

# ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE P53, CERB-B2, EGFR Y PCNA EN CÁNCER GÁSTRICO

Drs. Gutiérrez Yraima, Márquez Rita, Peraza Simón, Becker Juan Carlos, Romero Sandra, Calderón Marialí, Vivas Jorge, Castro Denny.  
Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal Dr. Luis Andersón, San Cristóbal, Estado Táchira-República Bolivariana de Venezuela.

## RESUMEN

Diversas anomalías genéticas han sido reportadas en el desarrollo del carcinoma gástrico. Este trabajo estudia la inmuno expresión de marcadores inmunohistoquímicos: p 53, C-erb-B2, PCNA y EGFR, en 65 casos (37 hombres y 28 mujeres) con edad promedio de 54.5 años con cáncer gástrico precoz y avanzado. Histológicamente de acuerdo a la clasificación Japonesa, 8 casos (12,3%), se reportaron como adenocarcinomas moderadamente diferenciados, 7 (10.8%) como adenocarcinomas poco diferenciados con patrón sólido, 8 (12,3%) adenocarcinomas pobremente diferenciados patrón no sólido, 1 (1,5%) adenocarcinoma papilar, 12 (18,5%) carcinomas con células en anillo de sello y 12 (18,5%) carcinomas mucinosos. Tres lesiones (4,6%) fueron clasificadas como otro tipo de tumores, específicamente linfoepiteliomas. Según la clasificación de Lauren 23 lesiones (35.4%) se reportaron como carcinomas de tipo intestinal, 27 (41,5%) como carcinomas difusos, 1 (1.5%) como carcinoma mixto y en 14 casos (21.5%) los tumores se consideraron como no clasificables.

Observándose: 37 casos positivos para p53, 24 con expresión de EGFR, 33 con expresión c-erbB2, y 55 que expresaron PCNA.

La expresión de genes supresores, de factores de crecimiento, así como la expresión de marcadores de proliferación celular en el cáncer gástrico, son frecuentes en tumores gástricos avanzados y precoces. En este estudio no se encontró correlación entre la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos y los estadios clínico-patológicos.

Palabras Claves: Cáncer Gástrico, p53, c-erb B-2 PCNA, EGFR.

## SUMMARY

Many genetic abnormalities have been reported in gastric cancer. We study the immunoexpression of p 53, Cerb B2, PCNA and EGFR in different types of gastric cancers. 65 cases (37 men and 25 women) with a rate of 54.5 years old with early and advanced gastric cancer from the records of our institute, 89.2% were advanced cases, 37cases positive to p53, 24 cases positive to EGFR and 55 cases positive to PCNA. Histological diagnosis was made according to the Japanese classification, 8 cases (12%) were moderately differentiated adenocarcinomas, 7(10.8%) poorly differentiated adenocarcinomas with a solid pattern type, 8(12.3%), poorly differentiated adenocarcinoma with a non solid pattern type 1(1.5%), papillary adenocarcinomas 12 (18.5%), signet-ring cell carcinoma and mucinous carcinoma 12 (18.5%). We also found 3(4.6%) lymphoepithelioma. According to Lauren's classification 23(35.4%) cases were intestinal type, 22(41.5%) cases diffuse type, 14(21.5%) not otherwise specified and 1 case mixed (intestinal and diffuse type).

The expression of tumor Suppressors Genes, Growth Factors Genes and Proliferative Genes are frequently expressed in gastric cancer, but there are no correlations with clinical and pathological stages in this study.

Key Words: Gastric Cancer, p53, c- erb B2, PCNA.

## INTRODUCCIÓN

Los carcinomas gástricos han sido divididos en dos subtipos histológicos: Carcinoma difuso y de tipo intestinal (1). La mayoría de los adenocarcinomas de tipo intestinal corresponden a adenocarcinomas tubulares de acuerdo a la clasificación de la World Health Organization (2). Este tipo de carcinoma gástrico se desarrolla en estrecha conexión con la atrofia y la metaplasia intestinal de la mucosa gástrica y es el subtipo más frecuente en poblaciones de alto riesgo para cáncer de estómago (3,4).

Importantes progresos en el análisis molecular de los cánceres humanos han revelado que los tumores se desarrollan siguiendo la ruta de alteraciones genéticas (multiestadios) en oncogenes y genes supresores de tumores. Diversas anomalías genéticas han sido reportadas como protagonistas en el desarrollo del carcinoma gástrico (5).

Las alteraciones del p53, un gen supresor de tumores ubicado en el brazo corto del cromosoma 17, son las más comúnmente observadas en varias neoplasias humanas. El producto del gen, una proteína de 53 KD, juega un papel regulador muy importante en el ciclo celular. Conocida como "el guardián del genoma", esta proteína detiene el ciclo celular cuando hay alteraciones del ADN e induce apoptosis en caso de no poder ser reparado el daño (6). Las proteínas p53 mutantes no logran la acción de frenar el ciclo celular o de inducir la apoptosis y son fácilmente detectadas por métodos inmunohistoquímicos por ser más estables que la proteína natural (7). La significancia clínica del gen p53 en la carcinogénesis gástrica sigue siendo tema de controversia. Para algunos investigadores la inmunoexpresión de p53 no es un evento usualmente observado en lesiones gástricas premalignas, mientras que suele encontrarse con mayor frecuencia a medida que progresa la lesión tumoral (8, 9,10), especialmente si se trata de carcinomas intestinales (11) y de carcinomas de localización cardinal (12,13).

