



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE P53 EN LA FOTOCARCINOGENÉISIS

**AUTORES:
DÍAZ, FRANCYS
PÉREZ, ISABEL
RODRÍGUEZ, ERIKA
SÁNCHEZ, ANDREA**

**TUTOR ESPECIALISTA:
HIST. GUSTAVO MERCHOR.
TUTOR METODOLÓGICO:
ALCIRA ARGUELLO**

BÁRBULA, JUNIO 2017



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el Informe Monográfico titulado:

**TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE P53 EN LA
FOTOCARCINOGENÉISIS**

Presentado por los bachilleres:

Díaz Francys C.I: 25.971.217.
Pérez, Isabel C.I: 23.420.435.
Rodríguez, Erika C.I: 23.648.230.
Sánchez, Andrea C.I: 23.440.036.

Hacemos constar que hemos examinado y aprobado el mismo, y que aunque no nos hacemos responsables de su contenido, lo encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha: _____

Profesor

Profesor

Profesor



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
TRABAJO MONOGRÁFICO



**TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE P53 EN LA
FOTOCARCINOGENÉNESIS**

AUTORES:

Díaz, Francys

Pérez, Isabel

Rodríguez, Erika

Sánchez, Andrea

TUTOR ESPECIALISTA: Hist. Gustavo Merchor.

TUTOR METODOLÓGICO: Prof. Alcira Arguello.

RESUMEN

El cáncer en los últimos años ha sido la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo de alta incidencia en Venezuela, por ésta razón el objetivo de este trabajo es analizar la importancia de la técnica de inmunohistoquímica para la determinación de la P53 en la fotocarcinogénesis y conocer los métodos que en el área de Histotecnología se puedan aplicar para darle a los pacientes la información y los resultados precisos de su carcinoma cutáneo, aplicando estudios directos para dicha patología. Por lo tanto ésta investigación busca analizar el procedimiento para la detección de la P53 mediante un estudio histopatológico, siendo de gran relevancia a la sociedad puesto que existe un gran número de afectados que ignoran la patología en general y la alta incidencia en los últimos años. Presentando esta investigación monográfica de tipo documental se analizaron revistas, tesis, entre otros, que fueron publicados y aprobados científicamente mediante los estudios del cáncer por medio de la detección del P53 realizando investigaciones utilizando esta proteína como marcador tumoral. En conclusión el uso de esta proteína en particular va a arrojar un tipo de cáncer específico, el estado y avance del tumor que en este caso será de la fotocarcinogénesis y a su vez facilitará el trabajo del profesional de la salud porque al laborar lo hará con una sola técnica directa, ahorrando reactivos y tiempo para dar un resultado que posteriormente se convertirá en un diagnóstico preciso y certero.

Palabras clave: Cáncer, fotocarcinogénesis, estudio histopatológico, inmunohistoquímica, P53.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO MONOGRÁFICO



**TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF P53 IN
PHOTOCARCINOGENICITY**

AUTHORS:

Díaz, Francys
Pérez, Isabel
Rodríguez, Erika
Sánchez, Andrea

SPECIALIST TUTOR: Hist. Gustavo Merchor.

METHODOLOGICAL TUTOR: Alcira Arguello

ABSTRACT

In recent years, Cancer has been the second cause of death in the world, being of high incidence in Venezuela, for this reason the main objective of this investigation is to analyze the importance of the immunohistochemistry technique to determine P53 in photocarcinogenesis, and to know the methods that they can be applied to give the patients the information and specific results of their cutaneous carcinoma in the histotechnology area, with direct studies in this pathology. Therefore, this research seeks to analyze the procedure for the detection of P53 by means of a histopathological study, being relevant to the society since there is a high number of affected people who ignore the pathology and the high incidence in the last years. This research is based in a documental investigation like a monographic and it was analyzed magazines, theses, among others, that were published and approved scientifically through cancer studies by means of the P53 conducting research using this protein as a tumor marker. In conclusion, the use of this particular protein will throw a specific type of cancer, the state and evolution of tumor that in this case will be photocarcinogenesis an it will facilitate the work of the professional health because the work will do a single direct technique, saving reagents and time to give a result that will become an accurate diagnosis.

Keywords: Cancer, photocarcinogenesis, histopathological study, immunohistochemistry, P53.

ÍNDICE

CONSTANCIA DE ENTREGA.....	II
CONSTANCIA DE APROBACION.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUCCIÓN.....	07
DESARROLLO.....	10
ANTECEDENTES.....	10
DETECCIÓN DE LA P53 Y EL CÁNCER.....	12
TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE P53 EN LA FOTOCARCINOGENESIS...	15
IMPORTANCIA DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA P53.....	18
CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el número de fallecidos y afectados por la fotocarcinogénesis se ha incrementado significativamente puesto que afecta a todas las personas que se expongan horas prolongadas a los rayos ultravioleta (UV), dicho de otra manera la exposición a la radiación electromagnética que no es visible por su longitud de onda menor, ejerce un efecto perjudicial sobre los seres vivos al alterar el ADN y ARN, que puede inducir a la diferenciación celular dando origen a diversas lesiones de piel, por un lado debido al deterioro de la capa de ozono y por el otro a una cultura que va en contra de la prevención (protección solar), siendo un problema de salud pública.

