

Estudio de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular y p185 en el carcinoma no microcítico de pulmón

P. Alemany Monraval, M. Martorell Cebollada, I. Salvador Villalba y E. Martínez Leandro

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital General Universitario de Valencia.

En este estudio hemos realizado una valoración de la expresión inmunohistoquímica de p185 y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en 68 carcinomas no microcíticos de pulmón sometidos a tratamiento quirúrgico.

El adenocarcinoma de pulmón fue el tipo histológico que con mayor frecuencia expresó p185 a niveles superiores al 10%, con relación estadísticamente significativa; mientras que el carcinoma epidermoide se asoció a índices de proliferación más elevados.

Aunque estos dos marcadores no mostraron carácter pronóstico en el estudio de la supervivencia, debe señalarse que las supervivencias más prolongadas se obtuvieron en los pacientes que expresaron p185 en menos del 10% de las células neoplásicas.

Palabras clave: Antígeno nuclear de proliferación celular p185. Carcinoma no microcítico de pulmón.

Arch Bronconeumol 1996; 32: 165-169

Study of proliferating cell nuclear antigen and p185 in non-small cell lung cancer

We assessed immunohistochemical expression of p185 and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in 68 patients undergoing surgery for non-small cell lung cancer.

Adenocarcinoma of the lung was the histological type whose expression of p185 at levels exceeding 10% was greater to a statistically significant degree. Epidermoid carcinoma, on the other hand, was associated with the highest PCNA indices.

Although these 2 markers had no prognostic value in the survival study, it must be pointed out that the longest survivors were patients with p185 expression less than 10% in neoplastic cells.

Key words: Proliferating cell nuclear antigen p185. Non-small cell lung cancer.

Introducción

El cáncer de pulmón es el tumor maligno que ha experimentado un mayor incremento a lo largo del siglo XX; en la actualidad es la causa principal de muerte por tumores malignos en los países occidentales¹.

Hasta la actualidad la estadificación clínica, la tipificación histológica y el estado del enfermo han sido marcadores pronósticos en el cáncer de pulmón², pero con frecuencia los oncólogos se encuentran con pacientes que muestran una evolución desfavorable a pesar de tener factores pronósticos favorables. Esto nos induce a pensar en la falta de sensibilidad de los actuales índices pronósticos, y nos sugiere la posibilidad de que pueden existir otros marcadores específicos que sean los responsables del curso clínico de cada paciente.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína ácida no-histona de 36 kD de peso molecular que cumple funciones auxiliares de la polimerasa delta del ADN y es, por lo tanto, esencial para la síntesis y reparación del ADN. Sus concentraciones oscilan a lo largo del ciclo celular, y alcanzan su máxima expresión durante la fase S del mismo^{3,4}.

La existencia de anticuerpos específicos que permiten mediante inmunohistoquímica identificar el PCNA en el tejido procesado ha permitido valorar la actividad proliferativa en procesos neoplásicos y no tumorales, mostrando en ocasiones carácter pronóstico⁵. Así, en el pulmón, niveles elevados de expresión de PCNA se han correlacionado con la tipificación histológica y con factores de mal pronóstico⁶⁻⁸.

La p185, la proteína del oncogén c-erb-B-2, es una glucoproteína de membrana con actividad tirosinasa que muestra una estrecha homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico^{9,10}. En el cáncer de mama y ovario la expresión inmunohisto-

Correspondencia: Dr. P. Alemany Monraval.
General Avilés, 48, 2.º. 46015 Valencia.

Recibido: 7-7-95; aceptado para su publicación: 21-11-95.

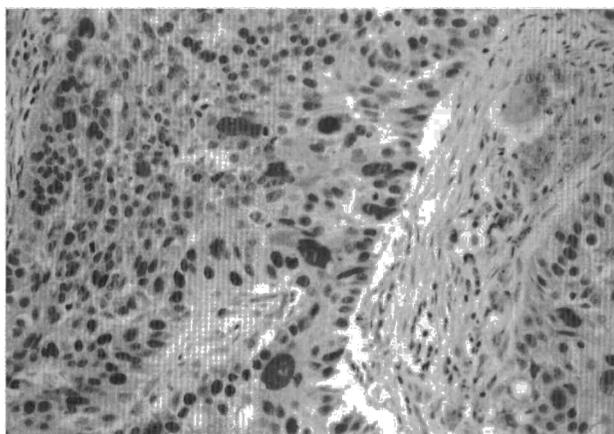


Fig. 1. Tinción del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Se observa la expresión del PCNA en el núcleo de las células tumorales (ABC, x280).

química de esta proteína se ha correlacionado en un 90% de los casos con la amplificación del oncogén, mostrando carácter pronóstico¹¹⁻¹³.

