

Ana Luisa Morales Moya

Expresión de oncogenes,
receptores hormonales
esteroideos y marcadores de
proliferación en el carcinoma
endometrial

Departamento

Anatomía Patológica, Medicina Legal y
Forense y Toxicología

Director/es

Morandeira García, María José

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

EXPRESIÓN DE ONCOGENES, RECEPTORES
HORMONALES ESTEROIDEOS Y MARCADORES
DE PROLIFERACIÓN EN EL CARCINOMA
ENDOMETRIAL

Autor

Ana Luisa Morales Moya

Director/es

Morandeira García, María José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología

1997



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE MEDICINA

***EXPRESIÓN DE ONCOGENES, RECEPTORES DE
HORMONAS ESTEROIDEAS Y MARCADORES DE
PROLIFERACIÓN EN EL CARCINOMA ENDOMETRIAL***

ANA LUISA MORALES MOYA

Tesis Doctoral
1997

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE MEDICINA

***EXPRESIÓN DE ONCOGENES, RECEPTORES DE
HORMONAS ESTEROIDEAS Y MARCADORES DE
PROLIFERACIÓN EN EL CARCINOMA ENDOMETRIAL***

Memoria presentada por ANA L. MORALES MOYA para optar al grado de

DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA

Autora: Ana Luisa Morales Moya

Directores: Dra. M^a José Morandeira García
Dr. Joaquín Soria Navarro

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible la culminación de este proyecto:

A la Dra. Dña. M^a José Morandeira García, directora de esta tesis, por su valiosa labor de dirección, su estímulo, su dedicación y su consejo constante.

Al Dr. D. Joaquín Soria Navarro, director de esta tesis por su inestimable ayuda, sus valiosas ideas y su apoyo tanto moral como científico.

A Dña. Sara Serrano Hernández y D. Alfonso Cóndor Güemes por su inestimable dedicación en el trabajo de laboratorio y en la realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

A todos los profesores, personal técnico y personal administrativo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Lozano Blesa”, que me han facilitado en todo momento el acceso al material de esta tesis.

Al Dr. D. Félix La Mata por su colaboración en el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en este trabajo.

A D. Luis Correas Subías por su colaboración en la elaboración del material fotográfico.

A mis amigos, especialmente a Fernando, Ana y Mayte por sus consejos, su estímulo y su ayuda incondicional.

A mi familia por toda su ayuda, su afecto y su preocupación en cada momento.

A mis padres, mis hermanos y a Fernando.

ÍNDICE

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARCINOMA DE ENDOMETRIO	2
1.1.1. Epidemiología	2
1.1.2. Factores de riesgo	2
1.1.3. Clínica	5
1.1.4. Diagnóstico	6
1.1.4.1. Exploración ginecológica	6
1.1.4.2. Exploraciones complementarias	6
1.1.4.3. Diagnóstico de extensión locorregional	8
1.1.5. Anatomía patológica	8
1.1.5.1. Macroscopía	8
1.1.5.2. Microscopía	9
1.1.5.3. Clasificaciones del carcinoma de endometrio	13
1.2. CONCEPTOS GENERALES DE INMUNOLOGÍA	17
1.2.1. Concepto de antígeno	18
1.2.2. Concepto de anticuerpos	18
1.2.3. Estructura de las inmunoglobulinas	19
1.2.4. Anticuerpos policlonales	20
1.2.5. Anticuerpos monoclonales	21
1.3. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA	23
1.3.1. Métodos inmunoenzimáticos	25
1.3.1.1. Método directo	25
1.3.1.2. Método indirecto	25
1.3.1.3. Método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP)	26
1.3.1.4. Método de avidina-biotina (ABC)	26
1.4. BASES MOLECULARES DE CÁNCER DE ENDOMETRIO	27
1.4.1. Receptores esteroideos: receptores de estrógenos y receptores de progesterona	28

1.4.1.1.	<i>Introducción</i>	28
1.4.1.2.	<i>Aspectos moleculares de los receptores esteroideos</i>	29
1.4.1.3.	<i>Interacción hormona-receptor</i>	32
1.4.1.4.	<i>Regulación de la intensidad de la respuesta hormonal</i>	34
1.4.1.5.	<i>Algunas funciones de los receptores hormonales nucleares</i>	35
1.4.1.6.	<i>Técnicas de estudio de los receptores esteroideos</i>	36
1.4.1.7.	<i>RE y RP en el endometrio</i>	38
1.4.1.8.	<i>Expresión de RE y RP en tumores de endometrio</i>	41
1.4.1.9.	<i>Expresión de RE y RP en otros tumores</i>	47
1.4.2.	<i>Antígeno de proliferación Ki-67</i>	48
1.4.2.1.	<i>Introducción</i>	48
1.4.2.2.	<i>Ki-67 y ciclo celular</i>	49
1.4.2.3.	<i>Determinación del antígeno Ki-67</i>	50
1.4.2.4.	<i>Expresión de Ki-67 en algunos tumores</i>	53
1.4.3.	<i>Proteína supresora tumoral P53</i>	56
1.4.3.1.	<i>Estructura de la proteína P53</i>	58
1.4.3.2.	<i>Funciones de la proteína P53</i>	60
1.4.3.3.	<i>Mutaciones del gen p53</i>	62
1.4.3.4.	<i>El ciclo celular y la proteína P53</i>	65
1.4.3.5.	<i>Determinación inmunohistoquímica de la P53</i>	68
1.4.3.6.	<i>Estudios de la expresión de la proteína P53 en carcinomas de endometrio</i>	68
1.4.3.7.	<i>Relación de la proteína P53 con otros tumores</i>	74
1.4.4.	<i>Oncoproteína Bcl-2</i>	74
1.4.4.1.	<i>Apoptosis</i>	75
1.4.4.2.	<i>Estructura de la proteína Bcl-2</i>	77
1.4.4.3.	<i>Mecanismo de acción de la proteína Bcl-2</i>	78
1.4.4.4.	<i>Expresión de la proteína Bcl-2 en carcinomas endometriales</i>	79
1.4.4.5.	<i>Expresión de la proteína Bcl-2 en otros tumores</i>	81
1.4.5.	<i>Oncogén C-erbB-2</i>	82
1.4.5.1.	<i>Estructura del proto-oncogén C-erbB-2</i>	83
1.4.5.2.	<i>Técnicas de estudio del C-erbB-2</i>	83
1.4.5.3.	<i>Expresión del oncogén C-erbB-2 con el carcinoma de endometrio</i>	83
1.4.5.4.	<i>Expresión del oncogén del C-erbB-2 con otros tumores</i>	86

