

## CONTENIDO

## COMUNICACIONES

- ▶ [Abstract](#)
- ▶ [PDF](#)
- ▶ [Comentarios](#)
- ▶ [Título](#)
- ▶ [Resumen](#)
- ▶ [Introducción](#)
- ▶ [Material](#)
- ▶ [Resultados](#)
- ▶ [Discusión](#)
- ▶ [Correspondencia](#)
- ▶ [Referencias](#)
- ▶ [Imágenes](#)

## EXPRESIÓN MORFOLÓGICA DEL PCNA EN MELANOMAS MALIGNOS EN FASE DE CRECIMIENTO VERTICAL Y EN NEVUS MELANOCÍTICOS.

*Alfonso López-Muñiz, Luis C. Hernández, Blanca E. Fernández, Agustín Triviño.*

*Departamento de Morfología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo, España.*

IV-CVHAP 2001 COMUNICACIÓN-E - 005

Fecha recepción: 01/12/2000  
 Fecha evaluación: 19/12/2000  
 Fecha publicación: 24/02/2001

## RESUMEN

**Objetivos:** Evaluación de la expresión del antígeno de proliferación celular (PCNA) en el melanoma maligno, correlacionándolo con parámetros pronósticos y de supervivencia.

**Pacientes y Métodos:** Se han estudiado 30 melanomas malignos en fase de crecimiento vertical (MMFCV) y 30 nevos melanocíticos (NM) con la técnica inmunohistoquímica anti-PCNA. Los MMFCV fueron clasificados según el nivel de infiltración (Clark), el espesor (Breslow) y el índice mitótico. También se valoró en los MMFCV la supervivencia real y teórica. Se relacionaron estadísticamente estos parámetros con el porcentaje de células PCNA positivas.

**Resultados:** En piel normal y en NM, la expresión PCNA era débil marcando menos del 1% de las células (casos negativos). En los MMFCV el marcaje fue positivo en el 86,66% de los casos. El porcentaje de núcleos marcados estaba relacionado con el espesor, el nivel de infiltración y en el número de mitosis. El porcentaje de núcleos positivos se correlacionaba con la supervivencia teórica, pero era independiente de la supervivencia real.

**Conclusiones:** Estos hallazgos sugieren que la valoración de la expresión PCNA debería emplearse como un marcador pronóstico en los melanomas malignos.

**Palabras clave:** nevos melanocíticos | melanomas | PCNA | inmunohistoquímica

## IMÁGENES

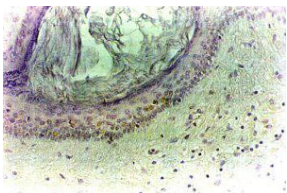


Fig. 1.

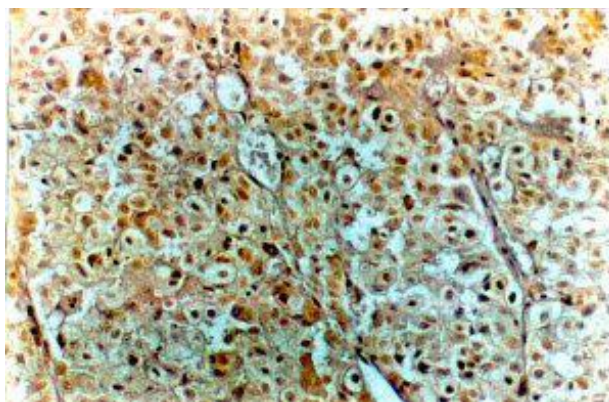


Figura 3.

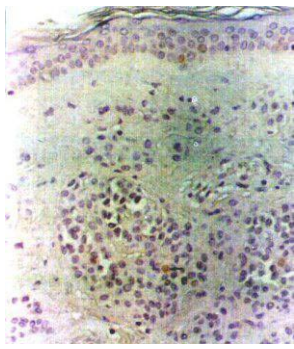


Fig. 2

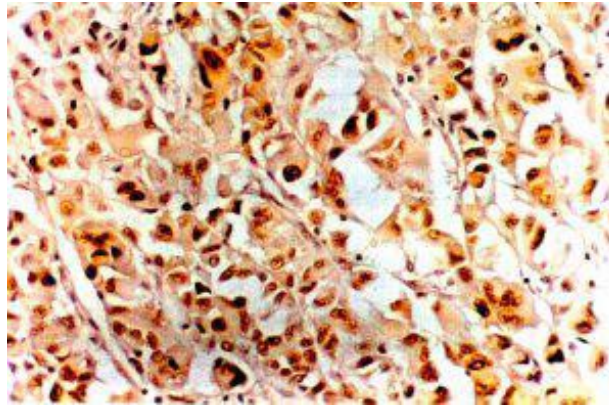


Figura 4.

