lo que es de interés su realización.

4. OBJETIVO

Correlacionar el grado de diferenciación histológica de los carcinomas epidermoides de laringe, por medio de la gradificación de Broder, con la expresión de p53 por inmunohistoquímica.

5. MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio observacional, comparativo, abierto, transversal, en el cual se revisaron libretas de registro de biopsias, de la División de Anatomía Patológica del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, así como libretas de registro de biopsias, del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, del año 2003 al 2007, para localizar laminillas teñidas con hematoxilina eosina y bloques de parafina de todos los casos diagnosticados como carcinomas epidermoides de laringe, las laminillas de cada caso se valoraron histológicamente para clasificar los carcinomas epidermoides como bien, moderadamente y poco diferenciados, de acuerdo al sistema de gradificación de Broder, que utiliza los siguientes criterios: Tumores bien diferenciados: La neoplasia presenta queratinización abundante y es fácilmente reconocible, así como uniones o puentes intercelulares aparentes, el pleomorfismo es mínimo y las figuras mitóticas son de localización basal.

Tumores moderadamente diferenciados: Presentan mayor desorganización estructural, el pleomorfismo nuclear y citoplasmático es más pronunciado y las figuras mitóticas (incluyendo formas atípicas) se observan con mayor frecuencia, la formación de queratina es menor y generalmente sólo se limita a la formación de perlas córneas y células con queratinización individual dispersas.

Tumores poco diferenciados: El pleomorfismo celular es intenso, las figuras mitóticas abundantes, en ocasiones es difícil establecer la naturaleza de la lesión, a menos que se identifiquen uniones intercelulares o focos pequeños de queratinización.

A cada bloque de parafina, se le realizó inmunohistoquímica para detectar la expresión nuclear de la proteína p53, a través de la utilización del anticuerpo monoclonal proteína anti-Humana p53 de ratón clona DO-7. La expresión nuclear de p53, se valoró como débil (+), moderada (++), intensa (+++), o negativa, empleando los siguientes parámetros:

Intensa (+++): Tinción nuclear oscura, fácilmente visible con el objetivo de bajo poder (4x), que involucra más del 50% de las células.

Moderada (++) : Áreas de tinción nuclear oscura focal (< 50% de las células) o tinción nuclear moderada de > 50% de las células.

Débil (+): Tinción moderada focal en < 50% o tinción nuclear pálida en cualquier proporción de las células que no sea identificada con facilidad al utilizar el objetivo de bajo poder (4x).

Negativa: Ausencia total de tinción en los núcleos de las células tumorales. ⁽²¹⁾

Finalmente se correlacionó la expresión nuclear de p53 con el grado de diferenciación histológico de los carcinomas epidermoides de laringe.

Criterios de inclusión:

Casos diagnosticados y corroborados histológicamente como carcinomas epidermoides de laringe, que cuenten con laminilla teñida con hematoxilina eosina, así como material tumoral adecuado en los bloques de parafina para realizar las reacciones de inmunohistoquímica (p53).

Criterios de exclusión:

Casos donde el material se pierda durante la técnica de inmunohistoquímica y no sea posible reponerlo.

Las variables independientes estudiadas fueron edad, sexo, gradificación de Broder y como variable dependiente la expresión de p53.

El tamaño de la muestra incluyó todos los casos diagnosticados y corroborados histológicamente como carcinomas epidermoides de laringe del Hospital General Dr. Manuel Gea González y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en el periodo comprendido entre 2003 y 2007, fueron identificados 17 casos del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" de los cuales 8 no contaron con bloque de parafina por haberse entregado al paciente por solicitud del mismo y 81 casos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, de los cuales 30 no tenían bloque de parafina y en 5 casos se término el tejido durante el proceso de inmunohistoquímica.

Se utilizó estadística descriptiva (proporciones o porcentajes) para la caracterización de la población y la prueba de chi cuadrada para comparar muestras relacionadas por ser variables ordinales.

Técnica de inmunorreacción:

En portaobjetos previamente con poly-L-lisina se montan cortes de tejido de 2 a 3 micras, los cuales se secan en forma horizontal, posteriormente se desparafinan a 60°C y se hidratan con agua destilada. Se efectúa recuperación antigénica en microondas con solución Buffer a pH 9 por 20 minutos, después se enfría y se enjuaga con agua corriente. Se inhibe la peroxidasa endógena 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se enjuaga en agua destilada y se incuba con solución buffer de fosfatos salinos 10 minutos, se procede a enjuagar en tres ocasiones, posteriormente se incuba en cámara húmeda con anticuerpo primario (proteína anti-Humana p53 de ratón, marca DAKO) media hora a temperatura ambiente, se enjuagan las laminillas una por una y se incuban en solución buffer de fosfatos salinos por 10 minutos, se incuban con anticuerpo de enlace (Inmunoglobulinas biotiniladas) por 15 minutos, se enjuagan las laminillas una por una y se incuban en solución buffer de fosfatos salinos por 10 minutos, en seguida se incuban con streptavidina 15 minutos, nuevamente se enjuagan las laminillas una por una y se incuban en solución buffer de fosfatos salinos por 10 minutos, se revelan con diaminobencidina por 5 minutos, se observan al microscopio deteniendo la reacción enjuagando con agua destilada, el siguiente paso consiste en contrateñir con hematoxilina de Harris realizando 5 baños, enjuagar, azular con carbonato de litio y volver a enjuagar, finalmente las laminillas se deshidratan, aclaran y montan en estellan.

6. RESULTADOS

Los resultados del estudio se expresan en la tabla 1.

De los 55 casos analizados, el rango de edad fue de 40 a 88 años, con un promedio de 65 años, 49 casos fueron masculinos y 6 femeninos. Gráfico 1

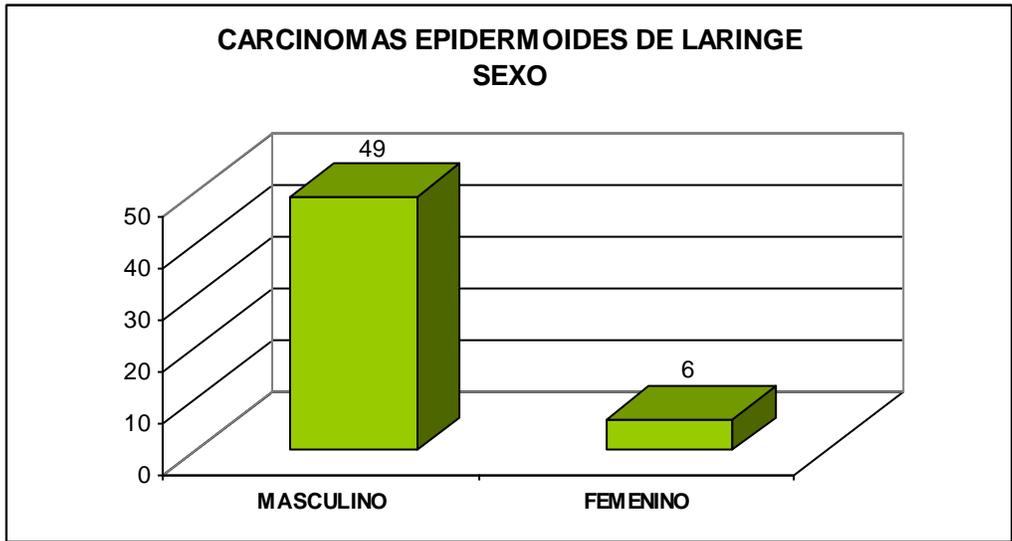
TABLA 1

No	Edad	Sexo		Grado de diferenciación de carcinomas epidermoides de laringe de acuerdo a la gradificación de Broder			Expresión de p53			
		M	F	BIEN DIFERENCIADO	MODERADAMENTE DIFERENCIADO	POCO DIFERENCIADO	(+)	(++)	(+++)	(-)
1	67	X				X			X	
2	40	X		X				X		
3	56	X				X			X	
4	64	X			X				X	
5	62	X		X				X		
6	64	X		X				X		
7	82		X	X				X		
8	72	X			X			X		
9	72	X			X				X	
10	56	X				X		X		
11	50	X		X					X	
12	64	X		X					X	