Para comenzar podemos aclarar que la piel, también conocida como membrana cutánea cubre la superficie externa del cuerpo y es el órgano más grande tanto en superficie como en peso, consta de dos partes principales, la porción superficial más delgada que está constituida por tejido epitelial y se le denomina epidermis, compuesta por un epitelio pavimentoso estratificado queratinizado que contiene cuatro tipos principales de células: los queratinocitos, los melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel y una más profunda engrosada denominada dermis, constituida por tejido conectivo denso irregular y fibras elásticas.¹ Así mismo la piel es una barrera que interconecta al cuerpo con el medio ambiente y está propensa a sufrir afecciones producidas por sus residuos, ocasionando el deterioro de la dermis y la sobre exposición a los rayos ultravioleta (UV).²

A nivel mundial, Australia es el país que tiene la más alta incidencia con promedios de 1% a 2% por año. En los EE.UU las cifras han ido en aumento en el adulto joven, en relación con los hábitos de exposición al sol y en Chile existen pocos estudios de prevalencia. El papel de la inmunosupresión inducida por radiación UV en la fotocarcinogénesis y los efectos de la radiación en la función de las células de Langerhans epidérmicas aportan cada vez más evidencia de que la radiación UVB, UVA, ejercen profundos efectos sobre la piel.³ Comprendiendo el espectro de la radiación UV la cual se divide en UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) y UVA (320-400 nm), en el caso de la UVC penetra poco la capa de ozono, por lo cual no posee relevancia a la hora de daños a la piel, sin embargo, la UVB y UVA tienen capacidad de penetración y son causantes de efectos perjudiciales en la piel

(eritema, fotoenvejecimiento, quemaduras solares, fotoinmunosupresión y la carcinogénesis en la piel), la UVB tiene mil veces mayor capacidad de producir la fotocarcinogénesis.⁴

La luz UV puede ser una de las principales causantes de estas enfermedades cutáneas o medio propicio para la evolución de las mismas aumentando la aparición de células cancerígenas que dan origen al cáncer de piel. Las últimas estadísticas publicadas por Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) para el año 2013, reflejan que el cáncer en sus distintas expresiones y estadios representaba la segunda causa de muerte con un 15,42%, lo que significa un total de 23.121 personas fallecidas dentro de las cuales 1.480 fueron por cáncer de piel,⁵ esta cifras no excluye que la causa del cáncer de piel se deba a la fotocarcinogénesis, ya que los venezolanos día a día se ven expuestos a estos efectos solares, muchas veces sin contar con medidas de prevención.

En este sentido, a nivel histológico las lesiones de piel de origen físico (luz UV), se pueden estudiar mediante marcadores inmunohistoquímicos con implicancia pronostica del origen etiológico del cáncer de piel. Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular: la regulación de la expresión génica, control del ciclo celular, programación de la muerte celular y estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula lo cual conduce, en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos. Actualmente, el conocimiento sobre las alteraciones genéticas que potencian la iniciación del cáncer puede facilitar la detección precoz de los tumores primarios y de las posibles recurrencias lo cual puede determinar el éxito en su tratamiento.⁶

La proteína codificada por el gen supresor de tumor P53, es una fosfoproteína que se localiza en el núcleo celular. Esta proteína fue descubierta a finales de la década de los 70 e identificada como una fosfoproteína celular de 53 kD capaz de enlazarse al antígeno transformante presente. Su determinación se considera un factor predictivo en diversas formas de cáncer; es decir, una expresión aumentada de P53 se utiliza como marcador tumoral para evaluar la progresión en el melanoma.⁶

El gen supresor tumoral P53 juega un papel importante en un gran número de neoplasias humanas, pudiéndose detectar sus alteraciones de forma indirecta mediante inmunohistoquímica, ya que la proteína «mutada» es más estable y de mayor vida media, lo que la hace detectable y sensible a las técnicas de diagnóstico. La expresión inmunohistoquímica de la proteína P53 es un factor controvertido en cuanto a su posible influencia pronóstica. El 90% de los casos de cáncer de piel en pacientes norteamericanos contienen mutaciones en el gen supresor P53, la radiación hace mutar tempranamente el gen en el desarrollo de la patología, demostrándose su presencia en los queratinocitos actínicos.^{7,8}

Por ésta razón, la investigación se diseña en un objetivo general que tiene como finalidad analizar la importancia de la técnica de inmunohistoquímica para la determinación de la P53 en la fotocarcinogénesis y de allí se desprenden los consecutivos objetivos específicos a desarrollar: describir la técnica para la detección de la P53, explicar la técnica para la determinación de P53 en la fotocarcinogénesis y especificar la importancia de la aplicación de la técnica para la determinación de la P53, de manera que se pueda evidenciar la triangulación de las referencias bibliográficas como parte del proceso de producción de conocimiento. Teniendo en cuenta lo anterior, desde el punto de vista metodológico esta investigación, se estructura en un diseño bibliográfico de tipo documental, ya que se revisaron las principales bases de datos para realizar un arqueo sistemático de las principales referencias bibliográficas publicadas sobre esta temática. Entre tanto, para dar respuesta al objetivo general se realizó una argumentación crítica e interpretativa de los datos secundarios obtenidos por otros autores.