## INTRODUCCIÓN

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína ácida nuclear no histona de 36 kd y de 261 aminoácidos con alto contenido en ácido glutámico y aspartato (1), que funciona como proteína adyuvante de la síntesis de ADN (2). El PCNA es considerado necesario, aunque insuficiente para completar el proceso de proliferación celular (3). El PCNA también está implicado en la escisión/reparación de nucleótidos al comprobarse asociación de éste con cromatina en todas las fases del ciclo celular tras irradiación con luz ultravioleta en cultivos celulares (4). En la actualidad se acepta que el PCNA, denominado también PCNA/ciclina, o, simplemente ciclina, es una proteína auxiliar del ADN polimerasa, y es imprescindible para la iniciación de la proliferación celular, por tanto, su detección, nos serviría de predicción en el porvenir biológico de los tumores (5-7). La síntesis de PCNA es muy baja en la fase inicial de G1, aumenta durante la fase tardía de G1 y alcanza su máximo en la fase inicial de la fase S. Además la tasa de esta síntesis desciende a niveles basales durante el período final de la fase S2. Esta demostrado que la fracción S es un excelente factor pronóstico en el estadio I del melanoma maligno (8). Se han elaborado distintos anticuerpos monoclonales frente a la ciclina, disponibles comercialmente: 19A2, 19F4 y PC10 (9).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han recogido un total de 30 melanomas malignos en fase de crecimiento vertical (MMFCV), comprendiendo 15 melanomas de extensión superficial, 9 de tipo melanoma léntigo maligno, 3 melanomas lentiginosos acrales y 3 melanomas nodulares. Todos ellos fueron diagnosticados básicamente por métodos histológicos rutinarios, siendo analizados por dos observadores distintos. También se han obtenido un total de 30 lesiones melanocíticas benignas (20 nevus melanocíticos intradérmicos y 10 nevus melanocíticos compuestos). Todos los pacientes eran de raza blanca. La edad de los pacientes con MM variaban desde los 26 a los 91 años, de éstos, 8 casos de MM eran varones y 21 correspondían a mujeres. En ningún caso había constancia de antecedentes familiares o personales de MM ni de nevus displásico. Los tumores se clasificaron mediante los parámetros clásicos: Espesor del tumor expresado en mm. (Breslow), el nivel de infiltración según la clasificación de Clark (5 niveles) y la presencia de mitosis por campo (600X). Siguiendo la clasificación de Clark, 1 caso se encontraba en el nivel 2, 3 en el nivel 3, 18 en el nivel 4 y 7 en el nivel 5. En cuanto a la infiltración tumoral expresada en milímetros (Breslow), variaba entre 0.73 mms y 10.2 mms (6 casos tenían menos de 3 mm y 24 más de 3 mm). Para analizar la supervivencia, se realizó por una parte la supervivencia teórica de la serie de MMFCV mediante un análisis del grosor de los tumores comparándola con la supervivencia en otras series, y la supervivencia real de los casos de seguimiento al menos de 5 años.

**Inmunomarcaje PCNA:** La identificación de las células reactivas al suero anti-PCNA, empleando la técnica inmunohistoquímica de estreptavidina-biotina, y usando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal anti-PCNA de ratón frente a PCNA humano (Novocastra Lab. Clone PC10) a dilución 1:20. Las muestras se incubaron en cámara húmeda durante 24 horas a 4º centígrados y sin digestión enzimática previa. El revelado se realizó con una solución tamponada conteniendo diaminobencidina (DAB Sigma). La reacción de oxidación de la peroxidasa fue interrumpida bajo control microscópico mediante el lavado de las preparaciones con agua corriente. El contraste se efectuó con hematoxilina. Para verificar la especificidad de la reacción, el suero anti-PCNA fue sustituido por PBS en vez del anticuerpo primario de una muestra control (adenocarcinoma bien diferenciado de colon).