En el cáncer de pulmón, la p185 ha sido reconocida como un marcador fenotípico tumoral del carcinoma de células no pequeñas, identificándose en un 30% de los adenocarcinomas y carcinomas epidermoides, pero con significado clínico diferente¹⁴.

Hemos realizado un estudio de expresión de p185 y PCNA en 68 casos diagnosticados de carcinoma no microcítico de pulmón sometidos a tratamiento o técnica quirúrgica, valorando su significado pronóstico.

Material y métodos

Nuestro estudio se realizó sobre 68 pacientes del Hospital General Universitario de Valencia, diagnosticados de carcinoma no microcítico de pulmón y sometidos a tratamiento o técnica quirúrgica (neumonectomía, lobectomía y resección atípica) durante el período 1989-1991.

Para la estadificación de los enfermos se aplicó la clasificación internacional por estadios, quirúrgico-patológica, del cáncer de pulmón¹⁵.

El estudio histopatológico e inmunohistoquímico se realizó sobre material fijado en formol al 10% e incluido en parafina, utilizando la clasificación de la OMS, en su segunda edición¹⁶, para la tipificación morfológica de los tumores.

El estudio inmunohistoquímico se realizó aplicando el método de avidina-biotina-peroxidasa descrito por Hsu et al¹⁷. Como anticuerpos primarios se utilizaron 2 anticuerpos monoclonales: PC-10 (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca) a una dilución de 1/20 para el estudio del antígeno nuclear de proli-

feración celular y el anticuerpo m-Ab-3 (Oncogene Science, Uniondale, Nueva York) a una concentración de 1/50 para el análisis de la p185.

El cálculo de la expresión de PCNA se realizó mediante el índice de PCNA tal y como sugiere Hall et al⁵, agrupando a los tumores en 4 categorías según el índice de PCNA fuera inferior a 25%, entre 25-50%, entre 50-75% y superior al 75%.

Para la valoración de los resultados de la expresión de la p185 empleamos un método semicuantitativo, clasificando a los tumores en 4 grupos según la tinción fuera en forma de células aisladas (< 10%), de forma parcheada (10-50%), difusa (> 50%) o tinción negativa. En los casos con tinción de p185 positiva se valoró la localización de la misma (membrana o membrana y citoplasma) y su morfología (lineal o granular).

Como control de ambas reacciones se empleó un sarcoma para el estudio del PCNA y muestras de pulmón normal para la p185.

El estudio estadístico se realizó utilizando un programa SPSS/PC+ versión 4.0 para ordenadores personales^{18,19}. Realizamos un estudio de correlación entre las variables (análisis de regresión lineal, prueba de la t de Student, χ^2) y un estudio de supervivencia.

La supervivencia se calculó en meses, tomando como punto de referencia el día de la realización del acto quirúrgico y finalizando en el momento del cierre del estudio clínico, en julio de 1993; los enfermos se clasificaron en vivos o fallecidos según el estado actual de los mismos. Se excluyeron del análisis los pacientes que fallecieron durante el primer mes tras la intervención quirúrgica (muerte postoperatoria). Para el estudio de la supervivencia se confeccionaron las tablas de la vida y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. El valor de p se consideró significativo cuando fue inferior a 0,05.

Resultados

De los 68 casos analizados en nuestro estudio, 33 tumores fueron clasificados como carcinoma epidermoide (48,5%), 23 como adenocarcinoma (33,8%) y 12 fueron clasificados como carcinoma indiferenciado de célula grande (17,6%).

Los estadios I y III-a fueron los de mayor incidencia en nuestra serie, con un 48,5% y 30,9% de los casos, respectivamente. La supervivencia se pudo calcular en 64 casos (cuatro fueron considerados muerte postoperatoria), con una media de 22 ± 14 meses. Un 36,8% (25 casos) estaban vivos en el momento del cierre del estudio y un 63,2% (43) fallecieron.