13	81	X		X						X
14	59	X			X			X		
15	53	X				X		X		
16	62	X		X					X	
17	55	X		X				X		
18	65	X		X			X			
19	46		X		X		X			
20	80	X			X		X			
21	83		X		X			X		
22	47	X		X					X	
23	80	X			X			X		
24	75	X			X				X	
25	53	X		X					X	
26	76	X			X			X		
27	60	X			X			X		
28	47	X			X			X		
29	79	X		X					X	
30	74	X		X					X	
31	46		X	X				X		
32	72	X			X		X			
33	53	X			X		X			

34	75	X				X			X	
35	56	X				X			X	
36	66	X				X		X		
37	88	X				X			X	
38	65	X				X			X	
39	53	X		X					X	
40	74	X		X			X			
41	79		X	X				X		
42	72	X		X					X	
43	66	X				X		X		
44	73	X		X					X	
45	82	X				X				X
46	54	X				X		X		
47	79	X				X			X	
48	60	X				X				X
49	74		X	X						X
50	59	X		X						X
51	59	X		X				X		
52	79	X				X		X		
53	52	X				X				X
54	55	X				X				X
55	58	X				X			X	

GRÁFICO 1



De acuerdo a la gradificación de Broder, 23 casos se diagnosticaron como carcinomas epidermoides de laringe bien diferenciados (41.81%), 26 casos fueron moderadamente diferenciados (47.27%) y 6 resultaron carcinomas epidermoides poco diferenciados (10.90%).

Gráfico 2 y 3

GRÁFICO 2

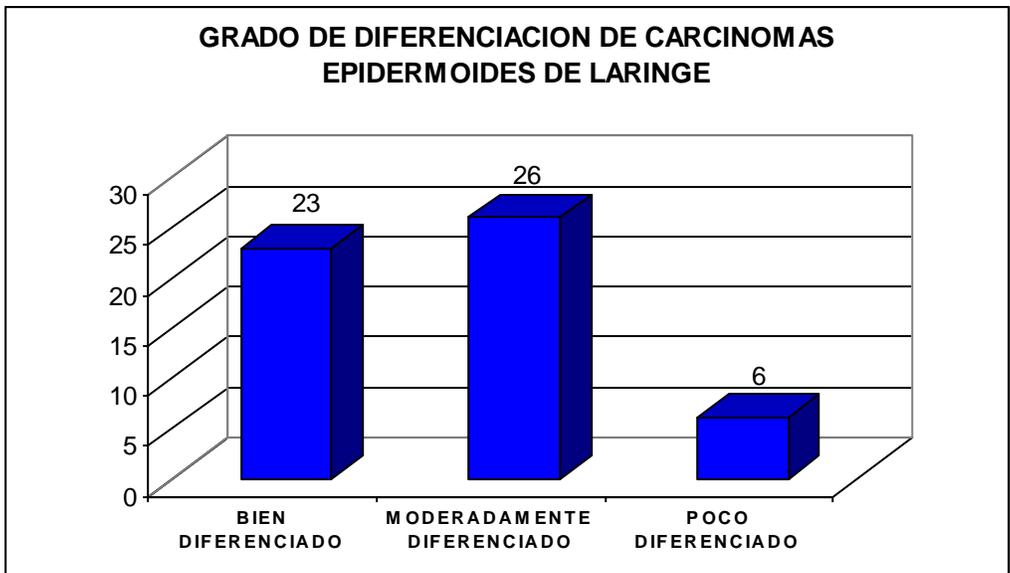
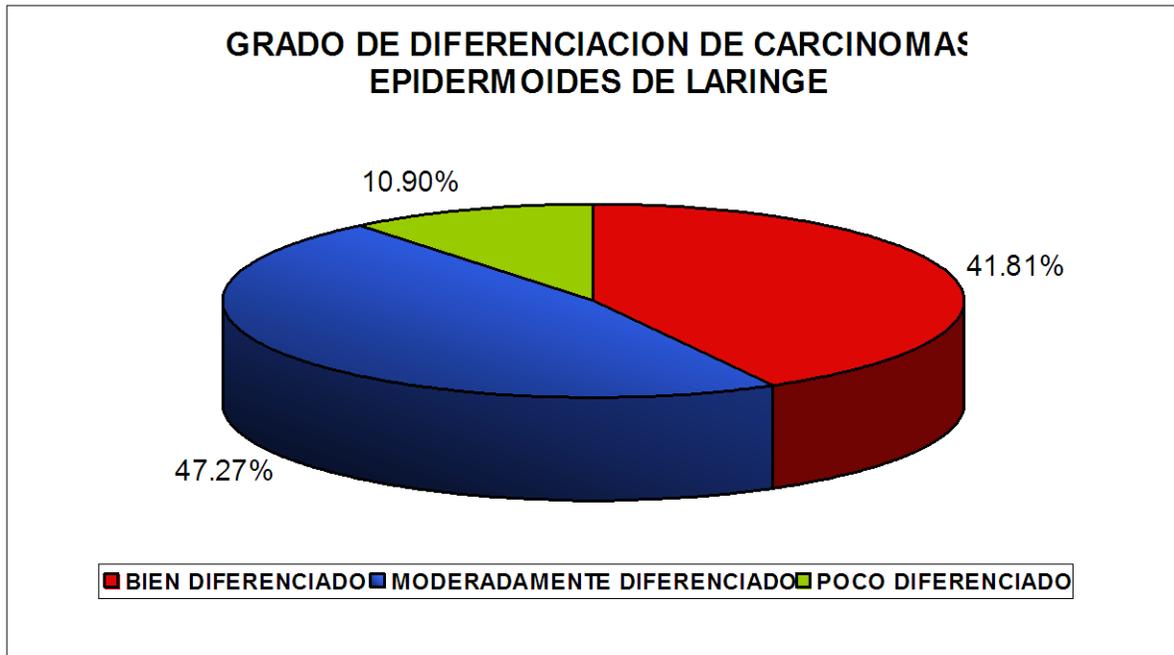


GRÁFICO 3



A continuación se muestran tres casos de carcinomas epidermoides de laringe representando los diferentes grados de diferenciación de Broder (tinción con hematoxilina eosina). Figuras 1 – 3