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO, JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS	
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA	89
2.2. OBJETIVOS	90
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. MATERIAL	92
3.1.1. Material biológico	92
3.1.2. Reactivos de laboratorio	93
3.1.2.1. Anticuerpos primarios	93
3.1.2.2. Anticuerpos secundarios	98
3.1.3. Soluciones de laboratorio	99
3.1.3.1. Preparación de la solución para el gelatinado de los portaobjetos	99
3.1.3.2. Procesado de las preparaciones en horno microondas	100
3.1.3.3. Preparación de la solución tamponada de fosfatos (PBS)	100
3.1.3.4. Preparación de la solución Buffer Citrato	100
3.1.3.5. Preparación de la solución substrato cromógeno (DAB)	101
3.1.3.6. Preparación de hematoxilina de Mayer	101
3.1.3.7. Preparación de PAS-Schiff	101
3.1.4. Otros materiales que han sido utilizados en este trabajo	102
3.1.4.1. Material para valorar resultados	102
3.1.4.2. Material informático	102
3.1.4.3. Material Fotográfico	103
3.2. MÉTODOS	103
3.2.1. Técnicas de rutina	103
3.2.2. Técnicas de inmunohistoquímica	104
3.2.2.1. Técnica de avidina-biotina peroxidasa. (ABC)	105
3.2.3. Método para la valoración de resultados	107
3.2.3.1. Criterios de valoración en las técnicas de rutina	108
3.2.3.2. Criterios de valoración de las técnicas inmunohistológicas	108
3.2.4. Método estadístico	109

4. RESULTADOS

4.1. ESTADISTICA DESCRIPTIVA	111
4.2. RESULTADOS DE LA ZONA TUMORAL	112
4.2.1. <i>Receptores de estrógenos</i>	112
4.2.2. <i>Receptores de progesterona</i>	113
4.2.3. <i>Proteína Mib-1 (Ki-67)</i>	113
4.2.4. <i>Proteína P 53</i>	113
4.2.5. <i>Proteína Bcl-2</i>	114
4.2.6. <i>Proteína C-erbB-2</i>	114
4.3. RESULTADOS EN LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR	114
4.3.1. <i>Receptores de estrógenos</i>	115
4.3.2. <i>Receptores de progesterona</i>	115
4.3.3. <i>Proteína Mib-1 (Ki-67)</i>	115
4.3.4. <i>Proteína P53</i>	116
4.3.5. <i>Proteína Bcl-2</i>	116
4.3.6. <i>Proteína C-erbB-2</i>	116
4.4. COMPARACIÓN DE MEDIAS PAREADAS	116
4.4.1. <i>Comparación de la expresión de los receptores de estrógenos entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor</i>	117
4.4.2. <i>Comparación de la expresión de los receptores de progesterona entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor</i>	117
4.4.3. <i>Comparación de la expresión de la proteína Mib-1 (Ki-67) entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor</i>	117
4.4.4. <i>Comparación de la expresión de la proteína P 53 entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor</i>	118
4.4.5. <i>Comparación de la expresión de la proteína Bcl-2 entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor</i>	118
4.4.6. <i>Comparación de la expresión de la proteína C-erbB-2 entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor</i>	118
4.5. MATRIZ DE CORRELACIÓN	119
4.6. ESTUDIOS MULTIVARIANTES	119
4.6.1. <i>Receptores de estrógenos</i>	120

