

"Expresión de telomerasa y ki67 en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado empleando técnicas inmunohistoquímicas"

Emma Vásquez P. *, Galo Benavides O. *, Guillermo López A. **, Nicolás Vivar ***, Luis Narváez ***, Felipe Rosales **

* CEMOPLAF;

** SOLCA Núcleo de Quito: a) Servicio de Citología, b) Jefe de Servicio de Patología;

*** Laboratorios Net@Lab

ABSTRACTO

Objetivo: Determinar el grado de expresividad de la Telomerasa y Ki67 en lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado en biopsias de cuello uterino diagnosticadas por histopatología y su grado de expresividad diferencial dependiendo de la severidad de la lesión histológica.

Material y Métodos: Se estableció la expresividad de Ki67 y Telomerasa, en un tamaño muestral mínimo de 85 biopsias de cérvix fijadas en formol al 10% y embebidos en parafina al 10%, 55 con lesión intraepitelial escamosa de alto grado y 30 con lesión de bajo grado, empleando técnica inmunohistoquímica mediante absorción capilar. La expresión de Telomerasa y Ki67 fue analizada en el Laboratorio Net@Lab: Quito Ecuador. Análisis estadístico: Se creó una base de datos en Microsoft Excel Xp para su posterior limpieza y análisis en Epi-Info 6.04b (CDC-Atlanta). Se expresó las variables en promedios, desvíos estándar, frecuencias simples y porcentajes; para el análisis inferencial se empleó t de Student y t de diferencia de proporciones. Resultados: La expresividad de Ki67 fue del 95.3% (IC95% 90.8–99.7), con una expresividad que abarcó la totalidad del epitelio en el 23.5% de los casos, siendo este patrón más frecuente en lesiones intraepiteliales de alto grado. La Telomerasa se expresó en 84.7% (IC95% 77–92.3) de los casos, con una expresividad que alcanzó los 2/3 del epitelio en el 20% de muestras estudiadas, especialmente en las lesiones intraepiteliales de alto grado. Se evidenció una estrechez de asociación estadísticamente significativa entre expresión de Ki67 y lesiones intraepiteliales de alto grado (C Pearson= 0.332 - p<0.05).

Conclusiones: Los resultados afirman la asociación entre expresividad de Ki67 y lesiones intraepiteliales de alto grado, por lo que se sugiere su empleo como herramienta diagnóstica coadyuvante a la histopatología en casos de lesiones cervicales de difícil diagnóstico.

Palabras claves: Telomerasa, Ki67, expresión, lesiones epiteliales, cérvix

Correspondencias y Separatas:

Dr. Luis Narváez
Servicio de Patología
Hospital Oncológico Solón Espinoza. Solca. Quito
Av. Eloy Alfaro y los Pinos
Quito - Ecuador

© Los Derechos de autor de los artículos de la Revista Oncología pertenecen a la Sociedad de Lucha contra el Cáncer.

ABSTRACT

Objective: To determine expressivity of Ki67 and Telomerase with a different grade of squamous lesions, in a sample of cervical biopsies.

Methods: The expressivity of Ki67 and Telomerase in a minimum of 85 cervical biopsies fixed and imbedded in 10% of formol and paraffin respectively. Immunohistochemistry techniques by capillary absorption was used with 55 samples with high grade squamous intraepithelial lesions and low grade squamous intraepithelial lesions 30 samples; it was made in the Net@Lab Laboratory of Quito-Ecuador. Statistical analyses were performed using the Microsoft Excel Xp and Epi-Info 6.04b (CDC-Atlanta). According to the type of variable was expressed average, standard deviation, simple frequency and percentages. Inferential analyses were done using T students test. and difference of proportions t.

Results: General expressivity of Ki67 was of 95.3% (IC95% 90.8 – 99.7), with a standard expressivity that covered the totality of the epithelium in 23.5% of the cases, being this pattern more frequent in high grade squamous intraepithelial lesions. Telomerase was expressed in 84.7% (IC95% 77 – 92.3) of the cases, with a standard expressivity that reached the 2/3 of the epithelium in 20% of the samples, especially in high grade squamous intraepithelial lesions.

Conclusions: It was statistically evident a significant association between Ki67 expression and high grade squamous intraepithelial lesions (C Pearson= 0.332 – p<0.05), that is why it is suggested to use it as a diagnostic tool to help histopathology in cases of difficult diagnosis of cervical lesions.

