

Cuantificación de la proliferación celular con PCNA en la neoplasia intraepitelial córneo-conjuntival

Quantification of cellular proliferation by PCNA in corneo-conjunctival intraepithelial neoplasia

ABRALDES MJ¹, ABDULKADER I¹, RODRÍGUEZ-PEREIRA C¹

RESUMEN

El anticuerpo monoclonal PCNA reconoce un antígeno nuclear, el cual se expresa en las células proliferantes. El objetivo de este estudio es evaluar la expresión inmunohistoquímica de PCNA en la neoplasia intraepitelial córneo-conjuntival y correlacionar el índice de proliferación cuantificado con PCNA con la agresividad del tumor. Nuestros resultados sugieren que no existe una relación entre el índice de proliferación cuantificado con PCNA y los otros parámetros estudiados.

Palabras clave: PCNA, proliferación, córnea, conjuntiva, neoplasia intraepitelial.

SUMMARY

The monoclonal antibody PCNA recognizes a nuclear antigen, which is expressed by proliferating cells. The purpose of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of PCNA in corneo-conjunctival intraepithelial neoplasia and to correlate the PCNA proliferative index with the tumor aggressiveness. Our results suggest that there are not a relationship between PCNA index and the other studied factors.

Key words: PCNA, proliferation, cornea, conjunctiva, intraepithelial neoplasia.

Instituto Gallego de Oftalmología. Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Hospital General de Castellón.

¹ Doctor en Medicina y Cirugía.

Correspondencia:

Maximino J. Abraldes López-Veiga

Instituto Gallego de Oftalmología (INGO)

Hospital de Conxo

C/. Rúa Ramón Baltar, s/n

15706 Santiago de Compostela

INTRODUCCIÓN

La neoplasia intraepitelial córneo-conjuntival representa el extremo de mayor malignidad dentro del espectro de las displasias córneo-conjuntivales. Este tipo de lesiones eran conocidas hasta hace pocos años como enfermedad de Bowen o carcinoma in situ, clasificándolas como displasia cuando el espesor del epitelio estaba afectado sólo de forma parcial y como carcinoma in situ cuando el espesor del epitelio estaba totalmente afectado. Actualmente, se recomienda denominar a ambos tipos de lesiones como neoplasias intraepiteliales.

Estas lesiones aparecen clínicamente como una lesión opaca, blanquecina y brillante o como una masa de aspecto carnososo, localizadas generalmente en el limbo esclero-corneal o próximas al mismo.

Histológicamente se observa una pérdida de la polaridad del epitelio, apareciendo células pleomórficas y atípicas en el espesor del epitelio conjuntival y/o corneal. Con frecuencia se observan figuras de mitosis en algunas capas del epitelio. La principal característica histológica de estas lesiones, y que además las diferencia del carcinoma epidermoide invasivo, es que la membrana basal del epitelio se encuentra íntegra (1).

En el presente estudio tratamos de correlacionar la proliferación celular cuantificada con el marcador PCNA con el tamaño de la lesión, el grado de displasia, la existencia o no de recidivas tumorales y la edad de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

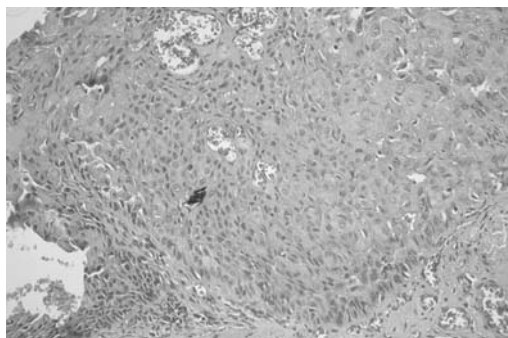
Se estudian 10 neoplasias intraepiteliales córneo-conjuntivales, correspondientes a 10 ojos de 10 pacientes, de los cuales 6 eran hombres y 4 mujeres, de edades comprendidas entre los 58 y 74 años de edad. En todos los casos se realizó una extirpación de la tumoración y un examen anatomopatológico de la pieza. Los pacientes fueron seguidos por un período mínimo de 5 años.

Todas las piezas fueron fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina. En todos los casos el tiempo de fijación fue inferior a las 24 horas. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina para su estudio rutinario. Tras dicho estudio los bloques seleccionados se volvieron a cortar para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica.

El estudio inmunohistoquímico se realizó utilizando el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (SABC-peroxidasa) utilizándose como anticuerpo primario Anti-PCNA clon PC 10, monoclonal, de Dako (Glostrup, Dinamarca) diluido al 1:10. La cuantificación de células neoplásicas inmunorreactivas se efectuó por medios manuales contando como mínimo 500 células por preparación en múltiples campos elegidos al azar. El conteo se realizó a 400 aumentos. Para cuantificar el índice de proliferación con PCNA se establecieron tres grados en función del porcentaje de núcleos de células neoplásicas inmunotñidos. Se consideró un índice de proliferación de grado 1 cuando la tinción fue inferior al 33%, de grado 2 cuando se observó inmunotinción entre el 34% y el 66%, y de grado 3 cuando se observó inmunorreactividad en más del 67% de los núcleos de las células neoplásicas. El grado 1 es un índice de proliferación bajo, el grado 2 es un índice de proliferación medio y el grado 3 un índice de proliferación alto.

