

Zelulen ugalketa gliometan. PCNA eta ki-67-ren adierazpena

*Koro Alkiza
Begoña Adán
José Vicente Lafuente*

Medikuntza Fakultatea.
Neurozientzien Saila. UPV-EHU (Leioa)
P.K. 699, 48080 BILBAO
Posta elektronikoa: alkiza@euskalnet.net

Laburpena: Garuneko tumorerik ohikoenak gliomak dira. Tumore hauek aztertzerakoan irizpide histologiko batzuk kontuan hartzen dira. Ezaugarri hauen arabera tumorearen diagnostikoa eta prognostikoa ematen da. Metodologia hau zenbait kasutan ez da oso zehatza izaten, ordea. Hau dela eta, azkeneko urteotan tumoreen hazkundea isla dezaketen beste metodo berri batzuk ikertzen ari dira, zelulen ugalketaren adierazle gisa erabiltzeko asmoz.

Lan honen xedea da zelulen ugalketaren azkerketa bat egitea. Honetarako 76 glioma desberdin bildu ziren (20 I astrozitoma, 14 astrozitoma anaplasiko, 34 glioblastoma multiforme, 4 oligodendroglioma eta 4 oligoastrozitoma). Ondoren, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) eta ki-67 antigenoen analisia burutu zen; izan ere, bi proteina hauek ugaltzen ari diren zeluletan soilik azaltzen dira. Jasotako emaitzak tumoreen histologiarekin erlazionatu ziren. Dela PCNA, dela ki-67-rekiko erreaktibotasuna glioma gaiztoenetan areagotzen zela ikusi zelarik, bi antigeno hauek zelulen ugalketaren adierazle onak direla ondorioztatu zen.

SARRERA

Garuneko zelula glialetan jatorria duten tumoreei gliomak deritze. Garuneko tumore hauetatik %80 astrogliatik sortzen dira eta astrozitomak esaten zaie [1]. Gaiztotasunaren arabera, astrozitomak hiru taldetan sailkatzten dira: I astrozitoma, astrozitoma anaplasikoak eta glioblastoma multiformeak [2]. Beste glioma mota batzuk ez dira hain ohikoak izaten: oligodendrogliomak eta oligoastrozitomak, besteak beste.

Patologia arloan, gliomen diagnostikoa eta prognostikoa ezagutzeko, tumore-ehunen zenbait ezaugarri kontuan hartzen dira: zelula mota, mitosien eta foku nekrotikoen agerpena, odol-hodien egoera. Hematoxilina-Eosina (H-E) tindaketa histologikoaren bitartez ehunaren egoera aztertzen da, aipatutako ezaugarriak kontuan hartuz. Azterketa honen arabera, tumorea sail-

katu eta prognostikoa emango da. Hala ere, badaude tumore batzuk onberak diruditenak eta azkar asko hazten direnak [3]. Tumoreen hazkunde prozesuan sakontzeko asmoz, zelulen ugalketa isla dezaketen beste metodo batzuk ikertzen ari dira azkeneko urteotan: timidina tritiatua edo bromodeoxiuridinaren eranspena DNAREN sintesian, DNAREN analisia jario-zitometriaren bitartez...; Patologia arloan hauen artean gehien zabaldu diren metodoak PCNA eta ki-67 antigenoen ebaluazioa dira.

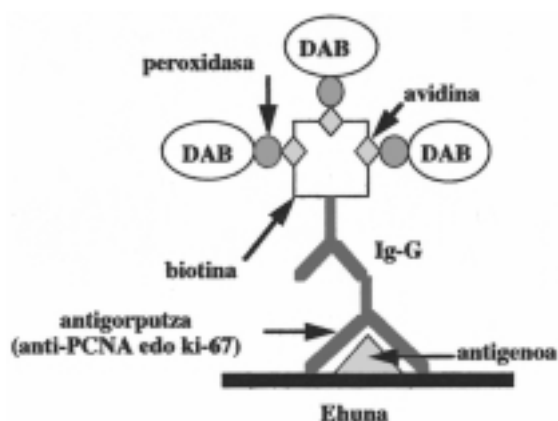


1. irudia. Zelularen bizitza-zikloa. PCNA eta ki-67 proteinak zelularen bizitza-zikloan G1, S, G2 eta M aldietan adierazita daude.

