

Análisis de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en 24 carcinomas primarios de pulmón de células no pequeñas y correlación con la supervivencia

V.M. Castellano, T. Sotelo, C. Ballestín, A. López-Encuentra* y G. Varela**

Departamento de Anatomía Patológica. *Servicio de Neumología. **Servicio de Cirugía Torácica. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) o ciclina es una proteína nuclear de 36 kD que está involucrada en la replicación del ADN celular y es considerada como un índice de proliferación en algunas neoplasias. Este trabajo analiza la expresión de PCNA en 24 carcinomas primarios de pulmón de células no pequeñas empleando el anticuerpo monoclonal PC-10 en material procesado en parafina. Encontramos importantes variaciones inter e intratumorales en la expresión de PCNA. No observamos relación estadísticamente significativa entre la cantidad de PCNA expresada y el tamaño y localización tumoral, índice mitótico, tipo histológico del tumor y edad del paciente. Estudiamos la supervivencia en los pacientes en 19 casos con el propósito de correlacionarla con la expresión de PCNA, obteniendo una relación estadísticamente significativa ($r = 0,47$; $p < 0,05$) entre la cantidad de PCNA expresada y la supervivencia en los casos incluidos en nuestro estudio, pero al establecer un sistema de graduación de la expresión de PCNA en tres grados –leve (0-25%), moderado (25-50%) e intenso (> 50%)– no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las supervivencias ni un valor pronóstico en la graduación de PCNA.

Palabras clave: Cáncer de pulmón. Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Ciclina. Supervivencia. Factor pronóstico. Inmunohistoquímica.

Arch Bronconeumol 1996; 32: 127-131.

Analysis of proliferating cell nuclear antigen expression in 24 cases of primary non-small cell lung cancer and correlation with survival

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a 36kD nuclear protein involved in DNA replication that is believed to provide an indication of proliferation in some neoplasms. This study analyzes PCNA expression in 24 cases of primary non-small cell lung cancer using monoclonal PC-10 antibodies in paraffin embedded material. We found significant inter- and intra-tumoral variations in PCNA expression, and no statistically significant relation between the amount of PCNA expression and the size and location of tumors, index of mitosis, histological tumor type or patient age. We found a statistically significant relation ($r = 0.47$; $p < 0.05$) between survival and amount of PCNA expression in a sample of 19 cases, but no statistically significant differences in survival related to whether PCNA expression was slight (0-25), moderate (25%-50%) or high (> 50%), and no prognostic value for degree of PCNA expression.

Key words: Lung cancer. Proliferating cell nuclear antigen. PCNA. Cyclin. Survival. Prognostic factor. Immunohistochemistry.

Introducción

El antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)¹, también conocido como ciclina²⁻³, es una proteína nuclear de 36 kD⁴ que se hace más patente durante la fase S del ciclo celular⁵ y desempeña un papel indispensable en la replicación del

ADN celular^{6,7}, actuando como proteína auxiliar de la enzima ADN-polimerasa delta⁸⁻¹⁰. La detección de PCNA, actualmente posible por técnicas de inmunohistoquímica, permite reconocer parte del compartimento proliferativo de una población celular^{11,12}. Sin embargo, al menos en algunas poblaciones celulares neoplásicas, existen dudas sobre la correlación entre expresión de PCNA y proliferación celular¹². En lo concerniente al cáncer de pulmón, en la actualidad existen algunas diferencias importantes en los resultados obtenidos de diversos estudios que relacionan la expresión de PCNA con distintos parámetros biológicos de tumor (tipo his-

Correspondencia: Dr. V.M. Castellano Megías. Departamento de Anatomía Patológica. Hospital 12 de Octubre. Ctra. de Andalucía, km 5.400. 28041 Madrid.

Recibido: 15-6-95; aceptado para su publicación: 24-10-95.