El estudio del PCNA fue realizado en 57 tumores (83,8%), en los 11 casos restantes la tinción fue considerada negativa o no valorable.

Se consideró tinción positiva la localizada en el núcleo de las células tumorales independientemente de la intensidad de la tinción (fig. 1). El índice de PCNA medio fue de 43,4% que por grupos histológicos correspondió a un 45,8% para los carcinomas epidermoides, 34,9% para los adenocarcinomas y 56,2% para el carcinoma indiferenciado de célula grande. Cuando agrupamos a los tumores en 4 categorías según su índice de PCNA, el epidermoide fue el tipo histológico de mayor incidencia entre los tumores que mostraban índices de PCNA más elevados (tabla I).

La expresión de la proteína del oncogén c-erb-B-2 fue valorada en 59 casos. En nueve la inmunotinción

TABLA I
Índice de expresión del PCNA

PCNA	Total	Carcinoma epidermoide	Adenocarcinoma	Carcinoma de célula grande
< 25%	16 (28,1)	8 (50,0)	8 (50,0)	0 (0,0)
25-50%	22 (38,6)	8 (36,4)	10 (45,5)	4 (18,2)
50-75%	11 (19,3)	6 (54,5)	1 (9,1)	4 (36,4)
> 75%	8 (14,0)	5 (62,5)	2 (25,0)	1 (12,5)

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular.
Las cifras entre paréntesis expresan el porcentaje.

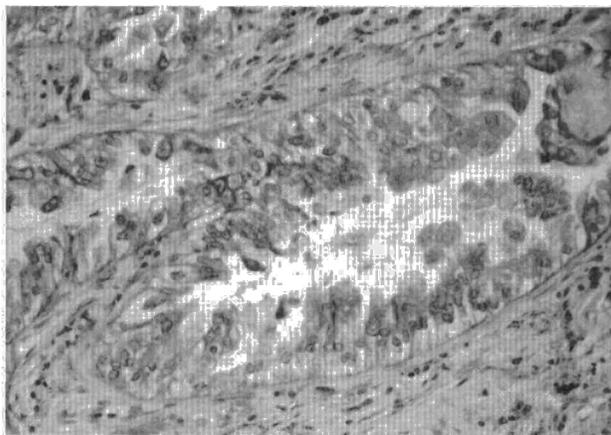


Fig. 2. Tinción de membrana de la p185. Se puede observar la localización de la inmunotinción de la p185 en la membrana citoplasmática de las células tumorales, en este caso con patrón lineal (ABC, x280).

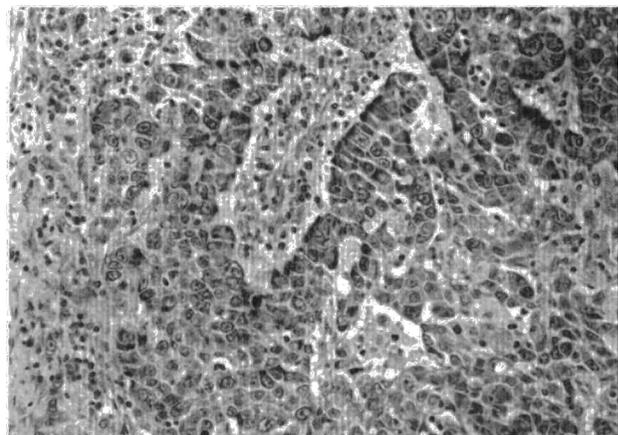


Fig. 3. Tinción de membrana y citoplasma de la p185 que muestra un patrón granular (ABC, x280).

fue no interpretable. Se consideró tinción positiva la inmunotinción localizada en la membrana (fig. 2) y la de membrana y citoplasma asociado (fig. 3), con una intensidad de tinción superior a la del pulmón no tumoral.

En 46 casos se observó tinción positiva (77,9%), siendo el adenocarcinoma de pulmón el tipo histológico que mostró un índice de positividad más elevado (95,25%).

La expresión inmunohistoquímica de p185 localizada en la membrana y en el citoplasma tumoral y la morfología de tinción granular fueron las predominantes en nuestro estudio con un 78,3 y 95,7%, respectivamente.

En el estudio de correlación entre las variables se observó una relación entre el índice de PCNA y el índice de mitosis; y entre la expresión de p185 y la tipificación histológica ($p = 0,0129$).