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), DNAREN bikoizketa prozesuan funtsezkoa den nukleo-proteina dugu. Antigeno hau ugaltzen ari diren zeluletan soilik adierazita dago, hots, zelularen bizitza-zikloko G1, S, G2 eta M aldietan [4] (1. irudia). Haien eginkizuna DNA polimerasa- δ izeneko entzimaren laguntzaile izatea da [5]. PCNA agerian jartzeko zenbait antigorputz monoklonal merkaturatu dira. Era berean, ki-67 antigorputzak ugaltzen ari diren zelulen nukleoan dagoen beste proteina bat ezagutzen du [6]. PCNA bezala, ki-67 antigorputza immunohistokimikan erabil daiteke [7, 8]. Teknika honen bitartez modu errazean, edozein ehunetan ugaltzen ari diren zelulen kopurua ezagut dezakegu. Hau dela eta, lan honetan PCNA eta ki-67-ren adierazpena aztertu eta kontrastatu egin da garuneko tumore talde batean.

LAGINAK ETA METODOAK

Tumoreen bilketa 1992ko irailean hasi eta 1998an bukatu zen. Honela, Gurutzetako eta Arantzazuko Ama Ospitaletatik 76 garuneko glioma bildu ziren. Tumore-laginak jaso ahala, formaldehidoaren bidez finkatu eta para-



Izandako antígeno-antigorputz erreakzioa agerian jartzeko, biotinarekin markatutako saguko-g-immunoglobulina (PCNAren saioan) eta untxiko-g-immunoglobulina (ki-67-rako) erabili ziren. Jarraian, laginak abidina-biotina-peroxidasa konplexuarekin inkubatu ziren (45 min.) eta bukatzeko, 3-3'-diaminobenzidina (DAB) eta hidrogeno peroxidozko soluzioan sartu ziren (10 min.). Peroxidasak hidrogeno peroxidoa hura eta oxigeno bihurtzen du, horrela diaminobenzidina oxidatzen denean, kolore marroia hartzen du. Honen ondorioz, positiboak diren zelulen nukleoak marroi kolorez tindatuta agertzen dira. Negatiboak diren nukleoak agerian jartzeko asmoarekin, hematoxilina koloratzailea erabili zen.

Mikroskopio optikoaz baliatuz, tumore-laginen azterketa egin zen. Lehenik eta behin, nukleo positiboen kokapena aztertu zen eta gero, zenbatu egin ziren. $2500 \mu\text{m}^2$ -ko azaleradun saretxo koadrikuladuna erabili zen. Ale bakoitzeko 400 zelula (positiboak eta negatiboak) zenbatu ziren eta positiboen portzentaiak jaso ziren.

Azterketa estatistikoa Statview II programa erabili zen. Hasteko, analisi deskriptiboa egin zen (batez besteko aritmetikoa, desbiderazio estandarra...). Analisi konparatiboa eta erregresio lineala ANOVA testaren bidez egin zen.