Se denominó neoplasia intraepitelial córneo-conjuntival de grado I cuando está afectado sólo un tercio del espesor del epitelio, de grado II cuando están afectados dos tercios del espesor epitelial y de grado III cuando está afectado todo el espesor del epitelio.

Fig. 1: Neoplasia intraepitelial córneo-conjuntival en la que puede apreciarse una lesión acantótica con marcada atipia que afecta a la totalidad del espesor del epitelio (hematoxilina-eosina).



RESULTADOS

En todos los casos se realizó el diagnóstico de neoplasia intraepitelial, en nueve de ellos los márgenes de resección quirúrgica no estaban afectados y en uno de los casos se observó que uno de dichos márgenes se encontraba infiltrado por la tumoración.

El tamaño de las lesiones estaba comprendido en un rango entre los 0,6 y los 2,0 cm de diámetros mayores y entre 0,5 y 1,8 cm de diámetros menores.

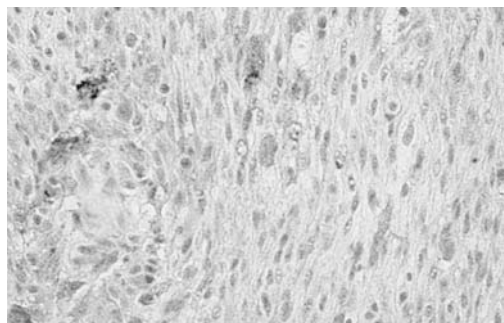
En 2 casos (20%) se observó que la lesión afectaba a menos de un tercio del espesor total del epitelio, en 4 casos (40%) el epitelio estaba infiltrado por células neoplásicas en las dos terceras partes de su espesor y en otros 4 casos (40%) el espesor del epitelio estaba afectado en su totalidad.

En 8 de los casos estudiados (80%) se observó un índice de proliferación de grado 2. En los 2 casos restantes (20%) el índice de proliferación era de grado 3. No se observó ningún caso con un índice de proliferación de grado 1.

A los 5 años tras el diagnóstico y la extirpación quirúrgica sólo uno de los casos había recidivado, coincidiendo este caso con el que tenía un borde de resección infiltrado.

DISCUSIÓN

El PCNA es una proteína de 36 kD que fue aislada en el núcleo de células proliferantes mediante electroforesis tridimensional (2). Se ha demostrado que el PCNA/ciclina es una proteína auxiliar de la polimerasa delta (3) que juega un papel crítico en la iniciación de la proliferación celular (4). Aunque el PCNA se correlacionó con la fase S del ciclo celular (5) hoy se sabe que, si bien su pico se encuentra en dicha fase, en realidad se expresa durante todo el ciclo (6). Es expresado, por tanto, por todas las células proliferantes, pero no, por las células quiescentes o en reposo, es decir en fase G0. Estos hallazgos básicos se pudieron aplicar a la inmunohistoquímica cuando se obtuvo un anticuerpo monoclonal murino frente a PCNA/ciclina (7).



*Fig. 2:
Microfotografía
en la que pueden
observarse los
núcleos de las
células
neoplásicas
inmunorreactivos
para PCNA
(peroxidasa).*

En nuestro estudio no hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre el índice de proliferación cuantificado con PCNA y los otros parámetros estudiados (tamaño de la lesión, grado de displasia, recidiva tumoral y edad de los pacientes). Esto pudiera ser debido al pequeño tamaño de la muestra estudiada. Sin embargo, llama la atención que en el caso en los que se produjo una recidiva tumoral el índice de proliferación era de grado 2 y que en los 2 casos en los que se observó un índice de proliferación de grado 3 no se haya observado ningún signo de recidiva tumoral.

Por tanto, a la vista de nuestros resultados, podemos concluir que las neoplasias intraepiteliales córneo-conjuntivales son tumoraciones con un índice de proliferación moderado y que o bien PCNA no es un buen marcador de proliferación en este tipo de tumores o bien que el índice de proliferación cuantificado con PCNA es independiente del comportamiento agresivo que pudiesen experimentar dichas lesiones entendiendo por comportamiento agresivo un mayor tamaño de la lesión, el grado de displasia, la recidiva tumoral o la potencial transformación maligna y, en lo que se refiere a estos dos últimos parámetros, parece influir más en el pronóstico una resección quirúrgica que incluya parte de tejido sano, que el índice de proliferación que pudiese presentar la tumoración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Warnig GO III, Roth AM, Ekins MB. Clinical and pathological description of 17 cases of corneal intraepithelial neoplasia. *Am J Ophthalmol*

- 1984; 97: 547-559.
2. Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84: 795-802.
3. Bravo R, Frank R, Blundell PA, McDonald-Bravo M. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 1987; 326: 515-517.
4. Jaskulki D, De riel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA-cyclin. *Science* 1988; 240: 1544-1546.
5. Celis JE, Celis A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-3266.
6. Hall PA, Woods AL. Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23: 505-522.
7. Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, Tan EM. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA-Cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 1987; 168: 476-486.