

Inmunoexpresión de la oncoproteína p53 en el carcinoma epidermoide de esófago resecado

Juan José González^a, José M. Fernández^a, Lourdes Sanz^a, Francisco Navarrete^a, M. Florentino Fresno^b y José Aza^a

^aServicio de Cirugía General. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. Asturias. ^bServicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. Asturias. España.

Resumen

Introducción. Aunque la supervivencia de los pacientes sometidos a resección por cáncer de esófago ha mejorado discretamente en el mundo occidental, los resultados distan mucho de ser satisfactorios. El estudio de la ploidía o la expresión de ciertos genes como el p53 abren, al menos en teoría, grandes posibilidades terapéuticas y pronósticas. El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de la proteína p53 y su influencia sobre la evolución de los pacientes con carcinoma epidermoide tras exéresis.

Pacientes y método. Estudio retrospectivo (sobre una base de datos prospectiva) de 65 pacientes con cáncer epidermoide de esófago sometidos a resección y válidos para un seguimiento mínimo de 30 meses en los que se determinó por inmunohistoquímica las alteraciones de la expresión de la proteína p53. Los resultados fueron comparados con variables clinicopatológicas habituales y con la supervivencia de los pacientes.

Resultados. Veinticuatro enfermos (36,9%) han sido negativos y los 41 restantes han presentado inmunotinción positiva. Han predominado las resecciones con intención curativa, 36 (55,4%); las lesiones T₃, 24 (36,9%), y T₄, 26 (40%), los ganglios positivos N₁, 35 (53,8%), y las metástasis (M₁, 11) de origen sobre todo ganglionar. En consecuencia, los estadios III (30 enfermos) y IV (11) suponen el 63,1% de la muestra. La inmunotinción no se ha relacionado con ninguna de las variables clinicopatológicas estudiadas. La supervivencia mediana global de la serie ha sido de 16,5 meses (intervalo de confianza [IC] del 95%, 13,7-19,3) y la supervivencia a los 12, los 36 y los 60 meses, del 67,9, el 20,8 y el 12,3%, respectivamente. La expresión de la oncoproteína p53 no ha condicionado la supervivencia, el intervalo libre de enfermedad ni la probabilidad de recurrencia.

Presentado en parte en el XXIV Congreso Nacional de Cirugía, Madrid, noviembre de 2002.

Correspondencia: Dr. J.J. González González.

Trabaj-El Escamplero, s/n. 33191 Las Regueras. Asturias. España.

Correo electrónico: jjglezglez@terra.es

Aceptado para su publicación en abril de 2003.

Conclusiones. Nuestro grupo de pacientes con cáncer de esófago resecado, que consultan con enfermedad muy evolucionada, expresan oncoproteína p53 en 2/3 de los casos. La supervivencia, limitada, y el intervalo libre de enfermedad no se ven influidos por los resultados inmunohistoquímicos.

Palabras clave: Cáncer de esófago. Factores pronósticos. Oncoproteína p53. Inmunohistoquímica.

IMMUNOEXPRESSION OF THE P-53 ONCOPROTEIN IN RESECTED EPIDERMOID CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS

Introduction. Although survival in patients undergoing resection of esophageal cancer has slightly increased in the Western world, the results are far from satisfactory. Study of ploidy or of the expression of certain genes such as the p-53 oncoprotein offer, at least in theory, great therapeutic and prognostic possibilities. The aim of the present study was to evaluate p-53 expression and its influence on outcome in patients with epidermoid carcinoma after resection.

Patients and method. We performed a retrospective study (using a prospective database) of 65 patients with epidermoid cancer of the esophagus who underwent surgical resection and a minimum follow-up of 30 months. Alterations in p-53 protein expression were determined by immunohistochemistry. The results were compared with routine clinicopathological variables and survival.