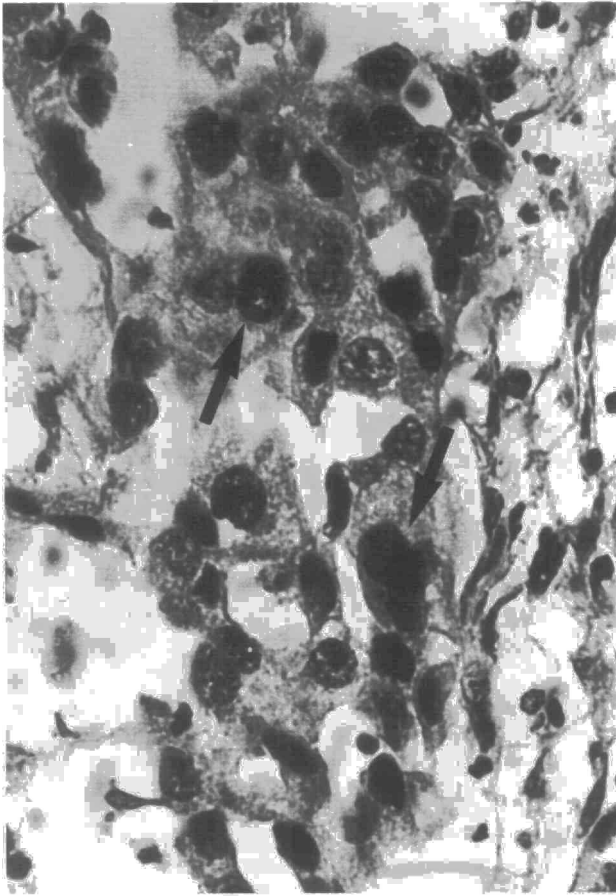
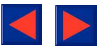


Fig. 1. Tinción inmunohistoquímica de un grupo de células neoplásicas de un carcinoma de célula grande de pulmón con el anticuerpo monoclonal PC-10. Obsérvese (flecha) la positividad en los núcleos celulares ($\times 400$).

tológico, índice mitótico, expresión de otros antígenos, o patrón de ploidía, entre otros) y con parámetros clínicos (estadio clínico, recidiva, respuesta a quimioterapia o supervivencia, entre otros)¹³⁻²⁴.

En este estudio retrospectivo valoramos la expresión de PCNA en 24 carcinomas primarios de pulmón de célula grande (carcinomas primarios de pulmón no indiferenciados de células pequeñas) tratados quirúrgicamente y su relación con otros parámetros anatomopatológicos (tamaño, localización, tipo histológico e índice mitótico). Por último, realizamos una correlación de la expresión de PCNA con la supervivencia en 19 de los 24 casos.

Material y métodos

Se recurrió a un listado constituido por los pacientes que habían sido intervenidos quirúrgicamente por carcinoma primario de células no pequeñas de pulmón en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital 12 de Octubre de Madrid entre los años 1984-1990 y que era conocida su evolución. Del mismo fueron seleccionados al azar 25 pacientes, de cualquier estadio clínico inicial y pretendiendo ligar fundamentalmente la variable morfológica, tiempo de evolución y expresión de PCNA. Un caso fue eliminado del estudio por no contarse con

tejido debidamente conservado para la realización de la técnica inmunohistoquímica. De los 24 casos finalmente estudiados todos los pacientes seleccionados resultaron ser varones, con edades comprendidas entre los 40 y 75 años en el momento de la cirugía. La edad media era de 61,2 años. Los casos comprendían 13 carcinomas epidermoides, 8 adenocarcinomas, 2 carcinomas indiferenciados y uno adenocarcinoso, y los procedimientos quirúrgicos consistieron en 9 neumonectomías, 13 lobectomías y 2 segmentectomías. Para la correlación de la expresión de PCNA con la supervivencia se tuvieron en cuenta únicamente aquellos pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico de carácter presuntamente curativo, que no hubieran fallecido en la primera semana postoperatoria y cuya causa de muerte no se debiera a otra enfermedad grave independiente de su neoplasia pulmonar. Cinco de los 24 casos fueron excluidos al no cumplir alguno de estos requisitos.

Las piezas quirúrgicas habían sido fijadas en formaldehído al 10% durante 24-48 horas y las muestras seleccionadas de cada tumor posteriormente incluidas en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina para el estudio histopatológico convencional y cortes histológicos en los que se aplicó el método de la estreptoavidina-biotina-peroxidasa (LSAAB Kit Dako-Glastrup, Dinamarca) y como marcador inmunohistoquímico de la PCNA al anticuerpo monoclonal PC-10 (Dako-Glastrup, Dinamarca) a una dilución de 1/50.