Finalmente, la presente investigación será de gran utilidad para ampliar y dar a conocer la técnica inmunohistoquímica para la determinación de la P53 en la fotocarcinogénesis y su importancia en los estudios de las lesiones de piel, dando información a las diferentes áreas de salud y estudiantes que quieran adquirir conocimientos acerca del tema.

DESARROLLO

Según, Tarriba, J., ET.AL en el año 2017 en un estudio reciente el cáncer de piel se ha convertido en un problema de salud pública debido a su alta incidencia y al porcentaje considerable que ocupa dentro de las principales neoplasias malignas. Existen diversos factores de riesgo para desarrollar esta patología, y se observó que la exposición a los rayos UV se encuentra dentro de los más importantes. Para su estudio se divide en dos tipos: el melanoma y cáncer de piel no melanoma, que a su vez se clasifican en carcinoma basocelular y espinocelular. La mayoría de los casos son prevenibles y tienen buena respuesta al tratamiento cuando son diagnosticados oportunamente; por ello, debe considerarse tema de relevancia dentro de la práctica médica.⁹

Esta investigación interrelaciona sus patogénesis porque comparten factores genéticos y ambientales, factores que se encuentran evidentes en zonas expuestas de la piel por lo cual es muy fácil que los rayos UV tengan capacidad de inducir un cáncer y activar el P53, donde es evidente que desarrollan con más frecuencia en la parte superior del cuerpo y que en estadios avanzados se diseminan al resto del cuerpo y otros órganos.

En este mismo sentido, Castañeda, P. y Eljure, J. en el año 2016 un estudio realizado en México de carcinoma basocelular (CBC) que es el más frecuente cáncer de piel, se diferenció de otras patologías, porque se caracteriza por crecimiento lento, ser invasivo y destructivo bajo un potencial metastásico, un 40% de los pacientes que tuvieron CBC podrían padecer de otras lesiones durante 5 años. Figurando como trabajo investigativo, uno de los factores de riesgo es la relación directa con los UVR, en cuanto a piel, cara y otros. El incremento de la exposición solar puede perjudicar e incrementar más el riesgo de CBC y de fotocarcinogénesis. Se utilizó hematoxilina-eosina y en los resultados se percibió escasas mitosis y anaplasia ocasional. Las células están inmersas en un estroma constituido por abundantes fibroblastos y mucina que puede ocasionar retracción. En conclusión, el cáncer de piel como lo es el carcinoma basocelular es uno de los más frecuentes y lentos en desarrollarse es por eso que deben realizarse ciertos diagnósticos.¹⁰

El trabajo ya mencionado guarda una estrecha relación con la presente investigación en las afecciones causadas por la exposición a los rayos solares que también son causales del incremento de esta patología y las diferentes anomalías relacionadas con ella, la aparición

de esta puede ser un punto de partida para que proliferen la fotocarcinogénesis, este cuadro clínico al igual que el cáncer de piel por radiación solar es poco frecuente en lugares donde no llegan los rayos UV pero que, en estadios avanzados si no se utilizan métodos o técnicas de diagnóstico y detección pueden expandirse por todas las partes del cuerpo.

Dadas las condiciones que anteceden, Mercadillo, P y Moreno, L, en el 2013 realizaron una investigación de la Fisiopatología del carcinoma epidermoide en México considerando que el carcinoma epidermoide cutáneo es el segundo tumor más frecuente en adultos con prevalencia de 8%, esto es causado mayormente por la radiación ultravioleta que también causa mutaciones y efectos inmunosupresores esenciales en los procesos de la Fotocarcinogénesis. El propósito de esta investigación fue identificar la mutación del gen supresor de la proteína p53, la cual puede permitir un crecimiento alterado de células anormales, teniendo en cuenta los múltiples factores patogénicos como la radiación solar y su capacidad para alterar el ADN. En otro orden de ideas en éste carcinoma también es detectada por la proteína p53 por el hecho de tratarse de problemas cutáneos. Finalmente, ha habido un 40% a 50% del gen supresor tumoral p53 causado por el carcinoma epidermoide cutáneo.¹¹

De esta manera se evidencia pertinencia con el trabajo monográfico al intervenir en la fase temprana de la carcinogénesis dentro de la epidermis y que al exponerse a los rayos UV del sol activan al gen 53 que se suprime dando comienzo a las mutaciones, con esto las células son incapaces de reparar el ADN, y a la larga dará una transformación neoplásica y llegara a la fotocarcinogénesis, para ello se necesita una técnica capaz de determinar el P53 y analizar el tipo y estadio del cáncer. Todo esto conlleva a que estas mutaciones de células dañadas proliferen y puedan convertirse en cáncer. Esto quiere decir que los RUV actuarían principalmente como inmunosupresor, evitando el rechazo inmunológico de células cancerosas y facilitando así su progresión.¹¹ Esta investigación interrelaciona sus patogénesis porque comparten factores genéticos y ambientales, factores que se encuentran evidentes en zonas expuestas de la piel por lo cual es muy fácil que los rayos UV tengan capacidad de inducir un cáncer y activar el P53, por lo tanto es necesario que se realicen técnicas específicas para que no se lleguen a confundir las patologías de estos tipos de cáncer de células epidérmicas a consecuencia de la exposición al sol, por lo cual es evidente

que se desarrollan con más frecuencia en la parte superior del cuerpo y que en estadios avanzados se diseminan al resto del cuerpo y otros órganos.