Results. Immunostaining was positive in 24 patients (36.9%) and negative in the remaining 41. The most frequent intervention was resection with curative intent in 36 patients (55.4%). The most frequent findings were T3 lesions in 24 patients (36.9%) and T4 lesions in 26 (40%), positive lymph nodes (N1) in 35 patients (53.8%), and metastases (M1) in 11, mainly of lymph node origin. Stage III tumors were found in 30 patients and stage IV tumors were found in 11, representing 63.1% of the sample. No relationship was found between immunostaining and any of the variables studied. The median overall survival in the series

was 16.5 months (95% CI, 13.7-19.3) and survival at 12, 36 and 60 months was 67.9%, 20.8% and 12.3%, respectively. Expression of the p-53 oncoprotein did not influence survival, disease-free survival, or the probability of recurrence.

Conclusions. Two out of three patients in the present series, who presented with advanced disease, showed p-53 expression. Neither survival, which was limited, nor disease-free survival was influenced by p-53 expression.

Key words: *Esophageal cancer. Prognostic factors. p53 oncoprotein. Immunohistochemistry.*

Introducción

La supervivencia de los pacientes sometidos a resección por cáncer de esófago ha mejorado en Occidente en los últimos años¹, aunque todavía estamos muy lejos de la comunicada con relativa frecuencia por los autores japoneses² o, esporádicamente, por algún grupo americano³, con cifras recientes espectaculares del 51% a los 5 años, con disección en tres campos. Sin embargo, es obvio que los diagnósticos son tardíos y, en comparación con otros tipos tumorales, los resultados han de ser considerados malos.

Por otra parte, el gran objetivo en el tratamiento de estos pacientes ha sido disponer de una prueba reproducible y de uso fácil capaz de predecir el riesgo de cáncer en grupos seleccionados⁴ o establecer, en el momento del diagnóstico, el pronóstico de los enfermos y la posibilidad de tratamiento⁵. Frente a los factores pronósticos derivados del tumor (epidemiológicos, clinicopatológicos) o del tratamiento aplicado (cirugía con o sin tratamientos complementarios), bien conocidos y estudiados^{6,7}, pero la mayoría sólo disponible una vez obtenida la pieza de exéresis, los estudios genéticos son relativamente recientes. El estudio de la ploidía o la expresión de ciertos genes como el p53 abren desde el punto de vista teórico un gran abanico de posibilidades. p53 es un gen supresor tumoral que contribuye a la preservación de la estabilidad genética en respuesta al daño del ADN⁸.

Nuestro estudio pretende valorar, mediante métodos inmunohistoquímicos de uso cotidiano en los laboratorios de anatomía patológica, la expresión de la proteína p53 como marcador tumoral en un grupo de pacientes con carcinoma epidermoide de esófago tras resección, y determinar su posible influencia evolutiva y pronóstica.

Pacientes y método

Entre enero de 1985 y diciembre de 1996 hemos atendido en nuestro servicio de cirugía a 233 enfermos con cáncer de esófago, 65 de ellos tratados de modo consecutivo, que reunían los criterios establecidos, y que constituyen la base de este trabajo.

Criterios de inclusión

Todos ellos fueron sometidos a resección por un tumor epidermoide de esófago en el período mencionado, sin tratamiento neoadyuvante.

Catorce (21,5%), vía transhiatal; 41 (63,1%), doble vía de Ivor Lewis, y los 10 restantes (15,4%), esofagectomía de tres vías. La disección ganglionar estándar fue en dos campos. El estudio de extensión preoperatorio, de acuerdo con los criterios del servicio, añadió a lo que se suele realizar en cualquier cirugía oncológica mayor, endoscopia, estudio baritado esofagogastrroduodenal, tomografía computarizada de tórax y abdomen, ecografía de abdomen superior, gammagrafía ósea y broncoscopio, en las neoplasias vecinas a la vía aérea. El seguimiento mínimo ha sido de 30 meses. Siempre había bloques de parafina con muestra tumoral suficiente para realizar el estudio inmunohistoquímico.

