

EXPRESION DE p53 Y DE bcl-2 EN ADENOMAS Y CARCINOMAS COLORRECTALES

ALBERTO S. SUNDBLAD, ROSA L. CHUMBITA, JORGE A. ZOPPI

Hospital Privado de Comunidad, Mar del Plata

Resumen Trabajos recientes han asociado a los genes p53 y bcl-2 en el proceso de la transformación neoplásica. Dado que la secuencia adenoma-carcinoma en el colon y recto es un buen modelo natural de carcinogénesis, consideramos de interés analizar la expresión de bcl-2 y de p53 en estas neoplasias. Se estudiaron 73 pólipos adenomatosos (adenomas) y 60 adenocarcinomas de colon y recto. De los adenomas 16 tenían displasia leve, 27 moderada, 15 severa y en 15 había carcinoma focal. Todos los adenocarcinomas sobrepasaban la muscular propia y eran moderadamente diferenciados. La expresión de los genes se analizó por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo bcl-2 de Dako y el anticuerpo p53 de Novocastra. Los resultados mostraron que hubo acumulación de proteína p53 en 34/73 (46%) del total de los adenomas y en 47/60 (78%) de los adenocarcinomas ($p = 0,0001$). El conjunto de adenomas con displasia mostró una reactividad de 26/58 (45%), similar a 8/15 (53%, $p = 0,4$) de los adenomas con carcinoma focal, aunque diferente a la de los adenocarcinomas, 47/60 (78%, $p = 0,0001$). Con referencia al bcl-2, 53/73 (73%) del total de los adenomas lo expresaban mientras que en los adenocarcinomas la expresión se observó en 14/60 (23%, $p = 0,0000$). En los adenomas sin carcinoma se encontró una expresión de 47/58 (81%) que comparada con la observada en los adenomas con carcinoma focal, 6/15 (40%), y con adenocarcinoma, 14/60 (23%), mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,001$ y $p = 0,0000$ respectivamente). Cuando se analizó la frecuencia de expresión de los dos genes estudiados en las diferentes neoplasias se observó entre ellos una relación inversa. Este trabajo permite concluir que la expresión de bcl-2 es un evento temprano en la carcinogénesis y que es reemplazado por la mutación de p53 al progresar la neoplasia.

Palabras clave: carcinoma colorrectal, pólipos, p53, bcl-2, inmunohistoquímica

La transformación neoplásica es producto de múltiples alteraciones genéticas en cascada. Estas alteraciones incluyen activación de oncogenes por mutación, translocación o amplificación, e inactivación de genes supresores por delección o mutación de punto¹. Uno de los genes que con mayor frecuencia se encuentra alterado en las neoplasias humanas es el p53^{2, 3}. Este gen, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, codifica una fosfoproteína nuclear que participa en la regulación del ciclo celular⁴. Las diversas

mutaciones que puede sufrir dan como producto proteínas funcionalmente ineficientes para regular la proliferación celular resultando en un aumento de la actividad proliferativa⁵⁻⁷ y de este modo en una acción oncogénica⁴. El producto de estas mutaciones puede ser detectado por medio de la inmunohistoquímica^{8, 9}.

Por su parte el proto-oncogen bcl-2 ha sido implicado en el funcionamiento de la apoptosis¹⁰. La apoptosis sería un mecanismo de importancia en el desarrollo de los tumores pues su crecimiento sería producto del balance entre la actividad proliferativa y la eliminación de células anómalas¹². La translocación (t14:18) del gen bcl-2, observada inicialmente en los linfomas B, produce sobreproducción de la proteína bcl-2 que

Recibido: 3-I-1997

Aceptado: 3-IX-1997

Dirección postal: Dr. Alberto S. Sundblad, Hospital Privado de Comunidad, Córdoba 4545, 7600 Mar del Plata, Argentina

induce el bloqueo de la apoptosis¹³. Hay varios estudios realizados en tumores sólidos¹⁴⁻¹⁸; sin embargo, debido a que el gen bcl-2 probablemente es regulado por los receptores de estrógenos¹⁹ su expresión en órganos hormono-dependientes, tales como mama, ovario, endometrio, etc. se vería influida por la presencia de receptores hormonales.

Por otra parte, recientes trabajos han asociado a los genes p53 y bcl-2 en el proceso de apoptosis^{20, 21} siendo sus acciones contrapuestas.

Dado que la secuencia adenoma-carcinoma en el colon y en el recto es un buen modelo natural de carcinogénesis y que las células comprometidas en estas proliferaciones no son hormono-dependientes, consideramos de interés estudiar la expresión de bcl-2 y de p53 en una serie de carcinomas colorrectales y sus precursores.