Una de las características principales del cáncer gástrico, al igual que otros tipos de tumores, es que sus células pueden expresar Factor de Crecimiento Epidérmico (EGE) Receptor del Factor de Crecimiento epidérmico (EGFR) y otros Factores de Crecimiento relacionados como el c-erb B2 simultáneamente, lo que permitiera a las células neoplásicas poseer la habilidad de producir y responder a sus propios factores de crecimiento y poseer autonomía en la proliferación tumoral bajo un mecanismo autocrino y paracrino (14,15,16). La expresión de Factores de crecimiento como el EGFR y el c-erb B2 en cáncer gástrico ha sido relacionada significativamente a la profundidad de la invasión tumoral y a pobre supervivencia (17,18,19). Ha sido mencionado además, que estos factores son expresados casi exclusivamente en tumores gástricos de tipo intestinal (20,21).

Estudios empleando marcadores de proliferación celular como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) han revelado que este marcador se expresa más frecuentemente en la mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori* que en la mucosa no infectada por este microorganismo. La proliferación celular es un fenómeno de la carcinogénesis, una alta tasa de proliferación celular, produce errores de replicación que pueden no ser detectados y por lo tanto corregidos siendo, transmitidos a las nuevas generaciones de células (22).

Algunos investigadores han observado que este fenómeno disminuye significativamente luego de erradicar la infección (23). Estos resultados indican que la tasa de proliferación del epitelio gástrico se incrementa en presencia del *H. pylori* y que esta bacteria ejerce efectos mutagénicos sobre el epitelio gástrico humano. Este efecto ha sido adjudicado a la bien conocida capacidad del *Helicobacter pylori* para producir amonio y estimular por tanto la replicación celular (24).

Al evaluar la proliferación celular mediante la determinación de la expresión de antígenos como PCNA (empleando técnica de inmunohistoquímica) en las diferentes etapas de la carcinogénesis gástrica se ha encontrado que el índice de proliferación celular se incrementa progresivamente a medida que progresa la lesión hasta llegar al carcinoma, especialmente si se encuentra asociada infección por *Helicobacter pylori* (25).

El Táchira, al igual que otras regiones montañosas de América Central y Sur -América tiene una alta tasa de cáncer gástrico. Hasta ahora, en nuestro medio, poco se conocía sobre las alteraciones genéticas en oncogenes, genes supresores de tumores y factores/receptores de crecimiento, y alteraciones en la proliferación celular, usualmente reportadas en el cáncer de estómago.

En este trabajo se planteó como objetivo fundamental determinar la prevalencia de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos, específicamente p53, c-erb B2 y Factor de Crecimiento Epidérmico y PCNA en cáncer gástrico, malignas de pacientes que habitan en una zona de alto riesgo para este tipo de neoplasia. Así mismo se planteó correlacionar la expresión de estos marcadores con parámetros clínico-patológicos, como también la expresión de mucinas (sialomucinas y sulfomucinas) 29. En tumores y áreas adyacentes al cáncer gástrico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Pacientes:** Se incluyeron en el estudio pacientes con cáncer gástrico, avanzados y precoces diagnosticados en el Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal "Dr. Luis Anderson" que habían sido sometidos a resección quirúrgica en el Hospital Central de San Cristóbal entre los años 2000 y 2002.

Se empleó la clasificación histológica de carcinoma gástrico y los criterios que definen el cáncer gástrico publicados por la Sociedad Japonesa de Investigación de Cáncer gástrico (26). Así mismo, para los diagnósticos histológicos finales también fueron aplicados los criterios estipulados en la clasificación de Lauren (1). Dentro de esta última clasificación, los adenocarcinomas pobremente diferenciados (clasificación Japonesa) fueron finalmente considerados como lesiones de tipo difuso.

Para el estadiaje de los tumores fue utilizado el Sistema de TNM adoptado por The American Joint Comite on Cancer (AJCC) con redefinición del estadio de N en 1.997 junto a La Unión Internacional Contra el Cáncer (27). Para la clasificación macroscópica en las lesiones de cánceres precoces y avanzados se utilizó la clasificación de la sociedad Japonesa de Investigación de Cáncer Gástrico (26).

**Material Histológico:** Para la determinación de la expresión de los marcadores evaluados se emplearon cortes extraídos de los bloques de parafina obtenidos de los tumores primarios. Con coloración de hematoxilina y eosinas.