Key words: telomerase, Ki67, expression, epithelial lesions, cervix.

Introducción

La detección oportuna de lesiones intraepiteliales se ha venido desarrollando con varios exámenes como Citología, Colposcopia, pero hasta el momento, el estudio histopatológico



ha sido considerado como la prueba de oro que ratifica la presencia o ausencia de lesiones pre-malignas y malignas y el cáncer de cérvix, pero en los últimos años la mejor comprensión de los fenómenos moleculares ha llevado a la búsqueda de enzimas y proteínas del ciclo celular que se alteran en fenómenos de alta proliferación como el cáncer, en miras a contar con herramientas diagnósticas cada vez más objetivas que aporten con evidencia pronóstica válida para la toma de decisiones terapéuticas. Recientemente la Telomerasa y el Ki67 han sido considerados como potenciales marcadores diagnósticos de lesiones pre-malignas de cérvix, que incrementan su expresividad en relación con la severidad de la lesión.

Estudios han demostrado que los telómeros son secuencias repetidas cortas de ADN (TTAGGG) que conforman los extremos lineales de los cromosomas para protegerlos de la degradación, en tanto que la Telomerasa es una ribonucleoproteína especializada, enzima que estabiliza el diámetro del telómero al añadirse a los extremos de los cromosomas. La acción de la Telomerasa fue descubierta en 1985 por Carol Greider y Elizabeth Blackburn al estudiar al protozoo Tetrahymena. La Telomerasa se expresa en las células germinales (mortales) y en células madre (inmortales), aunque normalmente en tejidos somáticos no es detectable. Una célula normal muere por apoptosis después de completar 40 a 60 ciclos de reproducción por la pérdida sucesiva de telómeros. Se ha detectado en varios tipos de tumores la Telomerasa está presente puesto que ésta produce telómeros permitiéndole que la célula se reproduzca indefinidamente, por lo que se le ha asociado a la inmortalidad celular y oncogenicidad.

Ki67 es una proteína nuclear, la cual es expresada en células proliferativas, y que se expresa en células en fases G1, S, M y G2 del ciclo celular, por lo tanto es un marcador del ciclo celular. La expresión de Ki67 fue observada tanto en lesiones precancerosas como en varios tipos de cáncer.

En este contexto y tomando en cuenta todos los factores de variabilidad pre-analítica que encierra el estudio histopatológico, sumado a la alta dependencia de la experiencia del observador, resulta imprescindible el contar con una herramienta diagnóstica visualmente objetiva como es el caso de la Inmunohistoquímica, para aclarar dudas diagnósticas en lesiones cuya estructura histológica nos permita definir con certeza la severidad de la lesión.

El propósito de esta investigación es la de detectar la expresividad de la Telomerasa y Ki67 en lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado en biopsias de cuello uterino diagnosticadas por histopatología; y, el grado diferencial de expresividad de estos marcadores, con la finalidad de establecer un patrón de expresividad útil para el diagnóstico en muestras problema.

Material y Métodos

El Universo del presente estudio estuvo constituido por la totalidad de biopsias con diagnóstico histopatológico previo de lesiones intraepiteliales de bajo (LIEBG) y alto grado (LIEAG) que se encontraron en el banco de muestras del Servicio de Patología del Hospital Oncológico “Solón Espinoza” – SOLCA, de la ciudad de Quito que fueron diagnosticadas en el periodo comprendido entre Enero del 2001 y Enero del 2003.

El tamaño muestral mínimo requerido fue de 85 muestras fijadas en formol al 10% y embebidos en parafina (LIEBG 30 y LIEAG 55). La expresión de Telomerasa y Ki67 fue analizada en el Laboratorio Net@Lab Quito Ecuador.

Para la técnica de Inmunohistoquímica se utilizó una olla de presión, holders con canastillas, estación de coloración, y reactivos de la casa BIO SB BIOCIENCE FOR DE WORLD ®.

