

The importance of immunohistochemistry analysis of p53 and Bcl-2 in patients with preoperative oncological therapy for rectal cancer

Importanța analizării imunohistochimice a proteinelor p53 și Bcl-2 la pacienții cu neoplasme rectale tratate neoadjuvant

Teodor Florin GEORGESCU^{1,2}, Claudiu Ștefan TURCULEȚ^{1,2}, Valentin ENACHE³,
Dragoș Eugen GEORGESCU^{2,4}, Mihai-Teodor GEORGESCU^{2,5}, Mircea BEURAN^{1,2}

¹Clinica de Chirurgie Generală, Spitalul Clinic de Urgență, București, România

²Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România

³Laboratorul de Anatomie Patologică, Spitalul Clinic de Urgență, București, România

⁴Clinica de Chirurgie Generală, Spitalul Clinic „Dr. Ion Cantacuzino”, București, România

⁵Radioterapie II, Institutul Oncologic „Prof. Dr. Al. Trestioreanu”, București, România

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the expression of certain proteins (p53, Bcl-2) and to find correlations between the status of these markers and clinicopathological parameters, and prognosis in patients with rectal cancer. This study included 50 patients diagnosed with rectal cancer (stage I-III AJCC staging system 8th edition) who underwent preoperative oncological treatment and then rectal resection procedures in Clinical Emergency Hospital Bucharest in the period 01.01.2016 – 31.12.2017. p53 and Bcl-2 expression was examined using immunohistochemistry from pathological specimens obtained after surgery in the Clinical Emergency Hospital Bucharest pathology laboratory. We observed significant associations between Bcl-2 and age or extramural vascular invasion, and between p53 and hemoglobin value at admission. The univariate analysis of disease free survival (DFS) showed an important link between the presence of p53 and a poor prognosis, and the multivariate one demonstrated that the best outcome was registered for the patients with p53 negative/Bcl-2 positive phenotype. In conclusion, we believe that immunohistochemical detection of these proteins is an important tool in determining the prognosis of the patients with rectal cancer.

Keywords: rectal cancer, immunohistochemistry, proteins, p53, Bcl-2

REZUMAT

Scopul acestui studiu a fost de a analiza expresia proteinelor p53 și Bcl-2 în raport cu prognosticul și particularitățile clinico-patologice ale pacienților cu neoplasme rectale ce au beneficiat de tratament oncologic neoadjuvant și intervenții chirurgicale curative. Această lucrare a inclus un număr de 50 de pacienți diagnosticați cu neoplasme rectale (stadiile I-III ale celei de-a VIII-a ediții ale clasificării AJCC) ce au urmat tratamente neoadjuvante și operații curative efectuate în cadrul Spitalului Clinic de Urgență București în

perioada 01.01.2016 – 31.12.2017. Statusul proteinelor p53 și Bcl-2 a fost obținut imunohistochimic din speci­menele chirurgicale rezultate în urma operațiilor curative în laboratorul de anatomie patologică al Spitalului Clinic de Urgență București. Am observat că expresia proteinei Bcl-2 se corelează semnificativ statistic cu vârsta mai înaintată a pacienților și cu absența invaziei tumorale extramurale vasculare. De asemenea, am constatat că prezența proteinei p53 este asociată cu o valoare mai scăzută a hemoglobinei la internare. Analiza univariată a supraviețuirii fără recurență tumorală (DFS) a decelat un prognostic favorabil pentru pacienții p53 pozitiv, iar cea multivariată a înregistrat cel mai bun prognostic pentru bolnavii cu fenotipul p53 negativ/Bcl-2 pozitiv. În concluzie, decelarea imunohistochimică a acestor markeri este valoroasă pentru aprecierea prognosticului pacienților cu neoplasme rectale.

Cuvinte cheie: neoplasme rectale, imunohistochimie, proteine, p53, Bcl-2

INTRODUCERE

Cancerul colo-rectal reprezintă o importantă cauză de morbiditate și mortalitate, având o rată semnificativă de cazuri noi și decese în Europa și în Statele Unite ale Americii [1].

