

Bcl-2, p27, p53 y MIB-1 como factores pronóstico en pacientes con mesoteliomas pleurales

RESUMEN

Antecedentes: el mesotelioma es un cáncer poco común, cuya incidencia se ha relacionado con la falta de protección personal por las prácticas de higiene industrial del pasado. En México ocasiona cerca de 100 muertes anuales. El pronóstico es malo con supervivencia media de 10 meses o menos.

Objetivo: determinar la utilidad pronóstica de *bcl-2*, *p27*, *p53* y MIB-1 y su relación con los factores de riesgo reconocidos de mesotelioma pleural.

Pacientes y método: estudio de cohorte, ambispectivo en el que se incluyeron 91 pacientes con el diagnóstico de mesotelioma en biopsias quirúrgicas del servicio de patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias entre enero de 1995 y junio de 2003. Se obtuvieron índices de reactividad en biopsias con diagnóstico morfológico y fenotípico con un analizador de imágenes con sistema AxioVision.

Resultados: la expresión de los anticuerpos *bcl 2*, *p27*, MIB-1 y *p53* fue *bcl 2*+ en 2%, *p27*+ en 61.2%, MIB-1+ en 70.5% y *p53*+ en 42.1%.

Conclusiones: en este estudio se determinó que el riesgo atribuido a la edad se debe a la pérdida de mecanismos de protección celular; la pérdida de supresión génica tumoral con el incremento de la edad no se ha descrito previamente. El periodo de supervivencia mostró también significación estadística con el incremento de la proliferación celular tumoral a medida que avanza la enfermedad. El análisis de supervivencia de Cox no mostró significación estadística al contrastar algunas variables clínicas reconocidas como factor de riesgo. Este estudio muestra que la expresión de *p27*, *p53* y MIB-1 se asocia con el pronóstico de los pacientes con mesoteliomas pleurales.

Palabras clave: *bcl-2*, *p27*, *p53*, MIB-1, factores pronóstico, mesoteliomas pleurales.

Bcl-2, p27, p53 and MIB-1 as Prognostic Factors in Patients with Pleural Mesotheliomas

ABSTRACT

Background: Malignant mesothelioma is an infrequent neoplasm but is increasing in incidence because of past industrial practices. In Mexico it causes approximately 100 deaths annually but it is predicted a rise

Manuel Gabriel Romo-Sánchez¹
Job Jesús Rodríguez-Hernández²
Marco Antonio Villalobos-Pérez²

¹ Especialista en Anatomía Patológica, Servicio de Patología, Hospital General de Ecatepec Las Américas. Catedrático de la materia de Patología en la Facultad de Medicina.

² Estudiante de la Licenciatura de Médico Cirujano. Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Recibido: 24 de octubre 2013

Aceptado: marzo 2014

Correspondencia

Dr. Job Jesús Rodríguez Hernández
job_6017@hotmail.com

Este artículo debe citarse como

Romo-Sánchez MG, Rodríguez-Hernández JJ, Villalobos-Pérez MA. *Bcl-2*, *p27*, *p53* y MIB-1 como factores pronóstico en pacientes con mesoteliomas pleurales. Med Int Méx 2014;30:257-269.

of mortality. The prognostic is poor with a median survival in the order of 10 months or less.

Objective: To determine the prognostic utility of *Bcl-2*, *p27*, *p53* and MIB-1 and their relation with the recognized risk factors of pleural mesothelioma.

Patients and method: A cohort and ambispective study was done with 91 patients with diagnosis of malignant mesothelioma in surgical biopsies of pathology service of National Institute of Respiratory Diseases of Mexico from January 1995 to June 2003. Reactivity indexes in biopsy were obtained with morphologic and phenotypic diagnosis using an image analyzer with AxioVision system.

Results: expression of antibodies *bcl 2*, *p27*, MIB-1 and *p53* was *bcl 2*+ in 2%, *p27*+ in 61.2%, MIB-1+ in 70.5% and *p53*+ in 42.1%.

Conclusions: In this study it was determined that the risk attributed to the age is because of the loss of cell protection mechanisms; the loss of tumor suppression with increase of age has not been previously described. The survival period also showed statistical significance with the increase of tumor cell proliferation as the disease progresses. The Cox survival analysis didn't show statistical significance compared to some clinical variables recognized as risk factor. This study shows that the expression of *p27*, *p53* and MIB-1 is associated with the prognosis of patients with malignant mesotheliomas.

Key words: *bcl-2*, *p27*, *p53*, MIB-1, prognostic factors, pleural malignant mesotheliomas.

El mesotelioma pleural, aunque es una enfermedad poco frecuente, debe alcanzar una incidencia máxima en los próximos 20 años debido a su periodo de latencia prolongado y al establecimiento de medidas de control de polvos a finales del decenio de 1960 y principios del de 1970.^{1,2} El mesotelioma es una neoplasia maligna que no tiene un tratamiento curativo.^{2,3}

El mesotelioma es causado en 80% de los casos por exposición ocupacional a fibras de asbesto. Las fibras de asbesto generan radicales libres reactivos e inducen enzimas antioxidantes, que participan en la patogénesis y en la resistencia elevada a los fármacos administrados en el tratamiento de esta enfermedad.³⁻⁵

Los factores pronóstico son de utilidad en los pacientes con mesotelioma porque los tratamientos tienen un efecto relativamente bajo en la evolución natural de la enfermedad, lo que hace a la precisión pronóstica importante para el médico y el paciente.⁶ La identificación de factores pronóstico es importante para asesorar apropiadamente a los pacientes y sus familias, vigilar las complicaciones del tratamiento y guiar el desarrollo de terapias novedosas. Mientras se conoce un número de factores clínicos e histológicos que influyen en la supervivencia, la predicción de los resultados sigue siendo difícil.² La confirmación del diagnóstico es un requisito esencial para proporcionar un pronóstico; desafortunadamente llegar al diagnóstico de mesotelioma no siempre resulta sencillo, aunque

las oportunidades se elevan si se involucran oncólogos, cirujanos de tórax y patólogos. La histología puede ser verificada por un patólogo experimentado al realizar el diagnóstico de mesotelioma utilizando reacciones de inmunohistoquímica apropiadas; es importante que el patólogo defina el tipo celular del tumor.⁶