4.6.2. <i>Receptores de progesterona</i>	120
4.6.3. <i>Proteína Mib-1 (Ki-67)</i>	121
4.6.4. <i>Proteína P53</i>	121
4.6.5. <i>Proteína Bcl-2</i>	122
4.6.6. <i>Proteína C-erbB-2</i>	122
4.7. MANOVA	123
4.7.1. <i>Media de los marcadores considerando todos los casos</i>	123
4.7.2. <i>Media de los marcadores según la clasificación de la FIGO</i>	123
4.8. MEDIA DE LOS MARCADORES RESPECTO A CADA UNO DE LOS SUBTIPOS ANATOMOPATOLÓGICOS	124
4.8.1. <i>Media de RE y RP en cada subtipo histológico</i>	124
4.8.2. <i>Media de P53 y Mib-1 en cada subtipo histológico</i>	125
4.8.3. <i>Media de bcl-2 y c-erbB-2 en cada subtipo histológico</i>	126
4.9. DIAGRAMA EN PIRÁMIDE	126
5. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS	
5.1 <i>TABLAS Y GRÁFICOS</i>	129
5.2 <i>FIGURAS</i>	168
6. DISCUSIÓN	
6.1. <i>RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA</i>	186
6.1.1. <i>Estudios multivariantes</i>	189
6.2. <i>ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN Ki-67</i>	191
6.2.1. <i>Estudios multivariantes</i>	194
6.3. <i>PROTEÍNA SUPRESORA TUMORAL P53</i>	195
6.3.1. <i>Estudios multivariantes</i>	197
6.4. <i>ONCOGEN Bcl-2</i>	199
6.4.1. <i>Estudio multivariante</i>	202
6.5. <i>ONCOGEN C-erbB-2</i>	203
6.5.1. <i>Estudio multivariante</i>	205
7. CONCLUSIONES	209
8. BIBLIOGRAFÍA	211

INTRODUCCIÓN

1.1. CARCINOMA DE ENDOMETRIO

El carcinoma de endometrio es un tumor epitelial maligno, originado en el epitelio endometrial. La mayoría de los carcinomas son endometrioides, existiendo en menor proporción otras variedades.

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma de endometrio es el tumor infiltrante más frecuente del aparato genital femenino, y uno de los cánceres más frecuentes en la mujer, siendo superado en frecuencia sólo por el carcinoma de mama, intestino y pulmón (243).

La incidencia del cáncer uterino es de uno a dos casos, por 1000 mujeres postmenopáusicas al año, en la población general (243).

En EE.UU. se registraron 34.000 casos nuevos de carcinoma de endometrio durante 1996 produciendo una mortalidad de 6.000 muertes en este año (211).

En nuestro medio, según un estudio realizado sobre la población de Zaragoza entre los años 1987-1990 inclusive, se registraron 246 nuevos casos de cáncer de cuerpo uterino (249).

La frecuencia según áreas geográficas, es más frecuente en América del Norte y en Europa Occidental, siendo raro en Asia y Africa (225).

1.1.2. FACTORES DE RIESGO

Se han identificado múltiples factores de riesgo para el desarrollo del adenocarcinoma de endometrio, entre los que destacan los siguientes:

- **EDAD:** La edad de mayor incidencia se sitúa entre los 55 y 65 años (84). En la población de Zaragoza, entre los años 1987-1990, se encontró un aumento de la tasa de incidencia en el carcinoma endometrial

conforme aumentaba la edad hasta los 60-64 años, mientras que a partir de esta edad se mantenía la incidencia (249).

Se puede considerar que el aumento de la vida media de la mujer es una de las causas que ha contribuido al incremento de este tumor (84, 209).

- **ALTO NIVEL SOCIOECONÓMICO:** Las mujeres de elevado nivel socioeconómico tienen mayor riesgo de carcinoma de endometrio que las de bajo nivel socioeconómico. Esto podría ser debido a una mayor disponibilidad de estrógenos exógenos (243, 84).
- **OBESIDAD:** la obesidad se ha asociado al adenocarcinoma de endometrio por la hiperestrogenia que se genera en la conversión periférica de los precursores androgénicos (delta 4-androstendiona) en estrógenos (estrón) mediante su aromatización. Conversión que aumenta en la grasa corporal en las mujeres posmenopáusicas. Cuanto mayor es el peso, más alta será la síntesis de estrógenos. En las mujeres premenopáusicas, el hiperestrogenismo está favorecido por un déficit relativo de progesterona que se produce en el ciclo ovárico de las obesas (150, 243, 23, 84).
- **DEPENDENCIA HORMONAL:** El estímulo estrogénico prolongado y mantenido, sin ser equilibrado por una secreción adecuada de progesterona, constituye un factor etiológico importante en la génesis del adenocarcinoma de endometrio. Así la hiperplasia endometrial, que es consecuencia de un nivel de estimulación estrogénica anormalmente alto y prolongado, tiene una especial relación con el carcinoma endometrial, sobre todo la hiperplasia compleja o adenomatosa y la hiperplasia atípica.

Circunstancias donde se ha encontrado asociación con el hiperestrogenismo:

- **Menopausia tardía y menarquia temprana,** son mujeres que han estado sometidas durante más tiempo a la influencia de los estrógenos (23, 243, 84).

•**Nulíparas**, al no haber tenido embarazos también han estado expuestas durante mayor tiempo a los estrógenos (211, 150, 62). Por consiguiente se puede decir que el embarazo es un factor protector del adenocarcinoma de endometrio, ya que se interrumpe la continua estimulación del endometrio por los estrógenos (211, 209, 84).

•**Mujeres con ciclos anovulatorios** (23). Tienen largos periodos de acción estrogénica sobre el endometrio.

•**Mujeres con síndrome de Stein Leventhal**: La patología que suele producir es una hiperplasia de endometrio, que cura con tratamiento médico, aunque se han descrito casos de carcinoma de endometrio que suelen ser bien diferenciados (84, 62).