Se consideró que una célula expresaba PCNA cuando presentaba positividad nuclear para PC-10 (fig. 1) independientemente de que hubiese o no positividad citoplasmática^{12,25-28}. En cada tumor la expresión de PCNA fue estimada valorando 2.000 células neoplásicas, para lo que se escogieron 10 campos microscópicos de gran aumento ($\times 400$) y se contabilizaron 200 células neoplásicas por cada campo, obteniéndose 10 porcentajes parciales de positividad que arrojaron información sobre la variación intratumoral de expresión de PCNA. Posteriormente, los tumores se clasificaron por su porcentaje medio de expresión de PCNA de acuerdo con el siguiente sistema de graduación: 1-25% (leve), 25-50% (moderado) y mayor del 50% (intenso). El índice mitótico (suma del número de mitosis encontradas en 10 campos microscópicos de gran aumento) fue obtenido de los mismos 10 campos de gran aumento empleados para el estudio de la expresión de PCNA.

Los datos del tamaño y la localización tumoral se obtuvieron del estudio macroscópico anatomopatológico, considerándose central al tumor situado en un bronquio principal, lobar o segmentario.

El estudio estadístico se compuso de un análisis descriptivo de las variables, técnicas de análisis no paramétrico de la varianza para comparación de las medias de los distintos grupos (usando el test de Kruskal-Wallis) y coeficiente de correlación de Pearson para verificar asociaciones entre variables cuantitativas. Se realizó una tabla de vida actuarial y se hicieron curvas de supervivencia siguiendo el método de Kaplan-Meier. Para determinar si existían diferencias significativas de supervivencia entre los 3 grados de expresión de PCNA establecidos se empleó el Log-Rank Test.

Resultados

En las tablas I-II se aporta un análisis descriptivo de las variables. La expresión media de PCNA de los 24 casos fue del 36,5%. En el tumor que expresó menos PCNA ésta alcanzó un 9,9% de positividad, y en el que más, un 70,6%. De acuerdo con el sistema de graduación empleado hubo 8 casos (33,3%) con leve expresión, 10 (41,7%) con moderada y seis (25%) con inten-

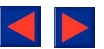


TABLA I
Análisis descriptivo de variables: expresión de PCNA (%), supervivencia, índice mitótico, edad y tamaño tumoral

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PCNA	9,9	70,1	36,5	18,4
Supervivencia (meses)*	3,9	86,4	30,7	21,6
Índice mitótico**	2	35	11	7,7
Edad (años)	40	75	61,2	9,3
Tamaño tumoral (cm)	1,2	7,7	4,1	1,6

*Meses.

**Número de mitosis por 10 campos de gran aumento.

TABLA II
Análisis descriptivo de las variables: tipo histológico, porcentaje medio de expresión de PCNA, rango de expresión de PCNA y supervivencia de cada caso

Tipo histológico	PCNA: porcentaje medio	PCNA: rango*	Supervivencia (meses)**
Epidermoide	9,9	0-16	66,7
Adenocarcinoma	10,8	3,5-20	44
Epidermoide	16,5	10-23,5	53,3
Epidermoide	17,7	11-21,5	37,5
Epidermoide	19	6-29,5	27,6
Adenocarcinoma	19,2	13-26	22,5
Epidermoide	20,1	13-29	52,8
Adenocarcinoma	24,5	12,5-33,6	11,5
Epidermoide	25,5	16,5-40	19,4
Epidermoide	26,6	16,5-33	23,7
Epidermoide	29,5	23,5-40,5	3,87
Epidermoide	38,7	30-60	86,4
Indiferenciado	41,5	26-67,5	8,3
Adenocarcinoma	44,2	39,5-52	16,6
Adenocarcinoma	50	44,5-64,5	7,7
Epidermoide	57,5	36,5-77,5	18,1
Adenocarcinoma	58,3	46-79	27
Epidermoide	60,6	31-63	31,7
Epidermoide	68,1	35-80	24,1
Adenocarcinoma	27,5	20-36	-
Epidermoide	42,8	22-77	-
Adenocarcinoma	45,4	34-67,5	-
Indiferenciado	52,4	38-62	-
Adenocarcinoma	70,6	56-80	-

*Mínimo y máximo porcentaje parcial de expresión de PCNA.

**En 5 casos la supervivencia no fue considerada.

sa. El tumor que mostró mayor variación de expresión de un campo microscópico a otro presentó porcentajes parciales mínimo y máximo del 35 y el 80%, respectivamente. En general, los carcinomas epidermoides tendieron a mostrar mayor positividad en la periferia que en el centro de los nidos tumorales, mientras que los adenocarcinomas mostraron una positividad distribuida de forma más homogénea y, en algún caso, mayor distribución central. No se encontraron diferencias significativas cuando se correlacionó la expresión de PCNA con la edad de los pacientes, tamaño y localización del tumor, índice mitótico y tipo histológico.