Muchas series han demostrado que la supervivencia media es de 4 a 18 meses. Existen muchos artículos publicados acerca de los factores pronóstico en pacientes con mesotelioma. Algunos de los criterios incluyen tipo histológico, estado de función, edad, género, pérdida de peso, dolor torácico y estadio clínico; no obstante, muchos datos aún son confusos debido a que la estadificación, los tratamientos, los métodos de evaluación de respuesta y la elegibilidad de pacientes han variado sustancialmente.^{2,6} En particular destaca el desacuerdo en la importancia del estadio como factor pronóstico, porque sorpresivamente el estadio no se encontró como factor pronóstico importante en varios estudios. Actualizaciones recientes de las dos series quirúrgicas más largas confirmaron que los pacientes estadificados quirúrgicamente en estadio I o II superviven más tiempo que los pacientes en estadios más avanzados. Los pacientes no considerados quirúrgicos con subtipo epitelioide estuvieron mucho mejor que aquellos con otros subtipos.⁶

El derrame pleural es la manifestación clínica más frecuente, incluso 95% de los pacientes pueden estar afectados; suele ser una manifestación temprana de la enfermedad y tiende a aliviarse a medida que la enfermedad progresa y el tamaño del tumor se incrementa.^{4,7} El curso de la enfermedad es evidente por el engrosamiento progresivo de las pleuras visceral y parietal que encierran al pulmón. La diseminación de la enfermedad por afección del pulmón contralateral o por metástasis es frecuente, afecta a 30-70% de los casos en series de autopsia. La frecuencia de afección del hemitórax izquierdo suele ser

baja y probablemente pueda explicarse por el menor tamaño de la pleura izquierda. Los esquemas de estadificación propuestos basados en la afección de la pared torácica, el mediastino, el diafragma, el pulmón contralateral y la existencia de metástasis a distancia parecen tener un valor pronóstico; sin embargo, son difíciles de aplicar en ausencia de exploración quirúrgica.⁴

El grupo B de cáncer y leucemia examinó la supervivencia de pacientes con mesotelioma y encontró que los pacientes con mal estado de la función, dolor torácico, disnea, conteo plaquetario mayor de 400,000/ μ L, pérdida de peso, concentración en suero de deshidrogenasa láctica mayor de 500 UI/L, afección pleural, concentración de hemoglobina baja, conteo leucocitario elevado y edad superior a 75 años tuvieron un peor pronóstico. El análisis multivariado de Cox demostró que la afección pleural, concentración en suero de deshidrogenasa láctica mayor de 500 UI/L, deficiente estado de la función, dolor torácico, conteo plaquetario mayor de 400,000/ μ L, subtipo no epitelioide y edad superior a 75 años, en conjunto, predijeron una supervivencia corta.⁸

La Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer, mediante el análisis multivariado, asoció un mal pronóstico con el estado deficiente de la función, conteo leucocitario alto, diagnóstico histológico de mesotelioma probable o posible, género masculino y subtipo sarcomatoso.⁹

Otros estudios han corroborado como factores de mal pronóstico: sexo masculino, edad avanzada, pérdida de peso, dolor torácico, prevalencia de placas pleurales, deficiente estado de la función, hemoglobina baja, leucocitosis, trombocitosis y tipo celular no epitelial.^{2,10}

Aunque el pronóstico es malo, la duración de la supervivencia es muy variable y probablemente

se relacione con el porcentaje de proliferación de células tumorales equilibrado contra la pérdida celular por apoptosis. El *p27* y *p53* como marcadores de la mutación *p53*, la proliferación Ki67/MIB-1, PCNA y los índices mitótico y apoptótico pueden ser marcadores de pronóstico útiles en pacientes con mesotelioma, aunque parecen ser marcadores pronóstico independientes o de correlación inversa. La expresión reducida de *p27* se asocia con peor pronóstico en pacientes con mesoteliomas pleurales; el deterioro terminal de la condición de los pacientes puede asociarse con la reducción de *p27* o aumento en el índice de proliferación MIB-1.^{2,11,12}

El *p53* es codificado por un gen de supresión tumoral descubierto por Lane y Crawford como consecuencia del producto de una proteína de unión del antígeno T del virus largo SV40. Alguna vez se creyó que esta proteína nuclear tenía un papel en la neoplasia como oncoproteína de transformación dominante, pero actualmente existe suficiente evidencia para considerar a *p53* un gen de supresión tumoral. La mayor parte de las anomalías son mutaciones sin sentido que inactivan la función supresora tumoral de *p53*; aunque también se ha descrito una actividad promotora de crecimiento en *p53* mutante. La proteína *p53* tiene una vida media corta y no es detectable por métodos inmunológicos. De manera consistente se ha encontrado que la proteína mutante, que toma una conformación anormal, es más estable que la proteína *p53* natural y se acumula en las células neoplásicas, haciéndose detectable inmunológicamente. Existe considerable evidencia de que la mutación del gen *p53* es un evento común en neoplasias humanas. Además, existe una estrecha asociación entre inmunorreactividad detectable de *p53* y la existencia de mutación. Las bases moleculares de esto parecen implicar la conformación de proteínas alteradas y la subsiguiente prolongación de la vida media con acumulación de

p53, aunque esto puede ocurrir en una pequeña proporción de casos como consecuencia de otras anomalías moleculares, incluidas las alteraciones en las vías de degradación. Hasta hace poco los anticuerpos que reconocían *p53* sólo podían trabajarse en secciones congeladas de tejido, limitando el número de estudios que podían realizarse y su aplicabilidad en patología quirúrgica. En el contexto de la patología quirúrgica la frecuencia elevada de inmunorreactividad de *p53* en los mesoteliomas y su ausencia en el mesotelio reactivo sugieren que pudiera ser útil en el diagnóstico morfológico.¹¹

La proteína *p27* (inhibidor proteínasa [Kip] 1) es un inhibidor ciclina-cinasa dependiente que bloquea el ciclo celular por la unión del complejo ciclina E/Cdk2, lo que previene la progresión del ciclo celular de la fase G₁ a la fase S. Las mutaciones de los genes *p27* son poco frecuentes (en contraste con los genes que codifican *p53* y *p16*) y se piensa que el porcentaje de degradación de *p27* participa en la regulación de los niveles de actividad. La expresión reducida de *p27* se correlaciona con un curso clínico adverso en numerosas neoplasias. La pérdida de *p27* decrece la actividad supresora tumoral, lo que permite que las células proliferen activamente, promoviendo la progresión de la enfermedad.

