

Expresión del BCL-2 en epitelio escamoso cervical y neoplasia cervical intraepitelial

María Moreno-Cid¹
Eulalia Bernet²
Rafael Cano²

¹Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital "La Mancha Centro" Ciudad Real
²Servicio de Anatomía Patológica Hospital de la Ribera Alzira Valencia

Resumen

Objetivo: Determinar las positivities mediante técnicas inmunohistoquímicas del BCL-2 en nuestras muestras así como la intensidad y localización en el espesor del epitelio de los casos positivos para este marcador.

Material y métodos: Nuestro estudio está formado por 113 muestras de tejido cervical divididas en cuatro grupos: 30 casos de epitelio escamoso cervical normal (CC), 31 de neoplasia cervical intraepitelial grado 1 (CIN1), 27 de neoplasia cervical intraepitelial grado 2 (CIN2) y 25 de neoplasia cervical intraepitelial grado 3 (CIN3). Se obtienen cortes de tejido, tras su fijación e inclusión en parafina, sobre los que se aplica una técnica inmunohistoquímica específica para la detección del BCL-2.

Resultados: La distribución de las positivities de este marcador fueron 0% para el CC, 42% para el CIN1, 29% para el CIN2 y 40% para el CIN3, con una p (el nivel de significación estadística aplicado ha sido del 5%) inferior al 0,05 en la relación del CC con cada grupo de CIN. La diferencia en la distribución de la localización en el epitelio y de las intensidades en los casos positivos no fue significativa, aunque se apreció una tendencia clara a la disminución en la intensidad de la tinción según aumenta el grado de CIN.

Conclusión: La alteración del gen de la proteína BCL-2 es un hecho precoz en la oncogénesis en cérvix y la tendencia a la disminución en la intensidad de su expresión conforme aumenta el grado de displasia puede representar la pérdida de la importancia de este gen a medida que avanza el proceso de carcinogénesis del tejido cervical.

Palabras clave: Neoplasia cervical intraepitelial. BCL-2. Inmunohistoquímica.

Summary

Objective: The aim of this work is to determine positive BCL-2 diagnosis by immunohistochemical techniques on several samples. Moreover, intensity and position of the stains into the epithelial tissue is analysed.

Material and methods: The experiment has been carried out on a set of 113 samples of cervical tissue, classified in four groups: 30 samples of cervical squamous epithelia (CC), 31 samples of cervical intraepithelial neoplasia of grade 1 (CIN1), 27 samples of cervical intraepithelial neoplasia of grade 2 (CIN2) and finally 25 samples of

cervical intraepithelial neoplasia of grade 3 (CIN3). From each sample a tissue portion is obtained by formalin fixed and paraffin embedded, and subsequently a immunohistochemical technique, specifically designed for BCL-2 detection, is applied.

Results: Positive BCL-2 diagnosis distribution was 0% in the CC group, 42% for CIN1, 29% for CIN2 and 40% for CIN3, with a p (significance level) <0.05 in the CC group relation with anyone of the CIN groups. Differences in intensity distribution and position of the stains into the epithelial tissue was not statistically significant. We observed a correlation between the decrease in staining intensity of BCL-2 expression with the increasing severity of CIN.

Conclusions: Our results suggest that alterations of BCL-2 expression is a relatively early event in cervical tumorigenesis. The decrease in staining intensity of BCL-2 with the degree of dysplasia suggests that this protein does not have an important role, in fact the transformed cells acquire malignant phenotypes by an additional accumulation of other gene abnormalities.

Key words: Cervical intraepithelial neoplasia. BCL-2. Immunohistochemical.

Introducción

La biología molecular ha abierto nuevas vías para la explicación del proceso de cancerogénesis. En estas técnicas están basadas la mayoría de investigaciones que han dado lugar al modelo de Vogelstein¹. Es la teoría más reciente y aceptada basada en estudios de tumores humanos, sobre todo en el colon. Las hipótesis que postula este modelo son que algunos carcinomas necesitan en su desarrollo múltiples cambios en el genoma de las células implicadas ya que el cáncer no se explica por un mecanismo de una sola causa-un efecto, sino como el resultado final de un proceso en múltiples pasos y que la acumulación de estos cambios sigue una secuencia determinada a lo largo del proceso de oncogénesis.