**Cuantificación:** Para la cuantificación del número de células marcadas con el antisuero anti-PCNA se analizaron con un objetivo de 40X y con un ocular de 10X. En los diferentes campos microscópicos que presentaban de células marcadas se seleccionaban éstas por métodos de análisis de imagen y se valoraba semicuantitativamente el porcentaje de las mismas. Se consideraba inmunomarcaje positivo cuando el

resultado final era mayor del 10%.

**Análisis estadístico:** Para el estudio comparativo de las medias de las muestras en las distintas variables cuantitativas continuas se utilizó la "t" de Student-Fisher, tanto para datos independientes como para datos apareados. Previamente se realizó análisis de la varianza de las muestras como condicionantes de validez de esta prueba paramétrica. También se empleó como prueba el modelo de la regresión múltiple de Cox y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer para relacionar la supervivencia real y la supervivencia teórica con la proporción de células marcadas (comparando en cada uno de los casos el porcentaje de células PCNA con la supervivencia real en meses y la supervivencia teórica en meses) (10), empleando los programas informáticos Microsoft Office Excel 97 y SPSS 8.0.

## RESULTADOS

**PCNA y nevus/piel normal:** De los 30 nevus melanocíticos estudiados, se apreció una positividad en 18 de los mismos (60%). Como control positivo para la inmunorreacción se utilizó la propia epidermis y anejos cutáneos, ya que existía escasa inmunoreactividad en células de la epidermis de forma aislada, ligeramente mayor en elementos de áreas basales o suprabasales, y todavía en menor número, en el estrato espinoso (fig.1). En lo que respecta a los nevus melanocíticos, de las 27 lesiones que se estudiaron, las células névicas positivas para el marcador anti-PCNA fueron escasas, en una proporción menor del 1%, y éstas mostraron una débil tinción limitada al núcleo. La inmunoreactividad de las células névicas con el marcador PCNA se encontró preferentemente en las tecas de localización más alta (fig.2).

**PCNA y melanoma maligno:** De los 30 casos estudiados de MM, 26 fueron positivos (86,66%). En la generalidad de los casos, la reacción inmunohistoquímica, dio lugar al depósito de cromógeno exclusivamente sobre el núcleo. Ocasionalmente se observó inmunoprecipitado tanto sobre el núcleo como sobre la masa citoplásmica. No se apreció ninguna especificidad en la localización de las células inmunorreactivas, siendo similar el número de células marcadas en tecas o células superficiales o profundas (fig. 3 - 4). profundas

La proporción de células inmunorreactivas frente al suero PC10 fue significativamente mayor en los MM de más de 3 mm de espesor que en los de menos de 3 mm, también se relacionaba la proporción de células marcadas con los niveles de infiltración y con el número de mitosis (Tabla I). Aplicando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer, paradójicamente, se observaba que algunos casos con muerte al cabo de un año mostraban inmunoreactividades bajas, mientras que otro caso en el que la supervivencia real fue de 10 años presentaba una proporción de inmunomarcaje alto. La supervivencia real de la serie no fue significativa cuando se relacionaba con el inmunomarcaje con PCNA. Por el contrario la supervivencia teórica, relacionada con el espesor del tumor, sí mostró variaciones significativas según el porcentaje nuclear marcado (Breslow) según el test de Cox (Tabla II).

	- 30% núcleos marcados	+ 30% núcleos marcados
- 3 mm	6	0
+ 3 mm	7	16
Nivel 2 de Clark	6	0
Nivel 3 de Clark	9	0
Nivel 4 de Clark	2	6
Nivel 5 de Clark	0	6
Nº mitosis	+	+++

**Tabla I:** Comparación entre los parámetros pronósticos y el porcentaje de células PCNA positivas según su marcaje fuera mayor o menor del 30% de las células inmunoreactivas.

Variable:	B	S.E.	df	Sig	R	Exp(B)
Supervivencia real						
Porcentaje celular positivo	0,0076	0,0148	1	0,6062	0,0000	0,9924
Variable:						
Supervivencia/grosor (Breslow)						
Porcentaje celular positivo	2,9971	0,0729	1	0,0004	-0,4024	0,5411

**Tabla II:** Relación entre la supervivencia real y teórica con el porcentaje de células PCNA positivas. (Test de regresión de Cox). (B: Estimación de la variable dependiente; SE: error estándar; Sig: significación del valor B; R: Coeficiente de correlación; Exp(B): Valoración del coeficiente de regresión).