•**Adenomiosis**, que suelen coincidir con niveles altos de estrógenos (84).

•**Miomas**, también se acompañan de niveles altos de estrógenos (84)

•**Tumores secretores**, producen normalmente estrógenos (84, 62).

•**Tratamiento con tamoxifen**. Recientemente, varios autores (2, 67, 112, 218, 113) han sugerido que mujeres que padecen carcinoma de mama y son tratadas largo tiempo con tamoxifen, tienen un mayor riesgo para padecer un carcinoma de endometrio, además hay estudios en los que se relaciona con tumores poco diferenciados y un peor pronóstico.

•**Tratamiento con estrógenos exógenos**. Debemos recordar que el tratamiento con estrógenos exógenos administrados durante los años 1960-1970, fueron un factor dentro de la patogenia del carcinoma de endometrio. En la actualidad, gracias a la prescripción de tratamientos combinados de estrógenos y progesterona, la incidencia del carcinoma endometrial ha disminuido. Sin embargo, según Rose 1996 (211), el carcinoma de endometrio aún aparece en mujeres sometidas a tratamientos sustitutorios en los que se administra progesterona durante menos de 12 días, que es lo recomendado.

Tenemos que señalar, que existe un grupo de pacientes con cáncer de endometrio que no muestra signos de hiperestrogenismo.

- **TABACO:** No está clara la acción del tabaco sobre el cáncer de endometrio. Hay autores, como Lesko o Burke que tras diversos estudios estimaron que las fumadoras postmenopáusicas habituales presentaban un riesgo disminuido de desarrollar cáncer de endometrio (243). Sin embargo Daniells, al igual que otros autores, publicó un estudio en 1993 en el que sugería que las mujeres fumadoras con cáncer de endometrio se encontraban en un estadio más avanzado (44).
- **OTROS FACTORES** que debemos tener en cuenta en el adenocarcinoma de endometrio son: diabetes, hipertensión, historia familiar, dieta rica en grasas, etc.

1.1.3. CLÍNICA

La manifestación inicial del carcinoma de endometrio es con gran frecuencia una hemorragia uterina. En las mujeres postmenopáusicas, las hemorragias se presentan como pérdidas irregulares. Cuando la mujer es premenopáusica, habitualmente la pérdida de sangre es intermenstrual, hay ocasiones menos frecuentes en que aparecen como reglas abundantes y prolongadas (menorragias) (84).

Después de las hemorragias, el síntoma más frecuente es la leucorrea mezclada con sangre y a veces de aspecto purulento (150).

Otros síntomas menos frecuentes son: dolor, pérdida de peso, anemia, etc. (150, 84).

Hay ocasiones en que los adenocarcinomas de endometrio son asintomáticos.

1.1.4. DIAGNÓSTICO

Como ya hemos comentado anteriormente, ante toda mujer postmenopáusica con hemorragias uterinas y en mujeres premenopáusicas con hemorragias intermenstruales, debemos pensar en un carcinoma de endometrio, pero debemos descartar previamente otros procesos que pueden producir hemorragias, como pólipos endometriales, hiperplasia de endometrio, metrorragias funcionales, etc.

Para el diagnóstico utilizaremos diferentes pruebas:

1.1.4.1. Exploración ginecológica

La exploración bimanual vagino-abdominal suele detectar un útero agrandado de volumen, aunque no debemos olvidarnos de que el tamaño del útero puede ser normal e incluso puede estar disminuido (84, 150).

1.1.4.2. Exploraciones complementarias

Las exploraciones complementarias más frecuentemente utilizadas son las siguientes:

- **Citología cérvico-vaginal:** Es la técnica empleada para el despistaje de cáncer de cérvix. Pero desafortunadamente en el caso del adenocarcinoma de endometrio sólo un 30% de los casos nos dan un frotis de Papanicolau con células compatibles con el carcinoma (150).
- **Citología endometrial:** La sensibilidad para el diagnóstico del adenocarcinoma de endometrio oscila entre el 80 y 90%, llegando a una especificidad del 95%. La citología endometrial es difícil de interpretar, por lo que requiere citólogos muy expertos (150).
- **Biopsia de endometrio:** Es la técnica que nos da el diagnóstico de certeza. Para obtener material endometrial podemos utilizar varios

métodos: Microlegrado, biopsia dirigida por histeroscopia y legrado fraccionado (endocérvix y endometrio) (150, 84).

Para hacer un legrado uterino fraccionado, debemos hacer primero un legrado uterino cuidadoso de todo el endocérvix, depositándolo en un frasco con líquido fijador. A continuación, dilatamos el cuello uterino y legamos toda la cavidad corporal, y se deposita al material del cuerpo en otro frasco separado del material del cuello uterino.

En ocasiones durante la realización de un legrado surgen complicaciones como por ejemplo la perforación del útero. Cuando esto ocurre nos orienta hacia un posible carcinoma de endometrio (84).

El legrado fraccionado es el método más eficaz para el diagnóstico de certeza del carcinoma de endometrio, sin embargo la información que aporta en cuanto a la clasificación quirúrgica y al pronóstico es insuficiente. Por esta razón algunos autores como Lanzón consideran la histeroscopia de gran importancia en la exploración rutinaria de las metrorragias (150).