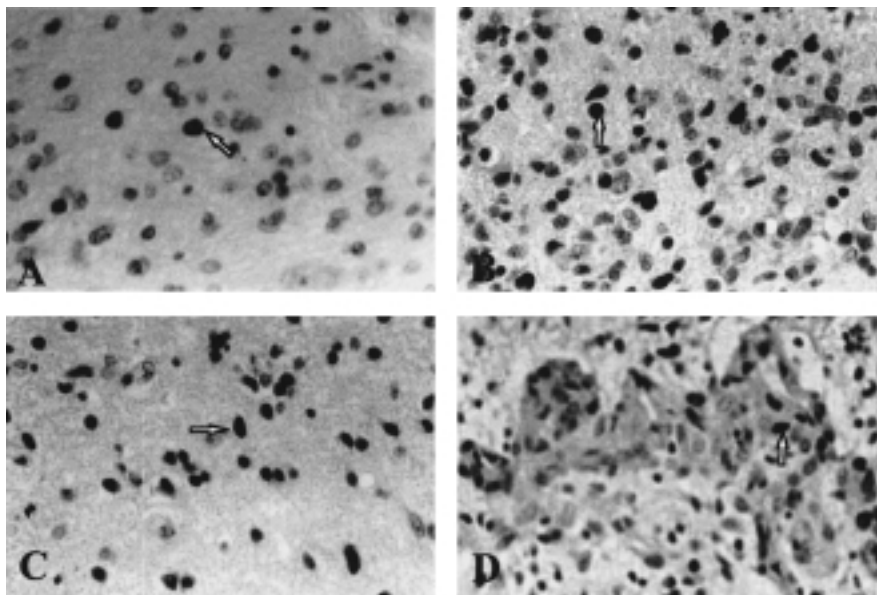
EMAITZAK

Kontrol gisa erabilitako amigdala-ehunean, bai PCNA, bai ki-67-ren analisisan, nukleo positibo ugari ikusi ziren. Garuneko ehun ez-patologikoan berriz, ez zen PCNA edo ki-67-rekiko errektibotasunik detektatu.

Bi markatzaile hauekin analizatutako I garduko astrozitometan oso errektibotasun txikia detektatu zelarik, ehunean nukleo positibo isolatu batzuk ikusi ziren (ikusi A argazkia). Astrozitomak behe-graduako tumoreak dira eta zelularen dentsitatea ez da oso handia izaten. Aztertutako kasu gehienetan %1 baino gutxiagok adierazten zuten PCNA eta ki-67.

Astrozitoma anaplasikoei dagokienez, zelula positibo gehiago ikusi ziren (B argazkia), batez besteko portzentaiak %12,7 eta %5,6 izanik (I taula). Portzentaia hauek I graduako astrozitomen portzentaiekin konparatzean, ezberdintasuna nabarmena izan zen ($p = 0,0001$). Tumore-laginetan PCNA, zein ki-67-rekin markatutako zelulak homogeneoki kokatuta zeuden. Tumore hauen ezaugarri histologiko nabarmenenak dira mitosien agerpena eta zelularen dentsitate handia. Zenbait astrozitoma anaplasikotan, tumore-zeluletan ez ezik, zelula endotelialen nukleoetan ere agertu ziren PCNA eta ki-67 antigenoak.

Glioblastoma multiformeak izan ziren zelula positiboen kopuru handienak izan zituzten tumoreak (%24,5 eta %19,5), beste bi tumore motetikoki batez besteko balioa estatistikoki ezberdina izanik ($p = 0,0001$). Tumore



A) I graduko Astrozitoma, PCNAreko erraktibotasuna (x280). B) Astrozitoma anaplasikoa, Ki-67 (x280), C) Glioblastoma multifomearen gune peritumoral, PCNA (x280), D) Glioblastoma multifomearen odol-hodiak, PCNA (x280).

hauetan zelula positiboen kokapena homogeneoa izan zen. Glioblastoma multiformeen alboko guneetan, hots, gune peritumoraletan, non zelularen dentsitatea tumore-gunean baino askoz baxuagoa den, zelula positibo asko detektatu ziren (C argazkia). Glioblastometan aurkitzen diren odol-hodi berezi batzuei glomeruloideak deritze. Odol-hodi hauetan nabarmena da endotelioaren ugalketa. Hau dela eta, zelula endotelialek ere PCNA eta ki-67 adierazi zuten (D argazkia).

I. taula. PCNA eta Ki-67-rekiko positibotasunen batez besteko portzentaiak (BP), desbiderazio estandarrak (DE) eta heinak tumore desberdinetan.

Tumore mota	PCNA		ki-67	
	BP $\pm$ DE	heina	BP $\pm$ DE	heina
I Astrozitoma	0,2 $\pm$ 0,1	(0-0,5)	0,3 $\pm$ 0,4	(0-1,5)
A. anaplasiko	12,7 $\pm$ 8,4	(4,5-37,6)	5,6 $\pm$ 1,9	(3,4-9,7)
G. Multiforme	24,5 $\pm$ 14,6	(9,7-60,6)	19,5 $\pm$ 10,7	(5,3-45,2)
Oligodendroglioma	3,7 $\pm$ 4,3	(0,5-10,0)	2,9 $\pm$ 1,6	(0,1-7,0)
Oligoastrozitoma	3,4 $\pm$ 2,7	(0,2-6,1)	4,5 $\pm$ 3,2	(0,1-13,4)

Oligodendroglioma, oligodendroglian jatorria duen tumorea dugu; bes-tetik, oligoastrozitoma tumore mixtoa da, eta hauen jatorria oligodendro-glian eta astroglia dago. Aipatutako bi tumore mota hauetan jasotako por-tzentaiak tumorearen histologiaren arabekoak izan ziren. Horrela, tumore batzuetan, non mitosiak ikusi ziren, positibitate-portzentaia handiak jaso ziren.