Las concentraciones reducidas de *p27* en tumores malignos parecen estar relacionadas con la degradación elevada postranscripcional mediada por la proteólisis de la ubiquitina y no por las mutaciones en *p27* o los genes asociados con la ciclina E. La inhibición de la degradación de *p27* ofrece una oportunidad terapéutica potencial para retardar la progresión de los tumores malignos. El *p27* se relaciona también con otros parámetros de conducta maligna, como la recurrencia y el periodo libre de enfermedad.²

Ki-67 es un antígeno nuclear expresado durante partes específicas del ciclo celular y existe una

buena correlación entre la expresión de Ki-67 y las mediciones de proliferación celular. MIB-1 es un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de fijación resistente del antígeno K1-67, lo que permite que el anticuerpo se utilice en bloque de parafina después de la recuperación de antígenos por medio de calor. En algunas neoplasias la expresión de Ki-67 y MIB-1 proporciona una guía pronóstica útil.¹³

La inhibición de la apoptosis es un evento clave durante la transformación maligna, *bcl-2* es regulador de la apoptosis que se localiza en la membrana mitocondrial, la membrana nuclear y el retículo endoplásmico, cuya expresión depende del tipo de neoplasia y grado de diferenciación.^{14,15} La interacción de las proteínas *bcl-2*, *bcl-X*, *mcl-1* y *bax* toma parte en la regulación de la apoptosis de los mesoteliomas.^{16,17}

PACIENTES Y MÉTODO

Estudio de cohorte, ambispectivo, con hipótesis de trabajo del tipo $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \dots \mu_n$, relativas a determinar la relación entre los índices de proliferación celular y actividad de supresión tumoral con los factores pronóstico en pacientes mexicanos con mesoteliomas pleurales.

Recolección de datos

Se incluyeron 91 pacientes con diagnóstico de mesotelioma de la base de datos del Servicio de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de enero de 1995 a junio de 2003. Se obtuvieron 107 biopsias; se colectaron las laminillas y bloques en parafina. Se eliminaron 21 casos, 13 por no contar con bloques de parafina y 8 por incompatibilidad diagnóstica. Los 70 casos restantes se sometieron a un nuevo análisis del perfil inmunohistoquímico; dos observadores realizaron de manera independiente el diagnóstico morfológico y fenotípico.

Los antecedentes clínicos se colectaron retrospectivamente de los expedientes médicos del hospital. La información obtenida incluyó: nombre, edad, sexo, estadio, residencia, teléfono, ocupación, exposición al asbesto, hábito de fumar, vacuna contra el sarampión, deshidrogenasa láctica, plaquetas y leucocitos en sangre, pH, glucosa, proteínas deshidrogenasa láctica, leucocitos y eritrocitos en líquido pleural, registro de tomografía axial de tórax, método de obtención de la muestra en la que se basó el diagnóstico, inicio de los síntomas, localización, fecha de ingreso, fecha de defunción y seguimiento. La supervivencia se definió como el tiempo entre el diagnóstico histológico de mesotelioma y la fecha de la muerte o la última revisión clínica. El periodo mínimo de seguimiento fue de seis meses. El diagnóstico de mesotelioma, en todos los casos, se reconsideró ante los hallazgos clínicos.

Inmunohistoquímica; técnica de reactividad

Las piezas quirúrgicas se fijaron con formaldehído a 10% en buffer de fosfatos y se incluyeron en bloques de parafina. Los cortes se realizaron a 3 μ m para el diagnóstico histopatológico y a 2 μ m para la inmunorreacción. Se usó sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa. Para desmascarar epítipes se utilizó citrato de sodio a 0.1 M con pH 6.2, 0.1% *tween* 20; la actividad de peroxidasa endógena se bloqueó tratando las muestras con peróxido de hidrógeno a 0.3% en medio acuoso durante 5 minutos; los sitios de unión inespecíficos se eliminaron tratando la muestra con albúmina sérica bovina a 1% en solución amortiguadora de fosfatos durante 5 minutos. Las muestras se incubaron durante 45 minutos con los siguientes anticuerpos: antígeno carcinoembrionario (ACE) policlonal, dilución 1:200; proto-oncogén *bcl-2* clona 124, dilución 1:20; proteína S-100 policlonal, dilución 1:400; antígeno epitelial de membrana clona E29, dilución 1:100; antígeno epitelial clona

BerEp4, listo para usarse; calretinina clona DAK carlet 1, dilución 1:50; células mesoteliales clona HBME-1, listo para usarse; células endoteliales CD31 clona JC/70^a, dilución 1:50; gen supresor *p53* clona DO-7, dilución 1:50; antígeno *Ki-67* clona MIB-1, dilución 1:100; gen supresor *p27^{Kip1}* clona SX53G8, dilución 1:25; sinaptofisina clona SY38, dilución 1:50 (todos de Dako Corporation, Carpinteria, California, Estados Unidos), y células NK CD57 clona Leu 7, dilución 1:100 (Biogenex, California, Estados Unidos). Las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-ratón-anti-conejo biotinilado y con el complejo estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos cada uno LSAB+ (Dako Corporation, Carpinteria, California, Estados Unidos). Para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-deaminobencidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpinteria, California, Estados Unidos). Los controles positivos se utilizaron en cada reacción, así como el control negativo del suero normal de ratón en solución amortiguadora de fosfatos. Toda la pieza quirúrgica se analizó por inmunohistoquímica.

