

Evaluación de los marcadores inmunohistoquímicos PCNA y MIB-1 en el diagnóstico de lesiones de bajo grado del cuello uterino.

Milagros Sánchez-Rosales¹, Sergio Osorio-Morales² y Felipe Díaz-Araujo³.

¹Postgrado de Anatomía Patológica, ²Cátedra de Anatomía,

³Cátedra de Biología Celular y Molecular, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Cuello uterino, PCNA, MIB-1, inmunohistoquímica, neoplasia intraepitelial cervical.

Resumen. Se realizó un estudio prospectivo, comparativo de 112 biopsias, diagnosticadas según técnicas convencionales como Neoplasia Intraepitelial Cervical I (NIC I) procedentes de pacientes de diversos centros hospitalarios de la ciudad de Maracaibo, para establecer la utilidad de los marcadores inmunohistoquímicos PCNA y MIB-1 en el diagnóstico de lesiones de bajo grado del cuello uterino. Las 112 muestras recibidas se clasificaron mediante tinción con hematoxilina-eosina (H-E), excluyéndose 3 muestras por diagnóstico diferente a NIC I. Luego de la inmunotinción 19 (17,4%) de las muestras con el marcador PCNA se reclasificaron como NIC II, y 18 (16,5%) con MIB-1 cambiaron el diagnóstico inicial a NIC II. Se encontró una diferencia estadística significativa ($p < 0,01$) entre el diagnóstico con H-E y con los inmunomarcadores. No se hallaron diferencias significativas entre los marcadores. Se concluye que el uso de estos métodos auxiliares puede ser de utilidad en el diagnóstico de lesiones de bajo grado del cuello uterino, tomando en cuenta que en este estudio un 17% de las muestras analizadas suponían una lesión de bajo grado en presencia de una premaligna de alto grado.

Evaluation of the immunohistochemical markers PCNA and MIB-1 in the diagnose of low grade lesions of the uterine cervix.
Invest Clín 2004; 45(3): 213 - 220

Key words: Uterine cervix, PCNA, MIB-1, immunohistochemical, cervical intraepithelial neoplasia

Abstract. A prospective and comparative study of 112 uterine cervix biopsies, received from hospitals of Maracaibo, Venezuela, with the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia I (CIN I) determined with the traditional Hematoxilin-Eosin (H-E) diagnostic staining, was performed to compare the immunohistochemical markers PCNA and MIB-1 with the conventional H-E staining. The samples were classified with H-E, and 3 samples were excluded of the study with a different diagnostic from CIN I. After the immunohistochemical study, 19 biopsies (17.4%) were classified as CIN II with PCNA and 18 (16.5%) with MIB-1. The analysis showed a significant difference ($p < 0.01$) between the H-E staining and the immunomarkers. These results allow us to conclude that the immunohistochemical evaluation of the proliferative activity is very useful to establish with certainty the diagnosis of preneoplasie lesions of uterine cervix and also represents an important parameter in the prognostic evaluation.

Recibido: 08-05-2003. Aceptado: 19-02-2004.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino constituye un problema de salud pública en los países subdesarrollados, especialmente en Latinoamérica. En Venezuela, este tipo de cáncer muestra una magnitud considerable, tanto en incidencia como en mortalidad, con una tasa estandarizada que se estima para el país en 33,3 X 100.000 mujeres, ubicada entre las más altas del mundo (1, 2).