El *Helicobacter pylori* se identificó utilizando la coloración de Giemsa

y la cuantificación bacteriana, establecida empleando una escala de 0 a 3 puntos (0: Ausente, 1: Difícil de encontrar, 2: Fácil de encontrar, 3: Abundante). Esta escala ha sido utilizada previamente en varios estudios de investigación llevados a cabo en este Centro (42)

Las determinaciones inmunohistoquímicas fueron realizadas empleando el método de Streptavidina-Biotina, basado en la aplicación consecutiva de anticuerpo primario policlonal, purificado por afinidad (DAKO: P53 M7001, antiC-erb B2 AO 485, anti EGFR M7 001 v anti PCNA (DAKO MO879) anticuerpo secundario biotinilado, enzima conjugada de Streptavidina y de un cromógeno (DAB, DAKO).

Una vez seleccionadas las muestras histológicas se realizaron secciones de 4 micras de tejido, las cuales fueron desparafinadas e hidratadas en sucesivos pasos de xilol, alcohol absoluto y alcohol al 95 %. La peroxidasa endógena fue bloqueada con Peróxido de Hidrógeno al 0,3 % en Metanol por 7 min. y equilibradas en baño de agua destilada por 25 minutos más. Para la recuperación de antígenos se utilizó una solución de Citrato buffer 10 mM, pH 6 (Antigen Unmasking Solution, Vector Laboratory, C.A.) 15°, seguida de dos baños de agua destilada y equilibrio en solución salina buffer fosfato (PBS), pH 7.5 por 5 min.

Se empleó suero bloqueador de proteínas inespecíficas (DAKO, 405050, Pittsburg, Pennsylvania) por 7 minutos y se incubó durante toda la noche con anticuerpo primario. Después de lavado con PBS se incubaron las secciones de tejido con anticuerpo secundario biotinilado multivalente (DAKO, LSAB) por 15 minutos: se lavó con buffer y se aplicó Streptavidina (DAKO LSAB) por 15 minutos. La actividad de la peroxidasa fue demostrada con diaminobenzidina (DAB, DAKO) aplicada por 15 minutos y lavadas con agua destilada por 2 minutos. Se contratiñó con hematoxilina.

El método de Evaluación e inmuoexpresión Se consideró de la proteína p53 como la expresión del cromógeno a nivel del núcleo y la inmunoreactividad del EGRF fue establecida en el citoplasma. En los casos de inmuoexpresión para c-erb B2 la positividad fue considerada tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática. La expresión de PCNA fue considerada en el núcleo y para su cuantificación fueron contados, en cada caso, 200 núcleos de células tumorales (28), Para este marcador fue calculado el índice de expresión como el porcentaje de núcleos neoplásicos positivos empleando la siguiente escala: Puntaje 0: No expresión, Puntaje 1: 1%-30% de células positivas, Puntaje 2: de 31% a 60% de células positivas y Puntaje 3: más del 61% de células positivas para el marcador. La intensidad de cada uno de los marcadores fue evaluada cualitativamente (débil, moderada, e intensa).

Se tomaron como controles positivos de las reacciones, tejidos conocidos previamente como positivos para cada uno de los marcadores y láminas con PBS (Thris-Buffer) como controles negativos, obtenidos del propio laboratorio de Inmunohistoquímica y Biología molecular de esta Institución.

Los cortes histológicos fueron evaluados por los patólogos y se les aplicó la técnica de HID (High Iron Diamine) con el fin de determinar la expresión de mucinas en las lesiones tumorales y de establecer la presencia de metaplasia intestinal en las áreas adyacentes al tumor. Esta última fue clasificada de acuerdo a Filipe. Tipo I: Células caliciformes secretoras de sialomucinas, Tipo II: Sialomucinas secretadas por células caliciformes y por células columnares y Tipo III: Sialomucinas y sulfomucinas independientemente de la presencia de sialomucinas y/o sulfomucinas en células caliciformes.(29).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron procesados en una base de datos elaborada previamente en el programa. EPI INFO versión 6.02. El análisis estadístico fue realizado empleando las pruebas de Chi cuadrado y Mantel-Haenszel con Corrección de Yates. Los valores obtenidos fueron considerados estadísticamente diferentes cuando el valor de P fue menor de 0,05.

## RESULTADOS

En total fueron incluidos en el estudio 65 pacientes que habían sido intervenidos quirúrgicamente por cáncer gástrico, 37 hombres (56.9%) y 28 mujeres (43.1%) con edad promedio de 54.5 años +/- (rango: 34 - 83 años) 13.5 DF. Los pacientes habían sido sometidos a gastrectomía subtotal en 46 casos (70.8%), gastrectomía total en 16 (24.6%) y a gastrectomía total + esofagectomía distal en 3 casos (4.6%).

El 89.2% (58/65) de las lesiones correspondieron a tumores avanzados. La distribución según el tipo macroscópico de lesión puede verse en la Tabla N. 1.

Tabla N.1. Tipo macroscópico de carcinoma gástrico

Tipo de Lesión	N(%)
Ila	1 (1.5)
Ilc	2(3.1)
Ilc+III	3 (4.6)
Ila+Ilc	1(1.5)
Borrmann	1(1.5)
Borrmann II	9(13.8)
Borrmann III	43(66.2)
Borrmann IV	2(3.1)
Borrmann V	3 (4.6)
Total	65 (100)

Los carcinomas estuvieron localizadas en el antro en 34 casos (52.3%), en cuerpo: 9 (13.8%), antro y cuerpo: 11 (16.9%) casos, ángulo: 2 casos (3.1%). funduscardias y unión esófago-gástrica: 4 casos (6.1%) y abarcando mas de dos segmentos gástricos: 5 casos (7.7%).