- **Histeroscopia:** Esta técnica tiene una especificidad casi del 88%, y unos falsos negativos de 0'5%. La histeroscopia permite visualizar, localizar la lesión y observar su extensión hacia el endocérvix.

Tiene varias ventajas con respecto al legrado endometrial: se puede realizar de forma ambulatoria, sin anestesia general, permite realizar la biopsia bajo visión directa y diferencia otros procesos que producen hemorragias uterinas como pólipos, miomas submucosos, hemorragias por atrofia, etc. (150).

- **Ecografía (ECO):** La ECO endovaginal se utiliza para valorar el grosor de la línea endometrial y para estudiar lesiones asociadas como miomas, tumores de otras localizaciones, etc. (150).

Osmer (187), realizó un estudio en el cual no encontró adenocarcinoma ni hiperplasia cuando el grosor del endometrio era menor de 4mm. A raíz

de este estudio, hoy día se debe biopsiar toda mujer postmenopáusica cuando el endometrio tenga un grosor mayor o igual a 4mm.

1.1.4.3. Diagnóstico de extensión locorregional

Para valorar la extensión del tumor a órganos vecinos se pueden utilizar diversas técnicas:

- **Tomografía axial computerizada:** Podemos valorar la presencia y tamaño de los ganglios linfáticos y permite valorar la extensión pélvica y abdominal.
- **Resonancia magnética nuclear:** Es útil para valorar el grado de invasión miometrial y vaginal.
- **Radiografía de tórax:** Se utiliza como prueba preoperatoria y además descarta metástasis pulmonares.
- **Marcadores tumorales:** CEA y Ca 125 (150).

1.1.5. ANATOMÍA PATOLÓGICA

1.1.5.1. Macroscopía

Los carcinomas de endometrio normalmente se originan a partir del epitelio endometrial del cuerpo uterino, siendo más frecuentes en la pared posterior que en la anterior (225).

El tamaño del útero esta normalmente agrandado, aunque puede tener un tamaño normal e incluso estar disminuido (225, 62).

El carcinoma de endometrio puede ser circunscrito, presentando un crecimiento exofítico, fungoso hacia la luz endometrial, o bien puede afectar difusamente al endometrio. En este caso tiende a invadir el miometrio, pudiendo en casos avanzados ocupar todo el miometrio, e incluso formar nódulos subserosos y serosos (62, 209).

A la sección, el tumor tiene una coloración blanca-grisácea, aunque en ocasiones muestra áreas marrón rojizas (hemorragias) o amarillentas (necróticas).

El tumor puede infiltrar por contigüidad el cérvix, y una vez ha roto la serosa infiltra estructuras peritoneales por continuidad directa, además puede producir metástasis ganglionares y alcanzar por vía hematógena pulmón, hueso y otros órganos (209, 225).

1.1.5.2. Microscopía

Según Robbins (209) y Pardo-Mindán (192), la mayoría de los carcinomas de cuerpo uterino (aproximadamente el 85%) son adenocarcinomas endometrioides. Para otros autores como Fariña (62) y Ackerman (210) los adenocarcinomas de endometriales suponen un 80%.

En estudios realizados sobre el carcinoma de endometrio en la población de Zaragoza, el 81,7% de los casos también fueron de tipo adenocarcinoma endometrioide (249).

Los carcinomas endometriales se caracterizan por un patrón más o menos definido, formado por células epiteliales cilíndricas, estratificadas y malignas (209).

Las glándulas endometriales son muy numerosas, con escasa cantidad de tejido conjuntivo interglandular como podemos ver en la figura 1b. La morfología de las glándulas es muy diversa. En ocasiones mantienen una morfología similar al endometrio normal, aunque su número está muy aumentado. En otros casos las glándulas tienen una forma muy irregular, con dilataciones, ramificaciones y deformidades que les da un aspecto polimorfo (Figura 2).

Las glándulas están revestidas por un epitelio que muestra grados diversos de desviación de las células cilíndricas del epitelio normal. El epitelio está formado por células poliédricas u ovoideas con núcleos situados en distintos niveles, aunque normalmente se disponen formando varias hileras celulares. Se observa en mayor o menor proporción, desdiferenciación y anaplasia celular. Los núcleos pueden tener diferente morfología, tamaño distinto, aclaramiento nuclear

con acúmulo de cromatina a lo largo de la membrana nuclear, pueden ser hipercromáticos y mostrar mitosis normales y anormales. La atipia y el número de mitosis están directamente relacionados con el grado malignidad. Los citoplasmas pueden ser de escaso volumen, estando aumentada la relación núcleo-citoplasma, dando la impresión de estar los núcleos muy próximos entre sí (225).

Según la diferenciación histopatológica podemos diferenciar tres grados: Grado 1, aquel que tiene 5% o menos de patrón sólido y el resto de patrón tubular, (tanto en la figura 3 como en la 4 podemos apreciar dos ejemplos de carcinoma endometrial grado G1). Grado 2, aquel que tiene entre 6-50% de patrón sólido que no sea escamoso ni morular (Figura 5 y 6). Grado 3, el que tiene más del 50% de patrón sólido que no sea ni escamoso ni glandular (Figura 8).

El estroma suele ser escaso, puede ser más o menos celular y con mayor o menor cantidad de fibras de colágena. A veces también se pueden encontrar leucocitos y células redondas (84).