En consideración de lo antes estudiado, Liuzzi J, ET.AL en el 2013, realizaron un trabajo investigativo en Venezuela con la finalidad de procesar muestras histológicas procedentes de células escamosas del cáncer bucal con la coloración rutinaria de hematoxilina-eosina, realizando cortes adicionales que incluían una sección del tumor y 0.5 cm de margen no tumoral, luego de utilizar la coloración de rutina para dichas muestras se le realizó una técnica inmunohistoquímica de marcaje para P53 y otras proteínas propias del tumor del cáncer bucal, factor que demostró crecimiento en las células epidérmicas y endoteliales vascular, concluyendo que para la determinación de sitios tumorales con presencia de células epidérmicas el oncogén 53 se encontraba positivo entre 1.5 a 2 cm del área con marcaje intenso.¹²

Observando una relación en este estudio del cáncer bucal y en nuestro trabajo investigativo de la determinación del P53 en la fotocarcinogénesis porque pueden atacar la piel y puede haber cambios moleculares en el tejido aparentemente sano hasta unos 15 milímetros, por estas razones se necesita realizar una rutina inmunohistoquímica de lesiones pre-malignas y malignas, que pueden ayudar al diagnóstico y tratamiento de esta y otras patologías teniendo especial relevancia el estudio del oncogén 53 que puede ir acompañado de antígenos nucleares de proliferación celular (PCNA).

DETECCIÓN DE LA P53 Y EL CÁNCER

El gen supresor alterado con mayor frecuencia en neoplasias es el P53, que está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, región uno, banda tres, sub-banda uno (17p¹⁰); y presenta 11 exones, siendo el primero no codificante; produciendo un transcrito de ARNm cuyo producto codificado es una fosfoproteína nuclear de vida media corta involucrada en el control del ciclo celular. Mutaciones en el gen P53 se traducen en una proteína P53 de vida media prolongada, la cual llega a ser detectada en el núcleo de la célula por inmunohistoquímica, mientras que el tipo salvaje tiene una vida media muy corta y no es detectable en células normales. Una variedad de tumores humanos que involucran al gen P53 mutado, mantienen pronóstico negativo de aquellos tumores del mismo tipo que

contienen el gen del tipo salvaje, como por ejemplo en cánceres de mama, de riñón y colorrectal.¹³

Un factor clave en el análisis de mutaciones es el tipo y ubicación de la variación, por ejemplo, se conoce que más del 70% de variantes descritas en TP53 son mutaciones missense, lo que afecta la estabilidad termodinámica de la proteína en su interacción con el ADN. Se conoce también que la presencia de mutaciones en regiones intrónicas puede modificar los puntos de corte en el splicing posterior a la transcripción, generando proteínas defectuosas, que han sido indicadas como blancos adecuados para el diseño de herramientas de detección temprana de cáncer.¹⁴

Las técnicas de inmunotinción permiten demostrar una variedad de antígenos en células y tejidos utilizando anticuerpos marcados, las técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos, ésta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe, emite luz o produce coloración. Por otro lado existen marcadores basados en las enzimas que son capaces de captar o suministrar un color a sustratos incoloros, posee una utilidad diagnóstica que permite la diferenciación en marcadores de pronóstico como neoplasias dando como ejemplo la identificación de los diferentes oncogenes y genes supresores con anticuerpos monoclonales específicamente para el P53 identificando adicionalmente marcadores diferenciales para melanoma, estas técnicas ayudan a determinar patologías en diferentes partes del cuerpo y células epidérmicas con alteraciones y anomalías genéticas, considerando el alto poder de preservación del tejido y los antígenos después de haber sido fijados en formalina.¹⁷

El diagnóstico de las mutaciones del P53 están basadas en dos teorías no contradictorias que se complementan, la teoría genética donde se plantea que las alteraciones que son adquiridas en el genoma de las células somáticas dan origen a un cáncer y por otro lado la teoría epigenética habla de alteraciones metabólicas que tienen que ver con las potencialidades neoplásicas, esto ocurre porque dichos oncogenes codifican la síntesis de moléculas que participan con dicha proteína a las cuales se unen los factores de crecimiento anormal del P53.¹¹

La demostración de la P53 con técnicas inmunohistoquímica muchas veces no puede ser objeto absoluto de diagnóstico en las mutaciones ya que tenemos que tener en cuenta que

este puede ser un resultado de la proteína 53 no mutada salvaje, la expresión de la P53 se ve en etapas avanzadas de las carcinogénesis, uno de los muchos problemas actuales no es la técnica en sí, de manera manual o automatizada sino la mala interpretación de los resultados obtenidos por la falta de conocimiento acerca de estas técnicas; el margen de error disminuye cuando el patólogo y sus colaboradores tienen experiencia porque se obtienen resultados que pueden ser analizados a la luz de otros hallazgos.¹¹