Desde el punto de vista histológico de acuerdo a la clasificación Japonesa, 8 casos (12.3%) fueron reportados como adenocarcinomas tubulares bien diferenciados,(TB1) 13 (20%) como adenocarcinomas moderadamente diferenciados,(TB2). 7 (10.8%) como adenocarcinomas poco diferenciados con patrón sólido, 8 (12.3%) adenocarcinomas pobremente diferenciados patrón no sólido, 1(1.5%) adenocarcinoma papilar. 12 (18.5%) carcinomas en células en anillo de sello y 12 (18.5%) carcinomas mucinosos. Tres lesiones (4.6%) fueron clasificadas como otro tipo de tumores, específicamente linfoepiteliomas. Según la clasificación de Lauren 23 lesiones (35.4%) fueron reportadas como carcinomas de tipo intestinal, 27 (41.5%) como carcinomas difusos, 1 (1.5%) como carcinoma mixto y en 14 casos (21.5%) los tumores se consideraron como no clasificables. Fue posible establecer invasión a ganglios linfáticos y, por tanto el estadio final, solo en 56 de los 65 casos evaluados.

Las determinaciones inmunohistoquímicas fueron realizadas en todos los casos. Los resultados de las mismas, para cada uno de los marcadores evaluados, pueden verse en la tabla N 2.

Tabla N. 2. Resultados de las inmunexpresión. En los casos de cáncer gástrico

Marcador	N.	%
p53		
+	37	56.9
-	28	43.1
EGFR		
+	24	36.9
-	41	63.1
c-erbB2		
+	33	50.8
-	32	49.2
PCNA		
+	55	84.6
-	10	15.4

N = numero de casos.

La intensidad de cada uno de las inmunotinciones puede verse detalladamente en la Tabla N.3

Tabla N. 3. Intensidad de los inmunexpresión establecida para cada uno de los marcadores estudiados.

Marcador	Intensidad (%)		
	Leve	Moderada	Intensa
p53	16(43.2)	8(21.6)	13(35.1)
EGFR	10(41.7)	9(37.5)	5(20.8)
c-erbB2	16(48.5)	10(30.3)	7(21.2)
PCNA	16(29.1)	9(16.4)	30(54.5)

En los 55 casos positivos para PCNA la inmunexpresión alcanzó score de 1 en 15 casos (23.1%), score 2 en 18 (27.7%) y score 3 en 22 pacientes (33.8%). Estos puntajes no fueron estadísticamente diferente cuando los mismos fueron analizados de acuerdo al sexo, localización del tumor, tipo de lesión, invasión a la pared, invasión a ganglios, estadio tumoral, invasión vascular y neural y estatus del helicobacter pylori (p> 0.05)

Fue posible identificar el Helicobacter pylori en el 38.5% (25 de 65) de los casos estudiados, localizado en 9 pacientes (36%), en la mucosa. advacente al área tumoral y en 16 casos (64%) en tejido neoplásico. La distribución del helicobacter pylori fue la siguiente: Difícil de encontrar: 8 pacientes (32%), fácil de encontrar: 14 (56%), abundante cantidad en 3 casos (12%). El status del Helicobacter pylori no fue significativamente diferente según el tipo histológico de tumor (clasificación de Lauren) (p=0.552).

No se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se analizó la expresión de los marcadores de acuerdo al sexo (p > de 0.05) ni de acuerdo al tipo histológico de tumor (p> de 0.05). De igual modo no se observó asociación entre los resultados de las inmunotinciones de algunos de los marcadores evaluados y el resto de las variables clínico-patológicas (tipo de lesión, invasión a la pared, invasión de ganglios, invasión vascular, invasión neural, estadio. Estos resultados son expuestos en la tabla número 4.