Criterios de inclusión y eliminación

Se incluyeron todos los casos de mesotelioma pleural en cualquier estadio que derivaron de procedimientos quirúrgicos realizados en vida con muestras histológicas representativas. Las laminillas se revisaron y clasificaron de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Ningún paciente tuvo otro tumor primario (incluido tumor pulmonar). Los algoritmos fenotípicos para eliminación de casos considerando siempre la morfología fueron: a) CEA +, HMBE 1 - y calretinina -, b) CEA +, HMBE 1 - y calretinina -, c) CEA + y CD57 + y d) Ber-Ep4 + y CD57 +. Los casos en los que el diagnóstico no pudo confirmarse y aquéllos con material insuficiente no se incluyeron. Los datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio se revisaron y registraron con estricto apego,

tomando en cuenta la fecha de biopsia, así como su eliminación respectiva para el ajuste de pruebas estadísticas.

Histología

El área más celular del tumor con el mínimo de infiltrado inflamatorio, fibrosis y necrosis se seleccionó en las laminillas para realizar el conteo en campos consecutivos con el objetivo de 40x. El número apropiado de células a contar fue de 300 a 500 o más, en dos a cinco áreas de 38,000 μm^2 , utilizando un analizador de imágenes con sistema AxioVision. Se usó el programa AxioVision 3.1 en un microscopio Carl Zeiss Axioskop 40 calibrado con laminilla micrométrica y cámara Carl Zeiss AxioCam MRc. El área tumoral total y el conteo celular se midieron en resolución media con los objetivos de 2.5x y 40x, respectivamente. El conteo se realizó sin el conocimiento de los datos clínicos; los resultados se expresaron como índices. La preservación del tejido se evaluó por medio de la reactividad de todos los anticuerpos en sus insertos. La antigüedad del tejido embebido en bloques de parafina se registró en 0 a 8 años. La densidad de reactividad se estableció como el cociente entre índice de marcaje y la unidad de área; unidad de área = (38,000 μm^2) (frecuencia).

Análisis estadístico

Una vez que se codificaron los datos se verificó la homogeneidad de variancias de las variables entre los grupos de área tumoral, sexo, hábito de consumo de tabaco y tipo histológico mediante la prueba χ^2 de Bartlett; la prueba *t* de Student para muestras independientes se utilizó para establecer la significación. El análisis de tablas de contingencia expresadas de manera nominal en tablas de 2 x 2 de las variables sexo, tabaquismo y supervivencia contra positividad para *p27*, *p53* y MIB-1 requirió la prueba χ^2 de Pearson. La prueba χ^2 de proporciones para muestras

independientes se aplicó en tablas de 2 x 3 en las variables tamaño de muestra, preservación y tipo histológico contra positividad para ACE, AEM, HMEB1, calretinina, CD57, *bcl 2*, *p27*, *p53* y MIB-1, y supervivencia y tipo de biopsia contra positividad para *p27*, *p53* y MIB-1; en tablas de 2 x 4 en las variables necrosis contra positividad para ACE, AEM, HMEB1, calretinina, *bcl 2*, CD57, *p27*, *p53* y MIB-1, y tipo histológico contra intensidad de reacción en *p27*, *p53* y MIB-1; en tablas de 3 x 3 en las variables tipo de biopsia contra tamaño de muestra en *p27*, *p53* y MIB-1; en tablas de 3 x 4 en las variables intensidad de reacción contra preservación en *p27*, *p53* y MIB-1; en tablas de 2 x 9 en las variables antigüedad del tejido contra positividad en *p27*, *p53* y MIB-1; los valores de probabilidad teóricos *p q* se ajustaron en cada caso. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó en las variables *p27*, *p53* y MIB-1 contra área tumoral, densidad de reactividad, edad, evolución, supervivencia, deshidrogenasa láctica, hemoglobina, plaquetas, leucocitos, antigüedad del tejido, *p27*, *p53* y MIB-1 y entre los valores de laboratorio.

El análisis estadístico se realizó por computadora; los valores de probabilidad (*p*) de las variables aleatorias se devolvieron siguiendo las distribuciones de probabilidad χ^2 y *t* del programa Excel.

El análisis de supervivencia se realizó con el programa Stata usando la prueba de log rank y el análisis de supervivencia de Fit Cox.

RESULTADOS

Setenta especímenes de tejido embebido en bloque de parafina se sometieron a análisis de perfil inmunohistoquímico y morfológico. Se eliminaron 20 casos, 7 expresaron CEA +, HMBE 1 - y calretinina -, 7 CEA +, HMBE 1 + y calretinina -, 2 CEA + y CD57 +, 1 Ber-Ep4 + y CD57 +, 2 tenían material insuficiente y un caso, un tumor maligno de vaina nerviosa periférica. Tres

casos admitidos como mesotelioma expresaron CEA +, HMBE 1 + y calretinina +. A los casos CD57 + adicionalmente se les realizó proteína S100 y sinaptofisina. La expresión fenotípica de los casos incluidos se caracterizó como CEA+ 6.12%, EMA+ 71.4%, HMBE1+ 73.4%, calretinina 57.1%, CD57 32.6% y Ber-Ep4 + 0%. Por tipo histológico se encontró 69.3% mesoteliomas epiteliales, 26.5% mesoteliomas mixtos y 4% mesoteliomas sarcomatosos. La cantidad de tejido neoplásico fue extensa en 40.8%, moderada en 22.4% y escasa en 36.7%. La reactividad se consideró adecuada en 36.7%, intermedia en 34.6% e inadecuada en 28.5% de los casos. La necrosis fue extensa en 20.4%, moderada en 26.5% y leve en 36.7%; ocho casos no tenían necrosis (16.3%). La antigüedad del tejido embebido en bloques de parafina fue de cero años en 10.2%, un año en 18.3%, dos años en 14.2%, tres años en 22.4%, cuatro años en 8.1%, cinco años en 6.1%, seis años en 6.1%, siete años en 10.2% y ocho años en 4%.