Dentro de los factores pronósticos clásicos relacionados con la neoplasia tenemos la extensión tumoral,

Correspondencia:
María Moreno-Cid
García-Suelto
Avd. de los Institutos 6,
P3 3º B
13600 Alcázar de San Juan
Ciudad Real
E-mail:
mamocigas@terra.es

el grado de diferenciación histológica, la actividad proliferativa, la capacidad de invasión tumoral y los marcadores genéticos y moleculares².

El marcador utilizado en nuestro estudio es el BCL-2. Este gen es el miembro más representativo de la familia de genes que controlan los procesos homeostáticos en el curso del desarrollo y de la vida adulta. Algunos miembros de la familia BCL-2 (BCL-2 alfa, BCL-XL) inhiben la apoptosis o muerte celular, mientras que otros (BAX, BCLXS) la inducen³.

La actividad biológica de estas proteínas se caracteriza por su capacidad para integrarse en membranas específicas del citoplasma y su habilidad para presentarse como homo o heterodímeros debido a la presencia de dos dominios, los cuales son una característica de esta familia de genes. El producto de este gen es una proteína de membrana de 25 Kd que se encuentra más en el interior de la célula que en su superficie. Se asocia con la mitocondria, retículo endoplásmico y membrana perinuclear, y actúa en una vía metabólica antioxidante que elimina radicales libres de oxígeno, con lo que inhiben la apoptosis o muerte celular programada. Está modulado por el flujo de calcio intracelular⁴.

La expresión de la proteína codificada por el gen BCL-2 se encuentra frecuentemente en los linfomas foliculares, a su vez relacionados con la traslocación cromosómica 14;18. La sobreexpresión de este gen se produce en yuxtaposición a la del gen que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas, aunque esta anomalía citogenética no es un requisito indispensable para la expresión del BCL-2⁵.

El gen BCL-2, y seguramente otros de su grupo, interacciona con otros genes relacionados con el control de la proliferación y muerte celular programada, como son el C-Myc o el P53⁶.

El propósito de este estudio fue determinar la expresión mediante técnicas inmunohistoquímicas del BCL-2 y su grado, en cuanto a localización en el espesor del epitelio e intensidad, a lo largo del proceso de oncogénesis del tejido escamoso cervical.

Material y métodos

La casuística está constituida por 113 muestras de tejido cervical.

Se recogieron todos los casos de displasias cervicales diagnosticadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ciudad de Jaén entre los años 1992 y 1996 inclusive y 30 de tejido cervical sin

patología. Se realizan cuatro grupos según su diagnóstico anatómico-patológico: epitelio escamoso cervical normal (C.C.) 30 casos, neoplasia cervical intraepitelial grado 1 (CIN1) 31, neoplasia cervical intraepitelial grado 2 (CIN2) 27 y neoplasia cervical intraepitelial grado 3 (CIN3) 25 casos.

Se realiza un estudio descriptivo retrospectivo caso-control. El tejido cervical estudiado se obtuvo mediante dos procedimientos: biopsias bajo visión colposcópica tras citologías sospechosas de displasia o cirugía por otras causas diferentes a lesiones cervicales.

Las muestras de tejido cervical normal o control procedían en su gran mayoría de piezas quirúrgicas, mientras que las representativas de displasias lo hicieron de biopsias bajo colposcopia. Tras la recogida de los casos se procedió a la reevaluación diagnóstica por un mismo patólogo de todas las muestras obtenidas.

Todos los datos obtenidos se han introducido en una base de datos para su manejo estadístico, realizado con el programa Epi Info (versión 6; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga).

Se ha utilizado el test de la chi-cuadrado (χ^2) para valorar la asociación de variables cualitativas de dos o más categorías y el test exacto de Fisher cuando el número de casos fue menor de 5 en alguna tabla de contingencia. El error α se ha fijado en el 5%.

Las muestras se fijaron en su momento, tras la cirugía o biopsia, en formalaldehído tamponado al 10% y se incluyeron en parafina según el método convencional.

Posteriormente se eligió el bloque más representativo de la lesión y de éste se obtuvieron 2 cortes seriados de 5 micras de grosor en un microtomo de rotación.

El primero de éstos se tiñó sistemáticamente con hematoxilina-eosina según el método habitual, lo que sirvió para la reevaluación diagnóstica. El segundo se utilizó para la tinción inmunohistoquímica del BCL-2.

El anticuerpo utilizado para el BCL-2 fue el monoclonal de ratón anti oncoproteína BCL-2 humana, clon 124. Se incubó a 45°C durante 30 minutos. La dilución fue 1:40. Se utilizaron como control cortes de linfoma folicular. La tinción es citoplásmica.