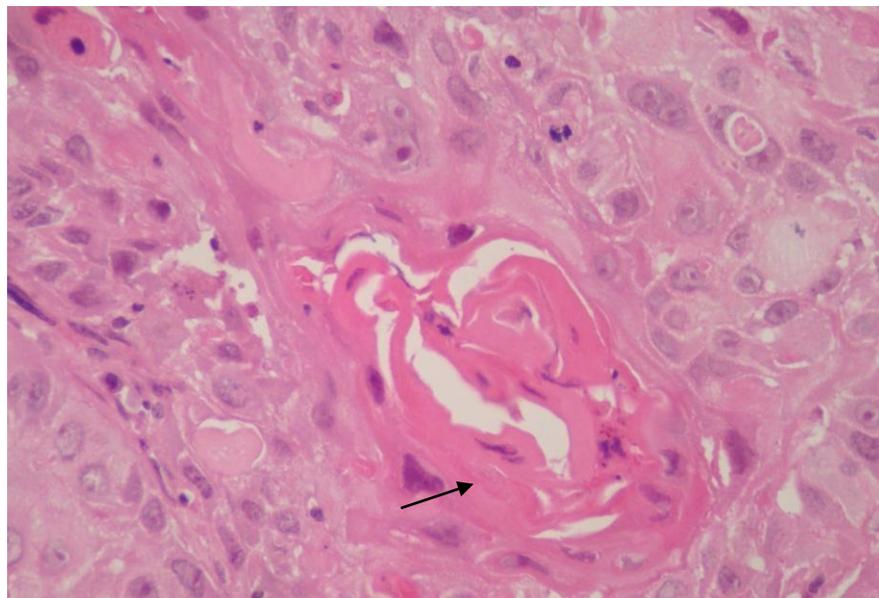


Figura 1. Carcinoma epidermoide bien diferenciado. Note los puentes intercelulares y la zona amplia de queratinización en el centro (flecha).

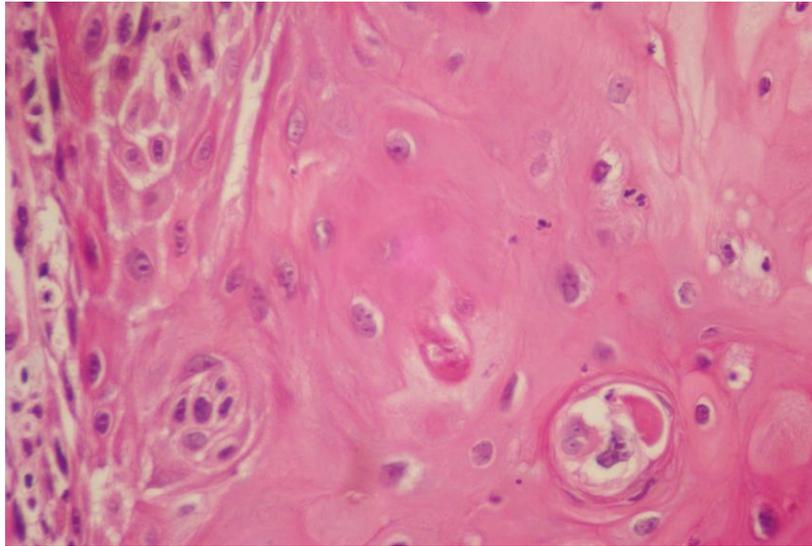


Figura 2. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Presenta áreas de queratinización individual y pleomorfismo celular moderado.

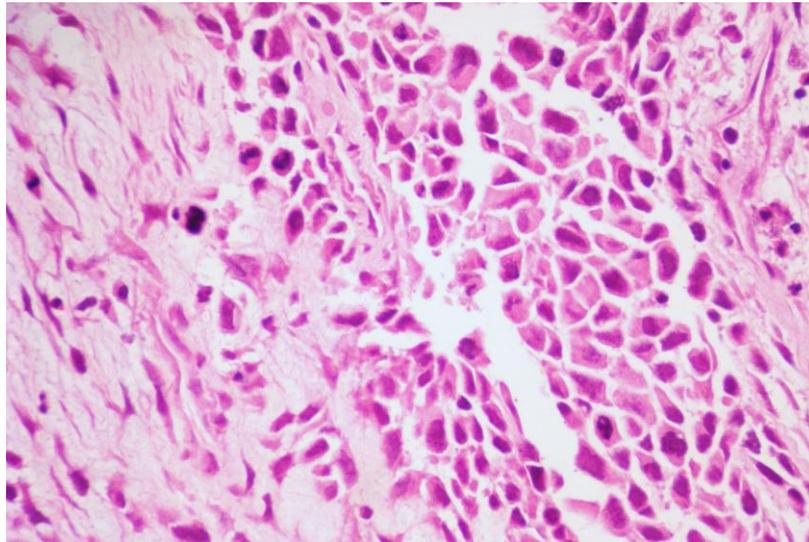


Figura 3. Carcinoma epidermoide poco diferenciado.

La expresión nuclear de p53 se interpretó débil (+) en 7 casos (12.72%), moderada (++) en 20 casos (36.36%), intensa (+++) en 21 casos (38.18%) y negativa en 7 casos (12.72%).

Gráfico 4 y 5

GRÁFICO 4

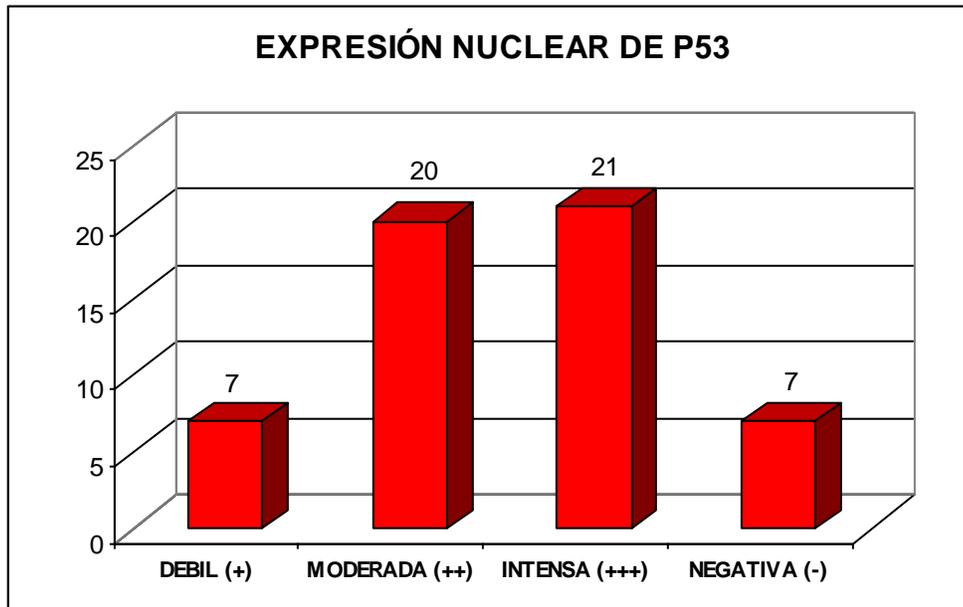
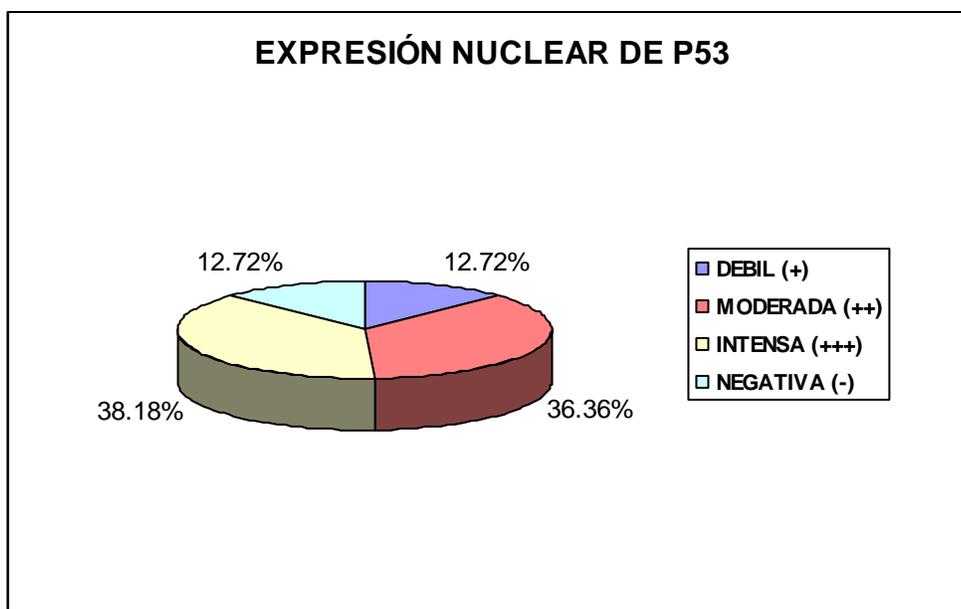