De los bloques de parafina seleccionados con diagnósticos de lesiones intraepiteliales de alto y bajo grado se procedió a realizar 2 cortes en el micrótopo a 4 micras, los mismos que se depositaron en placas portaobjetos Probe on plus (placas electrostáticas tratadas con Silano) para su respectiva desparafinización, rehidratación, recuperación de antígenos y la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas de la Telomerasa y Ki67 respectivamente con el respectivo Kit de reactivos. Concluida la técnica inmunohistoquímica, las láminas fueron evaluadas en su expresión de Telomerasa y Ki67 con un microscopio óptico con la supervisión de dos Médicos Patólogos con experiencia en la evaluación de inmunohistoquímica. La observación se la hizo primero con la lente de 10X para visualizar la expresión de los marcadores y con 40X para confirmar su positividad.(Cuadro I)

Procedimiento:

PASO	TIEMPO	OBSERVACIONES
Desparafinado	2 x 5'	Xilol
Rehidratado	2 x 3'	Alcohol
Tratamiento Térmico	1 x 15'	Olla de presión
Reposo	1 x 15'	Temp. Ambiente
Bloqueo Peroxidasa	1 x 10'	Temp. Ambiente
Anticuerpo primario	1 x 60'	Temp. Ambiente
Ac. Secundario-Biotina	1 x 10'	Temp. Ambiente
Estrepta vidina HRP	1 x 10'	Temp. Ambiente
DAB	1 x 10'	Temp. Ambiente

BIO SB, Inc., Santa Bárbara, CA, EUA., Tabla 1. p.5.



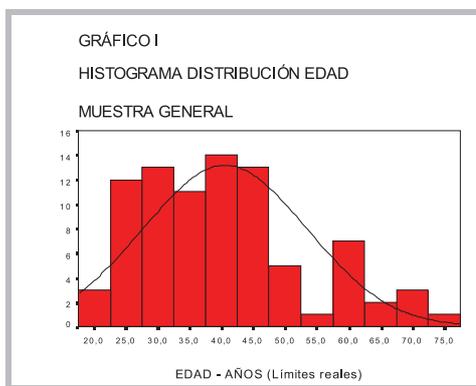
El principio de la Inmunohistoquímica de Telomerasa y Ki67 se basa en la expresión de estos marcadores en los tejidos en sus diferentes estratos epiteliales siendo más progresiva conforme aumenta la lesión.

La información del presente estudio fue recopilada en un formulario específico creado para el efecto, a partir del cual se procedió a la creación de una base de datos en Microsoft Excel Xp para su posterior limpieza y análisis en Epi-Info 6.04b (CDC-Atlanta).

Para el análisis estadístico de resultados, la expresividad de Ki67 y Telomerasa fue presentada en porcentajes, acompañada de su respectivo intervalo de confianza al 95% (IC95%). La estrechez de asociación para la expresividad entre Telomerasa y Ki67, de frente a la presencia de lesiones intraepiteliales de alto grado, fue establecida mediante el coeficiente contingencia de Pearson, aceptando como válido un nivel de significación del 95% ($\alpha = 0.05$). Para el análisis inferencial, en el caso de las variables cuantitativas se empleó t de Student y para las cualitativas t de diferencia de proporciones para grupos no independientes, aceptando como válido un nivel de significación del 95% ($\alpha = 0.05$).

Resultados

La edad promedio de las mujeres estudiadas fue de 40.5 ± 12.8 años (Rango: 20 – 75 años). **Gráfico I.**



Tipo de lesión histológica identificada, el 64,7% (n=48) fueron lesiones intraepiteliales de alto grado. **Gráfico II.**

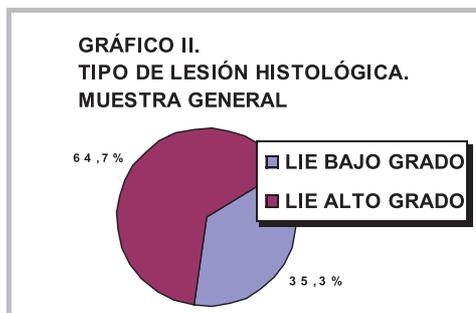


Tabla I
Edad promedio por tipo de lesión histológica

TIPO DE LESIÓN	EDAD - AÑOS (X ± SD)*
LIE Bajo grado (n=30)	39.8 ± 11.9
LIE Alto grado (n=55)	40.9 ± 13.4

*p>0.05–No diferencia estadísticamente significativa (Student t test)

El tipo de lesión histológica por grupo de edad, se presenta en la siguiente tabla.

Tabla II.
Tipo de lesión histológica por grupo de edad

GRUPO DE EDAD	TIPO DE LESIÓN n (%)*	
	LIE Bajo Grado*	LIE Alto Grado*
≤ 40 años (n=47)	18 (38. 3)	29 (61. 7)
> 40 años (n=38)	12 (31. 6)	26 (68. 4)

*p>0.05–No diferencia estadísticamente significativa (t de diferencia de proporciones)

Expresividad de Ki67

La expresividad de Ki67 para la muestra general, fue del 95.3% (IC95% 90.8 – 99.7).