La expresión de los anticuerpos *bcl 2*, *p27*, MIB-1 y *p53* fue *bcl 2*+ en 2%, *p27*+ en 61.2%, MIB-1+ en 70.5% y *p53*+ en 42.1%; la intensidad de reacción en los 28 casos *p27*+ fue baja en 75% y moderada en 25%, en los 34 casos MIB-1+ fue baja en 55.8%, moderada en 35.2% e intensa en 8.8%, y en los 24 casos *p53*+ fue baja en 62.5%, moderada en 29.1% e intensa en 8.3%. El área tumoral total fue susceptible de medición en 59.1% de los casos, el resto se consideró área tumoral extensa $\geq 50,000,000 \mu\text{m}^2$.

Datos clínicos

Sólo se compilaron 48 expedientes de los 49 casos incluidos en este estudio con diagnóstico de mesotelioma. La documentación inadecuada en el expediente de datos epidemiológicos, clínicos, de laboratorio y gabinete no permitió la captura de las variables exposición ocupacional, tiempo de exposición ocupacional, sector

industrial involucrado, intervalo medio entre el comienzo de la exposición y el diagnóstico, vacuna contra el sarampión, consumo acumulado de tabaco, tratamiento y estadificación. Los datos mencionados en este rubro prácticamente fueron inexistentes; algunos pacientes fueron sometidos a centellografía, sin embargo, ninguno fue estadificado correctamente.

El grupo de estudio incluyó 36 hombres y 12 mujeres (edad media: 59.06 ± 13.17 años; límites: 27 y 89 años). Treinta y ocho pacientes provenían de la Ciudad de México, 4 de comunidades del Estado de México, 5 de estados del centro de la República Mexicana y uno de la costa este (Cuadro 1). No hubo predominio en la afección del hemitórax, 48.9% fueron derechos, 48.9% izquierdos y 2.1% bilaterales. La media del intervalo entre los primeros síntomas clínicos y el diagnóstico histológico fue de 140.6 días, límites: 28 y 672 días. Al concluir el registro de datos nueve pacientes habían fallecido en este hospital y 39 no tenían seguimiento; vía telefónica se recuperó la fecha de defunción de otros 14 casos, un paciente permanecía vivo y los 24 restantes no pudieron ser recuperados (Cuadro 2). La supervivencia registrada a partir del diagnóstico histológico fue de 20.8% en el primer año y de 4.1% a dos años, con media de 244.83 días. La media de supervivencia en sujetos de 60 años o más fue de 209.27 días vs 274.92 días en los menores de 60 años de edad, χ^2_{Bartlett}

Cuadro 1. Lugar de residencia

Distrito Federal	Núm.	Zona metropolitana	Núm.
Álvaro Obregón	1	Atizapán	3
Azcapotzalco	1	Chimalhuacán	1
Coyoacán	4	Cuautitlán	4
Gustavo A Madero	1	Ecatepec	3
Iztacalco	1	Nezahualcóyotl	4
Iztapalapa	2	Tlalnepantla	4
Milpa Alta	1	Tultitlán	2
Tláhuac	1		
Venustiano Carranza	3		

Cuadro 2. Registro telefónico de casos sin seguimiento

Motivo	Núm.
No registrado en el expediente	6
No contestan	2
Teléfono con cambio de domicilio	3
Fuera de servicio	6
Teléfono de referencia; curso clínico desconocido	1
No conocían a la persona	2
Larga distancia; código no identificado	3

= 22.69 ($p < 1,1828\text{E-}05$), $t = 0.72$ (una cola $p < 0.23$; dos colas $p < 0.47$). La media de supervivencia de los pacientes con mesoteliomas de localización derecha fue de 275.62 días contra 183.25 días en los del lado izquierdo, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 16.24$ ($p < 0.0002$), $t = 0.97$ (una cola $p < 0.17$; dos colas $p < 0.34$).

El diagnóstico histopatológico se determinó por biopsia percutánea en 40.4%, toracoscopia en 23.4% y toracotomía en 36.1%. El hábito de fumar fue positivo en 74.4% y negativo en 25.5%. La media de supervivencia en sujetos con tabaquismo positivo fue de 248.85 días vs 239.66 días en los sujetos sin tabaquismo, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 11.13$ ($p < 0.003$), $t = 0.06$ (una cola $p < 0.47$; dos colas $p < 0.94$). La media de supervivencia en sujetos con mesotelioma epitelioide fue de 253.68 días vs 227.12 días en los de mesotelioma mixto o sarcomatoide, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 15.46$ ($p < 0.0004$), $t = 0.27$ (una cola $p < 0.39$; dos colas $p < 0.78$). La media de supervivencia en sujetos con biopsias sin necrosis o necrosis leve fue de 248.14 días vs 240.2 días en biopsias con necrosis moderada o extensa, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 19.48$ ($p < 5.8613\text{E-}05$), $t = 0.08$ (una cola $p < 0.46$; dos colas $p < 0.93$).

El registro de los factores pronóstico en sangre periférica fue del 100% para hemoglobina, leucocitos y plaquetas y de 93.7% para deshidrogenasa láctica; en líquido pleural fue de 39.5% para leucocitos, 25% para eritrocitos, 27% para

pH, 54.1% para glucosa, 56.2% para proteínas y 50% para deshidrogenasa láctica. La asociación lineal se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Cuadro 3).

La frecuencia del intervalo de supervivencia en dos (grupo 1, 1 a 249 días y grupo 2, 250 días o más) y tres grupos (grupo 1, 1 a 100 días;

grupo 2, 101 a 200 días y grupo 3, más de 200 días) se contrastó con los índices de marcaje de *p27*, MIB-1 y *p53*; obteniendo *p27* $\chi^2_{\text{Pearson}} = 0$ ($p < 1$), MIB-1 $\chi^2_{\text{Pearson}} = 0.90$ ($p < 0.34$) y *p53* $\chi^2_{\text{Pearson}} = 0.68$ ($p < 0.40$) y *p27* $\chi^2_{\text{Proporciones}} = 7.92$ ($p < 0.16$), MIB-1 $\chi^2_{\text{Proporciones}} = 17.86$ ($p < 0.003$) y *p53* $\chi^2_{\text{Proporciones}} = 7.99$ ($p < 0.15$), respectivamente (Cuadros 4 y 5). La intensidad