En el grupo compuesto por los 19 casos en los que se valoró la supervivencia la expresión media de PCNA fue del 33,5%. El análisis estadístico demostró una co-

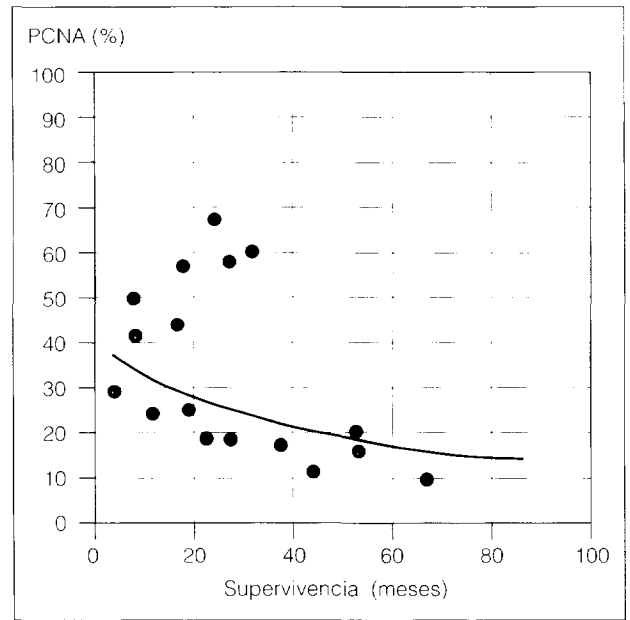


Fig. 2. Curva de correlación inversa entre la supervivencia y la expresión de PCNA ($r = 0,47$, transformación recíproca). Los círculos señalan la supervivencia y el porcentaje medio de expresión de PCNA de cada caso estudiado ($n = 19$).

relación inversa ($r = 0,47$, transformación recíproca) estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la supervivencia y el porcentaje de expresión de PCNA (fig. 2). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la supervivencia media de cada uno de los 3 grados de expresión establecidos ($p = 0,08$) ni se encontró que dicho sistema de graduación tuviera un valor pronóstico significativo ($p = 0,39$).

Discusión

Cuando en 1978 Miyachi et al¹ identificaron a la PCNA como un antígeno contra el que reaccionaban autoanticuerpos detectados en el suero de algunos pacientes lúpicos, el hecho de que fuera identificado sólo en células de conocida actividad proliferativa (como, por ejemplo, los linfocitos de la corteza ganglionar o los linfocitos periféricos sometidos a la presencia de mitógenos) pero no en células quiescentes, sugirió que el antígeno involucrado debía tener algún papel en la replicación celular. La fabricación de anticuerpos monoclonales contra la PCNA y la posibilidad de su aplicación en muestras de tejido procesadas en parafina han facilitado enormemente el estudio de su expresión en numerosas neoplasias^{12,19,28,29} y su correlación con parámetros anatomoclínicos. En algunas neoplasias hematológicas y en algunos tumores sólidos la expresión de PCNA ha presentado un valor pronóstico^{30,31}.

En nuestro trabajo, al igual que en otros realizados¹⁵, no hemos encontrado correlación entre la expresión de PCNA y el índice mitótico. La expresión de PCNA aumenta al final de la fase G1, es máxima en la fase S, desciende durante la fase G2 del ciclo celular y está au-



sente en la fase de mitosis¹². Esto podría explicar la ausencia de correlación entre la expresión de PCNA y el índice mitótico, según algunos autores¹³. Sin embargo, existen trabajos en los que esta correlación sí se observa y es además sustentada basándose en que tanto las células en mitosis como las células en fase S son proliferantes¹¹.

El principal objetivo al estudiar la expresión de PCNA en los carcinomas de pulmón es distinguir estos tumores por su mayor o menor expresión de PCNA de forma que este criterio ofrezca un valor pronóstico y condicione actitudes terapéuticas. Aunque en nuestro estudio encontramos relación estadísticamente significativa entre la cuantía de expresión de PCNA y la supervivencia de los pacientes ($p < 0.05$) no encontramos valor pronóstico en el sistema de graduación empleado. En la literatura no existen resultados unánimes, ya que hay trabajos que asignan un valor pronóstico independiente a la expresión de PCNA^{15,17,20} y otros en los que, aunque observan correlación estadísticamente significativa entre supervivencia y PCNA, no encuentran un valor pronóstico independiente^{16,21}. Otro hecho relevante es la gran variación de expresión de PCNA que observamos en un mismo tumor (tabla II). Esta variación podría originar infra o supervaloraciones de la expresión media de PCNA de un tumor si el muestreo que se realiza no es suficientemente extenso. Aunque estas variaciones podrían ser detectadas mediante un estudio suficientemente seriado de la neoplasia, el tamaño menor pero suficiente de la muestra todavía no ha sido acordado. En este sentido, el uso de métodos de cuantificación computarizada parece cada vez más necesario en la práctica rutinaria de la patología, ya que permite hacer muestreos más extensos en menor tiempo y de forma más objetiva y reproducible. El reconocimiento del grado de heterogeneidad en la actividad proliferativa de la neoplasia podría ser por sí mismo un dato relevante.