La ventaja de este procedimiento es que puede ser realizado de un modo rutinario en los laboratorios de histopatología, pero tiene el inconveniente de que algunas mutaciones pueden abolir la expresión de la P53 ("nonsense mutations", inserciones, deleciones, mutaciones de señal), no producen la proteína y como consecuencia dan un resultado negativo (5-10 % de los casos). Por otra parte, los tumores pueden sobre expresar la P53 en la completa ausencia de mutaciones en cualquier parte del gen. Esta hiper-expresión es específica de las células tumorales y no afecta a los tejidos normales, sería una alteración desconocida de la P53. Los problemas de evaluación de la hiper-expresión de P53 en los tumores malignos han sido revisados por Dowell *et al* (1994).¹⁵

Lo anterior representa la importancia del conocimiento básico de las técnicas inmunohistoquímica y la genética para lograr una interpretación correcta de los resultados observados, siendo necesario el uso de controles positivos y negativos para darle certeza y credibilidad. Sin embargo, en la actualidad la inmunohistoquímica de P53 es un método económico y sencillo para detectar la función aberrante de P53, ya que en la interpretación de los resultados los tumores P53 positivos se distinguen según el patrón de la tinción observada.¹⁶

La proteína P53 puede ser dividida en tres regiones: a) aminoterminal que contiene un gran número de residuos básicos y hay un gran número de prolinas; b) carboxiterminal que es muy hidrofílico y contiene muchos residuos cargados, y c) la región central de la proteína que contiene varias regiones muy hidrofóbicas y pocos aminoácidos cargados. La proteína p53 de diversas procedencias muestra una homología no uniformemente distribuida y hay cinco bloques bien conservados durante la evolución: cuatro bloques están en la región central y el restante se encuentra localizado en el aminoterminal. La presencia de cuatro bloques en la región central muestra la gran importancia de la misma; es la región de contacto con el ADN.¹⁵

La proteína P53 está inactivada en muchos cánceres humanos. El análisis genético del cáncer colorrectal revela una tasa muy alta de pérdida heterocigótica del brazo corto del cromosoma 17, que contiene el gen de la proteína P53. El análisis con la PCR y la secuenciación del alelo restante de P53 muestra que éste contiene a menudo una "point mutation". Se considera que hay tres clases de mutaciones de P53: a) mutaciones nulas que inactivan totalmente la P53; pero no interfieren en la transformación; b) mutaciones dominantes negativas con una P53 totalmente inactiva que todavía es capaz de interferir con la P53 natural, y c) mutaciones dominantes positivas donde la función normal de la P53 está alterada y la P53 mutante adquiere una actividad oncogénica que está directamente implicada en la transformación maligna.¹⁵

TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE P53 EN LA FOTOCARCINOGENÉISIS

La fotocarcinogénesis es un proceso que consta de tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión, con cambios celulares y moleculares característicos de cada una de ellas. En la iniciación, tiene lugar la transformación de células sanas en células cancerosas, caracterizadas por presentar fallos en los mecanismos de regulación del ciclo celular y en la señalización intercelular. Como punto crítico, tenemos una iniciación de dichas células tumorales en la piel por la mutación del gen supresor P53 en las células queratinocíticas epidérmicas a causa de la incidencia de los rayos UV, esto favorece la proliferación de estas células dañadas y por lo tanto un cúmulo de más mutaciones al no inducir mecanismos de reparación del ADN, estos rayos desencadenan una intolerancia inmunológica que tiene como resultado que dicho sistema no desarrolle una respuesta apropiada que no solo favorece la supervivencia de la célula sino que la ayuda a proliferar.^{15,20}

Una de las propiedades más significativas de las proteínas P53 mutantes es el alargamiento de su vida media. En las células normales, la P53 es indetectable por tener una vida media extremadamente corta (15-20 min). En células transformadas, la proteína P53 mutada es mucho más estable, con una vida media de 24 h y se acumula en el núcleo. Esta acumulación nuclear de la P53 mutada permite su detección por métodos o análisis

inmunohistoquímicos, las cuales se ha empleado en diversos tipos de cáncer con una buena correlación entre el análisis molecular (presencia de una mutación).¹⁵

Previo al análisis inmunohistoquímico, todo tejido debe pasar primero por las técnicas histológicas convencionales que consisten en la elaboración de bloques de parafina con tejido o muestras tumorales incluidas, con la tinción posterior rutinaria de hematoxilina - eosina (H-E) y con coloraciones especiales como lo es Schiff (PAS) para así ser revisados histológicamente. Luego se le hace un estudio de inmunohistoquímica para profundizar y verificar los resultados de lo que fue el procesamiento rutinario de la proteína P53 porque el proceso de rutina arroja el cáncer pero no su tipología, la técnica rutinaria se realiza para tener una prueba control de la muestra y obtener un campo más amplio de comparación de resultados en las técnicas aplicadas. De acuerdo con la literatura consultada, para la detección inmunohistoquímica de la proteína P53 los cortes histológicos deben ser de 4 mm de espesor de cada tumor, se deben montar en láminas silanizadas, desparafinadas en xilol y rehidratados con alcoholes decrecientes hasta agua des-ionizada.^{7,19}