La aplicación de técnicas inmunohistoquímicas para establecer una cuantificación determinada, está sujeta a variaciones que se escapan a los ojos de cualquier observador<sup>11</sup>. La elaboración de anticuerpos monoclonales frente a la ciclina, como los comercializados con los nombres 19A2, 19F4 y PC10, reconocen distintas zonas de una misma proteína (epítomos), con diferente inmunexpresión, al igual que ocurre con los diferentes anticuerpos que se dirigen frente a distintos fragmentos proteicos (12). Es indudable que la fijación y el procesamiento de los tejidos influyen decisivamente en el resultado de ésta técnica.

La efectividad de la tinción en lesiones névicas varía cuando se revisan distintas series, oscilando entre el 11% de algunos autores<sup>13</sup> y el 60% de la nuestra. En los casos presentados, se demostró la correlación significativa entre el número de células teñidas frente al PC10 y el tipo de lesión: en las lesiones benignas apenas habían células marcadas mientras que en las malignas los melanocitos atípicos resultaban frecuentemente positivos (13, 14). Algunas observaciones, manifiestan que las escasas células névicas benignas teñidas con este antisuero se localizan en las áreas más superficiales (13).

Llama la atención, que en lo referente al porcentaje de células teñidas con PCNA, existe disparidad con lo encontrado por otros autores, comprendiendo series en donde el máximo era del 7.5% hasta el 40% (15). Sin embargo, en nuestros casos la mayoría mostraban más de la mitad de sus elementos marcados con este antisuero (58.1%+13.4).

También es de destacar, la efectividad (número de casos positivos) en el método inmunohistoquímico. Nuestros casos de MM expresaron marcaje en el componente neoplásico (inmunorreactividad superior al 10%) en 26 de 30 casos, es decir en algo más del 86% de los mismos, número similar al encontrado por otros autores (80%) (16). Sin embargo otros estudios encuentran un porcentaje sensiblemente inferior, identificando marcadores celulares positivos en el 63%<sup>15</sup> o el 56.5+7.5% (17) en enfermedades malignas de la piel, aunque todos estos autores coinciden en considerar que el PCNA tiene valor pronóstico.

En la valoración estadística entre el porcentaje de células melánicas atípicas marcadas con PCNA y el grosor en milímetros de Breslow, se encontró significación estadística, pero que a la hora de valorar la supervivencia real de la serie, mediante las curvas de Kaplan-Meier o la regresión de Cox, no había diferencias significativas. Este hallazgo no concuerda con otros investigadores, ya que encontraron que el tamaño tumoral, el índice mitótico de las células tumorales y el grosor, no se correlacionaba adecuadamente con la actividad proliferativa de las células tumorales medidas con este antisuero en términos similares a los empleados en este estudio (18, 19). Sin embargo, estos mismos autores hallaron mayor actividad proliferativa en los MM con niveles de Clark IV y V, que en aquellos de nivel I, II o III. También se ha relacionado significativamente el marcaje PCNA con la benignidad o malignidad histológica, pero no con el tamaño en melanomas malignos, de perros y gatos (20).

La correlación entre el grado de expresividad inmunohistoquímica para el PCNA como factor pronóstico independiente en los MMFCV, aún permanece en estudio, si bien muchas de las publicaciones actuales, evitan citar esta relación o emplean otros marcadores inmunohistoquímicos de proliferación celular como es el caso del Ki-67 (21), ya que la valoración de la actividad proliferativa como criterio pronóstico suele tener mayor relación directa con este último marcador, pues como es conocido, la expresión celular de PCNA, es dependiente también del resultado de activación de los mecanismos genéticos reparadores, apreciándose en esas células gran proporción de DNA aneuploide (22), careciendo, aparentemente, de estas interferencias el Ki-67 (23, 24).

Sin embargo, recientes trabajos sostienen que en células melánicas malignas el PCNA se expresa mayoritariamente mientras que el ki67 y el p53 tienen un marcaje muy debil<sup>14</sup>. Además en cultivos se ha ratificado la relación del PCNA con la proliferación celular en células malignas de los melanomas primarios (25). Consecuentemente, algunos autores consideran que el PCNA debería ser incluido en la batería de parámetros que permitieran valorar el comportamiento metastásico de los melanomas primarios (26).

