

SEMNIȚAȚIA EXPRESIEI PROTEINEI P53 ÎN CARCINOAMELE PROSTATICE ȘI METASTAZELE LOR LIMFOGANGLIONARE

SIGNIFICANCE OF P53 PROTEIN EXPRESSION IN PROSTATE CARCINOMAS AND THEIR METASTASES

Șef lucr.dr. *Daniela Diaconescu*¹, asist.univ.dr.d. *Sebastian Toma*¹,
*medic Radu-Sorin Diaconescu*²

¹Facultatea de Medicină, Universitatea „Transilvania” din Brașov,

²Spitalul Clinic Județean de Urgență, Brașov

Dr. *Toader Cristina*¹, Dr. *Pruteanu Elena*¹, Conf. dr. *Idomir Mihaela*^{1,2}

Abstract:

P53 tumour suppressor gene is the most frequently altered gene in human cancers. In this study an analysis of p53 expression for 40 primary prostatic tumours and their lymph node metastases was performed. P53 expression was studied using immunohistochemistry with monoclonal antibody anti-p53. Tumour expression of p53 protein was considered when strong nuclear staining was present and was evaluated as percent of immunoreactive p53 cells. 23 of 40 primary tumours (57.5%) and 14 of 20 metastases (70%) revealed strong nuclear positivity for p53. Lymph node metastases showed significantly higher p53 expression than primary tumours. Our results indicate that altered expression of p53 is associated with increased proliferative activity and support the hypothesis that mutation of p53 is an early event in prostate carcinoma progression.

Key-words: p53, immunohistochemistry, prostate cancer, prognosis

Introducere

Inactivarea genei p53 este cea mai comună și cea mai bine descrisă modificare molecular-genetică a tumorilor umane. Gena p53 este o genă recesivă (ca toate genele supresoare tumorale), situată pe cromozomul 17p13. Pierderea expresiei genei necesită alterarea ambelor sale alele. De obicei au loc pierderi alelice spontane, deleții ale unei alele, însoțite de mutații ale celeilalte alele (mutații punctiforme, deleții, rearanjamente). Această a două mutație poate fi de tip tranziție, transversie sau inserție/deleție ADN. Mutația p53 reprezintă un eveniment critic, care determină trecerea de la formele preinvazive la cele invazive ale cancerului prostatic. Lipsa p53 determină pierderea controlului ciclului celular, replicării ADN, fidelității replicării ADN și apoptozei. În acest mod, se ajunge la supraviețuirea celulelor cu leziuni ADN și la progresie tumorală. Forma mutantă a proteinei, mp53, se manifestă în același timp ca oncogenă dominantă [3, 4].

Expresia p53 este greu de evaluat, existând mai multe modalități de cuantificare. Metoda folosită mai frecvent constă în stabilirea

indicelui sau procentului de celule p53 pozitive din totalitatea de celule tumorale și măsurarea intensității expresiei p53. Un indice p53 mai mare și o colorație mai intensă sugerează un număr mai mare de celule tumorale scăpate de sub controlul p53 și respectiv un număr mai mare de celule stimulate de un p53 mutant [1, 6].

Studiul de față își propune o evaluare a exprimării imunohistochemice a p53 în adenocarcinoamele prostatice.

Material și metodă

Studiul de față a fost efectuat pe 40 de cazuri adenocarcinoame prostatice, diagnosticate histopatologic în Serviciul de Prosectură al Spitalului Clinic Județean Brașov, în perioada 1.01.2006-31.12.2007.

Au fost constituite două loturi, primul lot (lotul I) fiind considerat lot martor. Acest lot a fost selecționat dintre cazurile fără metastaze limfoganglionare. Cel de-al doilea lot (lotul II) a fost reprezentat de carcinoamele prostatice cu metastaze limfoganglionare. Metastazele limfoganglionare ale celui de al doilea lot au constituit lotul (II-LG).

Toate secțiunile histologice ale celor 40 de cazuri selectate pentru imunohistochimie au fost reexaminat, inclusiv metastazele lor limfoganglionare, selecționându-se zonele cele mai reprezentative pentru tumoră. După secționarea seriată a blocurilor și o recolorare de control cu hematoxilină-eozină, a fost efectuată colorația imunohistochimică cu anticorpii mono-clonali p53 (PAb 1801 și DO7, Dakocorp, Denmark).

În ceea ce privește cuantificarea expresiei p53, metoda folosită a fost obiectivă, rezultând un indice p53 exprimat ca numărul procentual al nucleilor pozitivi din tumoră, indice stabilit în urma evaluării unui număr mediu de 1000 de nucleii per tumoră, cu obiectivul de 10x. Pentru analizele statistice mai complexe au fost utilizate valorile p53 ale tumorilor pozitive din punct de vedere imunohistochimic, fiind excluse tumorile negative.