La enfermedad maligna del cuello uterino es precedida por una condición conocida como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). El diagnóstico histológico preciso del NIC es subjetivo y susceptible a variaciones entre observadores. Sobre el diagnóstico acertado se diseña el seguimiento y tratamiento de estas pacientes, por lo cual pueden ser de gran utilidad técnicas adicionales que permitan establecer preci-

sión en el diagnóstico. Una de ellas es la determinación inmunohistoquímica de los antígenos relacionados con el ciclo celular como el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), y el MIB-1, los cuales fundamentan su uso en el hecho de que las células con alta actividad proliferativa están asociadas con la aparición de neoplasias premalignas y malignas. Se ha pensado que la proliferación es un indicador temprano de crecimiento desordenado. El anticuerpo monoclonal MIB-1 detecta al antígeno constituyente nuclear Ki-67, expresado por células proliferantes en las siguientes fases del ciclo celular: etapa tardía de G₁, S, G₂ y M. PCNA es un antígeno, también conocido como ciclina, cuyo papel como inmunomarcador de proliferación celular es bien conocido, mostrando niveles elevados en las fases S, G₂ y M del ciclo celular (3).

En 1993 Mittal y col. establecieron la utilidad del PCNA en la diferenciación de la metaplasia escamosa inmadura y la displasia cervical, y refieren la necesidad de estudios futuros para investigar la significación pronóstica del porcentaje de células PCNA positivas en las lesiones cervicales (3).

En el mismo año Kobayashi y col. demostraron la eficacia de PCNA para la distinción precisa entre displasia moderada y severa, y entre esta última y el carcinoma *in situ* (4).

Para el año 1995, Mitchell estableció que la medición de la actividad proliferativa en las lesiones del cuello uterino y su correlación con marcadores de regulación y diferenciación, podrían ser importantes para entender el proceso neoplásico (5). Este hecho fue establecido por Hall y col. con similares conclusiones (6).

El trabajo de Steinbeck y col. demostró que el incremento de la atipia histopatológica en la mucosa cervical estuvo correlacionada con un incremento inicial de PCNA, seguido por una aneuploidía bien definida y una sobre expresión de P53 (7). En 1997 postuló que altos niveles MIB-1 combinados con aneuploidía del ADN, sin duda indican el comienzo de la carcinogénesis cervical (8). Estos cambios no son posibles de ser determinados con los métodos convencionales, y es con el advenimiento de novedosas técnicas inmunohistoquímicas, las cuales utilizan marcadores tumorales, que es factible obtener un diagnóstico preciso y la detección precoz de lesiones premalignas del cuello uterino, al igual que la gradación de las mismas.

En nuestro país es pobre la experiencia con estos indicadores de proliferación nuclear, es por ello que esta investigación pretende demostrar la utilidad de los mismos, detectados mediante técnicas inmunohistoquímicas, en el diagnóstico de las lesiones preneoplásicas de bajo grado del cuello uterino, al comparar el grado de certeza diag-

nóstica al utilizar los métodos histopatológicos convencionales y el método inmunohistoquímico, para la determinación de los grados de proliferación celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo, comparativo de 112 biopsias diagnosticadas según técnicas convencionales como Neoplasia Intraepitelial Cervical I (NIC I), procedentes de pacientes de diversos centros hospitalarios de la ciudad de Maracaibo.

Las muestras, incluidas en bloques de parafina, se procesaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, con la técnica clásica de hematoxilina y eosina. El estudio inmunohistoquímico se realizó según la técnica modificada de Stenberg de peroxidasa-antiperoxidasa; para tales efectos secciones de tejido 2 a 3 micras fueron desparafinadas, luego rehidratadas y luego incubadas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, por 20 minutos para bloquear la acción de las peroxidases endógenas. Posteriormente, fueron secuencialmente incubadas en suero normal por 20 minutos, anticuerpo primario diluido en PBS (solución salina de fosfato buffer) durante toda la noche a 4°C, anticuerpo secundario biotinilado por 60 minutos, y finalmente en una solución de adivina-biotina-peroxidasa (ABC).

Los anticuerpos monoclonales para PCNA y MIB-1 utilizados fueron de la casa DAKO Corporation y se prepararon en solución de 1/50 respectivamente. Para desarrollar la reacción, se utilizó una solución fresca de 3.3-diaminobencidina-HCL (DAB), que contenía peróxido de hidrógeno como sustrato para la enzima. Como control se utilizaron secciones biópsicas tratadas con suero normal o con buffer, sin la enzima. Todas las secciones fueron contrastadas con una solución diluida de Hematoxilina.