El índice de PCNA mostró una correlación lineal con el índice de mitosis con un coeficiente de correlación de 0,6 (fig. 4). Los adenocarcinomas de pulmón mostraron con mayor frecuencia expresión de p185 > 10% (tabla II).

En el estudio de la supervivencia fue la tipificación histológica, los estadios N y general los factores que mostraron relación estadísticamente significativa con la misma ($p < 0,05$). Los enfermos con tumores clasificados como carcinomas epidermoides y en estadios iniciales de la enfermedad (N_0 - N_1 y estadios I y II) fueron los que mostraron las supervivencias más prolongadas.

La expresión de PCNA y p185 no mostraron carácter pronóstico. No se observó relación ni con el estadio ni con

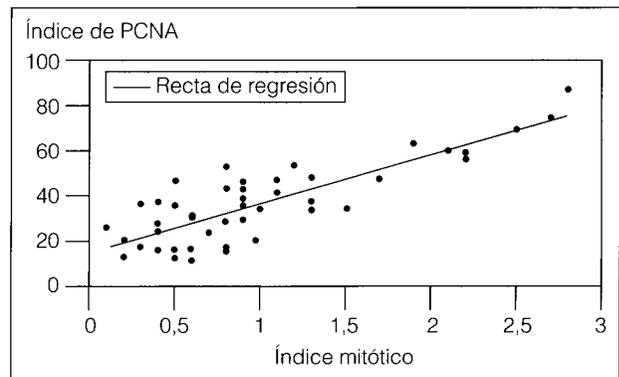


Fig. 4. Regresión lineal. Índice mitótico/índice del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

la supervivencia, aunque es de señalar las supervivencias más prolongadas de los enfermos con expresión de p185 < 10% (fig. 5) y de los pacientes con expresión de p185 localizada en la membrana tumoral (fig. 6), en este caso con relación estadísticamente significativa ($p = 0,0147$).

Discusión

A pesar de los avances realizados en el diagnóstico y en el tratamiento de cáncer de pulmón, el índice de supervivencia de los enfermos afectados por esta patología a penas ha variado en los últimos años²⁰. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos marcadores específicos, como son los de la actividad proliferativa y las alteraciones genéticas tumorales, que permitan identificar ciertos factores pronósticos que determinen el curso clínico de cada uno de los enfermos.

La información derivada del estudio del ciclo celular ha sido utilizada por los patólogos para determinar el índice de proliferación de los tejidos, siendo un importante marcador pronóstico en la patología tumoral.

A partir de la identificación y del desarrollo de anticuerpos específicos que reconocen determinados anti-

TABLA II
Expresión de p185

p185	Total	Carcinoma epidermoide	Adenocarcinoma	Carcinoma de célula grande
< 10%	10 (16,9)	7 (70,0)	2 (20,0)	1 (10,0)
10-50%	18 (30,5)	9 (50,0)	6 (33,3)	3 (16,7)
> 50%	18 (30,5)	4 (22,2)	12 (66,7)	2 (11,1)
Negativa	13 (22,0)	9 (69,2)	1 (7,7)	3 (23,1)

Las cifras entre paréntesis expresan el porcentaje.

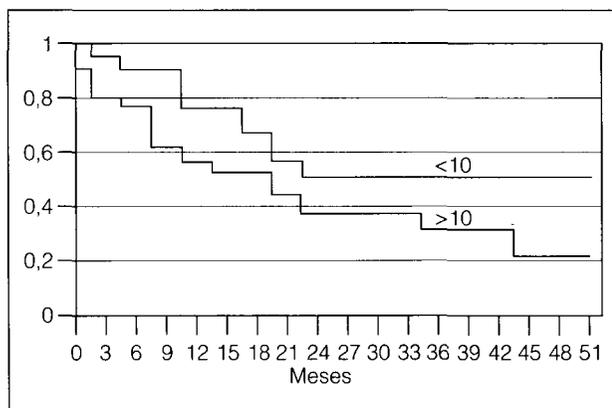


Fig. 5. Curva de Kaplan-Meier. Expresión p185.