TP53 este o genă supresoare tumorală, ce are un important rol în răspunsul organismului la stres. Proteina p53 poate activa atât căi intrinseci, cât și extrinseci de apoptoză celulară. Printre țintele p53, enumerăm factori supresori tumorali ca: GADD45, WAF1 (p21), Rb, 14-3-3-σ. De asemenea, p53 inhibă acțiunea unor proteine antiapoptoice ca Bcl-2 [2]. Dacă p53 detectează un ADN lezat, poate să oprească celula în faza G1 a ciclului celular sau să conducă celula pe calea apoptozei, când leziunea este iremediabilă [3].

Bcl-2 este o protooncogenă care produce o proteină membranară capabilă de a inhiba moartea celulară programată prin stabilizarea funcției membranei mitocondriale [4]. Supraexpresia genei Bcl-2 a fost descrisă în limfoamele Hodgkin cu celule B, dar și în tumorile epiteliale colo-rectale [5].

Scopul acestui studiu a fost acela de a găsi corelații între expresia proteinelor p53 și Bcl-2 și parametrii clinico-patologici ai pacienților cu neoplasme rectale. Totodată, ne-am propus să determinăm în ce măsură expresia acestor proteine influențează prognosticul acestor pacienți.

MATERIALE ȘI METODE

Studiul a inclus 50 de bolnavi diagnosticați cu neoplasme rectale, care au fost operați în Clinica de Chirurgie Generală a Spitalului Clinic de Urgență București în perioada 01.01.2016 – 31.12.2017.

Criteriile de includere în studiu au fost reprezentate de:

- prezența cancerului rectal în stadiile I-III ale celei de-a VIII-a ediții ale clasificării AJCC;
- efectuarea unei terapii oncologice neoadjuvante;

- intervențiile chirurgicale curative au fost realizate în cadrul Spitalului Clinic de Urgență București;
- acordarea consimțământului informat în vederea analizării imunohistochimice a statusului proteinelor p53 și Bcl-2 din piesele chirurgicale.

Au fost excluși din cercetarea noastră pacienții cu neoplasme de joncțiune recto-sigmoidiană.

Parametrii clinico-patologici urmăriți au fost adunați din sistemul informatic Hipocrate, din foile de observație, din alte documente medicale provenite din alte servicii (radioterapie, oncologie, gastroenterologie) și din rapoartele histopatologice ale speci­menelor chirurgicale. A fost realizată o bază de dată ce a inclus: vârsta pacienților, valoarea hemoglobinei la internarea în spital, scorul regresiei tumorale după tratamentul oncologic neoadjuvant Ryan, stadiul T al calcificării TNM, invazia tumorală vasculară extramurală (EMVI), grading-ul tumoral, statusul p53 și Bcl-2. Urmărirea postoperatorie s-a axat pe supraviețuirea globală, recurență tumorală și supraviețuirea pacienților fără recurență tumorală (DFS). Durata medie de urmărire postoperatorie a fost de 20 de luni.

Diagnosticul imunohistochimic a fost realizat în cadrul laboratorului de anatomie patologică a Spitalului Clinic de Urgență București din piesele chirurgicale rezultate în urma operațiilor curative practicate. Citirea rezultatelor a fost realizată de către același medic anatomopatolog, specializat în acest diagnostic, pentru a reduce erorile de interpretare.

Sintetizând, procedura de imunohistochimie utilizată a inclus următoarele etape: secționarea blocului de parafină la 3 micrometri, introducerea lamelor în diferite băi (apă, soluție pentru deparafinare, alcool etilic, apă distilată, TBS – tris buffered saline, surfactant – Tween 20, substanță conservantă – Proclin 950), adăugarea unor substanțe – peroxidază, soluție Punisher, anticorpii primari cu diluantul aferent, anticorpii secundari (probă sau polimer), DAB (diaminobenzidină) cromogen, hematoxilină, soluție Bluing 10% –, deshi-

dratare prin cufundare în băi de alcool etilic și toluen, iar în final montarea pe lamă.