I taulan adierazita dagoen bezala, PCNA eta ki-67-rekiko batez besteko portzentaiak antzekoak izan ziren. Lagin bakoitzean jasotako datuak ere konparatu ziren eta estatistikoki adierazgarria zen korrelazioa ikusi zen ($r = 0,8$, $p = 0,001$).

EZTABAIDA

Artikulu honek PCNA eta ki-67 antigenoen adierazpena zenbait glioma desberdinetan aztertzea du helburu. Bildutako emaitzak tumoreen ezaugarri histologikoekin erlazionatu direlarik, bi markatzaile hauek zelulen ugalketa ondo islatzen dutela ondorioztatu da.

Lehenik eta behin, PCNA-ren analisia burutu zen. Proteina hau detek-tatzearen, PC10 antigorputz monoklonala aukeratu zen. Izan ere, ikertzaile batzuen arabera, antigorputz honek hobeto detektatzen ditu ugaltzen ari di-ren zelulak merkaturatu diren beste antigorputzek baino [9, 10]. Ikerketa honetan PCNAren adierazpena tumorearen gaiztotasunarekin erlazionatuta zegoela ikusi zen. Onberak diren gliometan (I graduako astrozitometan) ze-lula positibo gutxi ikusi ziren eta glioblastoma multiformeetan, aldiz, zelula positiboen kopurua areagotu egin zen, tumore hauen gaiztotasuna agerian jarritz. Honi dagokionez, argitaratu diren emaitzak ez datoz bat elkarren ar-tean [11, 12, 13].

Lehen aipatu dugun bezala, ki-67-ren eta PCNA-ren portzentaiak para-leloak izan zirela ere ikusi zen. Beste ikerketa batzuetan ondorio berbera iritsi da eta bai PCNA, bai ki-67 zelulen ugalketaren markatzaile balio-garriak direla ondorioztatu da [14]. Hau horrela izanda ere, Ki-67-rekiko erraktibotasuna PCNAren baino baxuagoa zen. Datu hau PCNA antigenoa-ren bizitzarekin erlazionatuta egon daiteke, proteina honen bizitza oso lu-zea dela ikusi baita [15, 16].

Astrozitoma anaplasiko eta glioblastoma multiformeen gune peritumo-raletan bi markatzaile hauekin zelula positiboak ere detektatu ziren. Datu hau beste argitalpen batzuetan ere jaso da [17, 18, 19]. Tumore mota hauen morfologia heterogeneoari buruz asko hitz egin da. Zelularen dentsitatea eta diagnostikatzeko kontuan hartzen diren beste ezaugarri histologiko ba-tzuk gune batetik bestera aldatzen dira [1]. Hau dela eta, batzuetan diag-nostikatzeko jasotzen den lagina ez da oso adierazgarria izaten, horrelakoe-

tan markatzaile hauek laguntza moduan erabil daitezke. Dela PCNA, dela ki-67-rekiko erreaktibotasuna gune peritumoraletan detekta dezakegunez, interesgarria izan daiteke tumorearen zabalera aztertzeko ere.