Todas las muestras fueron interpretadas por un mismo patólogo con experiencia en las técnicas inmunohistoquímicas realizadas, con desconocimiento de cualquier dato previo. La interpretación se realizó de la siguiente forma:

1. No hay expresión.
2. Hay expresión del anticuerpo utilizado. Se valora:
 - a. Intensidad: Leve (+/+++). Moderada (+/+). Intensa (+++/+++).
 - b. Localización: En el tercio inferior del epitelio (1/3). En los dos tercios inferiores del epitelio (2/3). En la totalidad del epitelio (3/3).

Valoramos la inmunotinción sólo en el epitelio y en ningún caso en el estroma.

Resultados

La distribución de las positividades del BCL-2 fueron 0 (0%) para el CC, 13 (42%) para el CIN1, 8 (29%) para el CIN2 y 10 (40%) para el CIN3 (Figura 1), presentando significación en la relación del CC-CIN1 (0% vs. 42%; $p=0,00007$), CC-CIN2 (0% vs. 29%; $p=0,001$) y CC-CIN3 (0% vs. 40%; $p=0,0001$) (Tabla 1).

La distribución de las intensidades en los casos BCL-2 positivos fueron: leve 4 (30,7%), moderada 6 (46%) e intensa 3 (23%) para CIN1; leve 0 (0%), moderada 4 (50%) e intensa 1 (12,5%) para CIN2; leve 8 (80%), moderada 0 (0%) e intensa 2 (20%) para CIN3 (Figura 2). Estas diferencias no presentan significación estadística ($p=0,08$).

La expresión de la localización de la tinción en el espesor del epitelio en los casos BCL-2 positivos fueron: un tercio del epitelio 8 (61,5%), dos tercios 0 (0%) y totalidad 5 (38,4%) para CIN1; un tercio 3 (37,5%), dos tercios 0 (0%) y totalidad 5 (62,5%) para CIN2; un tercio 2 (20%), dos tercios 0 (0%) y totalidad 8 (80%) para CIN3 (Figura 3). Tampoco encontramos significación estadística.

Discusión

El BCL-2 es el miembro más representativo de una familia de genes que controlan varios procesos homeostáticos. Concretamente este gen actúa en una vía metabólica antioxidante eliminando radicales libres de oxígeno, con lo que inhibe la apoptosis o muerte celular programada. A su vez interacciona con otros grupos de genes que también están relacionados con el control de la proliferación celular.

Por la actividad "anti-apoptosis" antes mencionada que posee este gen, se ha postulado en los últimos años que podría tener un papel importante en la carcinogénesis al bloquear este paso y facilitar la inmortalidad de los clones celulares anómalos.

La expresión elevada de la proteína que codifica este gen se descubrió inicialmente en tejido linfóide neoplásico, sin embargo estudios posteriores han

Figura 1. Porcentaje de muestras positivas para el BCL-2 según el diagnóstico histológico

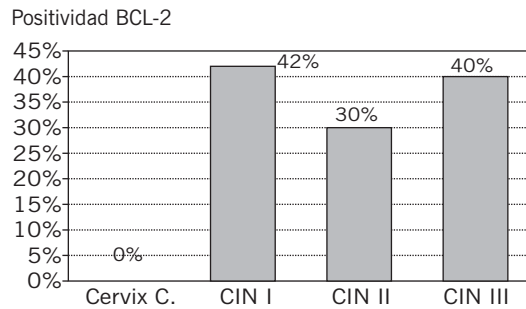


Tabla 1. Expresión del BCL-2 según el diagnóstico histológico

Grupo histológico	BCL-2 positivo	%
Cérvix control	0/30	0
CIN 1	13/31	41,93
CIN 2	8/27	29,62
CIN 3	10/25	40

Significación: χ^2 : 16,6; p : 0,0008; C.C-CIN1; p : 0,00007; C.C-CIN2; p : 0,001; C.C-CIN3; p : 0,0001

Figura 2. Distribución de los porcentajes de muestras positivas para el BCL-2 según su intensidad en relación con el tipo de lesión