El tejido benigno adyacente al cáncer de endometrio puede ser atrófico (como muestra la figura 1), proliferativo o hiperplásico.

El examen del tejido que rodea al carcinoma de endometrio es importante porque la presencia de hiperplasia se asocia a un mejor pronóstico (7, 49).

A veces el diagnóstico diferencial entre una hiperplasia de endometrio y un adenocarcinoma bien diferenciado, resulta difícil. Para su estudio nos basamos en la presencia de invasión estromal y se reconoce por: reacción desmoplásica o fibroblástica del estroma, arquitectura glandular confluyente o en criba, arquitectura papilar (192).

Formas de carcinoma endometriode:

- **Adenoacantoma:** Es un carcinoma de endometrio que contiene focos de diferenciación escamosa (metaplasia). Las células se agrupan en mórula sin atipia citológica importante (192).

- **Carcinoma adenoescamoso:** Es un carcinoma de endometrio con focos de metaplasia, pero el componente escamoso es atípico e invasivo (192).

Otros tipos de carcinomas de cuerpo uterino:

- **Carcinoma seroso papilar:** Es el más frecuente de los subtipos de carcinoma de endometrio. Según algunos estudios, entre un 5-10% corresponden a este tipo de carcinoma. Un ejemplo de esta variedad podemos observarlo en la figura 9. (225).

Se caracteriza por una compleja forma de crecimiento, es un modelo papilar con un alto grado de atipia en la citología, con pleomorfismo, hiperchromasia, nucleolos gigantes, numerosas mitosis, extensa necrosis, cuerpos de psamoma (30% de los casos) y una importante invasión miometrial (210, 225).

El carcinoma seroso además de por su frecuencia es importante por su alta agresividad, con gran tendencia a invadir el miometrio y una rápida diseminación más allá del útero, tanto por vía linfática como hematogena (225).

La supervivencia de este tipo de tumor se correlaciona con: a) la invasión vascular linfática, b) la diseminación peritoneal, c) el contenido nuclear de ADN (ploidía), d) la expresión de P53.

El carcinoma seroso se diferencia del carcinoma endometriode por la demostración de aneuploidía, amplificación del proto-oncogén c-myc, y bioquímicamente por la ausencia de receptores de estrógenos y progesterona (225).

- **Adenocarcinoma de células claras:** Este tipo de adenocarcinomas de endometrio supone aproximadamente el 4% de los carcinomas y al igual que otros carcinomas de endometrio suele ocurrir en mujeres postmenopáusicas (225).

Es una variante de tumor mülleriano (derivado de restos de los tubos de Müller, a partir de los cuales se forma el útero) (62, 210).

Microscópicamente, este tipo de tumor se caracteriza por la presencia de células tumorales largas con citoplasmas claros en técnicas de hematoxilina-eosina, y otras técnicas como Schif o carmín de Best. Los exámenes ultraestructurales demuestran también el aspecto claro del citoplasma, que es el resultado de un masivo acúmulo de glucógeno (225, 62).

También encontramos en estos tumores otras células denominadas células en tachuela (al estar los núcleos localizados en el polo apical de la célula protuyen como clavos hacia la luz glandular) (225, 210, 62). Estas células pueden ser más numerosas que las células claras que dan nombre a este tumor. Otros rasgos a señalar son hialinización del estroma y mucina extracelular.

Este tipo tumoral se ha asociado a un alto grado de malignidad y a un peor pronóstico (225, 62).

No se han relacionado con el dietilestilbestrol, a diferencia de otros tumores de células claras como el de cérvix y vagina (210, 62).

Estos tumores pueden ser difíciles de diferenciar del carcinoma seroso, incluso puede haber lesiones en las que ambos tumores coexistan (225, 62).

- **Adenocarcinoma mucinoso:** Es un carcinoma endometrial infrecuente, algunas series hablan de 1% de los tumores endometriales malignos, sin embargo no es tan extraño encontrar áreas de esta diferenciación mucosecretora en los carcinomas endometrioides (62). Una muestra de este tumor podemos observarla en la figura 10.

Histológicamente se pueden observar células cilíndricas altas de aspecto mucosecretor, con núcleos de situación basal y poca tendencia a la pseudoestratificación, además suelen estar bien diferenciados (62).

El citoplasma es claro y se tiñe intensamente con el método P.A.S. (ácido per-iodico Schiff) y el mucicarmín de color rojo (225, 62).

La secreción acumulada en la luz de la glándula puede distenderla y darle un aspecto quístico. A veces la glándula puede romperse o necrosarse por la compresión de la secreción (62).

El pronóstico de dichos carcinomas suele ser bueno, al igual de otros carcinomas de bajo grado (62, 225).

Este adenocarcinoma se asemeja a los carcinomas endometriales típicos (210), además presenta una imagen muy similar a los adenocarcinomas mucosecretores de otras localizaciones, por lo que hay que hacer diagnóstico diferencial sobre todo con el adenocarcinoma mucosecretor de cérvix y el de ovario (210, 225, 62, 212).

- Existen **otros carcinomas** de endometrio como el carcinoma mixto, el carcinoma indiferenciado (de células pequeñas y de células gigantes), etc.