Método de estudio

Se trata de un estudio doble: por un lado, se lleva a cabo un estudio clínico retrospectivo (aunque los datos han sido extraídos de una base confeccionada de modo prospectivo). En él se estudian variables epidemiológicas, clínicas y patológicas, tanto al ingreso como durante el seguimiento de los pacientes, con fines descriptivos o para establecer una posible relación con la oncoproteína p53. Por otro lado, se ha realizado un estudio inmunohistoquímico, basado en la técnica de la avidina-biotina sobre material fijado en formaldehído tamponado al 10% e incluido en parafina. Brevemente, las secciones de tejido preparadas con PBS fueron incubadas durante una hora con el anticuerpo antiproteína p53, clon DO-7 (Dako). La expresión de p53 se midió de forma semicuantitativa con relación al porcentaje de núcleos tumorales tñidos mediante un microscopio Olimpus BHT. Según el porcentaje de inmunopositividad nuclear se realizó la siguiente clasificación en cuatro apartados: 0: negativa; 1: mínima, menos del 10% de las células con tinción; 2: moderada, del 10 al 50%, y 3: intensa, tinción de más del 50% de las células. No obstante, y con fines estadísticos se aplicaron los criterios de Casey et al⁹ que agrupan los cuatro apartados anteriores en dos patrones: I, negativo (0 y 1), y II, positivo (2 y 3). Las tinciones fueron evaluadas por dos observadores independientes.

Cálculo estadístico

Los datos fueron recogidos y analizados mediante el programa SPSS para Windows, versión 7.5 (Chicago, Illinois, Estados Unidos). Los datos cuantitativos se expresan como medias, medianas, desviación típica y rangos. Las variables categóricas se muestran como porcentajes. Para calcular las diferencias entre variables cuantitativas se llevaron a cabo las pruebas de la U de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis, según los casos. En las variables cualitativas los contrastes de independencia fueron establecidos mediante la prueba de la χ^2 de Pearson, con la corrección de Yates y el test exacto de Fisher, cuando fue necesario.

La supervivencia se ha estimado por el método de Kaplan-Meier, y las curvas comparadas con el test de rangos logarítmicos. La significación se ha ajustado a $\alpha = 0,05$.

Resultados

Los datos epidemiológicos clínicos y patológicos más relevantes se exponen en la tabla 1.

p53 y características clinicopatológicas

El análisis de la posible relación entre los valores de inmunotinción de p53 y otras variables clinicopatológicas ha puesto de manifiesto que la edad ($p = 0,60$), el sexo ($p = 0,29$), la topografía tumoral ($p = 0,43$), la longitud de la tumoración ($p = 1,00$), la diferenciación tumoral ($p = 1,00$), la profundidad lesional (T) aislada ($p = 0,36$) o agrupada T₁ + T₂ frente a T₃ + T₄ ($p = 0,22$), afección ganglionar (N) ($p = 0,61$) y número ($p = 0,18$) y estadificación

TABLA 1. Datos clínicopatológicos (n = 65)

	Número (%)
Edad (años)	
Media, 56,6 (DE, 8,2)	
Límites, 39-63	
Sexo	
Varón	62 (95,4)
Mujer	3 (4,6)
Topografía	
1/3 superior	6 (9,2)
1/3 medio	43 (66,2)
1/3 inferior	15 (23,1)
Múltiple	1 (1,5)
Longitud	
Media, 5,4 (DE, 2,3). Mediana, 5	
Límites, 0,5-11	
Intención exérésis	
Curativa	36 (55,4)
Paliativa	29 (44,6)
Diferenciación tumoral	
Buena	27 (41,5)
Moderada	22 (33,8)
Mala	16 (24,6)
Clasificación pTNM	
T ₁	2 (3,1)
T ₂	13 (20,0)
T ₃	24 (36,9)
T ₄	26 (40,0)
N ₀	30 (46,2)
N ₁	35 (53,8)
M ₀	54 (83,1)
M ₁	11* (16,9)
Ganglios afectados (n = 35)	
1	21 (60,0)
2	5 (14,3)
3	3 (8,6)
4	2 (5,7)
≥ 5	4 (11,4)
Estadios	
I	2 (3,1)
IIA	13 (20,0)
IIB	9 (13,8)
III	30 (46,2)
IV	11 (16,9)

*M₁ ganglionar: 10 (antiguo N₃).

tumoral aislada ($p = 0,24$) o agrupada, I + IIA + IIB frente a III + IV ($p = 0,29$) no se relacionan con el patrón inmunoquímico obtenido.