Luego, se debe realizar la recuperación antigénica en el tejido con células malignas ya que generalmente los tejidos se fijan en formalina y se embeben en parafina, esto provoca la alteración de la estructura tridimensional de la proteína, esto se realiza en una vaporera por 30 minutos, hay antígenos que pierden su reactividad inmunológica luego del procesamiento de rutina, para poder determinar estos antígenos han desarrollado estas técnicas de pre- calentamiento, luego de esto se sumerge en solución recuperadora blanco de Dako de pH 6. Las láminas deben ser lavadas con solución de tris buffer salino con tween 20 (TBST), el anticuerpo primario es el encargado de atarse a la proteína específica puede ser de ratón, cabra, rata y conejo se encuba sobre las secciones histológicas a temperatura ambiente durante 1 hora, después se lava con TBST.¹⁹

Se le aplica un anticuerpo secundario anti- Ig G de ratón unido a un extremo de peroxidasa de rábano blanco para que se adhiera al anticuerpo primario y los dos se asocien al antígeno, esto ayuda indirectamente en la detección y la purificación de la proteína P53, luego se procede a incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, después de lavar en TBST, se debe añadir una mezcla de peróxido de hidrógeno como sustrato. Se aplica 3,3 – diaminobencidina como cromógeno por 10 minutos, luego se lava en agua corriente. Por último, las muestras histológicas se colorean con hematoxilina de Mayer para contrastar el

fondo de la reacción, se deshidratan y se cubren con laminillas. El resultado de este método será considerado como un control positivo para la proteína P53.¹⁹

A continuación, para la realización de esta técnica, se utilizan muestras de diferentes partes de piel afectada. Después de desparafinar y bloquear la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 3% durante 30 minutos, se desenmascara el antígeno de las muestras con tampón citrato a pH=6 en microondas durante 10 minutos, se dejan enfriar e inmediatamente después se lavan con PBS y se incuban los tejidos con suero normal de cabra al 10% durante 1h a T^a ambiente. Después se incuban las secciones con el anticuerpo primario monoclonal contra antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) durante toda la noche a 4°C. Se lava e incuba con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse biotinado durante 1h a T^a ambiente, y finalmente se incuban con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 1h más a T^a ambiente. El revelado con diaminobenzidina durante 3,5 minutos, y las muestras se contrastaron con Hematoxilina de Mayers para diferenciación entre el fondo donde se encuentran las demás estructuras y la reacción inmunohistoquímica de la proteína.¹⁹

La eficiencia de la técnica inmunohistoquímica detectando la P53 en Fotocarcinogénesis es realmente confiable. Perfeccionando las técnicas se pueden observar que los resultados van a variar dependiendo del lugar y las pigmentaciones de los pacientes. El análisis de la expresión de proteína P53 mutada mediante inmunohistoquímica (técnica de Streptavidina-biotina), se puede realizar en muestras de cortes verticales de 5 micras de grosor de diferentes partes de la piel irradiadas, dichos cortes se montan sobre láminas de vidrio. Es importante comentar que previo a la incubación del anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anti-proteína p53 Ab-5) siendo este anticuerpo más específico a la proteína, los cortes histológicos son calentados hasta ebullición y lavados con buffer fosfato (PBS). Posteriormente, se incuban con el anticuerpo secundario, durante una hora y finalmente revelados con diaminobenzidina, que corresponde a un sustrato-cromógeno, que da una tinción color marrón.²⁰

En esta prueba se deben emplear controles negativos y positivos, en los controles negativos se sustituye el anticuerpo primario por suero normal, y como control positivo se utilizaron casos de carcinoma de colon, previamente se les había demostrado positividad para esta oncoproteína. La estimación de la positividad se realiza de acuerdo al porcentaje de células

positivas en la muestra examinada. Para los fines de este estudio se consideraron como positivos aquellos casos en que al menos 5% de las células mostraron positividad.²⁰

Comparando las técnicas es notable la efectividad de la combinación de los reactivos y la importancia de tener controles que puedan verificar la presencia de la proteína P53 mutada en el tejido, al realizar solo la coloración de rutina con hematoxilina-eosina sólo se detectaría el cáncer pero no la tipología cancerígena que los afecta.

IMPORTANCIA DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA P53

Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular: las células se encuentran bajo un control del ciclo celular, es decir, una regulación de la expresión génica (programación de la muerte celular y estabilidad del genoma). Un proceso patológico es producto de la pérdida de actividad de estos genes, lo cual provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce esto en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos. Diversos autores consideran que el conocimiento sobre las alteraciones genéticas que potencian la iniciación del cáncer puede facilitar la detección precoz de los tumores primarios y de las posibles recurrencias lo cual puede determinar el éxito en su tratamiento, lo cual reflejaría una cultura preventiva a nivel nacional.¹⁸

Por otra parte, un trabajo publicado en el 2002 ya develaba la importancia del gen supresor tumoral P53, hasta la fecha han sido diversos los trabajos que han determinado este gen debido a que juega un papel importante en las neoplasias humanas, pudiéndose detectar sus alteraciones de forma indirecta mediante inmunohistoquímica, ya que la proteína “mutada” es más estable y de mayor vida media, lo que la hace detectable inmunohistoquímicamente. La expresión inmunohistoquímica de la proteína P53 es un factor con influencia pronóstica. El gen supresor de tumor P53 está mutado en aproximadamente la mitad de casi todos los tipos de cánceres originados en un amplio espectro de tejidos. Las mutaciones de p53 se encuentran en todos los grandes grupos histopatogénicos.^{15, 18,21}