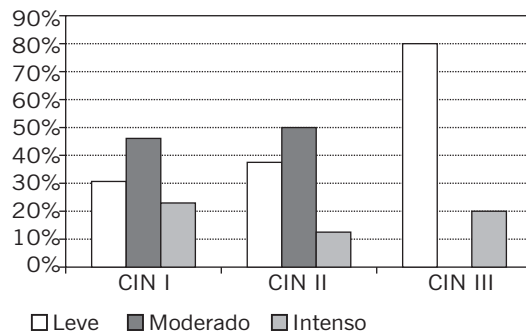
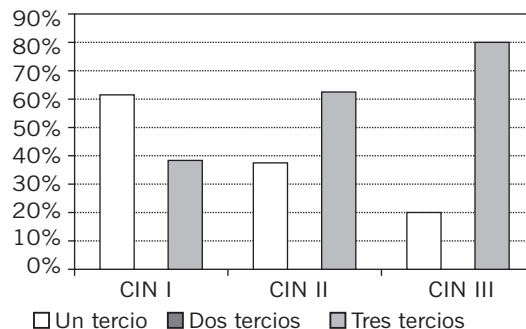


Figura 3. Distribución de los porcentajes de muestras positivas para el BCL-2 según la localización en el espesor del epitelio en relación con el tipo de lesión



demostrado también su hiperexpresión en tejido epitelial, mesenquimatoso, neural y endocrino, lo que indica el papel fundamental que realiza esta proteína en la homeostasis normal de los tejidos³.

La región anatómica más documentada en la literatura en referencia a la expresión de este gen tanto en tejido normal como en el preneoplásico y en el tumoral ha sido la colorectal, seguramente porque constituye un modelo de cancerogénesis ampliamente aceptado¹. Los diferentes estudios muestran que existe un notable incremento en la expresión de BCL-2 en los adenomas, expresión que es negativa en el tejido normal y en un alto porcentaje del carcinoma de colon. Estos autores consideran que la expresión del BCL-2 en los adenomas puede ser un paso precoz en la transformación hacia la neoplasia al ayudar a las células anormales a sobrevivir escapando a los mecanismos reguladores de la apoptosis y que la baja expresión que se encuentra ya en el carcinoma de colon se debe posiblemente a que el BCL-2 no es necesario para el mantenimiento de las células neoplásicas, ya que éstas han tenido tiempo de acumular otras anormalidades genéticas en el período en que actuó el BCL-2^{7,8}.

El comportamiento de las lesiones endometriales y endocervicales se ha visto que es semejante al colorectal, por lo que se habla de una "cancerogénesis similar" en el epitelio glandular^{9,10}.

Son más escasos los estudios realizados sobre la expresión de este marcador en el epitelio escamoso cervical normal y preneoplásico con diferentes resultados. En lo que sí se ponen de acuerdo todos los autores es en la existencia de positividad para esta técnica en la línea basal del epitelio escamoso sano. Esto refleja el papel de células progenitoras que tienen las células basales que requieren la protección del BCL-2 para inhibir su apoptosis y por tanto regenerar el epitelio. La ausencia en las líneas suprabasales indica que este proceso no se requiere para completar la diferenciación de las células epiteliales y que su ubicación mantiene la integridad del compartimento de células basales⁹⁻¹⁵. La existencia de positividad para el BCL-2 en la línea basal del epitelio escamoso normal se ha corroborado en la totalidad de nuestras muestras del grupo control, por lo que sólo hemos considerado positividad cuando la tinción se extiende a estratos superiores.

En nuestro estudio encontramos significación estadística en las diferencias encontradas entre el cérvix control y el resto de los grupos de displasia que presentan unas positivities del 42, 29 y 40% respectivamente para el CIN1, 2 y 3. No existen diferencias significativas entre ellos, pero sí es importante

destacar el salto cuantitativo importante que representa el encontrar una positividad anormal en las displasias en relación al epitelio normal, lo que podría indicar que una alteración de la expresión del BCL-2 es un cambio precoz en la cancerogénesis cervical, mantenida o no posteriormente, una vez establecida la neoplasia. La mayoría de los estudios concluyen de igual manera^{12,13,16-18}, mientras que en otros el grupo donde se produce el corte de la positividad para este marcador no es el mismo, encontrando diferencias significativas entre el grupo CIN1-2 y CIN3¹⁹ o entre las SIL de bajo y alto grado²⁰⁻²². Por último, algunos autores no encuentran diferencias en su expresión¹⁵.

En cuanto a la distribución de la intensidad en los casos BCL-2 positivos, nuestros resultados muestran una tendencia clara al aumento del número de muestras con tinción leve según lo hace el grado de displasia, con hasta un 80% de casos en el CIN3. Esta tendencia coincide con otros trabajos^{14,17,23} y con la hipótesis postulada por Vogelstein en el colon, donde la expresión de este marcador es alta en los adenomas y va disminuyendo con el grado de displasia. No todos los autores concluyen de la misma forma y encuentran un aumento de la intensidad con el grado de displasia y en carcinomas^{13,24,25}.