Expresión de p53 y supervivencia

La expresión inmunohistoquímica de la oncoproteína p53 se expone en la tabla 2. En la mayoría de las muestras la inmunotinción fue positiva. De los 38 pacientes sometidos a resección con intención curativa, 26 presentaron recidiva y fallecieron por el tumor. Siete fallecieron por otras causas sin recidiva y cinco estaban vivos en el momento de cerrar el estudio. Los 27 enfermos en los que la cirugía se juzgó insuficiente fallecieron (26 por progresión y uno por otras causas). La supervivencia mediana global de la serie (fig. 1) ha sido de 16,5 meses (intervalo de confianza [IC] del 95%, 13,7-19,3), con supervivencias a los 12, los 36 y los 60 meses del 67,9, el 20,8 y el 12,3%, respectivamente.

La expresión de la oncoproteína p53 no ha modificado la supervivencia de los pacientes ($p = 0,57$; fig. 2); no

TABLA 2. Inmunotinción de p53⁹

P53	Inmunotinción	Tinción células (%)	Pacientes; n (%)
(-)	Negativa	0	21 (32,3)
24 (36,9%)	Mínima	< 10	3 (4,6)
(+)	Moderada	10-50	7 (10,8)
41 (63,1%)	Intensa	> 50	34 (52,3)

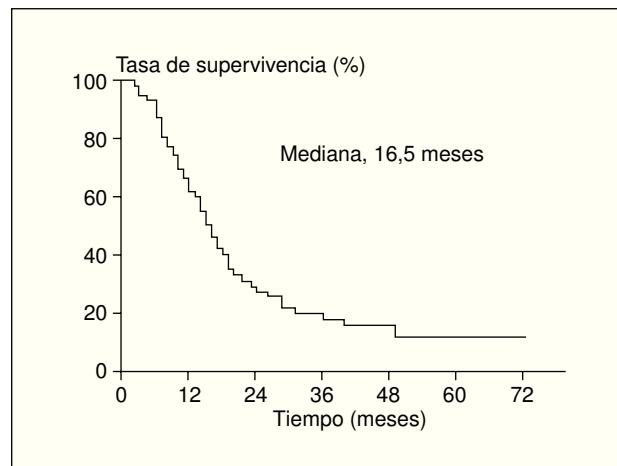


Fig. 1. Supervivencia global.

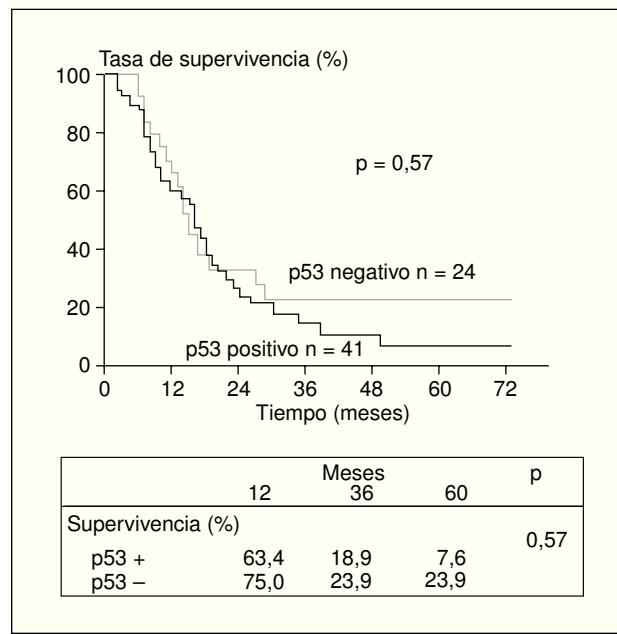


Fig. 2. Supervivencia según oncoproteína p53.

obstante, un estudio pormenorizado de los datos permite observar un mejor comportamiento del grupo con oncoproteína negativa (supervivencia a los 12, los 36 y los 60 meses del 75,0, el 23,9 y el 23,9%, respectivamente) frente al que presentó inmunotinción positiva (el 63,4, el

18,9 y el 7,6% para los mismos plazos). Sin embargo, las medianas son prácticamente coincidentes (mediana de supervivencia de 16,5 meses [IC del 95%, 13,7-19,3] en ausencia de tinción, y mediana de 17,0 meses [IC del 95%, 12,8-21,2] cuando los resultados fueron positivos).