La expresividad por tipo de lesiones histológicas, se presenta en la siguiente tabla.

Tabla III.
Expresividad de ki67 por tipo de lesión histológica

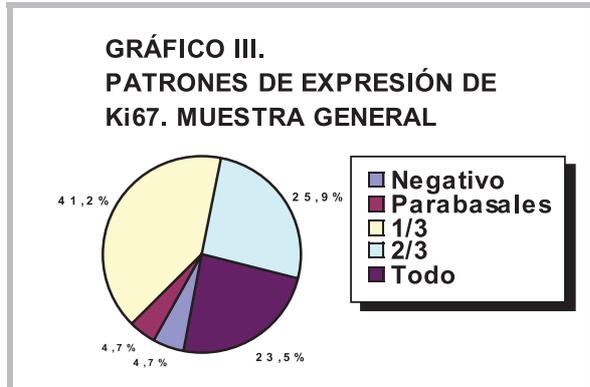
TIPO DE LESIÓN	Expresividad % (IC 95%)
LIE Bajo grado (n=30)	100 (NP)
LIE Alto grado (n=55)	92.7 (NP)

NP= No se presenta por cuanto el límite superior es mayor al 100%

Al analizar el tipo de expresividad de Ki67, en el 41.2% (n=35) de los casos estudiados este se expresó en 1/3 del



epitelio. Gráfico III.



La expresividad por tipo de lesiones histológicas, se presenta en la siguiente tabla.

Tabla IV.
Patrón de expresividad de ki67 por tipo de lesión histológica

LESIÓN	TIPO DE LESIÓN n(%)				
	Negativo ^{nc}	Parabasales ^{nc}	1/3**	2/3*	Todo**
LIE Bajo grado (n=30)	----	4 (13.3)	16 (53.3)	9 (30)	1 (3.3)
LIE Alto grado (n=55)	4 (7.3)	----	19 (34.5)	13 (23.7)	19 (34.5)

nc = No calculable

*p>0.05 – No diferencia estadísticamente significativa (t de diferencia de proporciones).

**p<0.05 – Diferencia estadísticamente significativa (t de diferencia de proporciones).

Expresividad de telomerasa

La expresividad de Telomerasa fue del 84,7% (IC95% 77-92,3)

Tabla V.
Expresividad de telomerasa por tipo de lesión histológica

TIPO DE LESIÓN	Expresividad % (IC 95%)
2. LIE Bajo grado (n=30)	90 (NP)
3. LIE Alto grado (n=55)	81.8 (71.6 – 92.2)

NP= No se presenta por cuanto el límite superior es mayor al 100%

Patrones de expresividad de Telomerasa, en el 60% (n=35) de la totalidad de casos estudiados este se expresó en 1/3 del epitelio. Gráfico IV.

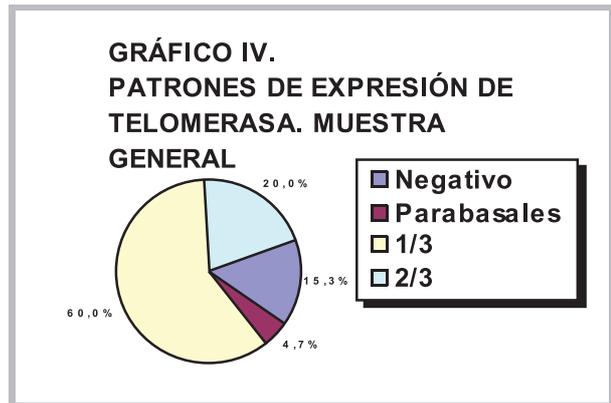


Tabla VI.
Expresividad de la telomerasa por tipo de lesión histológica

TIPO DE LESIÓN	TIPO DE LESIÓN n(%)				
	Negativo*	Parabasales*	1/3*	2/3*	Todo
LIE Bajo grado (n=30)	3 (10)	2 (6.7)	19 (63.3)	6 (20)	----
LIE Alto grado (n=55)	9 (16.3)	3 (5.5)	32 (58.2)	11 (20)	----

*p>0.05 – No diferencia estadísticamente significativa (t de diferencia de proporciones)

Expresividad de ki67 y telomerasa como factor de riesgo de LIE de alto grado.