Lo anterior recalca la importancia de su conocimiento y estudio a nivel de los profesionales de la salud, ya que la sobreexpresión de proteína P53 mutante ha sido estudiada por varios

autores que detectaron inmunopositividad de la proteína p53 en un rango de 27-35% de las lesiones pre malignas y de un 33-100% de carcinomas escamosos de cabeza y cuello, siendo necesario actualizar y dar a conocer su importancia. Por otra parte, la presencia de alteraciones de P53 en el tejido adyacente al tumoral ha demostrado ser un buen marcador pronóstico de recurrencia. Esto se debe a que las alteraciones moleculares son previas a las que se pueden observar histopatológicamente en el tejido.^{15, 21} Al observar los altos porcentajes de mutación del P53 por los rayos UV en la área superior podemos hallar la importancia de la aplicación de la técnica ya que esto podría esclarecer rápidamente la patología buscando un tratamiento a corto plazo que ayude a la enfermedad tomando previsiones a futuro, y siendo de fácil manipulación para los profesionales de la salud posibilitan el aumento de los parámetros de diagnóstico.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró esclarecer los aspectos moleculares relacionados con las mutaciones en la proteína P53 durante la Fotocarcinogénesis y las causantes de ello, impartiendo conocimientos a los estudiantes de Histotecnología y pacientes afectados por esta enfermedad. Asimismo, se destaca la importancia que tiene el realizarse estudios histopatológicos que sugieran diagnósticos más certeros, tales como las técnicas Inmunohistoquímicas. La alta incidencia de mutaciones de P53 en los cánceres humanos y las numerosas sugerencias de varios investigadores sobre las consecuencias tanto diagnósticas como novedades de las mutaciones de P53, señalan la importancia del conocimiento y la optimización de los métodos para el diagnóstico, siendo una excelente opción, los métodos Inmunohistoquímicos.

Al utilizarse anticuerpos que se encuentran endógenos en el organismo y ser una técnica histopatológica, las técnicas Inmunohistoquímicas pueden utilizarse para rutinas diagnósticas (teniendo en cuenta los costos necesarios) donde la proteína actúa como el marcador tumoral para detectar de manera indirecta la presencia de alteraciones en el ADN con un grado alto de especificidad y detección de las alteraciones en las células epidérmicas en la fotocarcinogénesis. Tomando en cuenta toda la información aquí suministrada se puede decir que de no realizar esta técnica, los pacientes ignorarán el tipo y el grado de malignidad que tiene el cáncer de piel por rayos UV para su posterior tratamiento.

Finalmente, se recomienda para futuras monografías que indaguen acerca de otras técnicas inmunohistoquímicas que puedan complementar los estudios ya realizados y así aumentar el índice de un diagnóstico certero y preciso de la enfermedad para reducir la incidencia patogénica de este y otros tipos de cáncer ligados con la técnica y el P53.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tórtora G., Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. 13^{ra} ed. Caracas, Madrid, México, Porto Alegre: Editorial Médica Panamericana; 2000.
2. Wolff K. [et.al.]. Dermatología en Medicina General. 7^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. [citado el 14 de junio del 2016]. Disponible en: <https://books.google.co.ve/books?id=1Osiphav6GMC&pg=PA2248&dq=la+fotocarcinogenesis&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiD3OzboNvNAhXHKB4KHRMCDr0Q6AEIGjAA#v=onepage&q=la%20fotocarcinogenesis&f=false>
3. Dr. Lobos B., Lobos A.S. Cáncer de piel no-melanoma. Rev. Med. Clin. Condes [Revista en Internet] 2011 noviembre [Acceso el 22 de junio del 2016]; 22 (6):2-9. Disponible en: http://ac.els-cdn.com/S0716864011704862/1-s2.0-S0716864011704862-main.pdf?_tid=b2d13740-536e-11e6-935f-00000aacb361&acdnat=1469564739_8a39476f3cbdd2b0c250dadbece6c96f
4. González Ma, Vernhes M, Sánchez Á. La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. Theoria. [Revista on-line] 2009 [Acceso 20 jul 2016]; 18(2):69-80. Disponible en: <http://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/194/v/v18-2/06.pdf>
5. Ministerio del Poder Popular para la Salud. República Bolivariana de Venezuela, Anuario de Mortalidad 2013. Caracas-Venezuela: MPPS; 2015 diciembre. Disponible en: <http://www.ovsalud.org/descargas/publicaciones/documentos-oficiales/Anuario-Mortalidad-2013.pdf>
6. M. López. ET AL. Revisión: P53, un gen supresor tumoral. Gac. Med. Bilbao [Gaceta en Internet] 2011 enero-marzo [Acceso el 20 de junio del 2016]; 98 (1): 21-27 Disponible en: www.elsevier.es/es-revista-gaceta-medica-bilbao-316-pdf-S0304485801743508-S300
7. Pérez-Requena J, [et.al.] Valor pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el cáncer de mama. Rev. Esp. Patol [Revista en Internet] 2002 [Acceso el 20 de julio del 2016]; 35 (3): 315-324. Disponible en: <http://patologia.es/volumen35/vol35-num3/pdf%20patologia%2035-3/35-3-08.pdf>

