

LA MUTACION DE P53 EN LOS TUMORES VESICALES. SU VALORACION MEDIANTE IHQ Y PCR

N. Hannaoui, N. Erill*, A. Colomer*, E. Vicente, A. Peña, J. Saenz De Cabezón, M. Verdú**, R. Román*, E. Condom**, X. Puig**, JM Banús. ICUN, Institut Català d Urologia i Nefrologia. (*)BIOPAT Biopatologia Molecular, (**) Histopat Laboratoris, Barcelona.

El carcinoma transicional de vejiga representa el 80% de los tumores vesicales. La expresión alterada de p53 en los tumores vesicales está correlacionada con la progresión y peor pronóstico de la enfermedad. El gen TP53 es un supresor localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y se encuentra alterado en muchos tumores de mama, cerebro y leucemias, entre otros. En estas neoplasias, la mutación de TP53 está relacionada con la agresividad. Hemos estudiado alteración de este gen, mediante IHQ y PCR, en los tumores vesicales, y su correlación con los estadios y grados del tumor.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma transicional TCC (Transitional Cell Carcinoma) es el tipo histológico más común entre los tumores de vejiga, y representa aproximadamente un 80% de los tumores vesicales diagnosticados. Una de las principales características de los TCC es la elevada incidencia de tumores multifocales y recurrentes. En general, los tumores vesicales son de buen pronóstico, con una tasa de supervivencia a los 5 años del 60%, pero un 10-15% de ellos puede evolucionar a tumor vesical profundo o cursar con enfermedad metastásica. Si bien los mecanismos que intervienen en la carcinogénesis no han sido totalmente identificados, numerosas alteraciones cromosómicas y genéticas parecen estar implicadas en el desarrollo y progresión de estos tumores. Entre estas se han descrito deleciones o monosomía del cromosoma 9, trisomía del cromosoma 7, mutaciones puntuales y pérdidas alélicas en el gen TP53 y mutaciones en el gen H-RAS. La proteína P53, implicada en el control del ciclo celular y la preservación de la integridad genómica, juega un papel clave en la carcinogénesis. La inactivación de la proteína p53, mayoritariamente mediante mutaciones puntuales en los dominios evolutivamente conservados del gen, se ha descrito en aproximadamente el 50% de las neoplasias, incluidos los tumores de vejiga. En este tipo de tumores, numerosos estudios han sugerido la posibilidad de que la proteína p53 juegue un papel importante en la evolución de los pacientes. En general, las alteraciones de p53 han sido claramente asociadas a progresión y mal pronóstico, si bien algunos estudios no le confieren ningún valor pronóstico adicional al grado o al estadije. Estas discrepancias podrían ser debidas a diferencias metodológicas entre los diferentes estudios. La mayoría de ellos analizan la sobreexpresión nuclear de la proteína mediante inmunohistoquímica (IHQ), mientras que otros identifican la presencia de mutaciones en el gen mediante secuenciación.

MÉTODO

Pacientes y tejidos. Se realizó un estudio prospectivo de 72 pacientes (7 mujeres y 65 varones), con edad media de 68 años (9,9) que fueron operados y tratados en nuestro centro (ICUN, Barcelona) entre mayo de 1999 y mayo 2002. El seguimiento medio ha sido de 4 años. El estudio histopatológico se realizó en un único laboratorio (HISTOPAT), según los criterios de los sistemas WHO y TNM. La distribución por grados fue la siguiente: 6 pacientes con grado I (pTa:5, pT1:1), 39 pacientes grado II (pTa:20, pT1:17, pT2:2) y 27 con grado III (pTa:2, pT1:12, pT2:4:13). En pacientes en los que se trataron más de un tumor recurrente, se consideró el grado y tipo histológicos más elevados. En todos los casos, muestras correspondientes a tejido normal y tumoral del paciente fueron procesadas rutinariamente en un mismo laboratorio mediante fijación en formol tamponado e inclusión en parafina.

Anticuerpos e inmunohistoquímica. El análisis por IHQ se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal murino DO-7, a una dilución de 1:2000 (200 ng/mL), mediante la técnica de la avidina-biotina inmunoperoxidasa. La recuperación antigénica se realizó con tampón citrato 0.1M pH 6 en secciones de 4-µm de tejido parafinado. Se utilizó anticuerpo secundario biotinilado de caballo (dilución 1:100). El complejo avidina-biotina (Vectastain ABC PK 4000 ST) se aplicó a una dilución 1:100 y se reveló con 3,3'-diaminobencidina.

Microdissección y extracción del DNA. De cada muestra (tanto normal como tumoral) se utilizaron diez secciones de 5-µm de grosor a partir de las que se microdisseccionó la zona de interés. La extracción de DNA se realizó mediante el método de fenol-clorofórmol tras digestión con proteinasa K. Todas las reacciones de amplificación se realizaron a partir de 200 ng de DNA en termocicladores GeneAmp PCR System 2400 (PE Biosystems, Foster City, CA) y se testaron en geles de agarosa al 2%. El control de calidad del DNA extraído se realizó mediante amplificación de un fragmento de 268pb del gen de la β-globina humana.

PCR-SSCP y secuenciación. Se amplificaron los exones 4 a 8 del gen TP53 en cinco reacciones independientes. El análisis mutacional se realizó mediante SSCP en geles no desnaturantes de poliacrilamida (GeneGel Excel 12.5/24, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), en dos condiciones diferentes, y el revelado final se realizó con nitrato de plata. Las muestras que mostraron una movilidad anómala fueron retestadas para verificar los resultados y, una vez confirmados, las bandas eluidas del gel se reamplificaron y secuenciaron (ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystems, Warrington, UK).