Laburbilduz, PCNA eta ki-67-ren adierazpena gliomen gaiztotasunari lotuta dago. Oso baliogarria izan daiteke tumore hauek elkarren artean bereizteko eta diagnostikatzeko, gaur egun erabiltzen den teknikarekin batera.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ESCALONA-ZAPATA, J. 1996. *Tumores del sistema nervioso central*. Ed. Complutense. Madrid.
- [2] KIM, T.S., HALLIDAY, A.L., HEDLEY-WHYTE, E.T., CONVERY, K. 1991. «Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas». *J. Neurosurg.*, **74**, 27.
- [3] COBB, M.A., HUSAIN, M., ANDERSEN, B.J., AL-MEFTY, O. 1996. «Significance of proliferating cell nuclear antigen in predicting recurrence of intracranial meningioma». *J. Neurosurg.*, **84**, 85-90.
- [4] KURKI, P., VANDERLAAN, M., DOLBEARE, F., GRAY, J., TAN, E.M. 1986. «Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle». *Exp. Cell. Res.*, **166**, 209-219.
- [5] BRAVO, R., FRANK, R., BLUNDELL, P.A., MACDONALD-BRAVO, H. 1987. «Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ ». *Nature*, **326**, 515-517.
- [6] GERDES, J., LEMKE, H., BAISCH, H., WACKER, H.H., CHWAB, U., STEIN, H. 1984. «Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67». *J. Immunol.*, **133**, 1.710-1.715.
- [7] CATTORETTI, G., BECKER, M.H.G., KEY, G., DUCHROW, M., SCHLÜTER, C., GALLE, J., GERDES, J. 1992. «Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections». *J. Pathol.*, **168**, 357-363.
- [8] KEY, G., BECKER, M.H.G., DUCHROW, M., SCHLÜTER, C., ASKAA, J., GERDES, J. 1993. «A rabbit anti-serum detects the Ki-67 antigen in routinely processed paraffin sections». *J. Clin. Pathol.*, **46**, 1.080-1.084.
- [9] LANDBERG, G., ROOS, G. 1991. «Antibodies to Proliferating Cell Nuclear Antigen as S-phase Probes in flow Cytometric Cell Cycle Analysis». *Cancer Res.*, **51**, 4.570-4.574.
- [10] TEAGE, K., EL-NAGGAR, A. 1994. «Comparative Flow Cytometric Analysis of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Antibodies in Human Solid Neoplasms». *Cytometry*, **15**, 21-27.
- [11] DIETZMANN, K., VON BOSSANYI, P., SALLABA, J., KIRCHES, E., SYNOWITZ, H.J., WARICH-KIRCHES, M. 1996. «Immunohistochemically detectable p53 and mdm-2 oncoprotein expression in astrocytic gliomas and their correlation to cell proliferation». *Gen. Diagn. Pathol.*, **141(5-6)**, 339-344.
- [12] HSU, D.W., LOUIS, D.N., EFIRD, J.T., HEDLEY-WHYTE, E.T. 1997. «Use of MIB-1 (Ki-67) Immunoreactivity in Differentiating Grade II and Grade III Gliomas». *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **56(8)**, 857-865.

- [13] GARCÍA, R., BUENO, A., CASTANÓN, S., RUIZ-BARNES, P., MARÍA DE CAMPOS, J., KUSAK, E., FORTES, J.R., ORTIZ, F., SARASA, J.L. 1997. «Study of the DNA content by flow cytometry and proliferation in 281 brain tumors». *Oncology*, **54(2)**, 112-117.
- [14] KORDEK, R., BIERNAT, W., LIBERSKI, P.P. 1996. «Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Ki-67 Immunopositivity in Human Astrocytic Tumours». *Acta. Neurochir. Wien.*, **138**, 509-513.
- [15] HALL, P.A., LEVISON, D.A., WOODS, A.L., YU, C. C.W., KELLOCK, D.B., WATKINS, J.A., BARNES, D.M., GILLET, C.E., CAMPLEJOHN, R., WASSEMM, N.H., LANE, D.P. 1990. «Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms». *J. Pathol.*, **162**, 285-294.
- [16] KHOSHYOMN, S., MAIER, H., MORIMURA, T., KITZ, K., BUDKA, H. 1993. «Immunostaining for proliferating cell nuclear antigen: its role in determination of proliferation in routinely processed human brain tumor specimens». *Acta Neuropathol.*, **86**, 582-589.
- [17] ALLEGGRANZA, A., GIRLANDO, S., ARRIGONI, G.L., VERONESE, S., MAURI, F.A., GAMBA-CORTA, M., POLLO, B., DALLA PALMA, P., BARBARESCHI, M. 1991. «Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms». *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, **419**, 417-423.
- [18] KIM, D.K., HOYT, J., BACCHI, C., KELES, G.E., MASS, M., MAYBERG, M.R., BERGER, M.S. 1993. «Detection of proliferating cell nuclear antigen in gliomas and adjacent resection margins». *Neurosurg.*, **33(4)**, 619-625.
- [19] COONS, S.W., JOHNSON, P.C. 1993. «Regional Heterogeneity in the Proliferative Activity of Human Gliomas as Measured by the Ki-67 Labeling index». *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **52(6)**, 609-618.