

Proliferación tumoral en cáncer de cérvix uterino. Relación con los factores clásicos de pronóstico y la supervivencia

Marta Lloret^{1,2}
Sofía Pérez¹
Agustín Rey³
Amina Lubrano⁴
Pedro Lara^{1,2}
Orlando Falcón⁴

¹Oncología
Radioterápica
²Investigación
³Anatomía Patológica
Hospital Dr. Negrín
Gran Canaria
⁴Ginecología
Oncológica
Hospital
Materno-Infantil

Correspondencia:
Orlando Falcón
Unidad de Ginecología
Oncológica
Hospital Materno Infantil
Avda del Sur, s/n
Las Palmas Gran Canaria
E-mail:
ofalcon@idecnet.com

Resumen

Objetivos: Estudiar la proliferación tumoral en el carcinoma de cérvix y su relación con el proceso de apoptosis tumoral y con factores clásicos de pronóstico, así como con la supervivencia.

Material y métodos: Se han incluido 137 pacientes tratadas y seguidas en nuestra institución. La proliferación fue estimada mediante inmunotinción frente a Ki67 (clon Mib-1). En tinciones de hematoxilina-eosina se determinaron la apoptosis y mitosis. Se trataron 99 pacientes mediante irradiación radical \pm quimioterapia (72%). En 37 casos (28%) el tratamiento fue la cirugía. Una paciente sólo recibió tratamiento paliativo.

Resultados: La fracción de crecimiento tumoral estimada mediante Ki67 está estrechamente relacionada con la apoptosis ($p < 0,027$). La fracción de crecimiento es mayor en epidermoides (53%) que en adenocarcinomas (48%), al igual que entre tumores con/sin adenopatías (50,55% vs 32,75%), sin alcanzar significación estadística. No se observó relación con la supervivencia. Sin embargo, tumores con fracción de crecimiento mayor de 23% tenían una tendencia a peor control local ($p < 0,09$).
Conclusión: La proliferación tumoral estimada mediante Ki67 muestra una estrecha relación con la apoptosis, de forma que esta última modula el papel pronóstico que en cuanto a control local tiene la proliferación.

Palabras clave: Cáncer de cérvix. Apoptosis. Proliferación. Ki67.

Summary

Aims: To study tumor proliferation in cervix uterine carcinoma and the relation with tumor apoptosis and with the classic prognostic factors, and also with survival.

Material and methods: One hundred and thirty seven patients, treated and followed-up in our institution, were included in this study. Tumor proliferation was estimated by immunostaining against ki67 (Mib-1 clon). Hematoxiline-eosine staining were used to determine tumor apoptosis and mitosis. Ninety nine patients were treated by radical radiotherapy \pm chemotherapy (72%). Radical surgery was the treatment in 37 cases (28%). One patient was treated with palliation intention.

Results: Tumor growth fraction estimated by ki67 is correlated with apoptosis ($p < 0.027$). Tumor growth

fraction is higher in epidermoid tumors (53%) than adenocarcinomas (48%). The same relation is observed in patients with/without pelvic adenopaties (50.55% vs 32.75%), without reaching statistical significance. No relation with survival was observed. However, tumors with growth fraction higher than 23% had a tendency to worse local control than those with lower growth fraction ($p < 0.09$).

Conclusion: Tumor proliferation estimated by ki67 shows a strong relation with tumor apoptosis. Apoptosis also regulates the prognostic value of tumor proliferation in local control of cervical carcinomas.

Key words: Cervix uterine carcinoma. Apoptosis. Tumor proliferation. Ki67

Introducción

El carcinoma invasivo de cérvix continúa siendo una enfermedad frecuente en nuestro medio¹, siendo el estadio clínico el factor pronóstico independiente más relevante en la mayoría de estudios realizados²⁻⁵. Sin embargo, tumores con igual estadio y que reciben igual tratamiento presentan evoluciones diferentes. Existen, por tanto, otros factores dependientes de las características del tumor, que están adquiriendo importancia en los últimos años y están siendo motivo de estudio.