Analiza statistică a fost realizată prin intermediul programelor GraphPad 6 Prism și MedCalc 14.1. Testele t student au fost utilizate pentru compararea diferențelor dintre două loturi, iar testul Anova la care s-a adăugat corectura Bonferoni a fost folosit pentru analiza a trei sau mai multe grupuri. S-a recurs la programul MedCalc14.1 pentru observarea corelațiilor dintre parametrii studiați. Supraviețuirea a fost studiată cu ajutorul examinărilor Kaplan Mayer. Un interval de confidență de 95% a fost apreciat satisfăcător pentru a evita erorile de tip1 (alfa), cu o putere de calcul de 90%.

REZULTATE

Dintre cele 50 de neoplasme rectale documentate, expresia proteinei p53 s-a înregistrat în 29 de cazuri, iar prezența proteinei Bcl-2 în 12 cazuri. Nu s-au înregistrat corelații semnificative statistic între statusul p53 și parametrii clinico-patologici precum: vârsta, scorul regresiei tumorale după tratamentul oncologic neoadjuvant Ryan, stadiul T al clasificării TNM, invazia tumorală vasculară extramurală sau grading-ul tumoral. Totuși, am obținut o asociere reprezentativă între expresia proteinei p53 și valoarea Hb la internare.

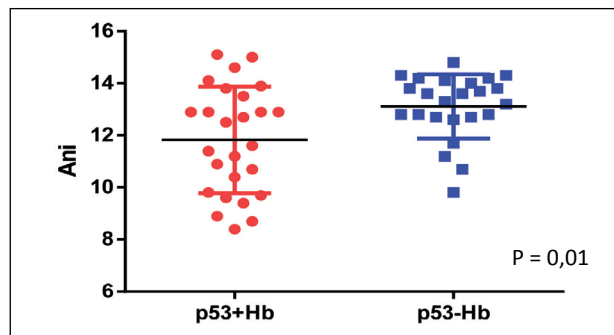


FIGURA 1. Valoarea hemoglobinei la internare în funcție de statusul p53

Astfel, se poate observa din figura 1 că bolnavii cu p53 pozitiv au o valoare a hemoglobinei mai scăzută la internare comparativ cu pacienții cu p53 negativ.

În ceea ce privește statusul proteinei Bcl-2, acesta a fost corelat statistic cu vârsta și cu invazia tumorală vasculară extramurală (EMVI).

Din figura 2, se poate constata că pacienții cu Bcl-2 pozitiv au vârstă mai mare la momentul diagnosticului față de cei cu Bcl-2 negativ.

Inviaza tumorală vasculară extramurală a fost diagnosticată cu preponderență în grupul pacienților cu Bcl-2 negativ. În antiteză, la bolnavii cu Bcl-2 pozitiv s-a înregistrat o rată scăzută a EMVI. Astfel, se poate afirma că pacienții cu Bcl-2 pozitiv au un risc mai mic de a

dezvolta invazia tumorală vasculară extramurală în decursul bolii comparativ cu cei cu Bcl-2 negativ.

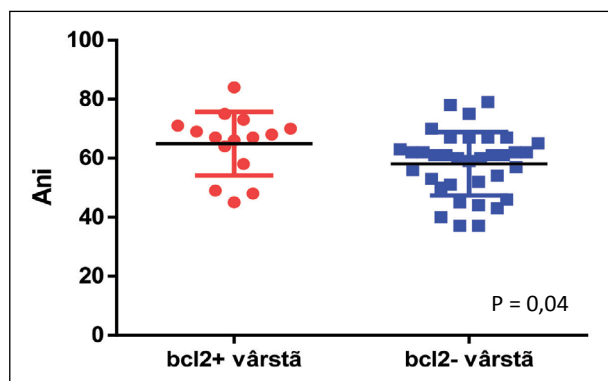


FIGURA 2. Vârsta în raport cu expresia Bcl-2

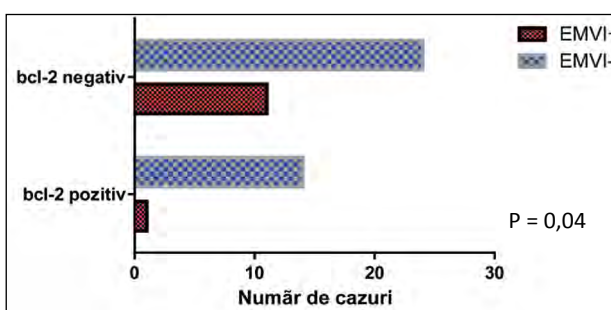


FIGURA 3. Invazia tumorală vasculară extramurală (EMVI) în raport cu statusul Bcl-2