GRÁFICO 5



A continuación se presentan cuatro casos de carcinomas epidermoides de laringe con expresión nuclear variable de p53 (débil, moderada, intensa y negativa). Figuras 4-7

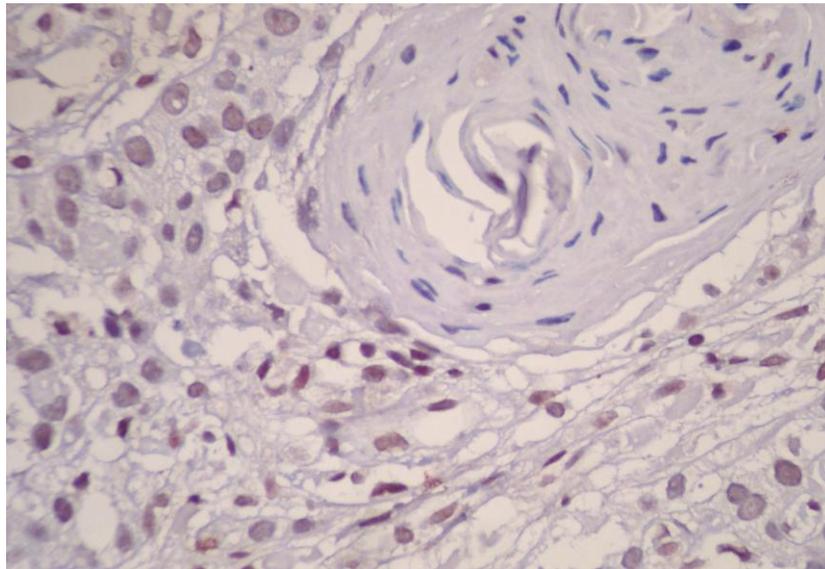


Figura 4. Carcinoma epidermoide bien diferenciado, con expresión nuclear débil (+) de p53 (el color café ocre indica positividad).

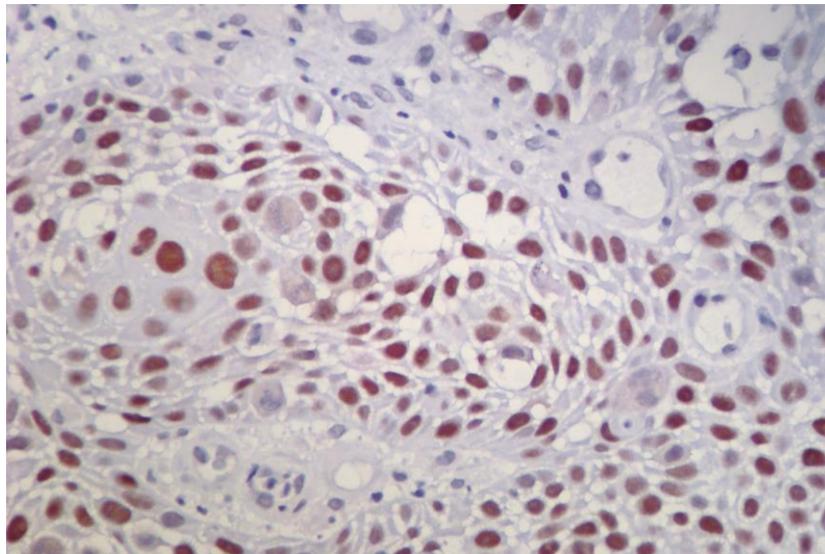


Figura 5. Expresión nuclear moderada (++) de p53, en un carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado.

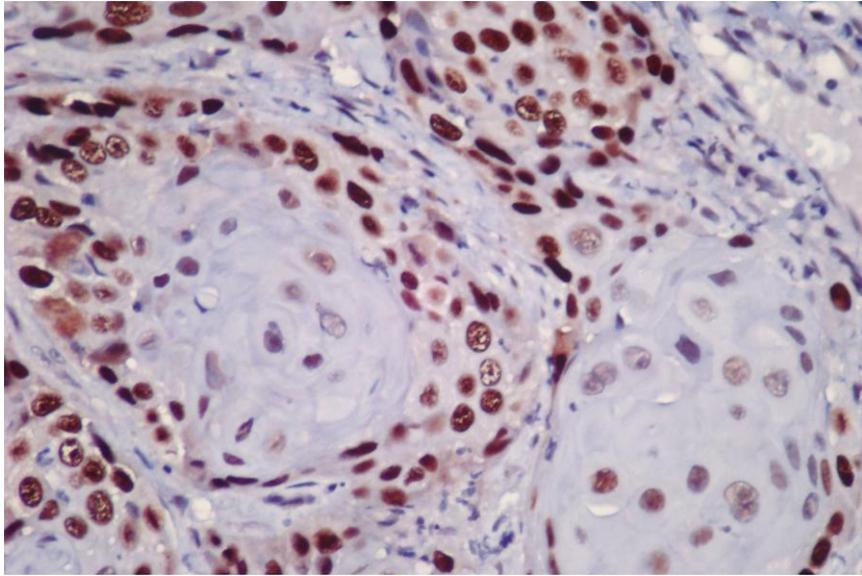


Figura 6. Carcinoma epidermoide bien diferenciado, con expresión nuclear intensa (+++) de p53.