El cáncer es consecuencia de una proliferación incontrolada de células con anomalías en su material genético. Las células aberrantes que escaparon a los mecanismos que tiene el organismo para evitar la enfermedad, no fueron eliminadas por apoptosis y perpetuaron las anomalías en su descendencia. Estas células anómalas proliferan más de lo que mueren, lo que da lugar al crecimiento tumoral⁶. La capacidad proliferativa ha sido relacionada con la progresión y la supervivencia en gran variedad de tumores^{7,8}. La cuantificación de la proliferación tumoral se puede realizar por varios métodos, incluyendo la tinción con hematoxilina-eosina (IM), inmunohisto-

química (ki67, PCNA), y la citometría de flujo con técnicas de marcado con bromodeoxiuridina (BrdUrd). El antígeno nuclear ki67 es una proteína que se expresa en las células en todas las fases del ciclo, excepto en G0, por lo que representa una estimación de la fracción del crecimiento tumoral (Figura 1). La relación entre proliferación tumoral (medida mediante la expresión de ki67) y la extensión tumoral (local, ganglionar), el grado histológico y la supervivencia, se ha estudiado en carcinoma de cérvix con resultados controvertidos (Tabla 1).

El objetivo de este estudio es estudiar la proliferación tumoral y conocer la relación que tiene con el proceso de apoptosis tumoral y con los factores clásicos de pronóstico, así como con la supervivencia.

Material y métodos

Se han incluido 137 pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de cérvix entre diciembre-1977 y abril-1999. Se han revisado de forma retrospectiva las historias clínicas de todas las pacientes, siendo evaluadas hasta la última revisión o hasta su fallecimiento, con un seguimiento medio de las pacientes vivas de 35,6 meses (1-146).

La evaluación pretratamiento consistió en historia clínica, exploración física general y ginecológica (especuloscopia, tacto vaginal y rectal), hemograma, bioquímica renal y hepática, y Rx de tórax. Se realizó TAC abdomino-pélvico con contraste para evaluar la extensión local y a órganos vecinos. La cistoscopia y rectoscopia se realiza en caso de sospecha de afectación vesical o rectal. El tamaño tumoral se midió mediante examen pélvico bimanual. En todos los casos se obtuvo confirmación histológica por biopsia. Esta biopsia conservada en parafina se utilizó también para realizar las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Las pacientes se estadiaron clínicamente según la clasificación de la FIGO vigente. El tratamiento

mayoritariamente realizado fue la irradiación con o sin quimioterapia concurrente (99 pacientes; 72% de todos los casos). Las pacientes sometidas a cirugía radical asociada o no a irradiación postoperatoria (37 casos) representan el 28% restante. En una paciente se realizó tratamiento exclusivamente paliativo. Las características de la serie se resumen en la Tabla 2.

Inmunohistoquímica

Para la realización de las distintas técnicas, se obtuvieron secciones de 4 micras a partir de los bloques de parafina, que se montaban en cristales polisínicos.

Para la determinación de la fracción de crecimiento tumoral mediante expresión de Ki67, se desparafinan las laminillas mediante pases de xylol y etanol a distintas concentraciones (100%, 70%, 50%), 10 minutos cada pase. Posteriormente se lavan en agua destilada, y se procede a la rehidratación de las muestras, sumergiéndolas en una solución citrato (3 minutos a partir de la ebullición de la solución). Tras el lavado de las muestras con agua destilada, se bloquea la peroxidasa endógena mediante H₂O₂ di-

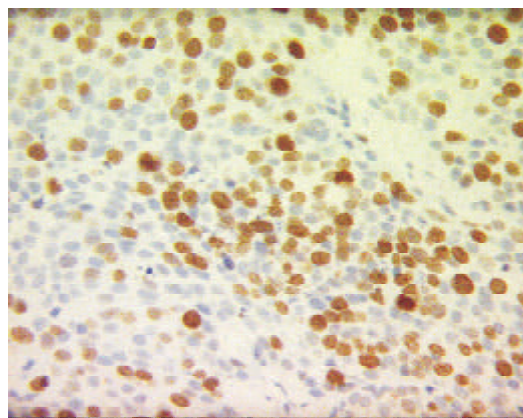


Figura 1. IHQ de ki67. Expresión de ki67 (tinción nuclear) mediante técnica de inmunohistoquímica (clon MIB-1)