Supraviețuirea

Am consemnat rezultate reprezentative statistic la analiza univariată a p53 în raport cu supraviețuirea fără recurență tumorală locală sau la distanță (DFS) și la cea multivariată (p53/Bcl-2) în funcție de DFS.

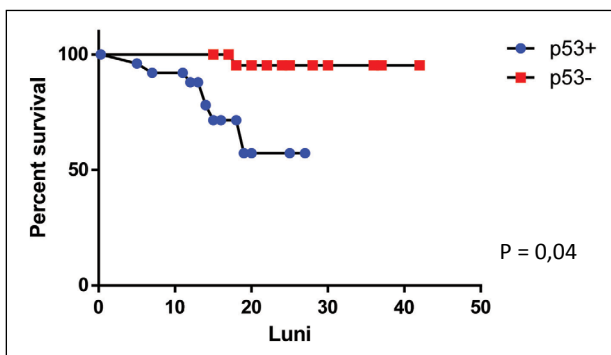


FIGURA 4. Supraviețuirea fără recurență tumorală (DFS) în raport cu expresia p53

Din figura 4, se poate constata cu ușurință că pacienții cu p53 negativ au prognostic mai bun comparativ cu cei cu p53 pozitiv. Astfel, se poate observa că durata de supraviețuire fără recidivă tumorală este mult mai mare în cazul grupului de bolnavi p53 negativ comparativ cu lotul de subiecți ce prezintă expresia proteinei p53. Rezultate similare s-au înregistrat în cazul supraviețuirii globale (OS), însă fără valoare statistică.

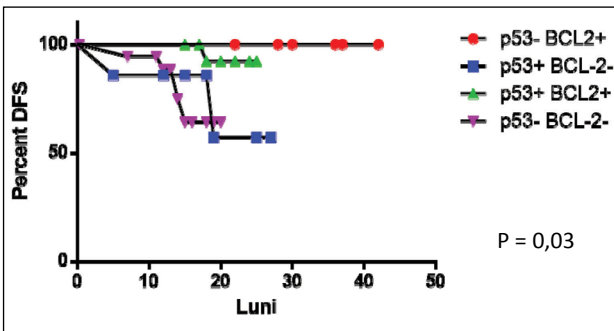


FIGURA 5. DFS în raport cu statusul combinat al p53 și Bcl-2

Analiza multivariată a markerilor imunohistochemici p53 și Bcl-2 în raport cu DFS, expusă în figura 5, relevă faptul că cel mai bun prognostic îl înregistrează bolnavii cu fenotipul p53 negativ/Bcl-2 pozitiv, urmași de cei cu p53 pozitiv/Bcl-2 pozitiv și de cei cu p53 negativ/Bcl-2 negativ. La polul opus, cel mai slab DFS s-a observat la pacienții din grupul p53 pozitiv/Bcl-2 negativ. Rezultate similare s-au înregistrat în cazul supraviețuirii globale (OS), însă fără valoare statistică.

DISCUȚII

Identificarea unor parametri ce pot aprecia comportamentul biologic al unui anumit tip de neoplazie și corelarea acestora cu agresivitatea tumorii reprezintă un punct cheie în aprecierea prognosticului. Deși s-au înregistrat progrese în definirea mecanismului de apariție și progresie a bolii neoplazice, puțini markeri moleculari ce pot indica prognosticul au fost identificați. Chiar dacă multe studii s-au axat pe descoperirea unei legături între protoncogenul Bcl-2, gena supresoare tumorală TP53 și prognostic, rezultatele rămân contradictorii [6,7].