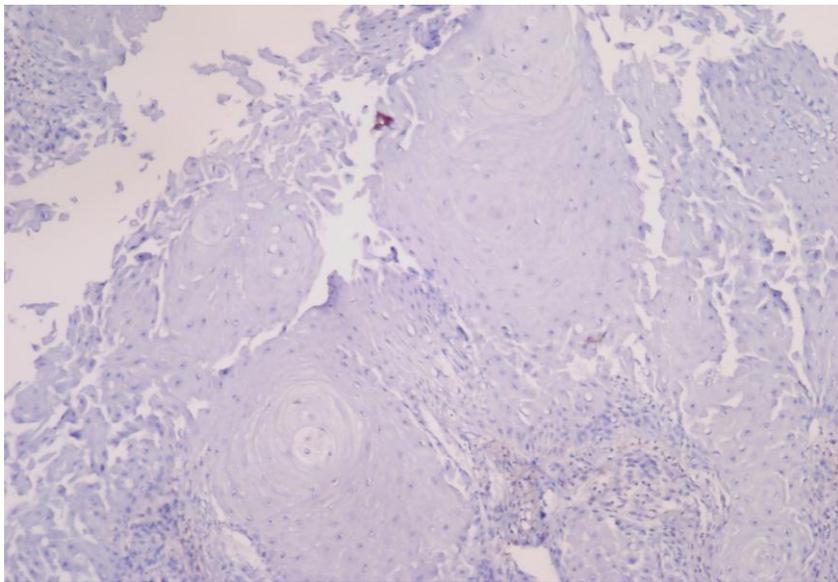


Figura 7. Expresión nuclear negativa (-) de p53.

De los 23 casos de carcinomas epidermoides bien diferenciados, 2 tuvieron expresión nuclear débil + de p53 (8.69%), 8 expresión nuclear moderada ++ (34.78%), 10 expresión nuclear intensa (43.47%) y en 3 casos la expresión de p53 resultó negativa (13.04%). Gráfico 6 y 7

GRÁFICO 6

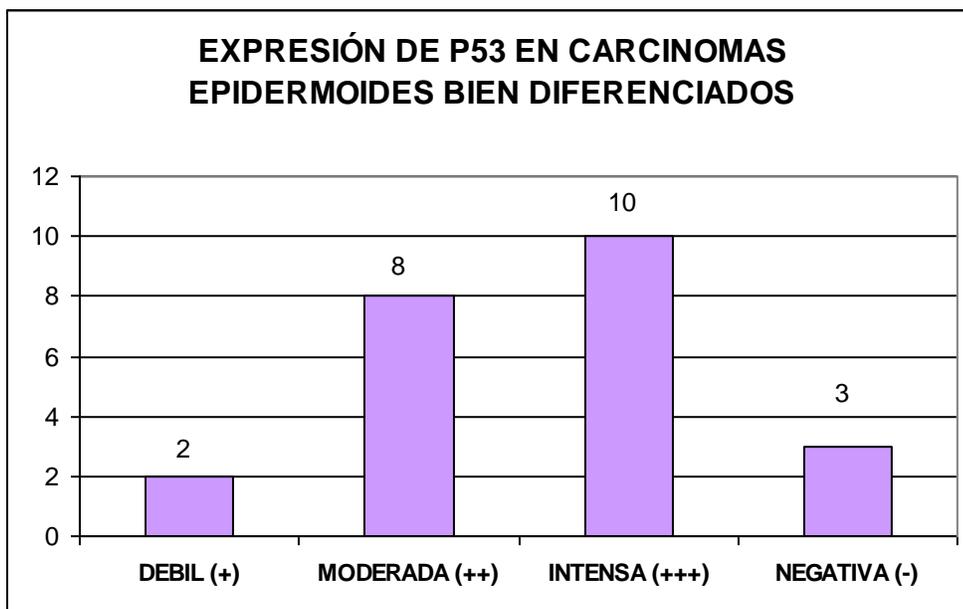
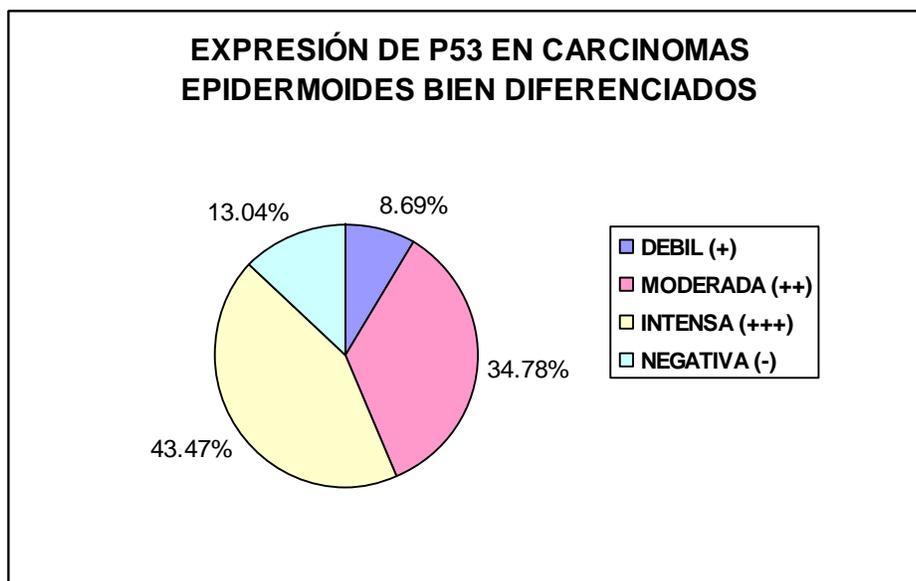


GRÁFICO 7



De los 26 casos de carcinomas epidermoides de larige moderadamente diferenciados, 5 tuvieron expresión nuclear de p53 débil + (19.23%), 10 moderada ++ (38.46%), 7 intensa +++ (26.92%) y 4 casos resultaron negativos (15.38%). Gráfico 8 y 9