	Nº Ptes	Grado histológico	Extensión local	Supervivencia
Wong (1991) ⁹	31	Sí		
Cole (1992) ¹⁰	28	No	No	No
Garzetti (1995) ¹¹	57	No	Sí	Peor
Levine (1995) ¹²	66		No	
Oka (1996) ¹³	76	Sí*	No	No
Camacho (1997) ¹⁴	35	Sí*	No	No
Nakano (1998) ¹⁵	64			Mejor
Pillai (1998) ¹⁶	152			Mejor

* Grado 2 vs 3

Tabla 1. Relación entre proliferación (estimada mediante ki67) factores pronósticos clásicos y supervivencia en carcinoma de cérvix

Tabla 2.
Características
generales de la serie

	N Casos (%)
Estadio	
IB	46 (34)
II	67 (50)
III	19 (14)
IV	2 (1)
Desconocidos	3
Tipo histológico	
Epidermoide	114 (84)
Adenocarcinoma	22 (16)
Desconocidos	1
Grado histológico	
I	14 (11)
II	56 (48)
III	48 (41)
Desconocido	19
Tamaño tumoral (cm)	
N=81	4.39 ± 1.44 (1-8); mediana 4
Ganglios (N= 72)	
Negativos	62 (86)
Positivos	10 (14)
Edad (años)	
N=121	52.44 ± 14.42 (27-89); mediana 51
Tratamiento	
RT ± QT	99 (72)
Cirugía ± Radioterapia	37 (28)
No tratamiento	1

luida en solución salina buffer fosfato (PBS), durante 10 minutos. Una vez desparafinadas, rehidratadas y bloqueada la peroxidasa endógena, se procederá a la técnica de IHQ específica. Se utilizó el kit de detección de DAKO LSBA (Carpintería, CA). Como control positivo, se utilizó un tumor con elevada positividad para el anticuerpo a estudio (Monoclonal Dianova 1001, con una dilución 1/100 y 24 horas de incubación) y un control negativo, en el que se omitía el anticuerpo primario y se ponía PBS. Para la estimación de la tinción nuclear se elige la zona de mayor expresión a bajo aumento (40X), y se cuentan 1.000 células aproximadamente a 400X, obteniendo el porcentaje de células con tinción positiva.

La identificación de células en apoptosis/mitosis se realiza con la técnica de hematoxilina-eosina. Se eligieron aleatoriamente diez campos con objetivo de alto poder (400x), de manera que se contaban al menos 1.000 células tumorales por cada sección. Los criterios utilizados para definir apoptosis y mitosis, fueron los descritos previamente por Kerr, *et al.*¹⁷.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software SOLO. La comparación de variables continuas se realiza mediante la correlación de Pearson en caso de distribución normal, y el test de Spearman en caso de distribución no normal. La comparación entre una variable continua y una discreta se realiza mediante el test de Kruskal-Wallis (Anova test). El punto de corte para las variables continuas fue preestablecido antes del estudio (mediana, tertiles, cuartiles, quintiles). Las variables discretas se comparan con el método de chi-cuadrado. El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y la comparación de resultados mediante el log-rank test.

Resultados

La tasa de proliferación tumoral estimada mediante Ki67 fue de 50,86 ± 24,15%, rango 0-98, mediana 53%. La apoptosis tuvo una expresión media de 2,12 ± 1,45%, rango 0,19-7, mediana 1,81%. Ambos parámetros estuvieron directa y estrechamente relacionados entre sí (n=97; r=0,22; p<0,027) (Figura 2). Las tasa de mitosis observadas en este grupo de pacientes fue de 1,31 ± 0,93% (0,10-6,1), mediana 1,12%. No se demostró relación entre ambos parámetros (n= 95; r=0,03; p=0,75).

Se analizó la relación de la proliferación tumoral con respecto a los factores clásicos de pronóstico (Tabla 3). Los adenocarcinomas mostraron una menor tasa de proliferación estimada mediante Ki67 (mediana 48%) comparada con los tumores de estirpe epidermoide (mediana 53,75%), aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (p=019). Los tumores que tenían adenopatías presentaban una tendencia a mayor tasa de proliferación que los tumores con ganglios negativos (p<0.08). Además, si dividimos en quintiles la tasa de proliferación (<=23%, 24-40%, 41-55%, 56-69%, 70-98%), se observa que los tumores con una proliferación mayor del 23% se relacionan con la presencia de adenopatías pélvicas, siendo esta diferencia significativa en nuestra serie (p<0,048). No se observó relación con la edad, el volumen tumoral, el grado histológico, ni el estadio clínico.