TABLA N° 4

VARIABLES CLINICOS	INMUNOEXPRESION DE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS EN CANCER GASTRICO											
	p53			EGFR			CERB 2			PCNA		
PATOLOGICAS	+	-	VALOR P	+	-	VALOR P	+	-	VALOR P	+	-	VALOR P
PRECOZ	3	4	0.695	2	5	0.944	4	3	0.965	6	1	0.638
AVANZADO	34	24	0.695	22	36	0.944	29	29	0.965	49	9	0.638
<b>INVASION A LA PARED</b>												
T1	3	4	0.693	2	5	0.751	4	3	0.965	6	1	0,924
T2	2	2	0.693	1	3	0.751	0	4	0.965	3	1	0,924
T3	31	22	0.693	21	32	0.751	28	29	0.151	45	8	0,924
T4	1	0	0.693	0	1	0.751	1	0	0.151	1	0	0,924
<b>INVASION DE GANGLIOS</b>												
N0	5	5	0.809	3	7	0.489	4	6	0.757	9	1	0,606
N1	16	13	0.809	13	16	0.489	16	13	0.757	25	4	0,606
N2	5	5	0.809	2	8	0.489	4	6	0.757	7	3	0,606
<b>INVASION VASCULAR</b>												
POSITIVA	29	8	0.723	20	4	0.400	26	7	0.719	40	15	0,442
NEGATIVA	20	8	0.723	29	12	0.400	23	9	0.719	9	1	0,442
<b>INVASION NEURAL</b>												
POSITIVA	30	7	0.349	19	5	0.807	15	8	0,828	42		0,975
NEGATIVA	19	9	0.349	30	11	0.807	24	8	0,828	7	3	0,975
<b>ESTADIO</b>												
IA	3	4	0.830	2	5	0.807	40	3	0,256	6	1	0,514
IB	1	1	0.830	1	1	0.807	0	2	0,256	1	1	0,514
II	1	2	0.830	1	2	0.780	16	3	0,256	3	0	0,514
IIIA	16	11	0.830	12	15	0.780	4	11	0,256	24	3	0,514
IIIB	5	5	0.830	2	8	0.780	3	6	0,256	7	3	0,514
IV	2	2	0.830	2	5	0.780	0	4	0,256	6	1	0,514

(+) = Positivo

(-) = Negativo

El score de PCNA determinado en áreas de tumor no fue estadísticamente significativo cuando el mismo fue analizado de acuerdo al sexo, localización del tumor, invasión a la pared.

Se encontró asociación significativa en la expresión de p53 y el resto de los marcadores evaluados (p< 0.05). De igual modo la expresión de c-erb B2 estuvo significativamente relacionada a la expresión de EGFR (p=0.0062) y la de PCNA (p=0.043). No hubo relación entre la expresión de EGFR y PCNA (p=0.300).

En 35 de los 65 casos estudiados, pudo identificarse metaplasia intestinal en las áreas adyacentes al tumor. El HID-AB evidenció que se trataba de metaplasia tipo I en 20 casos (57.1%), tipo II 3 (8.6%) y tipo III en 12 casos (34.3%). Debe mencionarse que la metaplasia intestinal fue significativamente más frecuente en tumores de tipo intestinal (p=0.013). En 31 de estos 35 casos fue posible la evaluación inmunohistoquímica encontrándose en las áreas de metaplasia positividad para p53, EGFR, c-erb B2 y PCNA en 7 (22,6%), 8(25.8%), 9(29%) y 18 (58.1%) casos respectivamente. Estos resultados fueron estadísticamente diferentes a los resultados de las inmunexpresiones de p53, c-erb B2 y PCNA en áreas de tumor (p=0.0015, p=0.04, p=0.0043). En ningún caso, la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en la metaplasia intestinal estuvo relacionada con el estatus del Helicobacter pylori (p> 0,05).

Cuando se trataba de cortes con tumor mostró inmunexpresión para PCNA comparado con las áreas de metaplasia que se expresaron con este marcador, los puntajes alcanzados en cada caso no fueron estadísticamente diferentes (p>0.05).

Finalmente, 12 de los 65 tumores estudiados (18.5%) tuvieron expresión de sialomucinas, 1 (15.5%), 19 (29.2%) expresaron ambos tipos de mucinas y 33 (50.89/o) fueron negativos para mucinas. Según la clasificación de Lauren, la expresión de sialosulfomucinas resultó significativamente más frecuente en los tumores de tipo difuso y en tumores considerados como muconodulares (p= 0.040). Iguales resultados fueron obtenidos cuando se empleó para el análisis la clasificación Japonesa (p=0.013).

## DISCUSIÓN

Muchas anomalías genéticas han sido descritas en los cánceres gástricos. De acuerdo a las observaciones de dichas alteraciones genéticas de oncogenes y genes supresores de tumores, el papel de estos genes puede diferir entre la histogénesis y el desarrollo del carcinoma. Las alteraciones en el gen p 53, clásico gen supresor de tumores, ha sido reportado como un evento que ocurre en los estadios iniciales del carcinoma de tipo intestinal y, contrariamente, en las etapas tardías de los carcinomas difusos (30, 31,32).

Por otra parte, algunos autores han encontrado que mutaciones en el p53, determinadas inmunohistoquímicamente, pueden estar asociadas al compromiso de ganglios linfáticos y al estadio tumoral (13), mientras que otros investigadores no han encontrado correlación entre la expresión de p53 y variables clínico-patológicas como edad, sexo, localización y tamaño del tumor, profundidad de la invasión, compromiso de ganglios y metástasis. Pese a lo expuesto, el p53 ha sido significativamente asociado a menor tiempo de supervivencia y puede ser considerado como un eficaz indicador de mal pronóstico, especialmente en los carcinomas de tipo intestinal (10, 33,34).