În studiul nostru am observat asocieri semnificative statistic între vârstă și invazia tumorală vasculară extramurală și expresia proteinei Bcl-2, respectiv între statusul proteinei p53 și valoarea hemoglobinei, decelată la internare. Rezultatele din literatura de specialitate cu privire la corelațiile dintre expresia proteinelor p53 și Bcl-2 și particularitățile clinico-patologice ale bolnavilor cu neoplasme colo-rectale sunt antitetice. Astfel, unele lucrări internaționale au raportat date ce susțin legături reprezentative statistic între expresia proteinei Bcl-2 și grading-ul tumoral, mărimea tumorii sau stadiul tumoral, iar altele nu au detectat nicio corelație între statusul proteinelor p53, Bcl-2 și caracteristicile clinico-patologice ale pacienților diagnosticați cu neoplasme colo-rectale [8-11].

Spre deosebire de alte cazuri prezentate în literatura de specialitate, nu am decelat cazuri de remisie completă sau complicații severe în urma tratamentului neoadjuvant [12,13]. În concordanță cu alte studii internaționale, nu am observat asocieri reprezentative

statistic între răspunsul la terapia oncologică neoadjuvantă și proteinele p53 și Bcl-2. În urma acestor rezultate, nu am putut aprecia eficacitatea terapiei neoadjuvante în funcție de expresia proteinelor p53 și Bcl-2, nereușind să ne orientăm asupra prognosticului pacienților cu neoplasme rectale din acest punct de vedere [14,15].

Referitor la supraviețuirea pacienților cu cancer colo-rectal în funcție de prezența sau absența proteinelor p53 și Bcl-2 în țesutul tumoral, datele existente în literatura de specialitate sunt controversate. În anumite cercetări, nu s-a decelat o relevanță prognostică a proteinelor p53 și Bcl-2 [10,16], iar în alte studii acești markeri au fost asociați cu supraviețuirea [6,7,17,18].

În studiul nostru, am obținut rezultate semnificative statistic la analiza univariată a proteinei p53 în relație cu supraviețuirea fără recurență tumorală locală sau la distanță (DFS) și la cea multivariată a p53 și Bcl-2 în raport cu DFS. Din datele noastre, proteina p53 a fost identificată ca un factor independent de predicție a supraviețuirii fără recidivă tumorală, cele mai bune rezultate referitoare la DFS obținându-se la pacienții fără expresia p53. Totodată, fenotipul reprezentat de absența p53 și de prezența Bcl-2 a înregistrat cel mai bun prognostic în ceea ce privește DFS. Observațiile noastre cu privire la supraviețuire au fost confirmate de alte studii internaționale realizate pe grupuri mai mari de subiecți comparativ cu lotul nostru de pacienți [17,18].

Rolul proteinelor p53 și Bcl-2 în celulele neoplazice este controversat. Astfel, se pare că proteina p53 mutantă asigură supraviețuirea celulelor tumorale în ciuda stresului oxidativ, facilitează adaptarea țesutului tumoral la acțiunea prototoxică și asigură dezvoltarea unui microclimat tumoral protooncogen [19-21]. În celulele tumorale care prezintă expresia proteinei Bcl-2, aceasta este deseori legată de proteine proapoptice ca BIM. În aceste condiții, celulele neoplazice sunt marcate pentru apoptoză [22].

Chiar dacă mecanismele de acțiune ale proteinelor p53 și Bcl-2 în țesutul tumoral nu sunt pe deplin înțelese la acest moment, se pare că acești markeri ce pot fi detectați imunohistochimic reprezintă factori prognostici în cazul pacienților cu neoplasme colo-rectale.

CONCLUZII

Cercetarea noastră subliniază importanța decelării imunohistochimice a proteinelor p53 și Bcl-2 prin faptul că acești markeri reprezintă factori prognostici după intervenția chirurgicală curativă la pacienții diagnosticați cu neoplasme rectale. Cunoașterea expresiei acestor markeri în țesutul tumoral poate contribui la identificarea pacienților cu risc crescut de apariție a recidivei tumorale, indicând, de asemenea, prognosticul

la distanță al acestor bolnavi. Cu toate că există diverse studii pe această temă, credem că ar fi benefică continuarea studiilor în acest domeniu pentru îmbogățirea informațiilor existente în prezent. Totodată, datorită

capacității prognostice a acestor markeri, considerăm ca ar fi de un real folos introducerea în analiza histopatologică uzuală detectarea imunohistochimică a expresiei proteinelor p53 și Bcl-2.