Finalmente la tasa de proliferación, eligiendo como punto de corte la mediana de la muestra (53%), no fue predictiva de control local ni supervivencia en nuestra serie. Sin embargo, si se establecía como punto de corte el 23% se observaba una tendencia

a peor control local en aquellas pacientes con valores por encima de este porcentaje ($p < 0,09$) (Figura 3).

Discusión

El carcinoma de cérvix continúa siendo una patología frecuente en nuestro medio con una supervivencia a 5 años del 60%. Cuando se produce un fallo local o a distancia, se asocia en general a un pronóstico sombrío¹⁸. Existe, por tanto, la necesidad de identificar factores de riesgo para determinar cuál es el tratamiento más adecuado. Si bien la extensión local de la enfermedad es el factor pronóstico más importante en la mayoría de estudios realizados, es obvio que tumores con igual estadio y que reciben tratamientos similares presentan distinta evolución.

Como ya hemos dicho, el cáncer es consecuencia de una proliferación incontrolada de células con anomalías en su material genético. Estas células anómalas proliferan más de lo que mueren, lo que da lugar al crecimiento tumoral. El desequilibrio entre

apoptosis/proliferación podría ser explicado, en parte, por la alteración de los genes reguladores de estos procesos. De la misma manera que ocurre en los tejidos sanos, existe una relación directa entre proliferación y apoptosis en los tejidos neoplásicos. Un tumor muy proliferante, suele tener una alta tasa de

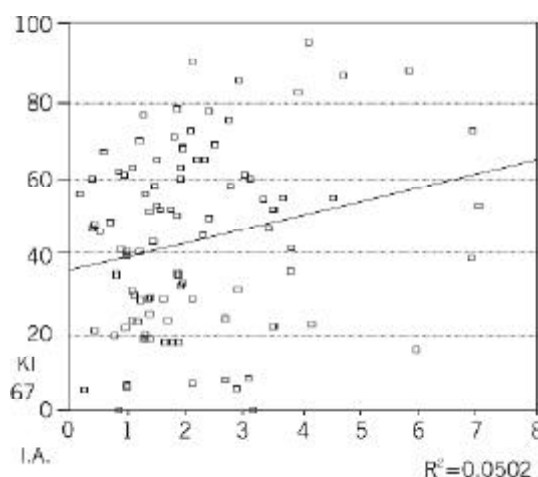


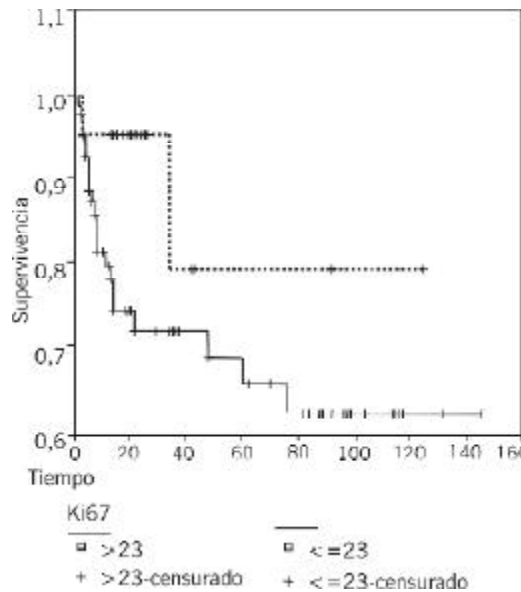
Figura 2. En nuestra serie los tumores que presentaban mayor apoptosis se asociaban a una tasa elevada de proliferación, estimada mediante ki67 (n=97; p=0,027)