Los resultados inmunohistoquímicos así como las secciones paralelas teñidas con Hematoxilina-Eosina fueron evaluados con microscopio de campo claro, marca Zeiss Axioscope, visualizando cada muestra a grande (400x), mediano (100x) y pequeño (50x) aumento. Para disminuir las diferencias ínter observador, cada una de las muestras fue evaluada por tres patólogos del centro.

La clasificación anatomopatológica utilizada para las muestras fue la de Rit-chat.

Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina, con diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical fueron clasificadas de la siguiente manera:

- NIC I: Alteración de la maduración y presencia de mitosis en el tercio profundo del espesor epitelial.
- NIC II: Alteración de la maduración y presencia de mitosis en los dos tercios profundos del espesor epitelial.
- NIC III: Alteración de la maduración y presencia de mitosis (típicas y atípicas) en casi todo el espesor epitelial; respetando máximo una o dos capas superficiales.

El análisis de las muestras procesadas para inmunohistoquímica se realizó a través de la visualización de las células que exhibieron tinción marrón de sus núcleos, clasificándolas de la siguiente manera:

- NIC I: un marcaje de las células del tercio profundo (33%) del espesor epitelial.
- NIC II: un marcaje de las células de los dos tercios profundos (66%) del espesor epitelial.
- NIC III: un marcaje de las células mayor de dos tercios del espesor epitelial.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 10 para Windows.

RESULTADOS

Las 112 muestras recibidas se clasificaron luego de realizar nuevamente tinción clásica con H-E, tal como se observa en la Tabla I. En 109 muestras se obtuvo diagnóstico de NIC I (Fig. 1) y el resto se clasificaron como NIC II (Fig. 2), por lo cual se excluyeron del estudio.

Después de la inmunotinción con PCNA y MIB-1, las 109 muestras fueron ana-

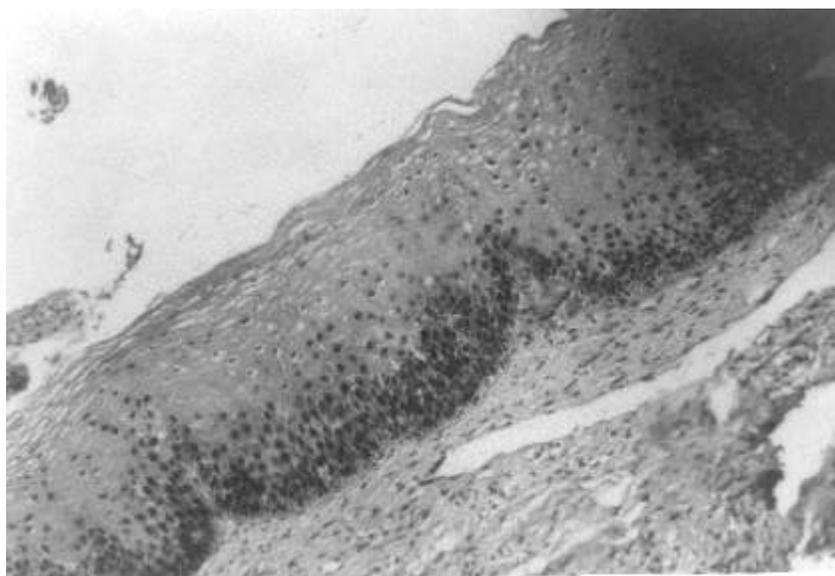


Fig. 1. Lesión intraepitelial de bajo grado. NIC I. 400X. Inmunotinción con PCNA.