Según los resultados de nuestro estudio, podemos concluir con que la alteración del gen de la proteína BCL-2 es un hecho precoz en la oncogénesis en cérvix y que la tendencia a la disminución en la intensidad de su expresión conforme aumenta el grado de displasia puede representar la pérdida de la importancia de este gen a medida que avanza el proceso de carcinogénesis del tejido cervical.

Bibliografía

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
2. Hermanek P, Hutter R, Sobin L. Prognostic grouping: the new step in tumor classification. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:513-6.
3. Yang E, Korsmeyer S. A discourse on the BCL-2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
4. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber R, Korsmeyer S. BCL-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6.
5. Pezzella F, Tse A, Cordell J, Pulford K, Gatter K, Mason D. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990;137:225-32.

6. Korsmeyer S. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80: 879-86.
7. Bosari S, Moneghini L, Graziani D. Bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995;26:534-40.
8. Bronner M, Culin C, Reed J. The BCL-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol* 1995;146:20-6.
9. Nakamura T, Nomura S, Sakai T, Nayira S. Expression of bcl-2 oncoprotein in gastrointestinal and uterine carcinomas and their premalignant lesions. *Hum Pathol* 1997;28:309-15.
10. Mozzetti S, Ferrandina G, Marone M, Scambia G. Expression of bcl-2, bax-xL, and bcl-xS in endometrial and cervical tissues. *Cancer Detect Prev* 2000;24(6): 536-41.
11. Ter Harmse B, Smedts F, Kuijpers J, Jeunink M. Bcl-2 immunoreactivity increases with severity of CIN: a study of normal cervical epithelia, CIN, and cervical carcinoma. *J Pathol* 1996;179:26-30.
12. Saegusa M, Takano Y, Hashimura M, Shoji Y, Okayasu I. The possible role of bcl-2 expression in the progression of tumors of the uterine cervix. *Cancer* 1995;76: 2297-303.
13. Ter Harmse B, Kuijpers J, Smedts F, Jeunink M. Progressing imbalance between proliferation and apoptosis with increasing severity of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16 (3):205-11.
14. Ferrandina G, Mozzetti S, Marone M, Scambia G. Bcl-2, bax, bcl-x(L) and bcl-x(S) expression in neoplastic and normal cervical tissue. *Cancer Lett* 2000;155 (1):19-27.
15. Zanotti S, Fisseler-Eckhoff A, Mannherz HG. Changes in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis in defined stages of human cervical dysplasia and carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003;89(3): 376-84.
16. Nair P, Nair K, Jayaprakash P, Pillai M. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Ocol Res* 1999;5(2):95-103.
17. Cooper K, Haffajee Z, Taylor L. Bcl-2 immunoreactivity, human papillomavirus DNA, and cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 1999;12(6):612-7.
18. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Michalas S. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol* 2000;77(1):129-36.
19. Aletra C, Ravazoula P, Scopa C, Kounelis S, Bonikos D. Expression of bcl-2 and bax in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000;21(5): 494-8.
20. Dellas A, Schultheiss D, Holzgreve W, Oberholzer M. Investigation of the Bcl-2 and C-myc expression in relationship to the Ki-67 labelling index in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16 (3):212-8.
21. Ozalp S, Yalin O, Tanir H, Yildirim S. Bcl-2 expression in preinvasive and invasive cervical lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;33(5):419-22.
22. Khaled A, Imamura Y, Noriki S, Fukuda M. Early progression stage of malignancy of uterine cervical dysplasia as revealed by immunohistochemical demonstration of increased DNA-instability. *Eur J Histochem* 2000;44(2):143-56.
23. Bitiren M, Cakmak E, Gocmen A, Inaloz S. The relationship between expression of p53/bcl-2 and clinicopathological criteria in cervix squamous cell carcinomas. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24(5):411-2.
24. Brychtova S, Brychta T, Kotrsova L, Kolar Z. Expression of Bcl-2 in dysplastic and neoplastic cervical lesions in relation to cell proliferation and HPV infection. *Neoplasma* 2000;47(3):143-7.
25. Li Z, Takeuchi S, Ohara N, Maruo T. Paradoxically abundant expression of bcl-2 and adrenomedullin in invasive cervical squamous carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2003;8(2):83-9.