En estudios previos realizados en este Centro sobre la expresión de p53 en la carcinogénesis gástrica, al evaluar 18 cánceres precoces y 19 avanzados, no se encontró asociación entre la inmunoexpresión de este marcador y las variables evaluadas (sexo, tipo histológico, metástasis a ganglios o a órganos distantes y estatus del *Helicobacter pylori*) (35). En esta serie, primera investigación en nuestro medio que comprende la determinación de alteraciones en varios genes en el carcinoma gástrico, se encontró que la mayoría fueron positivos para p53 (56.9%), proporción de inmunoexpresión semejante a la reportada en otras series (36). Así mismo, similar a lo reportado en la experiencia previa antes mencionada, los resultados obtenidos para p53 en esta investigación, no estuvieron relacionados a ninguna de las variables consideradas para el análisis (sexo, tipo de lesión, invasión a la pared, compromiso de ganglios linfáticos, invasión vascular, invasión neural, estadio tumoral y estatus del *Helicobacter pylori*). Por otra parte, la inmunoexpresión de P>53 ocurrió en proporciones similares en cánceres considerados como de tipo intestinal y en cánceres difusos.

La expresión simultánea, en las células del cáncer gástrico, de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) Receptor del Factor de Crecimiento epidérmico (EGFR) y otros Factores de Crecimiento relacionados como el c-erbB2,, permitiría al tejido neoplásico poseer la habilidad de producir y responder a sus propios factores de crecimiento y poseer autonomía en la proliferación tumoral bajo un mecanismo autocrino y paracrino (14,15,16). La expresión de Factores de crecimiento pertenecientes a la familia de Factores de crecimiento epidérmico como el EGFR y el c-erb B2 en cáncer gástrico ha sido correlacionada con la profundidad de la invasión tumoral y a pobre supervivencia (17,37). El c-erb B2 por ejemplo, codifica para una proteína llamada P185 a la cual se le han adjudicado funciones en la progresión del tumor, especialmente como promotor de la capacidad invasiva de las células neoplásicas (18).

La expresión de c-erb B2 ha sido evaluada conjuntamente con la expresión de EGFR y se ha encontrado que ambos pueden ser significativamente más frecuentes en cánceres submucosales que en

cánceres limitados a la mucosa (19). Por otra parte han sido establecidas diferencias en la expresión del c-erb B-2 en los carcinomas gástricos si se consideran los diferentes tipos histológicos. Las investigaciones llevadas a cabo tanto en los carcinomas gástricos de tipo intestinal como en carcinomas difusos, según la clasificación de Lauren (1), han reportado que la expresión de c-erbB2 ocurre en mayor proporción, e incluso selectivamente, en carcinomas de tipo intestinal (20, 21, 37,38). Al igual que lo observado para P53, en nuestra serie, la inmunopositividad de estos dos tipos de marcadores tumorales no estuvo relacionada a ninguno de los parámetros de invasión tumoral considerados ni al tipo histológico de tumor. Así mismo, tampoco estuvo relacionada a la presencia o ausencia del *Helicobacter pylori*.

Mediante la determinación de la inmunoexpresión de antígenos de proliferación celular como el PCNA en las diferentes etapas de la carcinogénesis gástrica se ha podido establecer que el índice de proliferación celular se incrementa progresivamente a medida que progresa la lesión hasta llegar al carcinoma, especialmente si se encuentra asociada infección por *Helicobacter pylori* (25). Ha sido descrito por ejemplo, que el PCNA puede ser observado en el 18.9% de los casos de gastritis atrófica, en el 40 % de la displasia hasta alcanzar un 72.4 % de los casos de cáncer gástrico avanzado (31). Estudios realizados con el objetivo de evaluar el valor pronóstico de marcadores de proliferación celular como el PCNA y de factores de crecimiento tumoral como el EGFR han mostrado que la expresión conjunta de estos marcadores puede indicar pobre pronóstico con menor tiempo de supervivencia (39). En nuestros pacientes, la inmunopositividad del PCNA ocurrió como un evento aparentemente independiente del estadio tumoral y del resto de las variables consideradas en el análisis incluyendo al *Helicobacter pylori*. El score de inmunotinción de este marcador tampoco fue estadísticamente diferente en los diferentes estadios de tumor.

Gran parte de las investigaciones sobre las alteraciones moleculares de las lesiones gástricas premalignas y de los carcinomas gástricos sugieren que estas alteraciones pueden ser observadas cada vez en mayor frecuencia a medida que progresa la cascada carcinogénica. En una investigación previa realizada en nuestro Centro en la cual se determinó la prevalencia de la expresión de marcadores tumorales en lesiones gástricas premalignas, se encontró que una importante proporción de las metaplasias intestinales evaluadas fueron positivas para P53, c-erb B2 y EGFR (40). En esta serie, aún cuando no era el objetivo principal de la investigación pudo evaluarse la expresión de los marcadores en áreas de metaplasia, observándose que la positividad fue significativamente menor a la observada en las áreas del tumor. En nuestra región, conocida como de alto riesgo para cáncer gástrico con una importante proporción de individuos con lesiones gástricas premalignas (41,42), en donde la mayor proporción de tumores debería ser de tipo intestinal, tal y como se describe en la literatura mundial (3,4), encontramos sorpresivamente que una parte importante de los tumores incluidos en esta investigación correspondieron a carcinomas de tipo difuso y a carcinomas no clasificables dentro de los parámetros establecidos por Lauren (1).