GRÁFICO 8

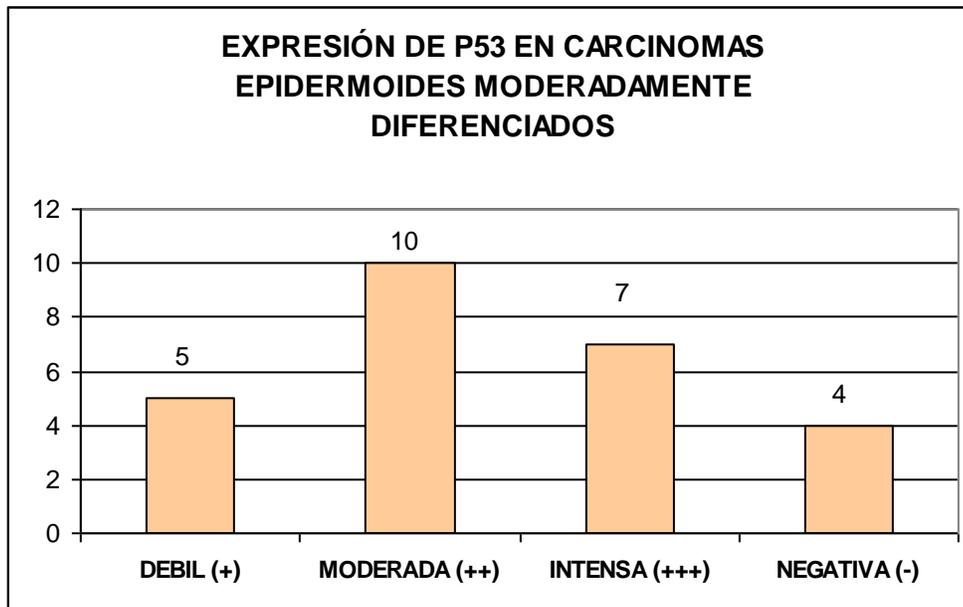
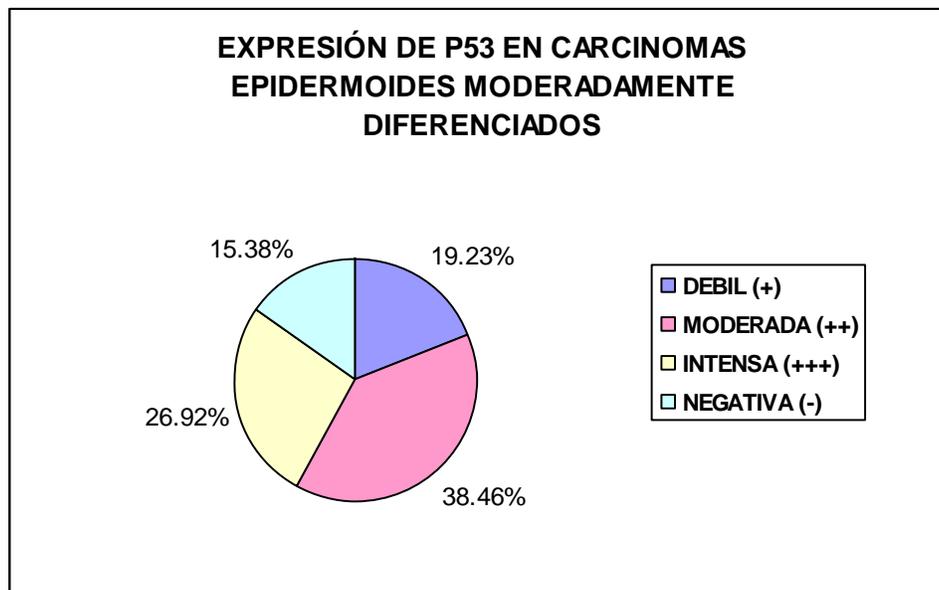


GRÁFICO 9



De los 6 casos de carcinomas epidermoides poco diferenciados, 2 casos presentaron expresión nuclear de p53 moderada (33.33%) y en 4 casos la expresión nuclear de p53 se interpretó como intensa (66.66%). Gráfico 10 y 11

GRÁFICO 10

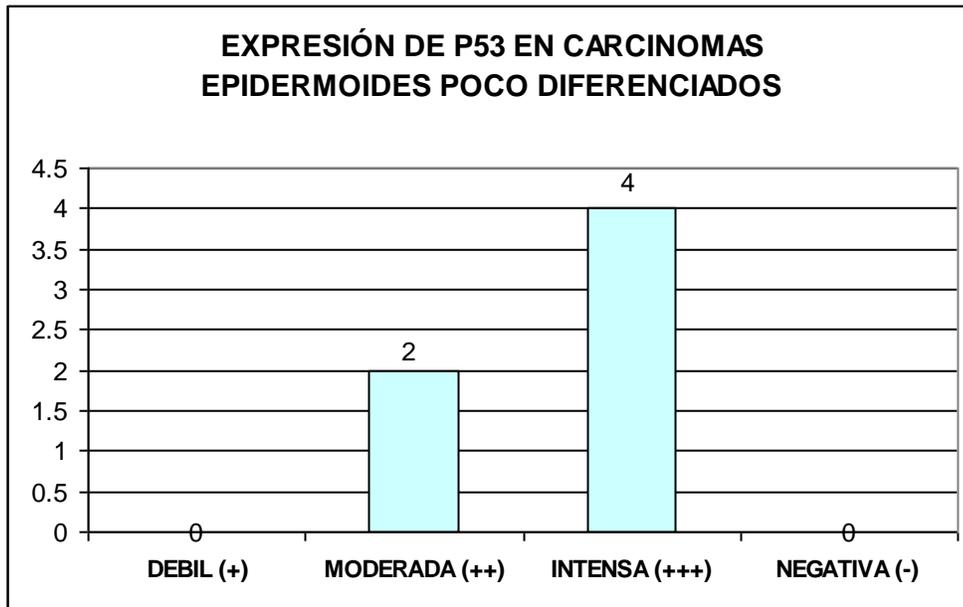
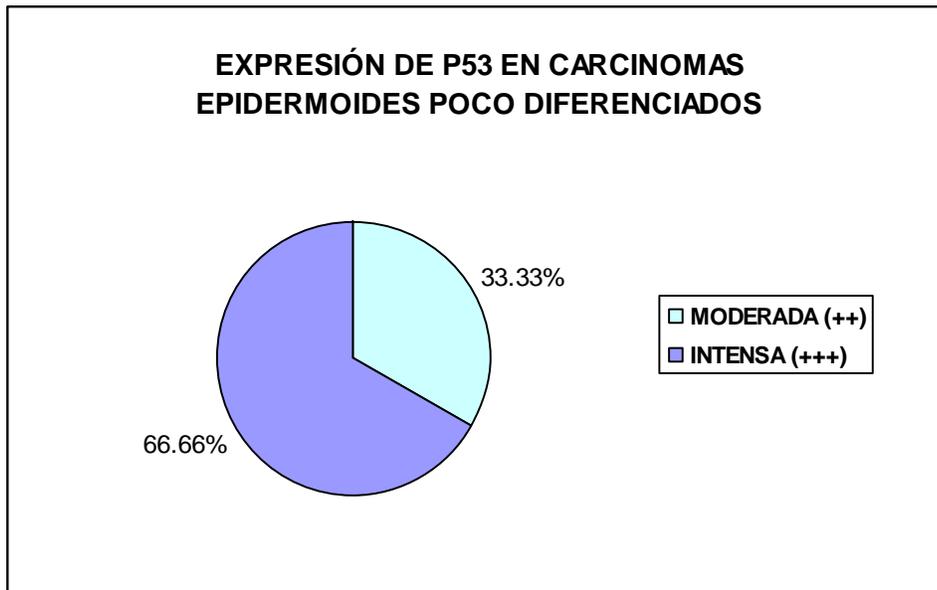


GRÁFICO 11



Se realizó una prueba de chi cuadrada (prueba de asociación para variables ordinales de Spearman r_s) los datos estadísticos se muestran a continuación. Tablas 2 – 10.

TABLA 2 **EDAD**

N	Valido	55
	Ausente	0
Media		64.96
Mediana		64
Moda		53 ^a
Desviación estándar		11.791
Mínimo		40
Máximo		88

Existen múltiples modas. Se muestra el valor más pequeño

TABLA 3
EDAD

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje valido	Porcentaje acumulativo
Valido 40	1	1.8	1.8	1.8
46	2	3.6	3.6	5.5
47	2	3.6	3.6	9.1
50	1	1.8	1.8	10.9
52	1	1.8	1.8	12.7
53	4	7.3	7.3	20
54	1	1.8	1.8	21.8
55	2	3.6	3.6	25.5
56	3	5.5	5.5	30.9
58	1	1.8	1.8	32.7
59	3	5.5	5.5	38.2
60	2	3.6	3.6	41.8
62	2	3.6	3.6	45.5
64	3	5.5	5.5	50.9
65	2	3.6	3.6	54.5
66	2	3.6	3.6	58.2
67	1	1.8	1.8	60
72	4	7.3	7.3	67.3
73	1	1.8	1.8	69.1
74	3	5.5	5.5	74.5
75	2	3.6	3.6	78.2
76	1	1.8	1.8	80
79	4	7.3	7.3	87.3
80	2	3.6	3.6	90.9
81	1	1.8	1.8	92.7
82	2	3.6	3.6	96.4
83	1	1.8	1.8	98.2
88	1	1.8	1.8	100
Total	55	100	100	