Material y métodos

Se estudiaron 73 pólipos adenomatosos (adenomas tubulares), 49 de colon y 24 de recto, correspondientes a 61 pacientes. En 12 de ellos se estudiaron 2 adenomas. Treinta y cinco habían sido obtenidos por resecciones endoscópicas y 38 estaban en piezas quirúrgicas reseadas por carcinoma. Pertenecían a 32 hombres y a 29 mujeres con una edad promedio de 69,5 años. El número y el grado de displasia de los adenomas fueron: 16 con displasia leve, 27 con displasia moderada, 15 con displasia severa y 15 con carcinoma focal que invadía los haces de la muscular de la mucosa de la cabeza del adenoma pero dejando el tallo libre^{22, 23}. La serie se completó con 60 adenocarcinomas, 43 de colon y 17 de recto, pertenecientes a 60 pacientes, de los cuales 24 eran hombres y 36 mujeres. La edad promedio fue de 70,3 años. Todos eran piezas de resecciones quirúrgicas, invadían hasta la subserosa y eran moderadamente diferenciados.

En todos los casos el tejido había sido fijado en formol buffer al 10% y los cortes teñidos con hematoxilina eosina. El grado de displasia de los adenomas fue asignado de común acuerdo entre los tres autores quienes examinaron los casos con un microscopio de múltiple cabezal. Para inmunohistoquímica se utilizó el anticuerpo bcl-2 de Dako (clon 124) diluido 1:100 y para la proteína p53 el anticuerpo de Novocastra (clon DO7) diluido también 1:100. Previamente los cortes fueron puestos en un horno de microondas con buffer de citrato²⁴. El anticuerpo primario fue incubado durante 18-20 hs a 4°C. Luego se aplicó un secundario biotinilado 1:300 durante 45 minutos seguido de complejo ABC 1:200 durante 45 minutos. Para el revelado se utilizó diaminobenzidina. La evalua-

ción de la reactividad de las neoplasias se hizo contando cien células en cinco campos a gran aumento (X 400). Los tumores que mostraron coloración citoplasmática en más del 10% de las células con el anticuerpo bcl-2 fueron considerados positivos. El mismo porcentaje de tinción nuclear fue usado para evaluar la reactividad al anticuerpo p53.

Para el estudio estadístico se utilizó el test del chi cuadrado para tablas de contingencia de 2 x 2.

Resultados

p53. Hubo acumulación de proteína p53 en 34/73 (46%) del total de los adenomas y en 47/60 (78%) de los adenocarcinomas ($p = 0,0001$). El conjunto de adenomas con displasia mostró una reactividad en 26/58 (45%), similar a la de los adenomas con carcinoma focal, 8/15 (53%), aunque diferente a la de los adenocarcinomas ($p = 0,4$ y $p = 0,0001$ respectivamente). La reactividad de las diferentes lesiones puede observarse en la Tabla 1.

bcl-2. La inmunohistoquímica mostró que 53/73 (73%) del total de los adenomas expresaba bcl-2 mientras que en los adenocarcinomas la expresión se observó en 14/60 (23%, $p = 0,0000$). Al agrupar los adenomas de acuerdo al grado de displasia y a la presencia de carcinoma focal se observó una frecuencia decreciente de reactividad a la proteína bcl-2 (Tabla 2). Cuando se fusionaron los adenomas con los tres grados de displasia en un solo grupo se encontró una expresión en 47/58 (81%) que comparada con la observada en los adenomas con carcinoma focal, 6/15 (40%), y con adenocarcinoma, 14/60 (23%), mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,001$ y $p = 0,0000$ respectivamente). Cuando se

TABLA 1.- Expresión de p53 en adenomas y adenocarcinoma

Tipo de neoplasia	n	%
Adenoma con displasia leve	7/16	44*
Adenoma con displasia moderada	10/27	37*
Adenoma con displasia severa	9/15	60*
Adenoma con carcinoma focal	8/15	53@
Adenocarcinoma	47/60	78#

vs @ $p = 0,4$ * vs# $p = 0,0001$

TABLA 2.- Expresión de bcl-2 en adenomas y adenocarcinoma

Tipo de neoplasia	n	%
Adenoma con displasia leve	11/16	69*
Adenoma con displasia moderada	24/27	89*
Adenoma con displasia severa	12/15	80*
Adenoma con carcinoma focal	6/15	40@
Adenocarcinoma	14/60	23#

*vs@ p = 0,001 *vs# p = 0,0000

TABLA 3.- Expresión de bcl-2 y p53 en todos los adenomas y en adenocarcinoma

Proteína	Adenomas	Adenocarc.	Valor de p
bcl-2	53/73	14/60	0,0000
p53	34/73	47/60	0,0001