	Proliferación (%)		
Estadio			
Desconocido (3)			
IB (46)	49,66 ± 27,24 (0-98); mediana 52		
II (67)	49,96 ± 23,42 (0-90); media 53		
III (19)	55,58 ± 20,81 (6-87,6); media 56		
IV (2)	58 ± 14,14 (48-68); media 58	p=0,83	
Tipo histológico			
Desconocido (1)			
Epidermoide (114)	51,72 ± 23,43 (0-95); media 53,75		
Adenocarcinoma* (22)	45,10 ± 27,29 (5,3-98); media 48	p=0,24	
Grado histológico			
Desconocido (19)			
I (14)	46,12 ± 15,71 (20-68,4); mediana 47,8		
II (56)	52,50 ± 25,51 (5-98); mediana 55,9		
III (48)	47,51 ± 26,37 (0-89); mediana 51,7	p=0,48	
Ganglios (N= 72)			
Negativos (62)	37,45 ± 22,12 (0-98); mediana 32,75		
Positivos (10)	49,89 ± 21,37 (7-79,6); mediana 50,55	p<0,08*	
Tamaño tumoral			
N=90			
<4cm (46)	52,51 ± 25,08 (0-98); mediana 53		
>4cm (44)	50,01 ± 27,85 (0-95); mediana 55,4	p=0,73	
Edad (años)			
N=136			
<51 (67)	50,21 ± 25,81 (0-95); mediana 53		
≥51 (69)	51,81 ± 22,62 (0-98); mediana 53	p=0,24	

Tabla 3. Relación de la proliferación (Ki67) con los factores clásicos de pronóstico

* $p < 0,048$ si dividimos en quintiles la tasa de proliferación, haciendo dos grupos: tasa de proliferación <23% y ≥23%.

Figura 3.
Gráfica de Control Local en relación con la proliferación estimada mediante ki67. Si dividimos la serie en quintiles, el grupo con tasa de proliferación mayor del 23% presenta peor control local que los que tienen una tasa menor o igual a 23%



muerte celular por apoptosis (mama, vejiga, próstata, cérvix)^{12,19-22}.

En nuestro grupo se ha observado una tendencia hacia una relación inversa entre apoptosis y proliferación según el tipo histológico. Así, la mediana de expresión del ki67 fue del 48% para los adenocarcinomas, más bajo que para los carcinomas epidermoides (53%), lo cual podría justificar la diferente conducta y respuesta a los tratamientos entre ambos tipos histológicos. Estos resultados son similares a los publicados por Oka, *et al.* (1996)¹³. Así, los tumores epidermoides son más proliferativos y muestran menores tasas de apoptosis que los adenocarcinomas (Lloret en prensa). Este hecho, ya descrito por otros autores^{12,23,24}, es de relevancia, dada la diferente conducta biológica que tienen ambos tipos tumorales²⁵.

En relación a la supervivencia, los resultados tampoco son concluyentes, ya que en dos estudios los niveles elevados de ki67 se asociaron a peor supervivencia^{11,26}, en dos la relación fue inversa^{15,16}, y en cuatro no se demostró ninguna relación entre ki67 y supervivencia^{10,12,13,27}.

En nuestra serie, la proliferación tumoral estimada mediante ki67 fue útil, junto con la apoptosis, para predecir el control local a largo plazo de estas pacientes. La repoblación tumoral durante los tratamientos, es por tanto, una de las principales limitaciones para la curación de tumores por radioterapia, ya que el crecimiento tumoral entre fracciones de irradiación, disminuye la efectividad de la misma.

Este fenómeno, ya observado por nuestro grupo en otras localizaciones tumorales, laringe y vejiga^{7,8}, nos demuestra la utilidad de un método tan fiable, sencillo y rápido, como es la estimación de la proliferación mediante ki67, en la predicción de control local para los tumores tratados con radioterapia.

Conclusión

La proliferación tumoral estimada mediante Ki67 muestra una estrecha relación con la apoptosis, de forma que esta última modula el papel pronóstico que en cuanto a control local tiene la proliferación.

Agradecimientos

Este trabajo está financiado por las becas FIS (98-1035 y 01/855).