Para el análisis de la asociación de riesgo entre la expresión de Ki67 y Telomerasa, frente al desarrollo de LIE de alto grado, se considerará como factor de riesgo en el caso del Ki67 una expresividad en todo el espesor epitelial, en tanto que para la Telomerasa, se considerará la expresión en los 2/3 del epitelio.



Tabla VII
Asociación de riesgo entre expresividad de ki67 y LIE de alto grado.

Ki 67 DE RIESGO	TIPO DE LESIÓN n(%)	
	LIE Bajo grado	LIE Alto Grado
2. Si (n=20)	1 (5)	19 (95)
3. No (n=65)	29 (44.6)	36 (55.4)

* X2 p <0.05. / C Pearson= 0.332 (p<0.05)

Tabla VIII
Asociación de riesgo entre expresividad de telomerasa y LIE de alto grado.

TELOMERASA	TIPO DE LESIÓN n (%)	
	LIE Bajo grado	LIE Alto Grado
2. Si (n=17)	6 (35.3)	11 (64.7)
3. No (n=68)	24 (35.3)	44 (64.7)

* X2 p >0.05.

Ki67 se expresó con mayor frecuencia en todo el espesor del epitelio en lesiones intraepiteliales de alto grado (34.5%), en relación con las lesiones de bajo grado donde apenas se presentó este patrón de expresividad en un 3.3%, expresividad que se justifica en lesiones con mayor actividad proliferativa celular. La Telomerasa en la totalidad de casos estudiados se expresó en el 60% en 1/3 del epitelio, sin variaciones significativas por tipo de lesión, expresándose en los 2/3 del epitelio en el 40% en las lesiones de alto grado estudiadas pese a lo cual no se pudo evidenciar asociación entre su expresión y la presencia de lesiones intraepiteliales de alto grado.

Discusión

En la actualidad la prueba de oro para diagnósticos de lesiones es el estudio Histopatológico de biopsias de cérvix, pero estas están sujetas a factores de variabilidad preanalítica que encierra el estudio como también a la alta dependencia de la experiencia del observador, resultando imprescindible el contar con una herramienta diagnóstica visualmente objetiva como es el caso de la Inmunohistoquímica que aclara dudas

diagnósticas en lesiones cuya estructura histológica no permita definir con certeza la severidad de la lesión.

Últimamente se ha desarrollado con rapidez el uso de marcadores tumorales los mismos que permiten dar diagnósticos más precisos y tratamientos adecuados. Entre ellos se cuenta la Telomerasa que se ha venido utilizando para marcar su incremento de expresión cuando hay progresión de metaplasia a lesiones intraepiteliales y eventualmente a cáncer invasivo. Otro marcador es el Ki67 que normalmente se expresa en el cérvix normal a nivel de células parabasales y se ha demostrado que la expresión de Ki67 se eleva en neoplasias de cérvix.

En el presente estudio la Telomerasa y Ki67 mostraron expresividad variable en las lesiones intraepiteliales de cuello uterino, alcanzando ambas un 90% de expresividad, lo que afirma su papel como marcadores de proliferación celular, dado que se espera una mayor proliferación en tejido catalogado como neoplásico. El grado de expresividad mostrado por Ki67 abarcó hasta la totalidad del epitelio, particularmente en las lesiones intraepiteliales de alto grado, mientras que en el mismo tipo de lesiones la Telomerasa se expresó únicamente en los 2/3 del epitelio, lo que permite afirmar que el grado de expresión de Ki67 es más intenso que el de Telomerasa.

Se evidenció una estrecha asociación entre la expresividad de Ki67 y la presencia de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado, sin que se haya logrado demostrar esto en el caso de la Telomerasa, permitiendo afirmar su valor de uso como herramienta diagnóstica coadyuvante en lesiones histológicas de difícil diagnóstico.

La expresividad de Ki67 para la muestra general, fue del 95.3% (IC95% 90.8 – 99.7) expresión elevada, que sumado al coeficiente de Contingencia de Pearson, que además fue significativo (p<0.05), permite afirmar que existe una estrecha asociación entre la presencia de este marcador y las lesiones intraepiteliales de alto grado, justificado por el hecho de que el Ki67 se expresa en células proliferativas preferentemente en fases G1, S, M y G2 de ciclo celular; lo que lo hace útil para evaluar el nivel de proliferación celular en lesiones intraepiteliales escamosas, esperándose un ciclo celular más activo en lesiones de alto grado.