	Grado				
	I	II	III	Total	
pT	pTa	5	20	2	27
	pT1	1	17	12	30
	pT2	0	2	9	11
	pT3-4	0	0	4	7
Total	6	39	27	72	

Tabla 1: Distribución de grado y estadio.

	Mutación	Total		
		Ausencia	Presencia	
IHQ	<20	44	1	45
	>20	6	21	27
Total		50	22	72

P < 0.001 (Test Chi-Cuadrado χ^2)
Tabla 2: Distribución de positividad inmunohistoquímica y mutación.

Caso	Exon	Codon	Cambio	Tipo	IHQ
28	5	131	AACa AGC	M	40
39	5	139	AAG a GAG	M	60
74	5/8	158/280	CGC a TGC/AGA a ACA	MM	75
52	5	180	GAG a AAG	M	40
90	7	248	CGG a TGG	M	60
64	7	258	GAA a AAA	M	30
3	7	258	GAA a GTA	M	75
46	8	262	GGT a GTT	M	70
98	8	262	GGT a GTT	M	25
75	8	271	GAG a AAG	M	60
70	8	273	CGT a CAT	M	85
51	8	274	GTT a CTT	M	40
57	8	274	GTT a GAT	M	35
91	8	279	GGG a AGG	M	65
69	8	285	GAG a AAG	M	90
89	8	281	AAG a AAC	M	25
59	4	.	Del 13 nt	F	80
47	5/7	1236	Ins TTTAC a TGC	FIM	60
18	Intron 4	.	C a T	F	90
72	5	?	No caracterizada		40

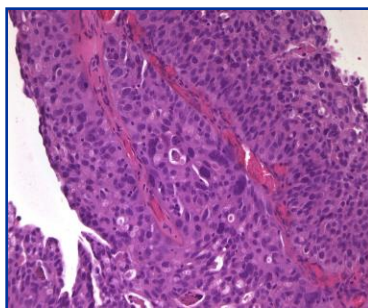
Tabla 3: Descripción de mutaciones encontradas.
Correlación con IHQ, grado y estadio.
M: Missense; cambio de sentido;
F: Frameshift; alteración de la pauta y
S: Silente

CONCLUSIONES

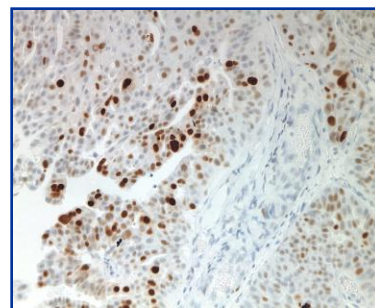
Nuestros resultados indican que la presencia de positividad nuclear es altamente sugestiva de mutación, la presencia de algunos casos discordantes sugiere que deben realizarse ambas técnicas. El seguimiento clínico de los pacientes permitirá en el futuro definir la utilidad de estos marcadores en predecir el pronóstico de la enfermedad especialmente de los tumores superficiales con posibilidad de progresión. Los pacientes a los que se les analizaron distintas recidivas, siempre presentan la misma mutación y un patrón similar de IHQ.

IHQ: Detección IHQ con el anticuerpo monoclonal DO-7 de la acumulación de la proteína p53 en tumores vesicales. Carcinoma transicional pT1GIII con un 30% de los núcleos intencionalmente positivos.

PCR: Caracterización molecular de mutaciones en el gen TP53 en tumores vesicales. En esta figura se ilustra la detección de dos mutaciones diferentes mediante secuenciación directa. Izqda.: Ejemplo de mutación de alteración de la pauta de lectura causada por la inserción de una timidina. Derecha: Mutación sin sentido que da lugar a una proteína truncada. Ambas mutaciones se localizaron en el exón 5



IHQ



PCR

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah R, Challen C, Griffiths TRL, Robinson MC, Neal DE, Lunec J. Alterations of TP53 in microdissected transitional cell carcinomas of the human urinary bladder: high frequency of TP53 accumulation in the absence of detected mutations is associated with poor prognosis. Br J Cancer 1998; 77: 2230-2238.
- Bernardini, Adessi, Billerey, et al: Immunohistochemical detection of p53 protein overexpression versus gene sequencing in urinary bladder carcinomas. J. Urol. 162: 1496-1501, 1999.
- Cordon-Cardo: Molecular alterations in bladder cancer. Cancer Surv. 32: 115-131, 1998.
- Henev NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Halfemann MD and Hawkins IR for the National Bladder Cancer Collaborative group A: Superficial bladder cancer: progression and recurrence. J Urol 1983; 130: 1083-.
- Lorenzo- Romero, Salinas Sanchez, Gimenez- bachs, et al: Prognostic implications of p53 Gene mutations in Bladder Tumors. J.Urol. 169: 492-499, 2003.
- Reiter, Ozer, Pins, et al: p53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. J.Urol. 167: 1469-1474, 2002.
- Sánchez-Zalabardo, Rosell Costa, Fernández Montero, López Ferrandis et al: Valor pronóstico de p53, Ki67 y la proteína Rb en los tumores vesicales infiltrantes. Actas Urol Esp. 26: 98-103, 2002.
- Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr H, Reuter VE. Nuclear overexpression of p53 transitional cell carcinoma: a marker for disease progression. J Natl Cancer Inst 1993, 85: 53-59.
- Stein, Grossfeld, Ginsberg, et al: Prognostic markers in bladder cancer: A contemporary review of the literature. J. Urol. 160: 645-659 1998.
- Tiguert, Bianco, JR, Oskanian, et al: Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. J. Urol. 166: 2155-2160, 2001.
- Vet JM, Wijtes A, Marras SAE, Hessels D, van der Poel HG, Debruyne FMJ, Schalken JA. Predictive value of p53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high-risk superficial bladder cancer. Clin Cancer Res 1996; 2: 1055-1061.