1.1.5.3. Clasificaciones del carcinoma de endometrio

Se han hecho gran número de clasificaciones de este tumor. Vamos a citar aquellas que consideramos más importantes:

A) Según el grado de diferenciación histológica (209):

- **Grado 1:** Bien diferenciado con un patrón glandular fácilmente reconocible.
- **Grado 2:** Moderadamente diferenciado, con glándulas bien formadas mezcladas con nidos sólidos de células malignas.
- **Grado 3:** Mal diferenciado, constituido por nidos de células glandulares apenas reconocibles y un elevado grado de atipia nuclear y de actividad mitótica.

B) Según Broders (84):

- **Grupo I:** Incluye los carcinomas muy diferenciados con glándulas muy semejantes en morfología a las del endometrio normal, pero muy numerosas y revestidas de un epitelio dispuesto en una sola hilera que recuerda al endometrio normal. Según Broders, se incluyen un 75-100% de células diferenciadas.
- **Grupo II:** Engloba los carcinomas con 50.75% de las células diferenciadas y el resto serían células indiferenciadas.
- **Grupo III:** Contiene carcinomas bastante indiferenciados con un 25-50% de células diferenciadas.
- **Grupo IV:** Tumores muy indiferenciados, que sólo contienen entre 0-25% de células diferenciadas.

C) Según los niveles de invasión del miometrio

Se distinguen los siguientes grados de invasión muscular o miometrial (My) (62):

- **My 0:** No hay invasión.
- **My 1:** La invasión no sobrepasa 1/3 interno del grosor miometrial.
- **My 2:** La invasión alcanza 2/3 del grosor miometrial.
- **My 3:** La invasión alcanza todo el grosor del miometrio, pero respeta la serosa.
- **My 4:** Invasión de la serosa.
- **My -:** Sin tumor residual.

D) Clasificación de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia):

D.1. ESTADIFICACIÓN CLÍNICA DE LA FIGO (243):

- **Estadio 0:** Carcinoma *in situ*. Hallazgos histológicos de cáncer (Los casos de estadio 0 no deben ser incluidos en las estadísticas de enfermedades invasoras).
- **Estadio I:** Carcinoma limitado al cuerpo uterino, incluyendo el istmo.
 - Ia:** La longitud de la cavidad uterina es de 8 cm o menos.
 - Ib:** La longitud de la cavidad uterina es mayor de 8 cm.
- **Estadio II:** Carcinoma que afecta al cuerpo uterino y el cérvix pero no se extiende fuera del útero.
- **Estadio III:** Carcinoma que se extiende fuera del útero pero no fuera de la pelvis verdadera.
- **Estadio IV:** Carcinoma que se extiende fuera de la pelvis verdadera o que afecta la mucosa de la vejiga o el recto (El edema bulloso solo, no permite considerar a una lesión en estadio IV).
 - IVa:** Diseminación del crecimiento a la vejiga o el intestino.
 - IVb:** Diseminación a órganos distantes.

D.2. ESTADIFICACIÓN QUIRÚRGICA (International Federation of Gynecologists and Obstetricians) (110).

- **Estadio I**
 - Ia G.123:** Tumor limitado al endometrio.
 - Ib G.123:** Invasión de menos de la mitad del miometrio.
 - Ic G.123:** Invasión de más de la mitad del miometrio.

- **Estadío II**

•**IIa G.123:** Afectación únicamente de las glándulas endocrinas.

•**IIb G.123:** Invasión del estroma cervical.

- **Estadío III**

•**IIIa G.123:** Invasión de la serosa, y/o anejos y/o citología peritoneal positiva.

•**IIIb G.123:** Metástasis vaginales.

•**IIIc G.123:** Metástasis en ganglios pélvicos y paraaórticos.

- **Estadío IV**

•**IVa G.123:** Invasión tumoral de la mucosa vesical y/o intestinal.

•**IVb G.123:** Metástasis a distancia, incluyendo los ganglios linfáticos intraabdominales o inguinales.

Tanto en la clasificación clínica como en la quirúrgica debemos aplicar además otros parámetros:

a) Debemos establecer la subclasificación histológica del adenocarcinoma:

•Grado 1 (G.1): Carcinoma adenomatoso bien diferenciado.

•Grado 2 (G.2): Carcinoma adenomatoso diferenciado con áreas parcialmente sólidas.

•Grado 3 (G.3): Carcinoma predominantemente sólido o completamente sólido o indiferenciado.

b) Notas sobre el grado de malignidad:

•Cuando la atipia nuclear es notable e inapropiada para el grado de arquitectura, aumentaría en un grado los tumores de grado 1 o grado 2.

- En adenocarcinoma seroso, adenocarcinoma de células claras, y carcinoma de células escamosas el grado nuclear tiene preferencia.
- Los adenocarcinomas con diferenciación escamosa se gradúan según el grado nuclear del componente glandular.

1.2. CONCEPTOS GENERALES DE INMUNOLOGÍA

Nuestro organismo constantemente está defendiendo su integridad biológica. Esta defensa es posible gracias a su sistema inmunológico, encargado de la detección y destrucción de elementos extraños procedentes del exterior como virus, bacterias o elementos internos como células tumorales, que al diferir de los elementos normales son reconocidas como células extrañas (100). El sistema inmune está a su vez dividido en dos subsistemas: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata o inespecífica se encarga de la defensa inicial frente a las infecciones (100, 247, 75).