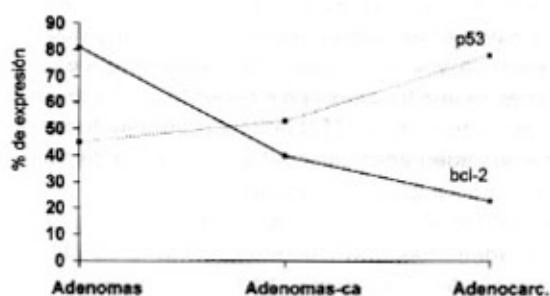
Adenomas y adenocarcinoma
Expresión de bcl-2 y de p53

Figura 1.

analizó la frecuencia de expresión de los dos genes estudiados en las diferentes neoplasias se observó entre ellos una relación inversa (Tabla 3 y Fig. 1).

Discusión

El gen p53 codifica una proteína que participa en un sinnúmero de procesos celulares²⁵, algunos de los cuales se relacionan con la función del gen bcl-2²⁶. Bajo ciertas circunstancias el gen p53 puede sufrir una mutación con sustitución de un codón, dando por resultado la síntesis de una

proteína con un aminoácido distinto al de la proteína normal y cuya función es anómala. Debido a que la vida media de la proteína mutada es mayor que la de la proteína normal, aquella se acumula en el núcleo lo que permite, mediante anticuerpos apropiados, su detección por inmunohistoquímica²⁷. En la presente serie se observó una expresión paralela al grado de transformación neoplásica de las lesiones. El 45% de los adenomas mostraron acumulación de proteína p53, cifra considerablemente mayor que el 16% relatado por otros autores²⁰. De los 15 adenomas con carcinoma focal el 53% eran reactivos al p53, porcentaje semejante al 60% de otra serie²⁶, mientras que esa reactividad aumentó al 78% en nuestro grupo de adenocarcinomas, algo más frecuente que 65% y 42% constatado en otros trabajos^{20, 26}.

Por su parte el proto-oncogen bcl-2, inicialmente estudiado en células hematopoyéticas, ha mostrado sobreexpresión en diversos tumores sólidos¹⁴⁻¹⁸. El alto índice de reactividad en neoplasias hormonodependientes, tales como mama, ovario y endometrio es atribuido a la asociación con la presencia de receptores estrogénicos^{14, 15, 19, 28}. En otros epitelios su expresión es variable, y dentro del tubo digestivo, se observó aumento de la proteína bcl-2 en displasias y en adenocarcinomas gástricos^{16, 29}. En colon y recto la secuencia adenoma-carcinoma brinda un modelo natural de carcinogénesis para el estudio de la expresión de genes comprometidos en este proceso. La presente serie mostró una cifra decreciente de reactividad a bcl-2 paralela al aumento de atipia. Los adenomas en general tuvieron 81% de expresión, cifra similar al 82% y 86% de series previas^{9, 20}. Cuando los adenomas presentaban carcinoma focal el porcentaje de adenomas con expresión de bcl-2 descendió al 40%, proporción mayor que el 28% observado por otros autores²⁶. Sólo el 23% de los carcinomas avanzados de nuestra serie expresaron bcl-2, valor similar al 34% de una serie anterior²⁶ pero considerablemente menor que el 67% referido en otra publicación²⁰.

Esta relación inversa entre la expresión de ambos genes no sólo ha sido observada en cáncer de colon sino también en otras neoplasias^{14, 21, 30}. Podría representar funciones opuestas de ambos genes²¹ o que la expresión de bcl-2 sea inhibida por la mutación de p53. Un efecto de

estas funciones contrapuestas es que un aumento de la actividad proliferativa en las neoplasias frecuentemente se asocia a alta expresión de p53 y baja expresión de bcl-2²¹. En este trabajo como en series anteriores se pudo observar que la expresión de bcl-2 es un evento temprano en la carcinogénesis colorrectal y que tiende a disminuir cuando más tardíamente aparece la mutación de p53.