## NOTAS AL PIE DE PÁGINA

**Correspondencia:** Alfonso López-Muñiz. Departamento de Morfología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo, España. <mailto:almu@correo.uniovi.es>

## REFERENCIAS

1. Almendral JM, Huebsch D, Blundell PA, McDonald-Bravo H, Bravo R. Cloning and sequence of human nuclear protein cyclin: homology with ADN binding proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 1575-1579.
2. Bravo R, Frank R, Blundell PA, McDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of ADN polymerasa-delta. *Nature* 1987; 326: 515-515.
3. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-2234.
4. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992; 21: 591-594.
5. Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1623-1628.
6. Jaskulski 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.
7. Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. An auxiliary protein for DNA polymerase delta from foetal calf thymus. *J Biol Chem* 1986; 261: 12310-12316.
8. Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Nordling S, Lipponen PK, Alhava EM, Kosma M. Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant melanoma. *J Cancer* 1998; 77: 1917-25.
9. Triviño A, Carbajo E, López-Muñiz A, Claros I, Herrero-Zapatero A. El antígeno de proliferación celular: respuestas complejas a un apelativo simple. *Patología* 1994; 27: 343-347.
10. Kleinbaum DG, Kuipper LL, Muller KE. Basic statistics, the correlation coefficient and straightline analysis. En: Kent PWA, ed. *Applied regression analysis and other multivariate methods*. Boston: PW Kent, 1998, 335-717.
11. López-Muñiz A, Triviño A, Hernández LC, Pérez A, Herrero A. Valoración y significación pronóstica de la expresión morfológica del p53 en melanomas malignos en fase de crecimiento vertical y en nevus melanocíticos. *ONCOLOGIA* 2000;
12. Ogata K, Ogata Y, Takasaki Y, Tan E. Epitopes of the proliferating cell nuclear antigen recognised by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. *J Immunol* 1987; 139: 2942-2946.
13. Tu P, Miyauchi S, Miki Y. Proliferative activities in Spitz nevus compared with melanocytic nevus and malignant melanoma using expression of PCNA/Cyclin and mitotic rate. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 311-314.
14. Kanitakis J, Euvrard S, Faure M, Claudy A. Proliferative characteristics of nevus in children with organ transplants. *Ann Dermatol Venereol*. 1999; 126(10):687-90.
15. Takahashi H, Strutton GM, Parsons PG. Determination of proliferating fractions in malignant melanoma by anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibody. *Histopathology* 1991; 18: 221-227.
16. Niemann TH, Argenzy ZB. Immunohistochemical study of Spitz nevi and malignant melanoma with use of antibody of proliferating cell nuclear antigen. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 441-445.
17. Kawahira K. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in malignant and nonmalignant skin diseases. *Arch Dermatol Res*. 1999; 291(7-8): 413-8.
18. Kuwata T, Masanobu K, Kasuga T. Proliferative activity of primary cutaneous melanocytic tumor. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993; 423: 359-364.
- 19.- Niezabitowski A, Czajewski K, Rys J, Kruczak A, Gruchala A, Wasilewska A, Lackowska B, Sokolowski A, Szklarski W. Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Surg Oncol*. 1999; 70(3):150-60.
- 20.- Roels S, Tilmant K, Ducatelle R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol*. 1999; 121:13-24.
- 21.- Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene

in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer* 1997; 74.: 255-259.

22.- Mc Cormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 1993; 22: 543-547.

23.- Vogt T, Zipperer KH, Vogt A, Holzel D, Landthaler M, Stolz W. p53<sup>?</sup>protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology* 1997; 30: 57-63.

24.- Hegegard S, Sommer HM, Broholm H, Broedstrup O. Proliferating cell nuclear antigen and ki-67 immunohistochemistry of oligodendrogliomas with special reference to prognosis. *Cancer* 1995; 76: 1809-1813.

25.-Rodriguez-Ayerbe C, Smith-Zubiaga I. Effect of serum withdrawal on the proliferation of B16F10 melanoma cells. *Cell Biol Int* 2000; 24(5): 279-83.

26.- Goldmann T, Ribbert D, Suter L, Brode M, Otto F. Tumor characteristics involved in the metastatic behaviour as an improvement in primary cutaneous melanoma prognostics. *J Exp Clin Cancer Res.* 1998; 17:483-9.