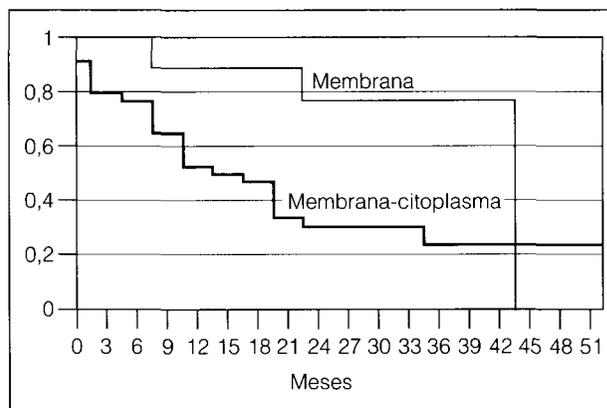


Fig. 6. Curva de Kaplan-Meier. Localización con tinción p185.

nos relacionados con el ciclo celular (Ki 67 y el PCNA) ha sido posible la valoración de la actividad proliferativa de los tejidos mediante la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas. El empleo de anticuerpos que reconocen el PCNA muestra la ventaja de poder ser utilizados sobre material fijado, lo que permite la realización de estudios prospectivos, sin necesidad de alteraciones tisulares²¹.

Hemos realizado un estudio de expresión del PCNA en 68 casos de carcinoma no microcítico de pulmón, utilizando material fijado en formol al 10% e incluido en parafina, procedente de piezas de resección quirúrgica pulmonar.

De los 3 anticuerpos comercializados para la determinación del PCNA²²⁻²⁴, el anticuerpo PC-10 ha sido considerado por un gran número de autores como el idóneo para la identificación del PCNA sobre material fijado, por la mayor resistencia del epítipo reconocido por este anticuerpo en la fijación formólica habitual^{21,25}.

Con el uso de este anticuerpo obtuvimos un índice de positividad del 83,8%, resultados algo inferiores a los apuntados por otros autores en el cáncer de pulmón^{6,7}.

Coincidiendo con los datos registrados en la bibliografía^{7,8,26}, el índice de PCNA fue diferente según el tipo histológico. Los carcinomas epidermoide e indiferenciado de célula grande mostraron un índice de PCNA superior al adenocarcinoma de pulmón; siendo el epidermoide el tipo histológico que predominó entre los tumores con mayores índices de PCNA. Estos resultados se confirmaron al valorar la capacidad proliferativa de nuestros tumores mediante el índice de mitosis. Ambos tipos histológicos (carcinomas epidermoide e indiferenciado de célula grande) mostraron un índice de mitosis superior con una relación estadísticamente significativa; apreciándose una correlación lineal entre el índice de PCNA y el de mitosis.

En cuanto al pronóstico, el índice de PCNA no fue concluyente en nuestro estudio, no observamos relación con el estadio clínico ni con la supervivencia. Los tumores en estadio I mostraron un índice de PCNA de $46,8 \pm 26,1$ frente a un $34,6 \pm 10$ para los tumores en estadio III-b de la enfermedad. Los enfermos con tumores con índices de PCNA entre 50-75% fueron los que

mostraron las supervivencias más prolongadas. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por otros autores en la bibliografía. Así Fontanini⁶, en el estudio de 40 carcinoma no microcíticos de pulmón, no encuentra correlación entre el índice de PCNA y el tumor no microcítico, sin embargo señala que el índice de expresión del PCNA junto al estadio, el tamaño tumoral, la infiltración vascular y el recuento de mitosis fueron las variables capaces de predecir la supervivencia.

Ishida et al²⁶, utilizando 2 marcadores de la actividad proliferativa (PCNA y AgNORS), señalan un índice de supervivencia a los 5 años inferior en los enfermos que presentan índices elevados de PCNA y AgNORS.

Junto al índice de PCNA, hemos realizado un estudio de la proteína del oncogén c-erb-B-2 valorando su significado pronóstico.

Con el empleo del anticuerpo m-Ab-3²⁷, obtuvimos un índice de positividad del 77,9% (46/59), siendo el adenocarcinoma de pulmón el tipo histológico con el índice más elevado (95,2%). Estos resultados son semejantes a los registrados por Shi et al²⁸, quienes obtienen un 88,5% de positividad en estos tumores; superando a los índices obtenidos por Kern y Tateishi^{29,30} con el empleo de anticuerpos policlonales.

Al igual que apunta Shi²⁸, consideramos que supuestamente el uso de anticuerpos monoclonales permite la obtención de resultados más sensibles.