Bibliografía

1. Lubrano A, López Bonilla A, Rubio MJ, Santana Melián S, *et al.* Prevalencia del cáncer de cérvix en la provincia de Las Palmas. Reunión Nacional de la Sección de Ginecología y Patología Mamaria de la SEGO, 1999.
2. Lloret M, Pinar B, Clavo B, Ruiz A, González G, Hernández MA, *et al.* Carcinoma epidermoide de cérvix tratado con radioterapia radical: factores clásicos de pronóstico y resultados. *Prog Obstet Ginecol* 2000; 43:465-72.
3. Fyles AW, Pintilie M, Kirkbride P. Prognostic factors in patients with cancer cervix treated by radiation therapy: results of a multiple regression analysis. *Radiother Oncol* 1995;35:107-17.
4. Gaarenstroom KN, Bonfrer Jm, Kenter GG, Korse CM, Hart AA, Trimbo JB, *et al.* Clinical value of pretreatment serum Cyfra 21-1, tissues polypeptide antigen, and squamous cell carcinoma antigen levels in patients with cervical cancer. *Cancer* 1995;76(5):807-13.
5. Ngan HY, Cheung AN, Lauder IJ, Wong LC, Ma HK. Prognostic significance of serum tumor markers in carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17(6):512-7.
6. Wheeler JA, Stephens LC, Tornos C. ASTRO Research Fellowship: Apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1487-93.
7. Lera J, Lara P, Pérez S, Cabrera JL, *et al.* Tumor proliferation, p53 expression and apoptosis in laryngeal

- cancer. Relation to radiation treatment results. *Cancer* 1998;83:2493-501.
8. Lara PC, Pérez S, Rey A, Santana C. Apóptosis in carcinoma of the bladder: relation with radiation treatment results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43(5):1015-9.
 9. Wong WS, McGuire LJ. Tumor growth fraction in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1991;40(1):48-54.
 10. Cole DJ, Brown DC, Crossley E, Alcock CJ, Gatter KC. Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of the relationship of tumour proliferation to prognosis. *Br J Cancer* 1992;65(5):783-5.
 11. Garzetti G, Ciavattini A, Lucarini G. MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer activity. *Gynecol Oncol* 1995;58(1):28-33.
 12. Levine EL, Renehan A, Gossiel R, Davidson SE, et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 1995;37:1-9.
 13. Oka K, Nakano T, Hoshi T. Analysis of response to radiation therapy of patients with cervical adenocarcinoma compared with squamous cell carcinoma. MIB-1 and PC10 labeling indices. *Cancer* 1996;77(11):2280-5.
 14. Camacho C, Lara PC, Rey A, López Bonilla A, Falcón O. Expresión del antígeno de proliferación ki67 en el cáncer de cérvix uterino. Relación con variables clásicas de pronóstico y supervivencia a largo plazo. *Prog Obst Bin* 1997;40:204-412.
 15. Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Immunohistochemical prediction of radiation response and local control in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer Detect Prev* 1998;22(2):120-8.
 16. Pillai MR, Jayaprakash PG. Tumour-proliferative fraction and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124(8):456-61.
 17. Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinoma that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972;107:41-4.
 18. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 1993;55:891-903.
 19. Lipponen PK, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apóptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994;30A (14):2068-73.
 20. Chyle V, Pollack A, Czerniak B, Stephens LC, Zagars GK, Terry NH, et al. Apoptosis and downstaging after preoperative radiotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;35(2):281-7.
 21. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apóptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 1994;30A:1797-803.
 22. Isacson C, Kessis TD, Hedrick L, Cho KR. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res* 1996;56(4):669-74.
 23. Komaki R, Fujii T, Perkins P. Apoptosis and mitosis as prognostic factors in pathologically staged N1 nonsmall cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36(3):601-5.
 24. Sheridan MT, Cooper RA, West CML. A high ratio of apoptosis to proliferation correlates with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44(3):507-12.
 25. Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1991;77:912-17.
 26. Cung TK, Cheung TH, Wong FW, Wong VF. Ki67 and AgNORs staining in squamous cell carcinoma of the cervix: a comparison. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37(2):127-9.
 27. Lloret M. Factores pronósticos en el carcinoma infiltrante de cérvix: factores clásicos, marcadores séricos tumorales, apoptosis, proliferación tumoral (IM, Ki67) y genes reguladores (p53, bcl-2, bax). Relación con la angiogénesis (CD-31 y VEGF) y la oxigenación. Tesis doctoral. Las Palmas de Gran Canaria, 2000.