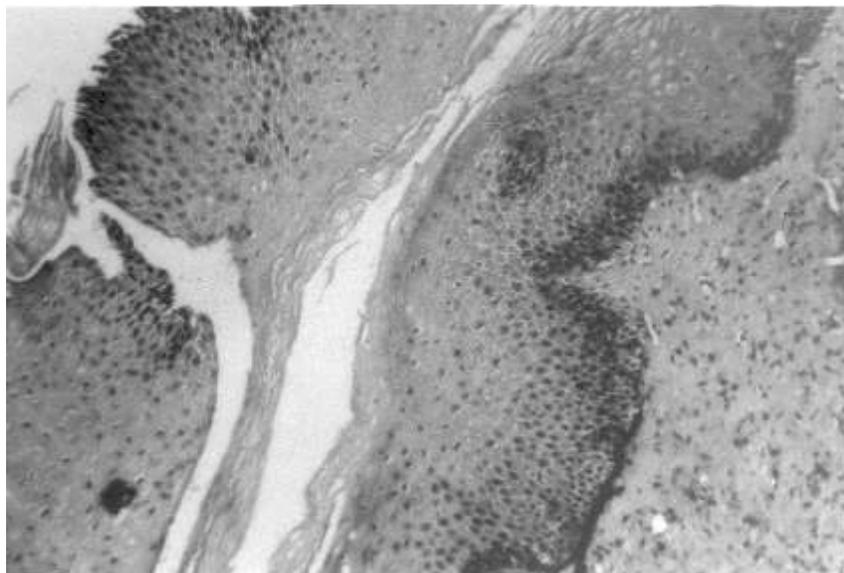


Fig. 2. Lesión intraepitelial de alto grado. NIC II. 400X. Inmunotinción con PCNA.

lizadas obteniéndose los datos presentados en la Tabla II, donde se observa que según el marcaje con PCNA 19 (17,4%) de las muestras fueron reclasificadas como NIC II, mientras que con MIB-1 18 (16,5%) cambiaron el diagnóstico inicial a NIC II.

DISCUSIÓN

Los anticuerpos monoclonales contra antígenos relacionados con el ciclo celular, tales como PCNA y MIB-1, han sido identificados como marcadores de la tasa de crecimiento de un tumor y estos anticuerpos pueden ser usados en tejidos fijados e incluidos en parafina (3-10).

Varios autores han sugerido que el porcentaje de células medidos inmunohistoquímicamente usando MIB-1, podría ser aplicable para examinar el crecimiento biológico potencial en cánceres cervicales, y el mismo anticuerpo podría ser un parámetro útil para indicar el pronóstico clínico del tumor (11). Otros autores reportan situaciones similares con la utilización de PCNA (5, 8, 9-11, 15, 18-20).

En la Tabla I se realizó la distribución de los grados de NIC según la tinción de he-

TABLA I
DISTRIBUCIÓN DE LA NEOPLASIA
INTRAEPITELIAL CERVICAL EN GRADOS
SEGÚN DIAGNÓSTICO
POR HEMATOXILINA-EOSINA

Tipo de lesión	Casos	Porcentaje
Neoplasia Intraepitelial Cervical I	109	97,32%
Neoplasia Intraepitelial Cervical II	3	2,68%
Total	112	100%

matxilina y eosina, donde puede observarse que de las 112 muestras recibidas y catalogadas como NIC I por distintos patólogos, sólo en 3 casos hubo diagnósticos distintos; es decir que hubo 97% de concordancia en el diagnóstico con H-E de estas lesiones de bajo grado entre los diferentes observadores. Al comparar estadísticamente los diagnósticos iniciales con el obtenido por el grupo de experimentación con tinción clásica de H-E, no se hallan encontraron diferencias significativas entre los grupos.

TABLA II
RECLASIFICACIÓN DE LOS CASOS DE NIC I MEDIANTE PCNA Y MIB-1

	PCNA		MIB-1	
	Casos	%	Casos	%
NIC I	90	82,6	91	83,5
NIC II	19*	17,4	18*	16,5
Total	109	100	109	100

*($p < 0,01$).