Algunos investigadores exponen, que la proporción de adenocarcinomas que contienen mucinas gástricas se ha incrementado en el tiempo y que estos tumores tienen la tendencia a desarrollarse en glándulas fúndicas y muestran metaplasia intestinal infrecuentemente. Contrario a este hecho se describe que en cánceres gástricos avanza-

dos, la tasa de carcinomas bien diferenciados ha disminuido (43). Esto sugiere que el adenocarcinoma tubular con mucinas de tipo gástrico cambia a adenocarcinoma pobremente diferenciado a medida que progresa el tumor. Adicionalmente a lo antes expuesto, algunos tumores se originan como de tipo intestinal y posteriormente adquieren histología de tipo mixto durante la progresión neoplásica. En estas últimas lesiones ambos tipos de alteraciones moleculares, como el p53, inestabilidad de microsatélites y E-cadherina, suelen coexistir. (43,44,45). Estas consideraciones podrían explicar, al menos en parte, la alta proporción de carcinomas difusos y la expresión por parte de los mismos de marcadores tumorales (como el p53 y c-erb B2, por ejemplo) y de mucinas que indican fenotipo intestinal observados en esta serie, descritos como eventos poco comunes en los carcinomas difusos. Esta "desdiferenciación", como podría llamarse, de los tumores gástricos podría considerarse entonces como un tipo de evolución relativamente frecuente dentro del comportamiento biológico de los carcinomas gástricos intestinales, en zonas de alto riesgo para este tipo de neoplasias como la nuestra.