La supervivencia libre de enfermedad para el grupo de resección con intención curativa tampoco se ha modificado en función de la inmunotinción obtenida ($p = 0,58$). Así, la mediana en inmunotinción negativa fue de 26,4 meses (IC del 95%, 16,3-36,5), frente a 40,2 meses (IC del 95%, 17,6-62,9) para el grupo positivo.

La probabilidad de recurrencia a los 12, los 36 y los 70 meses ha sido del 40, el 57 y el 100%, respectivamente, en ausencia de tinción y del 30, el 74 y el 81%, cuando la tinción fue positiva. No obstante, el pequeño tamaño muestral obliga a tomar con precaución estos datos.

Discusión

Nuestros pacientes siguen, en cuanto a epidemiología y características, clinicopatológicas el patrón habitual. El empleo de la inmunohistoquímica, que detecta básicamente p53 mutada, con una vida media más prolongada que la p53 nativa, está ampliamente avalado en la bibliografía y permite el uso de gran número de anticuerpos¹⁰. Un total de 41 pacientes (63,1%) en nuestro estudio expresaba la oncoproteína, cifras que son superponibles a las publicadas por otros grupos^{11,12}.

La acumulación nuclear de la oncoproteína p53 no se ha relacionado con las variables epidemiológicas, clínicas y patológicas estudiadas, un hecho quizás llamativo y decepcionante, pero no nuevo; así Lam et al¹¹ y Nozoe et al¹³ han confirmado hallazgos idénticos. De estos resultados quizás sorprenda más la falta de relación con el estadio de la enfermedad, aunque esté bien documentada¹⁴. Sin embargo, Ikeda et al¹⁵ y otros autores^{16,17} sí encontraron relación directa entre la inmunotinción y la afección ganglionar. También se han hallado resultados controversiosos para metástasis^{18,19}. Factores tan dispares como la técnica empleada o el tamaño muestral quizás expliquen estos hechos.

La supervivencia de nuestros pacientes sometidos a resección está en la línea de series comparables, mejores que los de Lam et al¹¹, pero peores que los de otros autores^{7,20,21}. Al establecer relaciones con la oncoproteína p53 la supervivencia no se ha modificado en función del grado de inmunotinción, un resultado coincidente con otros publicados²²⁻²⁴; pero una vez más los trabajos son discrepantes, así ciertos autores^{19,25} aprecian, como cabría esperar, que la inmunopositividad es un mal índice pronóstico, y Kuwahara et al²⁶ introducen un hecho adicional: el estadio. Sus pacientes con estadios menos evolucionados (I y II) tienen mal pronóstico cuando la oncoproteína es positiva; mientras que en los estadios III y IV carece de influencia. Es llamativo y quizás pueda abrir nuevas líneas de investigación el trabajo en sangre de Shimada et al²⁷, en el que los títulos elevados de anticuerpos p53 se muestran como un buen determinante de recidiva y pronóstico.

En conclusión, a la luz de nuestros datos y los de la bibliografía, el análisis inmunohistoquímico de la oncopro-

teína p53 en pacientes con cáncer epidermoide de esófago resecable es una técnica fácil, reproducible y aplicable incluso en material de biopsia; sin embargo, no se ha demostrado que tenga valor predictivo y, en consecuencia, puede intuirse que el estudio de material de biopsia preoperatorio no serviría para plantear la actitud terapéutica que se debe tomar. Por ello, su empleo ha de ser considerado, por ahora, complementario.