Al analizar los datos obtenidos en la Tabla II, se puede observar que en el caso del marcador PCNA hubo 19 (17,4%) muestras cuyo diagnóstico fue reclasificado de NIC I a NIC II, mientras que al utilizar MIB-1 se obtuvo 18 (16,5%) casos reclasificados. En ambos casos se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa al aplicar la prueba de t de student para muestras relacionadas y comparar diferencias entre el diagnóstico con H-E y el diagnóstico con los inmunomarcadores ($p < 0,01$). Sin embargo al comparar entre sí la sensibilidad de ambos marcadores no se encontraron diferencias significativas, no pudiéndose establecer de la superioridad o ventaja de un marcador sobre otro. En la Fig. 1 se puede apreciar una muestra catalogada como NIC I luego de la inmunotinción con PCNA y en la Fig. 2 se observa una imagen de otra muestra que, inicialmente fue diagnosticada como NIC I, según la tinción H-E, y luego reclasificada como NIC II después de la inmunotinción con PCNA.

Es importante señalar que la conducta terapéutica es distinta en NIC I y en el NIC II; en el segundo caso es más agresiva por considerarse que el NIC II una lesión pre-maligna de cuello uterino con tendencia marcada a la evolución hacia un carcinoma. Caso contrario del NIC I, donde la alta frecuencia de remisión imponen una terapéutica expectante más que intervencionista. Es por ello que el uso de estos métodos auxiliares en el diagnóstico de lesiones de bajo grado del cuello uterino, justifica su

uso para detectar y tratar las lesiones potencialmente malignas del cuello, tomando en cuenta que en este estudio un 17% de las muestras analizadas suponían una lesión de bajo grado en presencia de una pre-maligna de alto grado.

En este estudio se encontró que todos los casos de neoplasia intraepitelial cervical incluidos, mostraron positividad nuclear para PCNA y MIB-1, tanto en la capa de células basales como en las células parabasales; es decir, a mayor pérdida de la maduración, mayor porcentaje de células con tinción nuclear, coincidiendo esta observación con la reportada en otros trabajos de investigación (8-14, 21). Este incremento sostenido del número de células inmunoteñidas de acuerdo a la severidad de la lesión, refleja, a las luces del conocimiento del modelo molecular de carcinogénesis, una disrupción de la regulación de la proliferación celular, con un aumento del número de células que ingresan al ciclo celular, quizá por una inactivación inducida por factores como el VPH, o algún gen de supresión tumoral (P53 y P10). (8, 14, 15).

Nuestros hallazgos coinciden con aquellos de otros autores (11, 13, 15-18, 21) quienes encontraron un incremento progresivo del número de figuras mitóticas desde el epitelio escamoso normal, pasando por los diferentes grados de NIC. Analizando secciones histológicas teñidas con PCNA y/o MIB-1 se consume menos tiempo que contando figuras mitóticas en toda la biopsia, y se puede brindar mayor certeza en muestras

en las cuales resultase dificultoso el diagnóstico por tinciones convencionales.

En este estudio no se encontraron diferencias significativas al comparar los hallazgos inmunohistoquímicos en las muestras estudiadas con PCNA y con MIB-1, y no se demuestra la ventaja de un marcador sobre el otro; por lo tanto no se justifica su uso en conjunto y se sugiere la utilización de un solo inmunomarcador, lo cual repercutiría en beneficios económicos y mejor utilización de recursos.

Se concluye que la determinación inmunohistoquímica de la actividad proliferativa por medio de anticuerpos dirigidos contra antígenos relacionados con el ciclo celular, como PCNA y MIB-1 permite establecer diagnóstico más certero en lesiones preneoplásicas de cuello uterino, constituyendo una excelente herramienta auxiliar al estudio histopatológico para diferenciar los diferentes grados de neoplasia intraepitelial cervical.