Ki67 se expresó con mayor frecuencia en todo el espesor del epitelio en las lesiones intraepiteliales de alto grado (34.5%), en relación con las lesiones de bajo grado donde apenas se presentó este patrón de expresividad en un 3.3%, expresividad que se justifica en lesiones con mayor actividad proliferativa celular.

Los hallazgos de no marcaje de las proteínas estudiadas



tanto para Ki67 como para Telomerasa, se homologan a los hallazgos obtenidos por Heras A., y colaboradores e indican que una no expresión de la proteína o una expresión tan baja hace imposible detectarla por este método cualitativo.

En cuanto a la expresividad de la Telomerasa, esta fue del 84.7% (IC95% 77 – 92.3) sin presentar diferencia por tipo de lesión, este dato es contrario al reportado por otro autor en el que la expresión de la Telomerasa fue positiva, siendo menor en las lesiones intraepiteliales de bajo grado que en lesiones intraepiteliales de alto grado.

La Telomerasa en la totalidad de casos estudiados se expresó en el 60% en 1/3 del epitelio, sin variaciones significativas por tipo de lesión, expresándose en los 2/3 del epitelio en el 40% en las lesiones de alto grado estudiadas pese a lo cual no se pudo evidenciar asociación entre su expresión y la

presencia de lesiones intraepiteliales de alto grado.

En definitiva y en base a los resultados encontrados, se puede afirmar que existe una estrecha asociación entre la expresividad de Ki67 y la presencia de lesiones intraepiteliales de alto grado, por lo que se puede sugerir su empleo como una herramienta de diagnóstico coadyuvante a la Histopatología en casos de lesiones cervicales de difícil diagnóstico.

En relación a la Telomerasa, no se pudo demostrar su valor de asociación con lesiones intraepiteliales de alto grado.

Este estudio demuestra que el uso de la Inmunohistoquímica es muy útil, fácil de realizar y al contar con profesionales de reconocida experiencia en este campo, permite utilizar este tipo de exámenes para despejar dudas en casos de diagnósticos difíciles.

Bibliografía

- Cooper G. La Célula. 2a. ed. Marbán Libros. S. L.; 2002.
- Cotran R. S. Collins T. y Kumar V. Patología Estructural y Funcional. 6ª ed. Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid; 2000.
- Rojas W. Inmunología. 12ª ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín; 2001.
- Nagai, N., y Cols. Semicuantitativo análisis of telomerase activity in cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol. Rep.* 1999.
- Heras A. y Cols. Expresión de Telomerasa y Ki67 en cáncer cervical. XXIV Congreso latinoamericano de Patología. Oct;20; Quito-Ecuador; 2003.
- Beáta K. y Cols. Abstracto del XV Congreso Internacional de Citología. Abril;11 Santiago, Chile. 2004. p. 202.
- Boulder y Cols. Telomerase Activator Cloned: El descubrimiento del gen que direcciona la actividad de la telomerasa podría ser un importante descubrimiento para buscar desarrollar nuevos tratamientos para el cáncer [Sitio en Internet] Agosto 16, 1997.
- Nozawa H. y Cols. Detección de células de cáncer en vena mesentérica y vasos periféricos para valorar la actividad de telomerasa en pacientes con cáncer colorectal. [Sitio en Internet]
- Sotillo-Pineiro E. Y Cols. Actividad de la telomerasa y longitud del telómero en tumores primarios y metastásicos de pacientes con cáncer de hueso pediátrico. [Sitio en Internet].
- Novakovic S y Cols. Detección de telomerasa RNA in el plasma de pacientes con cáncer de mama, melanoma maligno o cáncer de tiroides. [Sitio en Internet] .
- Isacson C y Cols. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with HPV type. *Cancer Res* 1996.
- Leopardi G y Cols. Ki67 en lesiones epiteliales de la laringe: correlación con factores de riesgo. [Sitio en Internet] Disponible en: www.uniud.it/acta/previous/x0240_04leopardi.html
- Ikeda S y Cols. Correlación entre la expresión de transcriptasa reversa de la telomerasa y la actividad proliferativa en células de cáncer de mama usando un método inmunocitoquímico. [Sitio en Internet] .
- Acces-Lab. MicroProbe Sistema de tinción (resumen). acceslab@hotmail.com. Quito-Ecuador
- Flores T. y Cols. Manual de Histotecnología. Universidad Estatal de Louisiana. 1999.