Analiza statistică s-a efectuat cu programul Statistica for Windows (StatSoft Inc). Pentru corelația parametrilor cantitativi a fost folosit testul *t* (Student) de comparare a mediilor. Datele au fost considerate statistic semnificative pentru valori ale $p < 0,05$.

Rezultate

În carcinoamele prostatice studiate, proteina p53 a prezentat o pozitivitate imunohistochimică variabilă, atât în tumorile primare cât și în metastazele lor limfoganglionare, numeroase tumori fiind negative din punct de vedere imunohistochimic. În tumorile pozitive, expresia p53 a fost observată intranuclear, sub forma unei colorații brune fin granulare, proteina fiind evidențiată prea puțin în citoplasma celulelor tumorale. De asemenea, intensitatea colorației imunohistochimice a fost marcată, fără a se observa diferențe majore de intensitate între tumori și fără a sugera necesitatea studierii acestui aspect. În figura 1 se observă expresia p53 într-un carcinom prostatic slab diferențiat histologic.

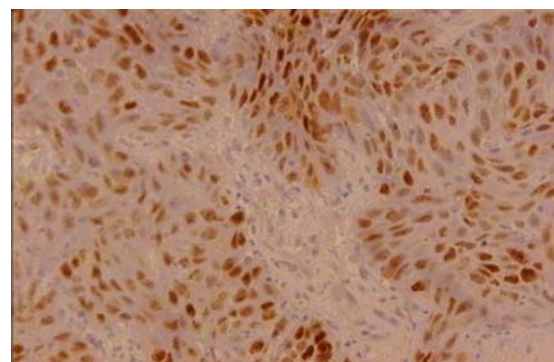


Fig. 1. Expresia p53 într-un carcinom prostatic slab diferențiat. Majoritatea celulelor tumorale sunt p53 pozitive (HE, 20x).

Din cele 40 de tumori studiate, 17 cazuri au fost p53 negative, din care 8 cazuri din primul lot (I), al tumorilor fără metastaze limfoganglionare și 9 cazuri din cel de-al doilea lot (II), al celor cu metastaze limfoganglionare. În ceea ce privește metastazele limfoganglionare ale celor 20 de cazuri din cel de-al doilea lot (II-LG), doar 6 au fost negative din punct de vedere imunohistochimic, 3 cazuri prezentând o pozitivare a colorației față de tumora primară, ceea ce sugerează fie o tehnică deficitară folosită în cazul tumorilor primare, fie o stabilizare a proteinei, posibil ca urmare a unei mutații TP53 câștigate în timpul progresiei tumorale și respectiv metastazare.

Analiza statistică a pozitivității respectiv negativității expresiei p53 nu a demonstrat diferențe semnificative statistic între loturi. Testul *t* dintre variabilele independente p53 I și p53 II, respectiv dintre variabilele dependente p53 II și p53 II-LG, care reflectă pozitivitatea (P) și negativitatea (N) expresiei p53 este indicat în tabelul 1. Indicele $p = 0,082814$, dintre loturile II și II-LG, este apropiat de cel semnificativ din punct de vedere statistic (t test for independent and dependent samples).

Lot	p53 (P/N)				Nr.
	Medie	+/-DS	test t	p	
I	100.400	0.503			
II	100.450	0.510	-0.312	0.756	20
II	100.450	0.510			
II-LG	100.300	0.470	1.831	0.083	20

Tabel 1. Testul *t* dintre loturile I vs II și II vs II-LG

Valoarea medie, deviația standard, minima, maxima și numărul de cazuri p53 pozitive din loturile (I+II), I, II și II-LG este prezentată în tabelul 2. Astfel, în lotul tumorilor primare cu metastaze limfo-ganglionare a rezultat un indice p53 mediu mai mic decât în lotul tumorilor fără metastaze limfoganglionare.

Lot	p53				Nr
	Medie	+/-DS	Minim	Maxim	
I+II	50.848	15.020	14.254	76.119	23
I	52.689	17.842	14.254	76.119	12
II	48.838	11.732	22.022	65.974	11
II-LG	52.921	12.955	37.898	80.264	14

Tabel 2. Valori statistice descriptive p53

Conform acestor date, testul Student t (t test for independent samples and for dependent samples) a stabilit lipsa diferențelor semnificative statistic între tumorile primare din cele două loturi, I și II (fără și cu metastaze limfoganglionare). Cu toate acestea, expresia p53 a prezentat diferențe semnificative statistic între tumorile primare din lotul II și metastazele limfoganglionare corespunzătoare din lotul II-LG (sunt excluse cele trei cazuri care nu au corespondent la nivelul tumorilor primare), cu un indice de probabilitate $p = 0,018150$, acesta relevând faptul că în metastazele limfoganglionare expresia p53 este semnificativ mai mare (ca număr de celule tumorale pozitive imunohisto-chimic) decât în tumorile primare corespunzătoare (Tabel 3).