Cuadro 3. Coeficientes de correlación

Variable	MIB-1	<i>p53</i>	<i>p27</i>	Supervivencia	Evolución	Hemoglobina	Plaquetas	Leucocitos
Deshidrogenasa láctica (UI/L)	0.1975	0.4241	-0.1591	-0.3499	-0.0636	0.0335	-0.1006	0.3831
Leucocitos/mm ³	0.3758	0.1581	-0.0282	-0.2642	-0.1190	-0.1756	0.2447	
Plaquetas/mL	0.2437	0.3312	0.1745	-0.1205	0.1443	-0.6014		
Hemoglobina (g/dL)	-0.3230	-0.1912	0.0280	0.2063	-0.1239			
Área tumoral	0.3228	0.2437	0.4346					
Biopsias sin área $\geq 5 \times 10^7 \mu\text{m}^2$	0.2100	0.0596	-0.0811					
Antigüedad del tejido	-0.1812	0.0604	-0.2165					
Densidad de reactividad	0.9273	0.9894	0.9470					
Edad	0.0346	0.0574	-0.1729					
Evolución	-0.1083	-0.0893	0.0005					
Supervivencia	-0.0976	-0.2319	0.0457					
<i>p27</i>	0.3082	0.0519						
<i>p53</i>	0.3740							

Cuadro 4. Prueba χ^2 de Pearson

	Hábito de fumar, χ^2 y $p <$		Sexo, χ^2 y $p <$		Supervivencia, χ^2 y $p <$	
<i>p27</i>	0.010307	0.919134	0.029038	0.864691	0	1
MIB-1	0.166587	0.683162	4.313725	0.037806	0.909890	0.340143
<i>p53</i>	0.444444	0.504985	1.777777	0.182422	0.685714	0.407625

Cuadro 5. Prueba χ^2 de proporciones para muestras independientes; tablas de 2 x 3

	Reactividad, χ^2 y $p <$		Tipo histológico, χ^2 y $p <$		Tamaño de biopsia, χ^2 y $p <$	
ACE	23.7766	0.0002	110.1666	3.78E-22	29.1666	2.15E-05
EMA	15.721	0.0076	64.8182	1.22E-12	14.4189	0.01315
HMBE1	16.971	0.0045	57.9432	3.23E-11	12.7696	0.0256
CD57	9.0296	0.1078	5.942	0.3118	8.829	0.116
Calretinina	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Pendiente
<i>p27</i>	9.2128	0.1008	11.9287	0.0357	8.8769	0.114
MIB-1	7.1049	0.2129	11.0325	0.0507	7.3148	0.1982
<i>p53</i>	8.8255	0.1162	11.6755	0.0395	8.627	0.1248

Reactividad en CD57, *p27*, MIB-1 y *p53*, $p < 0.4$ y $q < 0.6$; tipo histológico en *p27*, MIB-1 y *p53* $p < 0.5$ y $q < 0.5$; tamaño de biopsia CD57, *p27*, MIB-1 y *p53*, $p < 0.4$ y $q < 0.6$; resto $p < 0.1$ y $q < 0.9$.

de reacción inmunohistoquímica se agrupó por frecuencias como negativa, baja, moderada e intensa en tablas de contingencia de 2 x 4, 3 x 4 y 4 x 4 (Cuadros 6 y 7). El tipo de biopsia se contrastó con la cantidad de tejido obteniendo una $\chi^2_{\text{Proporciones}} = 11.60$ ($p < 0.16$).

La media de supervivencia en sujetos con p27+ fue de 251.75 días vs 237.91 días en los de p27-, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 11.18$ ($p < 0.003$), $t = 0.57$ (una cola p

Cuadro 6. Prueba de χ^2 de proporciones para muestras independientes; tablas de 2 x 4

	Necrosis, χ^2 y $p <$		Intensidad de reacción, χ^2 y $p <^*$	
p27	4.202	0.756	9.772	0.201
MIB-1	7.205	0.407	5.954	0.545
p53	1.607	0.978	15.784	0.027
Bcl 2	Pendiente	Pendiente		
ACE	16.984	0.017		
EMA	6.074	0.531		
HMBE1	6.558	0.476		
CD57	7.971	0.335		
Calretinina	Pendiente	Pendiente		

Necrosis en MIB-1, EMA, HMBE1 y CD57, p 0.4 y q 0.6; p27 y p53, p 0.3 y q 0.7 y ACE, p 0.1 y q 0.9. Intensidad de reacción p 0.5 y q 0.5.

*Por tipo histológico.

Cuadro 7. Prueba χ^2 de proporciones para muestras independientes p 0.1 y q 0.9

Intensidad de reactividad por estado de preservación; tablas 3 x 4				
p27	$\chi^2 =$	2.0976	$p <$	0.9981
MIB-1	$\chi^2 =$	0.6543	$p <$	0.9999
p53	$\chi^2 =$	4.1190	$p <$	0.9663
Intensidad de reactividad contra necrosis; tablas 4 x 4				
p27	$\chi^2 =$	0.8611	$p <$	0.9999
MIB-1*	$\chi^2 =$	0.5226	$p <$	1.0000
p53	$\chi^2 =$	1.2554	$p <$	0.9999
Antigüedad del tejido; tablas 2 x 9				
p27	$\chi^2 =$	1.2424	$p <$	0.9999
MIB-1	$\chi^2 =$	0.7530	$p <$	1.0000
p53	$\chi^2 =$	1.4618	$p <$	0.9999

* p 0.2 y q 0.8.

< 0.28 ; dos colas $p < 0.57$). La media de supervivencia en sujetos con p53+ fue de 249.91 días vs 239.75 días en los de p53-, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 15.69$ ($p < 0.0003$), $t = 0.11$ (una cola $p < 0.45$; dos colas $p < 0.91$). La media de supervivencia en sujetos con MIB-1+ fue de 261.29 días vs 199.5 días en los de MIB-1-, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 15.85$ ($p < 0.0003$), $t = 0.15$ (una cola $p < 0.44$; dos colas $p < 0.88$).