Bibliografía

- Hofstetter W, Swisher SG, Correa AM, Hess K, Putnam JB Jr, Ajani JA, et al. Treatment outcomes of resected esophageal cancer. *Ann Surg* 2002;236:376-84.
- Osugi H, Takemura M, Takada N, Hirohashi K, Kunoshita H, Higashino M. Prognostic factors after oesophagectomy and extended lymphadenectomy for squamous oesophageal cancer. *Br J Surg* 2002;89:909-13.
- Altorki N, Kent M, Ferrara C, Port J. Three-field lymph node dissection for squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Surg* 2002;236:177-83.
- Fagundes RB, Mello CR, Tollens P, Putten AC, Wagner MB, Moreira LF, et al. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2001;14:185-90.
- Kishi K, Doki Y, Miyata H, Yano M, Yasuda T, Monden M. Prediction of the response to chemoradiation and prognosis in oesophageal squamous cancer. *Br J Surg* 2002;89:597-603.
- Sanz L, González JJ, Miyar A, Navarrete F, Martínez E. Pattern of recurrence after esophageal resection for cancer. *Hepatogastroenterol* 1999;46:1393-7.
- Parrilla Paricio P, García Marcilla JA, Martínez de Haro L, Ortiz Escandell MA, Castellanos Escrig G. Factores pronósticos del cáncer de esófago resecado. Análisis uni y multivariante de 107 casos. *Cir Esp* 1994;55:196-200.
- Caelles C, Helmburg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994;370:220-3.
- Casey G, López ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M, et al. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 1996;13: 1971-81.
- Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant forme. *EMBO J* 1990;9:1595-602.
- Lam KY, Law S, Tin L, Tung PHM, Wong J. The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2060-8.
- Sarbia M, Gabbert HE. Modern pathology: prognostic parameters in squamous cell carcinoma of the esophagus. Recent results. *Cancer Res* 2000;155:15-27.
- Nozoe T, Kuwano H, Toh Y, Watanabe M, Kitamura M, Sugimachi K. Significance of p53 protein expression in growth pattern of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 1998;5:1119-23.
- Ikeguchi M, Oka S, Gomio Y, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Combined analysis of p53 and retinoblastoma protein expressions in esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2000;70:913-7.
- Ikeda G, Isaji S, Chandra Das B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;86:1396-405.
- Goukon Y, Sasano H, Nishihira T, Nagura H, Mori S. p53 overexpression in human esophageal carcinoma: A correlation with tumor DNA ploidy and two parameter flow cytometric study. *Anticancer Res* 1994;14:1305-12.
- Wang DY, Xiang YY, Tanaka M, Li XR, Li JL, Shen Q, et al. High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis. *Cancer* 1994;74:3089-96.
- Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, et al. Expression of p21^{WAF1/Cip1} in the p53-dependent

- pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2445-9.
- 19. Hashimoto N, Tachibana M, Dhar DK, Yoshimura H, Nagasue N. Expression of p53 and RB proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus: their relationship with clinicopathological characteristics. *Ann Surg Oncol* 1999;6:489-94.
 - 20. Zhang DW, Cheng GY, Huang GJ, Zhang RG, Liu XY, Mao YS, et al. Operable squamous esophageal cancer: Current results from the East. *World J Surg* 1994;18:347-54.
 - 21. Estes NC, Stauffer J, Romber M, Thomas JH, Jewell WR, Hermreck A. Squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am Surg* 1996;62:573-6.
 - 22. Wang LS, Chow KC, Chi KH, Liu CC, Li WY, Chiu JH, et al. Prognosis of esophageal squamous cell carcinoma; analysis of clinicopathological and biological factors. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1933-40.
 - 23. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, et al. P21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53 or Rb. *Ann Surg Oncol* 1999;6:481-8.
 - 24. Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002;94:2874-81.
 - 25. Heier SK, Rothman KA, Heier LM, Rosenthal WS. Photodynamic therapy for obstructing esophageal cancer: light dosimetry and randomized comparison with Nd:YAG laser therapy. *Gastroenterology* 1995;109:63-72.
 - 26. Kuwahara M, Hirai T, Yoshida K, Yamashita Y, Hihara J, Inoue H, et al. P53, p21 (Waf1/Cip1) and cyclin D1 protein expression and prognosis in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 1999;12:116-9.
 - 27. Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Shiratori T, et al. Prognostic significance of serum p53 antibody in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery* 2002;132:41-7.