TABLA 4**Estadísticas**

	Sexo	Grado de diferenciación	Expresión de p53
N Valido	55	55	55
Ausente	0	0	0

TABLA 5**Sexo**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje valido	Porcentaje acumulativo
Valido masculino	49	89.1	89.1	89.1
femenino	6	10.9	10.9	100
Total	55	100	100	

TABLA 6**Grado de diferenciación**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje valido	Porcentaje acumulativo
Bien diferenciado	23	41.8	41.8	41.8
Moderadamente diferenciado	26	47.3	47.3	89.1
Poco diferenciado	6	10.9	10.9	100
Total	55	100	100	

TABLA 7**Expresión de p53**

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje valido	Porcentaje acumulativo
Valido leve	7	12.7	12.7	12.7
moderado	20	36.4	36.4	49.1
intenso	21	38.2	38.2	87.3
negativo	7	12.7	12.7	100
Total	55	100	100	

TABLA 8**Grado de diferenciación * Expresión de p53**

	Leve	Moderado	Intenso	Negativo	Total
Bien diferenciado	2	8	10	3	23
Moderadamente diferenciado	5	10	7	4	26
Poco diferenciado	0	2	4	0	6
Total	7	20	21	7	55

TABLA 9**Prueba Chi-Cuadrada**

	Valor	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Cuadrada	5.201 ^a	6	0.518
Coefficiente de riesgo	6.496	6	0.37
Asociación de línea por línea	0.099	1	0.753
Número de casos válidos	55		

a. 8 celdillas (66.7%) tienen una cuenta esperada menor a 5. La cuenta mínima esperada es 0.76

TABLA 10

Medidas simétricas

	Valor	Error estándar asintótico ^a	Aprox. T ^b	Aprox. Sig.
Intervalo por intervalo Pearson R	-0.043	0.112	-0.311	.757 ^c
Ordinal por ordinal Correlación de Spearman	-0.057	0.123	-0.416	.679 ^c
Número de casos validos	55			

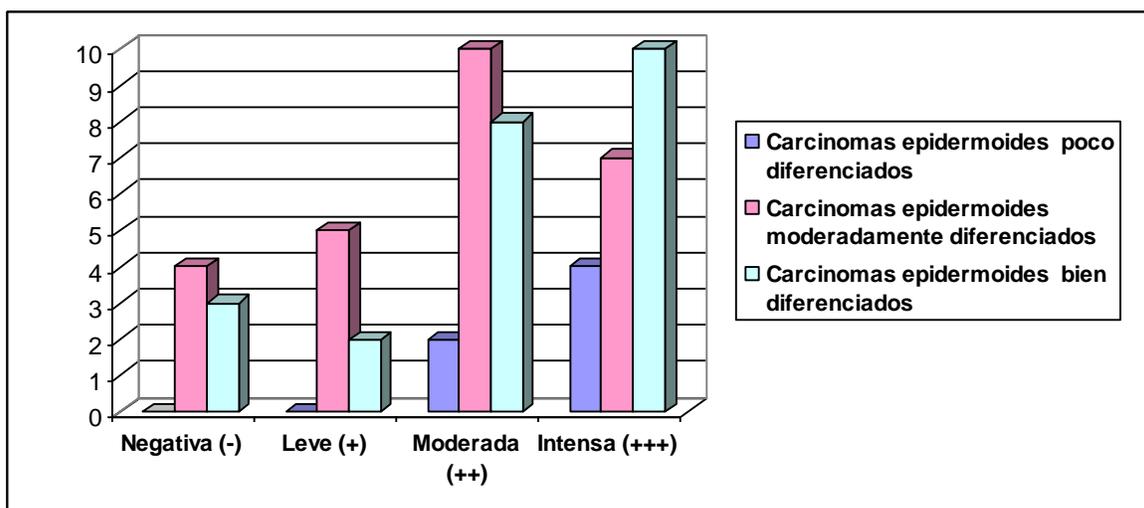
a. Sin asumir la hipótesis nula.

b. Usando el error estándar asintótico, asumiendo la hipótesis nula.

c. Basado sobre la aproximación normal.

No existe una relación estadísticamente significativa entre el grado de expresión nuclear de p53 y el grado de diferenciación celular de acuerdo a la gradificación de Broder. En este estudio se encontró que el grado de expresión de p53 y el grado de diferenciación celular no tienen relación.

GRÁFICO 12



Representación del grado de variabilidad en la expresión de p53 para carcinomas epidermoides bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados.

7. DISCUSION

La proteína p53 es codificada por el gen supresor tumoral p53 y fue descubierta en 1979 por Lane y Crawford. ⁽⁸⁾

Esta proteína regula de forma negativa la proliferación celular, actuando como una especie de “policía molecular” que vigila la integridad del ADN. Cuando se lesiona el ADN, la proteína nativa intenta repararlo deteniendo el ciclo celular, si no es capaz de hacerlo induce muerte celular programada o apoptosis. Cuando la proteína muta, no es biológicamente activa, y por tanto deja de ejercer esta función supresora sobre la proliferación celular. ⁽⁸⁾

En este estudio, de los 55 carcinomas epidermoides de laringe, 48 (87.27%) fueron positivos para la expresión de p53 y 7 casos (14.58%) fueron negativos, de los casos positivos la inmunorreacción fue débil en 7 casos (12.72%), de los cuales 2 fueron carcinomas epidermoides bien diferenciados y 5 carcinomas epidermoides moderadamente diferenciados, la expresión de p53 resultó moderada en 20 casos (41.66%), de los cuales 8 fueron carcinomas epidermoides bien diferenciados, 10 carcinomas epidermoides moderadamente diferenciados y 2 carcinomas epidermoides poco diferenciados, en 21 casos (43.75%) la inmunorreacción de p53 resultó intensa, de estos casos 10 fueron carcinomas epidermoides bien diferenciados, 7 moderadamente diferenciados y 4 poco diferenciados.

Se realizó prueba de chi cuadrada (prueba de asociación para variables ordinales de Spearman r_s), sin encontrarse correlación entre el grado de diferenciación histológica y la expresión de p53 en carcinomas epidermoides de laringe. Estos resultados concuerdan con los reportes de la literatura. En el 2001 Mustafa Kazkayasi y colaboradores analizaron la expresión de p53 por inmunohistoquímica en 27 biopsias de carcinomas laríngeos, el objetivo fue investigar si existía correlación entre la expresión de esta proteína y las características clínico patológicas del tumor y revelar cualquier valor pronóstico posible.

La intensidad de la inmunorreacción para p53, fue valorada como sigue: 0 sin tinción nuclear, 1 o débil < 10% de células positivas, 2 o moderada tinción nuclear en el 11 al 50% de las células, 3 o fuerte > 50% de células positivas.