El intervalo de evolución se definió como el tiempo entre el inicio de los síntomas hasta el momento del diagnóstico histopatológico. La media del intervalo de evolución en sujetos de 60 años o más fue de 99.21 días vs 195.44 días en los de menos de 60 años, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 83.84$ ($p < 6.1974\text{E-}19$), $t = 2.71$ (una cola $p < 0.004$; dos colas $p < 0.009$). La media del intervalo de evolución de los mesoteliomas de localización derecha fue de 157.04 días vs 145.83 días en los del lado izquierdo, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 50.78$ ($p < 9.3613\text{E-}12$), $t = 0.28$ (una cola $p < 0.38$; dos colas $p < 0.77$). La media del intervalo de evolución en sujetos con tabaquismo positivo fue de 146.4 días vs 156.33 días en los sujetos sin tabaquismo, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 24.69$ ($p < 4.3506\text{E-}06$), $t = 0.22$ (una cola $p < 0.41$; dos colas $p < 0.82$). La media del intervalo de evolución en sujetos con biopsias sin necrosis o necrosis leve fue de 151.30 días vs 147 días en biopsias con necrosis moderada o extensa, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 38.13$ ($p < 5.2264\text{E-}09$), $t = 0.11$ (una cola $p < 0.45$; dos colas $p < 0.91$). La media del intervalo de evolución en sujetos con mesotelioma epitelioide fue de 142.54 días vs 164.26 días en los de mesotelioma mixto o sarcomatoide, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 27.73$ ($p < 9.506\text{E-}07$), $t = 0.52$ (una cola $p < 0.29$; dos colas $p < 0.59$). La media del intervalo de evolución en sujetos con p27+ fue de 147 días vs 153.22 días en los de p27-, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 31.55$ ($p < 1.4029\text{E-}07$), $t = 0.15$ (una cola $p < 0.43$; dos colas $p < 0.87$). La media del intervalo de evolución en sujetos con p53+ fue de 123.66 días vs 175 días en los de p53-, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 65.52$ ($p < 5.8945\text{E-}15$), $t = 1.37$ (una cola $p < 0.08$;

dos colas $p < 0.17$). La media del intervalo de evolución en sujetos con MIB-1+ fue de 141.64 días vs 170.8 días en los de MIB-1-, $\chi^2_{\text{Bartlett}} = 37.02$ ($p < 9.1261\text{E-}09$), $t = 0.60$ (una cola $p < 0.27$; dos colas $p < 0.55$).

DISCUSIÓN

Interpretación de resultados

El análisis de supervivencia de Fit Cox del periodo supervivencia en una a siete interacciones, con intervalo de confianza de 95%, no mostró significación estadística al contrastar: el índice MIB-1 con edad, sexo, tabaquismo, evolución, localización, hemoglobina, leucocitos en sangre, plaquetas, deshidrogenasa láctica, citoquímico de líquido pleural, tipo de biopsia y estado de preservación de la muestra; el índice $p53$ con sexo, tabaquismo, evolución, localización, hemoglobina, leucocitos en sangre, plaquetas, deshidrogenasa láctica, citoquímico de líquido pleural y estado de preservación de la muestra; el índice $p27$ con sexo, tabaquismo, evolución, localización, plaquetas, deshidrogenasa láctica, citoquímico de líquido pleural y estado de preservación de la muestra.

El periodo supervivencia mostró significación estadística entre: a) índice $p53$ y edad; esta expresión fue afectada parcialmente por la cantidad de tejido tumoral en la muestra y el tipo de biopsia; b) índice $p27$ con edad, hemoglobina y leucocitos en sangre; esta expresión fue afectada parcialmente por el tipo de biopsia y la cantidad de tejido tumoral en la muestra; c) índice $p53$ y $p27$ con el periodo total de enfermedad. El intervalo de supervivencia y el periodo total de enfermedad se relacionaron con la expresión de $p53$ y $p27$; la pérdida de supresión génica tumoral con el incremento de la edad no se ha descrito, por el contrario, se postuló la posibilidad de que los mesoteliomas pierden estos mecanismos de protección celular a medida

que avanza la enfermedad.² No obstante, ante los resultados de este estudio, parece prudente considerar que el riesgo atribuido a la edad se debe a la pérdida de mecanismos de protección celular y no sólo al incremento propio de la agresividad tumoral.

La prueba χ^2 de Pearson no mostró significación estadística al contrastar los índices $p53$, $p27$ y MIB-1 con sexo, tabaquismo y supervivencia en dos grupos; excepto en la relación índice MIB-1 y sexo.

La prueba χ^2 de proporciones para muestras independientes mostró significación estadística en la reactividad positiva de AEM, HMBE-1, calretinina, $p27$ y $p53$; el tipo histológico epitelial tuvo preponderancia en la reactividad de AEM, HMBE-1, calretinina, $p27$ y $p53$ debido a su mejor grado de diferenciación; asimismo, ACE, Ber-Ep4 y *bcl 2* por su muy baja expresión en este tipo de neoplasias.^{18,19} La expresión preponderante de $p27$ y $p53$ en los tumores de tipo epitelial se debe a la preservación de este mecanismo celular en tumores mejor diferenciados. La expresión escasa de *bcl 2* se atribuye a que algunas neoplasias de alto grado, mal diferenciadas o en estadio tardío pueden mantener una relación proporcional, inversa o independiente de la apoptosis.¹⁴ El periodo de supervivencia en tres grupos también mostró significación estadística con la reactividad del índice MIB-1 y no con el periodo total de enfermedad en el análisis de supervivencia de Cox descrito previamente; esto debe interpretarse como un incremento de la proliferación celular tumoral a medida que avanza la enfermedad.

La prueba χ^2 de proporciones para muestras independientes no mostró significación estadística en la reactividad de los índices $p53$, $p27$ y MIB-1 con la necrosis, el estado de preservación de la muestra, el tipo de biopsia y la antigüedad del tejido.