Finalmente, podríamos concluir que en nuestra región una importante proporción de los carcinomas gástricos avanzados corresponden a tumores clasificados como difusos según la clasificación de Lauren. Dichas lesiones sin embargo, podrían corresponder a lesiones originadas de tumores avanzados que inicialmente son de fenotipo intestinal y que sufren desdiferenciación. La expresión de genes supresores de tumores (como el p53), de Factores de crecimiento y otros factores de crecimiento relacionados, así como la expresión de marcadores de proliferación celular en general en el cáncer gástrico, resultan ser eventos frecuentes en tumores gástricos avanzados y precoces. No obstante, no parecen ser eficientes indicadores de invasión ni de estadio tumoral. Dado los resultados, surge la necesidad de establecer cual es la verdadera histogénesis de los carcinomas gástricos, tarea que podría llevarse a cabo mediante la determinación inmunoquímica de mucinas. Por otra parte, es imperativo continuar en la búsqueda de marcadores pronósticos eficientes que puedan ser analizados de acuerdo a la sobrevida y a la sobrevida libre de enfermedad de los pacientes que padecen este tipo de neoplasia gastrointestinal.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma, *Acta Pathol Microbiol Scand* 64:31-49, 1965.
- 2) Oota K, Sobin LH. Histological typing of gastric and esophageal tumors. International histological classification of tumours. No. 18, Geneva WHO, 1977
- 3) Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of stomach: Its histogenesis and histological appearance. *Gann* 59: 251-258, 1968.
- 4) Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48:3354-3560.
- 5) Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. *Cancer (Suppl)* 75:1410-1417. 1995
- 6) Lane DP. P-53, Guardian del Genome. *Nature* 1992;358:15-16.
- 7) Levine A et al. The P-53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453
- 8) Mj Brito, Ml Filipe. Expresión de p53 in early (T1) gastric carcinoma and precancerous adjacent mucosa. *Gut* Vol 35:1697-1700, 1994.
- 9) Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat UN. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995;36(6): 848-52.
- 10) Kubicka S, Claas C, et al. P53 mutation pattern and expression of c-erb B2 and c-met in gastric cancer: relation to histological subtypes, Helicobacter pylori infection, and prognosis. *Dig Dis Sci* 01 Jan-2002;47(1): 114-21.
- 11) Ranzani GN, Luinetti O, et al. P53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev* 1.995 Apr-May;4(3):223-31.
- 12) Ruggie M, Shiao YH et al. The p53 gene in patients under the age 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. *Mol Pathol* 01 Aug-2000, 53(4): 207-10
- 13) Sanz - Ortega J, Steinberg SM, et al. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-erb B2 and EGFR as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathology*, 01 Apr-2000, 15(2): 455-62.
- 14) Kazuo Sugiyama, Yutaka Yonemura, Itsuo Miyazaki. Immunohistochemical Study of Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor in Gastric Carcinoma. *Cancer* 63:1557-1561, 1.989.
- 15) Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 64,249-270.1.991
- 16) Cross M, Dexter T M. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64,271-280, 1.991.
- 17) Ross JS Et al. The Her-2/neu oncogene in tumors of the Gastrointestinal Tract. *Cancer Invest*, 19(5): 554-68,2001.
- 18) Allgayer Il, Babic R et al. c-erb B2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol*. Jun 2000; 18(11 ):220 1-9.
- 19) Aoyagi K Kohfuji K. et al, Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erb B2 in superspreading-type and penetrating-type gastric carcinoma. *Kurume Med J*. Jan 2001; 48(3):197-200
- 20) Uogolkov A. Altered Expression of Beta-Catenin and c-erb B-2 in Early Gastric Cancer. *J Exp Clin Cancer*, 2.000:19(3): 349-55.
- 21) Dursun A, Poyraz A, Cetik B, Akkol G. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: correlation with histopathologic characteristics and analysis of Ki-67. *Pathol Oncol Res* 1999;5(2): 104-6
- 22) Correa P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention *Cancer Res* 1992; 52: 6735-40
- 23) Brenes E, Correa P, et al. Helicobacter pylori causes hyperproliferation of gastric epithelium. Pre-and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Am J Gastroenterology* 1.993;88:1870-5.
- 24) Tsujii M, Kawano S et al. Ammonia, a possible promoter in Helicobacter pylori related gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 1.992;65:15-18.
- 25) Zhong Zhang, Yuan Yuan, et al. Apoptosis, proliferation and P53 gene expression of H. pylori associated gastric epithelial lesions. *World J. Gastroenterology*, 2001;7(6): 779-782.
- 26) Japanese Classification of Gastric Carcinoma. Japanese Research Society for Gastric Cancer. First English Edition. Kanehara y Co., LTD., Tokyo. 1995.
- 27) Sobin LR, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, Fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer 1997 Nov 1; 80(9): 1803-1804.
- 28) Linden MD, Torres FX et al. Clinical application of morphologic and immunochemical assessment of cell proliferation. *Am J Clin Pathology*, 1990. 162:285-94.
- 29) Filipe Ml, Muñoz N, Matko I et al. intestinal Metaplasia Types and the Risk of Gastric cancer: A Cohort Study in Slovenia. *Int. J. Cancer* 1.994; 57: 324-5.
- 30) Lui XP, Tsumimi K et al, Expression of P53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse type gastric carcinoma. *Pathol int* 2001 Jun, 51(6): 440-4.
- 31) Xu A, Li S, Liu J, Correlation between apoptosis and proliferation in gastric-pre carcinoma. *Zhonghua Yi Xue ZA Zhi* 01 Mar 1999, 79(3): 185-6.
- 32) Sugay T, Nakamura S. Role of DNA aneuploidy, over expression of P53 gene product and cellular proliferation in the progression of gastric cancer. *Cytometry* 15 Jun 1.999,38(3) 111-7.
- 33) Roviello F, Marrelli D et al. P53 accumulation is prognostic factor in intestinal type gastrinoma but not in diffuse type. *Ann Surg Oncol* 01 Dec 1.999, 6 (8):739-45.
- 34) Ikeguchi M, Saito H et al. Mutated P53 protein expression and proliferative activity in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1999 Jul-Aug, 46(28): 2648-53.
- 35) Carreño Luz y Col. P53 en la Carcinogénesis Gástrica. Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal "Dr. Luis Anderson". (No publicado. Datos aportados por el Autor)
- 36) Wang J. Helicobacter pylori Infection and Oncogene Expression in Gastric Carcinoma and its Precursor Lesions. *Dig. Dis. Sci.* 2002;47 (1): 107-113.
- 37) Nakajima M. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinoma. *Cancer*; 85(9): 1894-902 1999.
- 38) Polkowski W et al. Prognostic Value of Lauren Classification and c-erb B 2 Oncogene Overexpression in adenocarcinoma of esophagus and Gastroesophageal Junction. *Ann Surg. Oncol.* 1999, 6(3): 290-7.
- 39) Joric N, Kovac K et al. Epidermal growth factor receptor expressions correlate with tumor cell proliferation and prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res* 1997 Sep-Oct, 17(5)3883-8.
- 40) Márquez R, Gutiérrez Y. Peraza S, Castro D et al. Marcadores inmunoquímicos en lesiones gástricas premalignas. Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal "Dr. Luis Anderson". (No publicado. Datos aportados por el Autor)
- 41) Peraza S, Castro D, Oliver WE, et al. Investigación histológica del Helicobacter pylori en 265 biopsias gástricas consecutivas. *GEN* 1.991;45:163-66.
- 42) Muñoz N, Kato I et al. Prevalence of Precancerous Lesions of Stomach in Venezuela. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1996;5:41-46.
- 43) Tsuji N, Ishiguro S et al. Time Trends for small gastric cancer in Japan. *Gastric Cancer* 2000 Dec 27, 3(3): 123-127.
- 44) Ruschoff J, Mehlinger S et al. Correlation between histological and molecular mechanism of carcinogenesis in stomach cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 01 Jan 1999 83: 71- 8.
- 45) Fiocca It, Luinetti O et al. Molecular mechanism involved in the pathogenesis of gastric carcinoma: Interactions between genetics alterations, cellular phenotype and cancer histotype. *Hepatogastroenterology* 2001 Nov-Dec, 48 (42): 1523-30.

Para cualquier información o separata contactar a la:  
Dra. Yraima Gutiérrez, Centro de Control de Cáncer Gastrointestinal Dr. Luis Anderson, San Cristóbal, Estado Táchira-República Bolivariana de Venezuela.  
Fecha de Recepción Sep. 2005- Fecha de Revisión Abr. 2006- Fecha de Aprobación. Jun. 2006