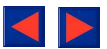
En conclusión, aunque hemos observado correlación estadísticamente significativa entre la expresión de PCNA y la supervivencia de los casos incluidos en nuestro trabajo, no hemos encontrado diferencias significativas de supervivencia en la graduación de dicha expresión. Creemos que aunque se conceda a este índice de proliferación un lugar en el estudio rutinario del carcinoma primario de pulmón, se requieren más estudios que correlacionen la expresión de PCNA y la supervivencia en series grandes, con control del mayor número posible de variables con reconocido significado pronóstico y en cuyos resultados la expresión de PCNA alcance un valor pronóstico independiente.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestra gratitud a los miembros de la Unidad de Epidemiología Clínica del Hospital 12 de Octubre por su inestimable aportación en el estudio estadístico de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. An autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2,228-2,234.
- Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84: 795-802.
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI. The identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984; 309: 374-376.
- Takasaki Y, Fischwild D, Tan EM. Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J Exp Med* 1984; 159: 981-992.
- Celis JE, Celis A. Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 143-157.
- Jaskulski D, De Riel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 1988; 240: 1,544-1,546.
- Zuber M, Tan EM, Ryoji M. Involvement of proliferating cell nuclear antigen (cyclin) in DNA replication in living cells. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 57-66.
- Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from foetal calf thymus. *J Biol Chem* 1986; 261: 12,310-12,316.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326: 515-517.
- Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517-520.
- Robbins BA, De la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura R. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-845.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellook DB, Watkins JA, Bames DM, Gillet CE, Camplejohn R, Dorel R, Waseen NH, Lane DP. 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.
- Theunissen PHMH, Leers MPG, Bollen ECM. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 1992; 20: 251-255.
- Carey FA, Fabbroni 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.
- Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S, Ruggiero A, Hardin MJ, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Ageletti CA. 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.
- Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Chuanchich H, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Angeletti A. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 106: 80-89.
- Ogawa JI, Tsurumi T, Yamada S, Koide S, Shohtsu A. Blood vessel invasion and expression of sialyl Lewis x and proliferating cell nuclear antigen in stage I non-small cell lung cancer. *Cancer* 1994; 73: 1,177-1,183.
- Ogawa JI, Iwazaki M, Inoue H, Koide S, Shohtsu A. Immunohistochemical study of glutathione-related enzymes and proliferative antigens in lung cancer. Relation to cisplatin sensitivity. *Cancer* 1993; 71: 2,204-2,209.
- García RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol* 1989; 134: 733-739.
- Fujii M, Motoi M, Saeki H, Aoe K, Moriwaki S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-small cell lung cancer. *Acta Med Okayama* 1993; 4: 103-108.
- Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, Linnoila RI. Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 2,496-2,503.
- 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.
- Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Merlo GR, Ribecchini A, Angeletti CA et al. Human non-small cell lung cancer: p53 protein accu-



- mulation is an early event and persists during metastatic progression. *J Pathol* 1994; 174: 23-31.
24. Kawai T, Suzuki M, Kono S, Shinomiya N, Rokutanda M, Tagaki K et al. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in lung carcinoma. Correlation with DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 1994; 74: 2,468-2,475.
 25. Bravo R, MacDonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987; 105: 1,549-1,554.
 26. Chang CD, Ottavio L, Travalli S, Lipson Ke, Baserga R. Transcriptional and posttranscriptional regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3,289-3,296.
 27. Almendral JM, Huebsch D, Blundell PA, MacDonald-Bravo H, Bravo R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1,575-1,579.
 28. Waseem NH, 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.
 29. 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.
 30. Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Handy AM, Weseem NH, Lane DP et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 1991; 19: 21-27.
 31. Yu CCW, Hall PA, Fletcher CDM, Camplejohn RS, Weseem NH, Lane DP et al. Haemangiopericytoma: the prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Histopathology* 1991; 19: 29-23.