La expresión de p185 ha sido considerada por algunos autores como un marcador diferencial de los adenocarcinomas de pulmón^{28,30}. Éstos expresan de forma constante altos niveles de p185, independientemente del estadio tumoral, lo que ha sido confirmado en nuestro estudio. El adenocarcinoma de pulmón con mayor frecuencia expresó p185 > 10%, con una relación estadísticamente significativa.

En el estudio de la supervivencia, la expresión de p185 no mostró carácter pronóstico; aunque los enfermos con tumores que mostraban expresión de p185 inferior al 10% fueron los que presentaron las supervivencias más prolongadas.

Por último, hemos de destacar el resultado obtenido en el estudio de la supervivencia en relación con la localización celular inmunohistoquímica de la p185. Este



factor, que anteriormente no ha sido estudiado como variable pronóstica en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, mostró en nuestro estudio una relación estadísticamente significativa con la supervivencia. Los tumores que expresaban p185 localizada en la membrana celular mostraron supervivencias más prolongadas. Consideramos que estos resultados pueden encontrarse en relación con los diferentes mecanismos que regulan la expresión y la localización celular de la p185 en el cáncer de pulmón³¹.

En resumen, según nuestros resultados, podemos considerar que el antígeno nuclear de proliferación celular es un buen marcador de la actividad proliferativa tumoral pero su carácter pronóstico no se evidencia en nuestro estudio. En cuanto a la p185, esta proteína se ha comportado como marcador fenotípico del adenocarcinoma de pulmón y los niveles elevados de expresión se acompañan de cortas supervivencias.

En el estudio de la supervivencia, la expresión de p185 localizada en la membrana citoplasmática tumoral junto al tipo histológico, los estadios N y general, han sido las variables que han mostrado carácter pronóstico; aunque sería interesante confirmar estos resultados en un estudio de multivariadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agudo A, González CA, Torrent M. Exposición ambiental al humo del tabaco y cáncer de pulmón. *Med Clin (Barc)* 1989; 93: 387-393.
2. Kern JA, Filderman AE. Oncogenes and growth factors in human lung cancer. *Clin Chest Medic* 1993; 14: 31-41.
3. 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* 1985; 82: 3.262-3.266.
4. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 1981; 154: 1.899-1.909.
5. Hall PA, Levison DA, Woods AL et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
6. Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S et al. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992; 70: 1.520-1.527.
7. Carey F, Fabbri G, Lamb D. Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology* 1992; 20: 499-503.
8. Theunissen PH, Leers MP, Bollen EC. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 1992; 20: 251-255.
9. Coussens L, Yang-Feng T, Liao Y-C et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1.132-1.139.
10. Schechter AL, Hung MCH, Vaidyanathan L et al. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; 229: 976-978.
11. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
12. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
13. Berger MS, Locher GW, Saurer S et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988; 48: 1.238-1.243.
14. Weiner DB, Nordberg J, Robinson R et al. Expression of the neu gene-encoded protein (p185 neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1990; 50: 421-425.
15. Mountain C. A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986; 89 (Supl): 225-228.
16. WHO. The World Health Organization histological typing of lung tumours (2.^a ed.). *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 123-126.
17. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
18. Norusis MJ. SPSS/PC+ Statics 4.0. SPSS. Inc. Michigan, 1986.
19. Norusis MJ. SPSS/PC+ Advanced statics 4.0. SPSS. Inc. Michigan, 1986.
20. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics 1992. *CA* 1992; 42: 19-38.
21. Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-192.
22. Waseen NK, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96: 121-129.
23. 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: 475-486.
24. Ogata K, Ogata Y, Takasaki Y, Tan EM. Epitopes on proliferating cell nuclear antigen recognized by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. *J Immunol* 1987; 139: 2.942-2.945.
25. Wolf H, Dittrich KL. Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1.269-1.273.
26. Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, Tateishi M, Sugio K, Sugimachi K. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res* 1993; 53: 5.000-5.003.
27. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon D. Sensivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54: 2.771-2.777.
28. Shi D, He G, Cao SH et al. Overexpression of the c-erbB-2/neu encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinog* 1992; 5: 213-218.
29. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE et al. p185 neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 1990; 50: 5.184-5.191.
30. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1.372-1.375.
31. Kern JA, Robinson RA, Gazdar A, Torney L, Weiner B. Mechanisms of p185 HER2 expression in human non-small cell lung cancer cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 359-363.