□ □
□ □

BIBLIOGRAFIE

- Boyle P. Some recent developments in the epidemiology of colorectal cancer. In Bleiberg H, Rougier P, Wilke HJ, eds. *Management of Colorectal Cancer*. London, Martin Dunitz, 1998, pp. 19-34.
- Ladelfa MF, Toledo MF, Laiseca JE and Monte M. Interaction of TP53 with tumor suppressive and oncogenic signaling pathways to control cellular reactive oxygen species production. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15:1749-1761.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anti-cancer agents. *Cell* 1993;74:957-967.
- Bărbulescu M. Factorii de prognostic ai cancerului colorectal (II). *Jurnalul de Chirurgie (Iași)*, 2007;3(3):215-229.
- Han HJ, Ho LI, Liu GC, Lin FG, Chang JY, Lee WH. Down-regulation of Bcl-2 by p53 in nasopharyngeal carcinoma and lack of detection of its specific t(14;18) chromosomal translocation in fixed tissues. *Histopathology* 1996;28:317-323.
- Baretton GB, Diebold J, Christoforis G et al. Apoptosis and immunohistochemical Bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer* 1996;77:255-264.
- Manne U, Myers RB, Moron C et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 1997;74:346-358.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Ghosh N et al. Coexpression of Bcl-2, c-myc, and p53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1997;40:785-790.
- Schneider HJ, Sampson SA, Cunningham D et al. Bcl-2 expression and response to chemotherapy in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1997;75:427-431.
- Bosari S, Moneghini L, Graziani D et al. Bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995;26:534-540.
- Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A, Rabitti C: Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinicopathological features in colon cancer. *Cancer Lett*. 2004;208:227-234.
- Georgescu DE, Georgescu MT, Pătrașcu T, Georgescu TF. Recurrent rectal cancer complicated with perforation and necrotising fasciitis during neoadjuvant therapy. *Research and Science Today* 2018;Suppl. 1:108-114.
- Georgescu DE, Georgescu MT, Bobircă FT, Georgescu TF, Doran H, Pătrașcu T. Synchronous Locally Advanced Rectal Cancer with Clinical Complete Remission and Important Downstaging after Neoadjuvant Radiochemotherapy – Personalised Therapeutic Approach. *Chirurgia (Bucur)*. 2017;112(6):726-733.
- Yılmaz Rakıcı S, Bedir R, Hatipoğlu C. Are there predictors that can determine neoadjuvant treatment responses in rectal cancer? *Turk J Gastroenterol* 2019;30(3):220-7.
- Lopez-Crapez E, Bibeau F, Thezenas S et al. p53 status and response to radiotherapy in rectal cancer: A prospective multilevel analysis. *British Journal of Cancer* 2005;92:2114-2121.
- Tollenaar RAEM, van Krieken JHJM, van Slooten HJ et al. Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma: No evidence for prognostic significance. *Br J Cancer*. 1998;77:1842-1847.
- Schwandner O, Schiedeck TH, Bruch HP, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R. p53 and Bcl-2 as significant predictors of recurrence and survival in rectal cancer. *Eur J Cancer*. 2000;36(3):348-356.
- Watson NFS, Madjd Z, Scrimgeour D et al. Evidence that the p53 negative / Bcl-2 positive phenotype is an independent indicator of good prognosis in colorectal cancer: A tissue microarray study of 460 patients. *World Journal of Surgical Oncology* 2005;3:47.
- Lisek K, Campaner E, Ciani Y, Walerych D, Del Sal G. Mutant p53 tunes the NRF2-dependent antioxidant response to support survival of cancer cells. *Oncotarget*. 2018;9:20508-23.
- Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:581-97.
- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*. 1994;9:963-9.
- Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:121-132.