REFERENCIAS

1. Bencomo M. Cáncer de cuello uterino. Afecciones oncológicas de la mujer. 1 era edición. Caracas, Venezuela; 1997.
2. Colvin R, Bhan A, Mc Cluskey R. Diagnostic immunopathology. 2nd ed. New York: Raven Press York; 1994.
3. Mittal KR, Demopoulos RI., Goswami S. Proliferating Cell Nuclear Antigen (Cyclin) expression in normal an abnormal cervical Squamos epithelia. *Am Surg Pathol* 1993; 17(2):117-122.
4. Kobayashi I., Matsuo K, Ishibashi Y, Kanda S, Saka I. The proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostainig and silver binding argyrophilips nucleolar organizer region staining. *Hum Pathol* 1994; 25(2): 198-202.
5. Mitchell MF, Hittelman WK, Lotan R, Nishioka K, Tortolero-Luna G, Richards-Kortum R. Chemoprevention Trials and Surrogate end points Biomarkers in the Cervix. *Cancer*. 1995 (10 Suppl); 76:1956-1977.
6. Hall P, Levinson DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA. Rapid communication. proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulate expression in some neoplasms. *Pathology* 1990; 162:185-194.
7. Steinbeck RG, Helselmeyer KM, Moberger HB, Auer GU. The relationship between proliferating cell nuclear antigen (PCNA), nuclear DNA. Content and mutant P53 during genesis of cervical carcinoma. *Acta Oncol* 1995; 34(2):171-176.
8. Steinbeck RG. Proliferation and DNA aneuploidia in mild dyaplasia imply carly steps of cervical carcinogenesis. *Acta Oncol* 1997; 36(1):3-12.
9. Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Torhorts J, Gudat TF. Assesment of Egfr and TGP alpha expression in relationship to VPH status and Ki-67 distribution intraepithelialneoplasm. *Int J Cancer* 1996; 69(3):165-166.
10. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(7):619-626.
11. Raju GC, Al-Saleh W, Delvenne P, Greimers R, Fridman V, Doyen J, Boniver R J. Expression of the proliferating cell nuclear antigen in cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1994; 13(4):337-341.
12. Shiffman M, Bromtpm LA. Epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*. 1995; 76(10 Supp):1902-1913.
13. Van Hoeven KH, Kovatich AJ, Oliver RE, Nobel M, Dunton CJ. Protocol for inmunocytochemical detection of SIL in cervical Smears using MIB-1 antibody to Ki-67. *Mod Pathol* 1996; 9(4): 407-412.
14. Mittal K. Proliferating Cell Nuclear Antigen expression in normal cervix and in cervical dysplasia. *Hum Pathol* 1994; 25 (9):964-966.
15. Tervahauta AI, Syrjanen SM, Antyjarvi R, Syrjanen J. Detection of P53 during protein and Ki-67 proliferation antigen in hu-

- man papilloma-Virus (HPV) positive and HPV-negative cervical lesions by immunohistochemical double staining. *Cytopathology* 1994; 5(5):282-293,
16. Al-Saleh W, Delvenne P, Greimers R, Fridman V, Doyen J, Boniver J. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with histologic grade and human papillomavirus type. *Am J Clin Pathol* 1995; 104(2):154-160.
 17. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 1995; 76(10 Supp): 1902-1913.
 18. Hall P, Levinson D, Wright N. Assessment of Cell Proliferation in Clinical Practice. 1st Edition. London: Springer-Verlag; 1992.
 19. Herbsleb M, Knudsen UB, Orntoft TF, Bichel P, Norrild B, Knudsen A, Mogensen O. Telomerase activity, MIB-1, PCNA, HPV 16 and p53 as diagnostic markers for cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS* 2001; 109(9): 607-617
 20. Bulten J, De Wilde PC, Schijf C, Van Der Laak JA, Wienk S, Poddighe PJ, Hanselaar AG. Decreased expression of Ki-67 in atrophic cervical epithelium of post-menopausal women. *J Pathol* 2000; 190(5): 545-553
 21. Al-Nafussi AI, Klys HS, Rebello G, Kelly C, Kerr G, Cowie V. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in the uterine cervix and cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 3(3):154-158.