El coeficiente de correlación de Pearson no mostró asociación en ninguna variable reconocida como factor de riesgo; aunque en este estudio no se parearon muestras dependientes de las variables derivadas de la biometría hemática y el estudio citoquímico de líquido pleural (Cuadro 3). La prueba *t* de Student mostró resultados similares a los del análisis de supervivencia de Cox en relación con la expresión de los índices *p53*, *p27* y MIB-1 con la cantidad de tejido tumoral en la muestra (Cuadro 8).

Las causas del conflicto de los resultados publicados en la utilidad de las variables de pronóstico de carácter clínico pueden atribuirse a la amplia variedad de factores, que incluyen la selección de casos, variaciones en la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos utilizados, tipo de espécimen en el que se realizaron los estudios de inmunohistoquímica, de si se realizaron o no los procedimientos de recuperación de epítopes, la interpretación de los resultados y la participación de un equipo multidisciplinario que incluya patólogos y biólogos moleculares.^{4,20}

CONCLUSIÓN

En años recientes se realizaron muchos estudios enfocados a definir el pronóstico de los

pacientes con mesotelioma; largas series han intentando identificar los marcadores clínicos que se correlacionan con la supervivencia. Algunos estudios han tenido la finalidad de estimar el pronóstico a través de la supresión génica tumoral, la proliferación celular y la apoptosis; esta vertiente de los factores pronóstico puede ser la más importante de todas, porque proporciona elementos de intuición en la biología del cáncer y conduce a mejorar la comprensión de la patogénesis molecular. Este estudio muestra que la expresión de *p27*, *p53* y MIB-1 se asocia con el pronóstico de los pacientes con mesoteliomas pleurales.

REFERENCIAS

1. Gottehrer A, Taryle DA, Reed CE, Sahn SA. Pleural fluid analysis in malignant mesothelioma. *Chest* 1991;100:1003-1006.

2. Beer TW, Shepherd P, Pullinger NC. p27 immunostaining is related to prognosis in malignant mesothelioma. *Histopathology* 2001;38:535-541.

3. Jarvinen K, Soini Y, Kahlos K, Kinnula VL. Overexpression of g-glutamylcysteine synthetase in human malignant mesothelioma. *Human Pathol* 2002;33:748-755.

4. Chailleux E, Dabouis G, Pioche D, Lajartre M, et al. Prognostic factors in diffuse malignant mesothelioma. *Chest* 1988;93:159-162.

5. Carbone M, Kratzke RA, Testa JR. The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Oncol* 2002;29:2-17.

Cuadro 8. Prueba χ^2 de Bartlett y *t* de Student

	χ^2_{Bartlett}	<i>p</i> <	<i>t</i>	Una cola <i>p</i> <	Dos colas <i>p</i> <
Sexo					
p27	36.7245	1.06E-08	0.6064	0.2735	0.5471
MIB-1	22.8161	1.11E-05	1.0484	0.1501	0.3002
p53	53.6814	2.20E-12	0.0642	0.4745	0.9490
Tabaquismo					
p27	24.4873	4.82E-06	0.5939	0.2777	0.5555
MIB-1	24.3091	5.26E-06	0.4697	0.3205	0.6410
p53	67.9368	1.77E-15	1.3406	0.0933	0.1867
Área tumoral*					
p27	52.8082	3.41E-12	4.1079	7.92E-05	0.0001
MIB-1	56.5999	5.12E-13	2.1023	0.0207	0.0414
p53	47.2256	5.56E-11	1.8187	0.0376	0.0753

*Área tumoral extensa contra escasa y moderada.

6. Steele JPC. Prognostic factors in mesothelioma. *Semin Oncol* 2002;29:36-40.
7. Gottehrer A, Taryle DA, Reed CE, Sahn SA. Pleural fluid analysis in malignant mesothelioma. *Chest* 1991;100:1003-1006.
8. Herndon JE, Green MR, Chahinian AP, et al. Factors predictive of survival among 337 patient with mesothelioma treated between 1984 and 1994 by the cancer and leukemia Group B. *Chest* 1998;113:723-731.
9. Curran D, Sahmoud T, Therasse P, et al. Prognostic factors in patients with pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 1998;16:145-152.
10. Edwards JG, Abrams KR, Leverment JN, et al. Prognostic factors for malignant mesothelioma in 142 patients: Validation of CALGB and EORT prognostic scoring systems. *Thorax* 2000;55:731-735.
11. Kafiri G, Thomas DM, Shepherd NA, Krausz T, et al. p53 expression is common in malignant mesothelioma. *Histopathology* 1992;21:331-334.
12. Ramael M, Jacobs W, Weyler J, Meerbeeck J, et al. Proliferation in malignant mesothelioma as determined by mitosis counts and immunoreactivity for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Pathology* 1994;172:247-253.
13. Beer TW, Buchanan R, Matthews AL, Stradling R, et al. Prognosis in malignant mesothelioma related to MIB-1 proliferation index and histological subtype. *Hum Pathol* 1998;29:246-251.
14. Jäckel MC, Dorudian MA, Marx D, Brinck U, et al. Spontaneous apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma is independent of *bcl-2* and *bax* protein. *Cancer* 1999;85:591-599.
15. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nakano R. Apoptosis and expression of *bax* and *bcl-2* in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1999;85:591-599.
16. Soini Y, Kinnula V, Kaarteenaho-Wiik R, Kurttila E, et al. Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins *bcl-2*, *mcl-1*, *bcl-X*, and *bax* in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 1999;5:3508-3515.
17. Narasimhan SR, Yang L, Gerwin BI, Broaddus VC. Resistance of pleural mesothelioma cell lines to apoptosis: relation to expression of *bcl-2* and *bax*. *Am J Physiol* 1998;275:165-171.
18. Ordonez NG. Immunohistochemical diagnosis of epitheloid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers. *Hum Pathol* 2002;33:953-967.
19. Tibor T. The value of cytokeratines 20 and 7 in discriminating metastatic adenocarcinomas from pleural mesotheliomas. *Cancer* 2001;92:2727-2732.
20. Liddell FDK, McDonald AD, McDonald JC. The 1891-1920 birth cohort of Quebec chrysotile miners and millers: Development from 1904 and mortality to 1992. *Ann Occup Hyg* 1997;41:13-36.