Summary

Expression of p53 and bcl-2 in adenomas and colorectal carcinoma

Recent publications have associated p53 and bcl-2 genes in the process of neoplastic transformation. As the colonic adenoma-carcinoma sequence is an adequate natural model for carcinogenesis, it was considered interesting to analyze the expression of bcl-2 and p53 in these neoplasms. Seventy three adenomatous polyps (adenomas) and 60 adenocarcinomas of the colon and rectum were studied. Adenomas showed mild dysplasia in 16, moderate in 27, severe in 15 and focal carcinoma in the remaining 15. Adenocarcinomas surpassed the deep muscle layer in every case and were moderately differentiated. The studied gene expression was analyzed immunohistochemically using antibodies bcl-2 from Dako and p53 from Novocastra, both at a 1:100 dilution. Cytoplasmic stain for bcl-2 and nuclear stain for p53 above 10% of the cells were considered positive for each gene respectively. Results showed that there was accumulation of p53 protein in 26/58 (45%) adenomas with different grades of dysplasia. This result is similar to the reactivity found in adenomas with focal carcinoma where 8/15 (53%, $p = 0.4$) were positive but different from adenocarcinomas which were positive in 47/60 (78%, $p = 0.0001$). Regarding bcl-2, positivity was found in 53/73 (73%) of all the adenomas whereas adenocarcinoma showed expression in 14/60 (23%, $p = 0.0000$). When adenomas were grouped according to their degree of dysplasia and the existence of focal carcinoma, a diminishing frequency of reactivity for bcl-2 was found and when adenomas with three different grades of dysplasia were fused together, 47/58 (81%) were positive and this was compared with adenomas having focal carcinoma, 6/15 (40%) and with adenocarcinoma, 14/60 (23%), they showed significant differences ($p = 0,001$ and $p = 0,0000$ respectively). The analysis of the fre-

quency of expression for both genes studied in the different lesions described yielded an inverse relation between them. This study allows the conclusion that the expression of bcl-2 is an early event in carcinogenesis and that it is replaced by mutation of p53 as the neoplastic change progresses.

Bibliografía

1. Vogelstein B, Kingler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-41.
2. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
3. Harris AL. Mutant p53- The commonest genetic abnormality in human cancer? Editorial. *J Pathol* 1990; 162: 5-6.
4. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 69: 409-16.
5. Lane DP. p53 and human cancers. *Br Med Bull* 1994; 50: 528-99.
6. Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993; 262: 1644-5.
7. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 1992; 70: 937-48.
8. Jacquemier J, Moles JP, Penault-Llorca F, Adelaide J, Torrente M, Viens P, et al. p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results. *Br J Cancer* 1994; 69: 846-52.
9. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alterations in human cancer: a review. *Int J Cancer*. 1994; 57: 1-9.
10. Hockenbery DM: The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 1992; 4: 413-20.
11. Korsmayer SJ: Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surveys* 1992; 15: 105-18.
12. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
13. Weiss LM, Chang KL. The bcl-2 proto-oncogene. *Appl Immunohistochem* 1993; 1: 163-5.
14. Diebold J, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfler K, Schmidt M. et al. bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian cancer. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 341-9.
15. Doglioni C, Dei-Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of bcl-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular reference to oestrogen receptor status. *Virchows Arch* 1994; 424: 47-51.
16. Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer* 1995; 75: 2209-13.

17. Pezzella F, Turley H, Kuzu Y et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-4.
18. Pilotti S, Collini P, Del Bo R, Cattoretti G, Pierotti MA, Rilke F. A novel panel of antibodies that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 1054-64.
19. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F et al. Harris AL, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-9.
20. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Muller C, Dopfler K, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996; 77: 255-64.
21. Nakamura S, Akazawa K, Kinukawa N, Yao T, Tsuneyoshi M. Inverse correlation between the expression of bcl-2 and p53 proteins in primary gastric lymphoma. *Hum Pathol* 1996; 27: 225-33.
22. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*, Vol I, S. Louis, Mosby, 1996; p. 765.
23. Konishi F, Morson B. Pathology of colorectal adenomas. A colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 1982; 35: 830-41.
24. Pellicer EM, Sundblad A. Recuperación de antígenos por horno de microondas. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 129-32.
25. Batsakis JG, El-Naggar AK. p53: fifteen years after discovery. *Adv Anat Pathol* 1995; 2:71-88.
26. Kaklamanis L, Savage A, Mortensen N, Tsiotos P, Doussis-Augnostopoulou I, Biddolphs S, et al. Early expression of bcl-2 protein in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal neoplasia. *J Pathol* 1996; 179: 10-4.
27. Bass IO, Mulder J, Offerhaus GJA, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 1994; 172: 5-12.
28. Zheng W, Cao P, Zheng M, Kramer EE, Godwin TA. p53 overexpression and bcl-2 persistence in endometrial carcinoma: comparison of papillary serous and endometrial subtypes. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 167-74.
29. Lauwers GY, Scott GV, Hendricks J. Immunohistochemical evidence of aberrant bcl-2 protein expression in gastric epithelial dysplasia. *Cancer* 1994; 73: 2900-4.
30. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, et al. The bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499-504.

*To see a world in a grain of sand
 And heaven in a wild flower
 Hold infinity in the palm of your hand
 And eternity in one hour*

Ver un mundo en un grano de arena
 Y un paraíso en una flor silvestre
 Sostener el infinito en la palma de tu mano
 Y contener la eternidad en una hora

William Blake (1757-1827)

Auguries of innocence