Lot	p53				Nr.
	Medie	+/-DS	test t	p	
I	52.689	17.842			12
II	48.838	11.732	0.605	0.551	11
II	48.838	11.732			11
II-LG	56.148	12.664	-1.436	0.018	11

Tabel 3. Testul t dintre valorile p53 ale loturilor I vs II și II vs II-LG

De asemenea, corelația dintre valorile p53 II și p53 II-LG, apreciată cu ajutorul indicelui de corelație Pearson $r(X,Y)$, a demonstrat o corelație directă de $r = +0,757568$, înalt semnificativă statistic, $p = 0,000095$. Indicele Pearson r fiind pozitiv și apropiat de

valoarea maximă +1, rezultă că există o creștere direct proporțională a valorilor din metastazele limfoganglionare cu cea a valorilor din tumorile primare corespunzătoare. Numai 11 cazuri au fost pozitive atât în tumorile primare, cât și în metastazele limfoganglionare (Tabel 4).

lot	p53				p	r.
	edie	/-DS	(X,Y)	est t		
I	48.838	11.732				1
I-LG	56.148	12.664	0.757	.988	.00009	1

Tabel 4. Indicele de corelație Pearson $r(X,Y)$

Discuții

În acest studiu, expresia p53 a fost negativă IHC la un număr semnificativ de cazuri și anume la aproape 50% din tumorile primare și la aproape o treime din metastazele limfoganglionare corespunzătoare. Având în vedere stadiul avansat al acestor tumori, numărul mare de tumori negative IHC poate fi explicat doar prin prezența unui mp53 trunchiat și instabil sau prin lipsa completă a p53 și mai puțin printr-un p53 normal și respectiv lipsa mutației P53. De asemenea, un număr de 3 cazuri cu metastaze limfoganglionare a prezentat o pozitivare a colorației față de tumora primară, cea ce sugerează fie o tehnică deficitară folosită în cazul tumorilor primare, fie o stabilizare a proteinei, stabilizare posibilă printr-o nouă mutație P53, mutație câștigată în timpul progresiei tumorale și metastazare.

Metastazarea limfoganglionară s-a dovedit independentă de indicele p53 din tumorile primare între cele două loturi, cu și fără metastaze limfoganglionare, neexistând diferențe semnificative statistic. Cu toate acestea, în metastazele limfoganglionare s-a observat o creștere semnificativă a indicelui p53 față de tumorile primare (creștere direct proporțională, deși neliniară a valorilor celor două loturi). Acest fapt, care sugerează selectarea preponderentă, în procesul metastazării, a celulelor tumorale cu mp53 prezent, a fost constatat și de către alți autori [5, 7, 8].

Din punct de vedere microscopic, expresia p53 a fost observată strict intranuclear, proteina nefiind evidențiată în citoplasma

celulelor tumorale, iar intensitatea colorației imunohistochemice a fost marcată în majoritatea tumorilor

Concluzii

Mutația P53, cu pierderea supresiei tumorale, reprezintă un eveniment incipient al tumorigenezei, eveniment critic în trecerea de la formele preinvazive la cele invazive ale cancerului prostatic, contrabalansat ulterior de alte mecanisme de inducere ale apoptozei tumorale.

Indicele p53 nu este în corelație cu proliferarea celulară și nici cu potențialul metastazant, cu toate că pe parcursul metastazării sunt selectate preponderent clonele celulare cu mp53 prezent.

Bibliografie

- [1] Borre M, Stausbol-Gron B, Overgaard J. p53 accumulation associated with bcl-2, the proliferation marker MIB-1 and survival in patients with prostate cancer subjected to watchful waiting. *J Urol* 2000;164(3Pt1):716-721.
- [2] Ghilezan N. - Mecanismele moleculare ale cancerogenezei și progresiei tumorale. *Radioterapie și Oncologie medicală*, 1995; 2: 1-15, 3:1-19.
- [3] Hussein MR, Cullen K: - Molecular biomarkers in HNSCC: prognostic and therapeutic implications. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 1, 1: 116-124, 2001.
- [4] Perkins AS, Stern DF: - Molecular biology of cancer: Oncogenes. DeVita V. T. Hellman S., Rosenberg S. A., *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, Chapter 4, 79-100, 1997.
- [5] Petrescu A, Mârzan L, Codreanu O, Niculescu L. - Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2006;47(2):143-146.
- [6] Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. - The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J. Oral Path Med* 2000;29(9):413-425.
- [7] Sasor A, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Ki-67 antigen and P53 protein expression in benign and malignant prostatic lesions. Immunohistochemical quantitative study. *Pol J Pathol* 2000;51(1):31-36.
- [8] Quinn DI, Henshall SM, Head DR, Golovsky D, Wilson JD, et al. Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 2000;69(6):1585-1594.