De 27 carcinomas laríngeos, 20 fueron positivos para p53, 13 mostraron positividad nuclear débil y 7 positividad nuclear moderada. No se observó una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 con la edad del paciente, localización del tumor, grado histológico del tumor ni estadio clínico. ⁽¹⁸⁾

Khurshid y colaboradores en 1993, examinaron la expresión de la proteína p53 mediante inmunohistoquímica, en 43 biopsias de carcinomas laríngeos. La inmunorreacción se valoró como positiva +++ cuando más del 70% de los núcleos fueron intensamente teñidos, positiva ++ cuando del 10 al 70% de los núcleos fueron intensamente teñidos, positiva + cuando menos del 10% de los núcleos fueron intensamente teñidos, se consideró negativa cuando los núcleos no fueron teñidos.

La proteína fue detectada por inmunohistoquímica en 65% de los carcinomas laríngeos, no se encontró una correlación entre la expresión de p53 y el grado histológico de los tumores. El porcentaje de las células positivas fue evaluado por 3 patólogos en al menos 1000 células. Del total de carcinomas epidermoides, 15 fueron bien diferenciados, de estos 8 fueron negativos para p53, 2 positivos +, 2 positivos ++, y 3 positivos +++, 19 casos fueron moderadamente diferenciados, de estos 4 fueron negativos, 6 positivos +, 5 positivos ++ y 4 positivos +++, 9 casos fueron poco diferenciados, de estos 3 fueron negativos, 3 positivos +, 2 positivos ++ y 1 positivo +++. ⁽²¹⁾

Barbatis y colaboradores en 1995, investigaron la expresión de la proteína p53 mediante inmunohistoquímica, en carcinomas epidermoides de laringe. Se estudiaron 41 biopsias de carcinomas epidermoides, 78% de los carcinomas epidermoides expresaron p53.

La expresión de p53 fue evaluada semicuantitativamente:

+ (una cruz) cuando menos del 10% de las células resultaron positivas, ++ (dos cruces) cuando del 10 al 15% de las células fueron positivas, +++ (tres cruces) cuando más del 50% de las células

resultaron positivas, como la intensidad de la tinción nuclear vario en cada caso, todos los núcleos positivos fueron considerados por igual.

14 casos fueron carcinomas epidermoides grado 1, de los cuales 4 resultaron positivos +, 4++, 3 +++ y 3 fueron negativos; 18 fueron grado 2, de los cuales 2 resultaron positivos +, 6 ++, 6 +++ y 4 fueron negativos; 9 fueron grado 3, de los cuales 2 resultaron positivos +, 3 ++, 2 +++ y 2 fueron negativos. La intensidad de la tinción en cada caso, vario de área a área. ⁽²²⁾

Vielva y colaboradores, en el 2003, estudiaron la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica, en 62 biopsias de carcinomas epidermoides laríngeos.

La inmunorreacción fue considerada positiva cuando más del 5% de los núcleos fueron teñidos.

Las siguientes variables fueron tomadas en cuenta: localización del tumor, estadio clínico, metástasis a ganglios linfáticos, grado histológico, y tinción p53 positiva.

En relación al grado de diferenciación, 28 fueron bien diferenciados, 28 moderadamente diferenciados y seis poco diferenciados, los tumores poco diferenciados presentaron mayor incidencia de recurrencia local o regional. En contraste a los tumores moderadamente diferenciados o bien diferenciados, los tumores poco diferenciados presentaron una sobrevida menor.

La proteína p53 fue detectada en el núcleo de 41.9% de los carcinomas laríngeos y estuvo asociada con un acortamiento de la sobrevida. ⁽²³⁾

8. CONCLUSIONES

En este estudio, no se encontró correlación entre el grado de diferenciación histológica y la expresión de p53, la cual fue variable (débil, moderada, intensa y negativa), sin importar el grado de diferenciación histológica, de modo que la mayor parte (43.47%) de los carcinomas epidermoides bien diferenciados presentaron expresión nuclear intensa +++ de p53. Los resultados de este estudio son similares a los reportados en la literatura.

Debido a que no se encontró relación entre el grado de expresión de p53 y el grado de diferenciación histológica, no es de utilidad para el clínico solicitar la inmunorreacción p53 a todas las biopsias de carcinomas epidermoides de laringe, ya que la expresión de esta proteína no predice el grado de agresividad de este tipo de neoplasias.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Academia Española, Diccionario de la lengua española. 22ª ed. Madrid: Real Academia; 2001.
[http://www.rae.es_apartado "diccionario"](http://www.rae.es_apartado_diccionario)
- 2.- Vinay K, Abul K, Nelson F. Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. Madrid: Elsevier; 2006.
- 3.- Instituto Nacional del Cáncer (NCI). <http://www.nci.nih.gov>
- 4.- Diccionario crítico de dudas inglés – español de medicina. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill interamericana; 2006.
- 5.- Prades J. Cáncer de laringe factores etiológicos y oncogenes. ORL-DIPS 2004; 31(1): 14-32.
- 6.- Diccionario ilustrado de términos médicos. www.igb.es/diccio/p/pe2.htm
- 7.- Boose R, Galleano Z, Walker Z., Prognostic value of the inmunohistochemistry correlation of ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx, Bras Otorrinolaringol, 2008; 74 (6): 855-9.
- 8.- Lozano R, García C, Clemente G. Proteína p53 mediante inmunohistoquímica en el carcinoma epidermoide de laringe. Acta Otorrinolaringol Esp, 2003; 54: 263-268.
- 9.- Tovar G. Mortality trenes in cancer attributable to tobacco in Mexico, Salud Publica Mex. 2002; 44 Suppl 1:S20-8.
- 10.- Rosai J. Surgical Pathology, 9ª ed. USA, Mosby, 2004, vol. I, p 341-346.
- 11.- Instituto de Enfermedades Respiratorias, México, Cáncer de Laringe, Departamento de Otorrinolaringología. www.cudi.edu.mx/aplicaciones/dias_cudi/08.../gabriel_tona.pdf
- 12.- Andrew K. Role of Alcohol and Tobacco in the Etiology of Head and Neck Cancer, Eur J. Cancer 1995; 31:301.
13. - Rodriguez C, Cancer of the larynx in Mexico: Review of 357 cases. Head Neck 1993; May-Jun; 15(3): 197-203.
14. - Bishop J. Molecular themes in oncogenesis. Cell 1991, 64: 235-48.
- 15.- Prades J. Cáncer de laringe factores etiológicos y oncogenes. ORL-DIPS 2004; 31(1): 14-32.

- 16.- O de la Calle M, Romero M, Yague J. Aspectos biológicos y moleculares del oncogen/antioncogen p53. *Inmunologia* 1990; Abril-Junio Vol 9, Núm 2.
- 17.- Bishop W. An immunohistochemical vademecum. Version May 2008, www.e-immunohistochemistry.info
18. - Kazkayasi M. Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 329-335.
19. - Morshed K, Skomra D, Szymanski M. An immunohistochemical study of p53 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska Lublin-Polonia*, 2008; vol. XXI, N2, 25.
20. - Fisher C, Gillet C, Vojtesek B. Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br. J. Cancer* 1994; 69, 26-31.
21. - Anwar K, Nakakuki K. Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. *Int J. Cancer* 1993; 53: 952-956.
- 22.- Barbatis C, Loukas L. P53 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995; 48: M 194-197.
- 23.- Vielba R, Bilbao J, Ispizua A. P53 and Cyclin D1 as Prognostic Factors in Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. *Laryngoscope* January 2003; 113.