8. Cabrera C, López M. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de P53 en tumores de piel. *Oncología (Barc.)* [Revista on-line] 2006 [Acceso 21 jul 2016]; 29(7):291-298. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/onco/v29n7/03.pdf>
9. Tarriba J., Plata A., Baldin A., Campo A. Diagnóstico y tratamiento de los tumores malignos de piel. *Acta Medica Grupo Ángeles*. [Acta en Internet] 2017 abril-junio [Acceso el 14 de mayo del 2017]; 15(2): 154-160. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2017/am172q.pdf>
10. Castañeda GP, Eljure TJ. El cáncer de piel, un problema actual. *Rev. Fac. Med. UNAM* [Revista en Internet] 2016 marzo-abril [Acceso el 22 de junio del 2016]; 59 (2):6-14. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2016/un162b.pdf>
11. Mercadillo-Pérez P, Moreno-López LM. Fisiopatología del carcinoma epidermoide. *Dermatol. Rev. Mex* [Revista en Internet] 2013 marzo- abril [Acceso el 22 de junio del 2016]; 57 (2):118-127. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd132f.pdf>
12. Liuzzi J, Correnti M, López C, Rivera H, Siso S, Dacunha M. Cambios moleculares en los márgenes de resección en el carcinoma de células escamosas de cavidad oral. *Rev. Ven. Oncol.* [Revista en Internet] 2013 [Acceso el 29 de junio del 2016]; 25 (1):28-33. Disponible en: [http://www.oncologia.org.ve/site/upload/revista/pdf/02_liuzzi_j_\(2-9\)\(1\).pdf](http://www.oncologia.org.ve/site/upload/revista/pdf/02_liuzzi_j_(2-9)(1).pdf)
13. Alfiler-Horna D., [et.al]. Sobre-expresión de la proteína P53 en el epitelio ectocervical de pacientes con displasia en el hospital Víctor Lazarte Echegaray. [Artículo en Internet] 2015 enero [Acceso el 21 de julio del 2016]; 18(1): 1-11. Disponible en: <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/1321/1288>
14. Murillo A., Contreras E., Figueroa E., Velásquez M., Descailleaux J. Mutaciones en TP53: Una breve revisión. *Revista Peruana de Divulgación Científica en Genética y Biología Molecular. RDGBM.* [Revista en internet] 2016 enero-febrero [Acceso el 25 de junio del 2016]; 1(1): 27-29. Disponible en: <https://www.e-quipu.pe/dinamic/publicacion/adjunto/5-1459869542PP6dCw.pdf>

15. López-Martínez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, Martínez de Pancorbo M. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (p53 en el CECC). [Artículo en Internet] Medicina Oral 2012 [Acceso el 15 de julio del 2016]; 7 (2): 108-20. Disponible en: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv7_i2_p108.pdf
16. Ando K, Oki E, Saeki H, Yan Z, Tsuda Y, Hidaka G, Kasagi Y, Otsu H, Kawano H, Kitao H, Morita M, Maehara Y. Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer. Cáncer Med [Revista on-line] 2015 [Acceso 29 de jul 2016]; 4(1):75-83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312120/>
17. Pontificia Universidad Católica de Chile [sede Web]. Chile: Facultad de Medicina; 2015 [Acceso el 19 de julio del 2016]. De Chuaqui B. y González S. Manual de Patología General, Capítulo 6. Disponible en: http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/Patol_125.html
18. Quíntela Senra D, López Sáez J.J.B, Senra Varela A. La proteína p53 y el cáncer de mama. Rev. Sen. Patol. Mam [Revista en Internet] 2001 abril [Acceso el 15 de julio del 2016]; 14(2): 71-77. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria-131-articulo-la-proteina-p53-el-cancer-13014476?redirectNew=true>
19. Belmar Ruíz, M.J. Estudio del efecto de polifenoles vegetales sobre un modelo de fotoenvejecimiento en ratones SKH1 [Tesis Doctoral]. España: Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento, Universidad de Murcia; 2014 [Acceso el 29 de junio del 2016] Disponible en: <https://digitum.um.es/jspui/bitstream/10201/41687/1/Tesis%20Mar%C3%ADa%20Jos%C3%A9%20Belmar%20Ruiz.pdf>
20. Graff Á, Evelyn A. Determinación histopatológica en piel de ratas del daño ocasionado por la radiación UVB y el peróxido de benzoilo cuando se le administra una infusión de *Haplopappus remyanus* [Título de químico farmacéutico] Valdivia-Chile: Universidad Austral de Chile; 2008 [Acceso el 10 de Agosto del 2016] Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fcg736d/doc/fcg736d.pdf>

21. Liu J, Li W, Deng M, Liu D, Ma Q, Feng X. Immunohistochemical determination of p53 protein overexpression for predicting p53 gene mutations in hepatocellular carcinoma: A Meta-Analysis. PLoS ONE [Revista on-line] 2016 [Acceso 29 de jul 2016]; 11(7):1-14. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0159636&type=printable>