Cuando el sistema de defensa innato es insuficiente, se pone en marcha el sistema inmunitario adaptativo, y aparece una respuesta específica para cada agente infeccioso. Otra ventaja de este sistema de defensa inmunitario con respecto al innato, es que posee capacidad de memoria, por lo que reconocerá en el futuro al agente infeccioso e impedirá que ocasione enfermedad. La inmunidad adaptativa puede estar mediada por anticuerpos (Ac) en cuyo caso se denomina inmunidad humoral (Linfocitos B), o por células cuyo nombre es inmunidad celular (Linfocitos T).

Los linfocitos B ejercen su acción a través de los anticuerpos (inmunoglobulinas) que estos segregan.

Los linfocitos T actúan directamente o a través de sustancias liberadas por los mismos linfocitos.

1.2.1. CONCEPTO DE ANTÍGENO

Podemos definir antígeno (Ag), como cualquier sustancia que, introducida en un organismo es capaz de provocar una respuesta inmune; bien sea humoral, celular o ambas a la vez. Para que dicha sustancia actúe como antígeno en un determinado organismo, debe poseer una estructura química distinta a los constituyentes propios del mismo.

Los antígenos pueden ser inmunógenos o no (haptenos). Los inmunógenos son moléculas capaces de inducir respuesta inmune. Cuanto más compleja y de mayor peso molecular sea la estructura molecular de un antígeno, mayor será su capacidad inmunogénica (las proteínas son las sustancias más inmunogénicas). Sin embargo, los haptenos sólo son capaces de interaccionar, pero no de inducir respuesta inmune. Para ello necesita una proteína transportadora denominada carrier (75)

Cada anticuerpo es específico para un antígeno determinado, y se une a una parte específica de este, denominada epítipo o determinante antigénico. Los epítipos son las zonas de unión al anticuerpo; o dicho de otra forma, son zonas del antígeno donde reside la antigenicidad (247).

1.2.2. CONCEPTO DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos son moléculas formadas por las células plasmáticas, que constituyen el estadio de diferenciación final de los linfocitos B del sistema inmune adaptativo. Un organismo es capaz de elaborar millones diferentes de anticuerpos que reaccionan con la mayor parte de los antígenos presentes en la naturaleza (75)

Para que un antígeno se una a un linfocito B, existen unos receptores de membrana: las inmunoglobulinas de superficie. Estos se unen a nivel del epítipo, o zonas de unión antígeno-anticuerpo.

El linfocito B puede activarse por dos mecanismos: activación del linfocito B por Ag T dependiente (antígeno linfocito T dependiente), o activación del linfocito B por Ag-T independiente. En la primera, el linfocito B se activa cuando tras la unión del Ag al receptor del Linfocito B, se produce una segunda señal relacionada con el linfocito T helper (por medio de la liberación de citocinas, especialmente la Interleukina 4). En la otra el antígeno es capaz de activar al linfocito B sin necesidad del linfocito T. Los antígenos son grandes moléculas poliméricas con determinantes antigénicos repetidos que entrecruzan masivamente las Inmunoglobulinas de membrana del linfocito B, activándolo.

Muchos de ellos cuando se encuentran a concentraciones elevadas, activan al linfocito B de forma policlonal inespecífica.

Una vez que el linfocito B esta activado, se diferencian a células secretoras de anticuerpo que migran a médula ósea donde completa su maduración a célula plasmática, así da lugar a una clona o grupo de células que proceden de una sola célula madre y produce el mismo tipo de anticuerpos.

1.2.3. ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Denominamos inmunoglobulinas (Ig) a las moléculas con actividad de anticuerpo. Por sus propiedades fisicoquímicas e inmunológicas se dividen en 5 clases principales; IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, y varias subclases, 4 de las IgG y 2 de las IgA. (100)

La estructura básica de todas las inmunoglobulinas, la forman cuatro cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. De estas, dos son de bajo peso molecular, aproximadamente 23.000 daltons, son las cadenas ligeras o light (L), y las otras dos son de alto peso molecular, entre 50.000 y 70.000 daltons, son las cadenas pesadas o heavy (H).

La forma molecular de las inmunoglobulinas IgG, IgE e IgD es un monómero, mientras que la IgM forma un pentámero unido por la cadena J, y la IgA puede estar formada por una, dos o tres unidades.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas constan de dos partes bien definidas y diferenciadas. La parte constante está constituida por un número semejante de aminoácidos, sea cual sea la inmunoglobulina a la que pertenece. La parte variable está constituida por gran variabilidad de aminoácidos. La parte constante corresponde al extremo carboxílico, mientras que la variable al extremo amínico. (100)

Los dos extremos de las inmunoglobulinas tienen funciones bien definidas: el denominado Fab (fragmento de la Ig que se une al antígeno) se encarga de reconocer los antígenos específicos y el Fc (fragmento cristalizable de las cadenas pesadas de las Ig) es capaz de unirse a diversos elementos, como el complemento, las células inflamatorias u otro Fc. Dentro del extremo Fab existe una zona hipervariable, que es la que se une al antígeno y es la responsable de la especificidad y afinidad de las inmunoglobulinas.

Además de la función de defensa inmunológica, los anticuerpos han sido utilizados en los últimos tiempos con fines diagnósticos y terapéuticos, por lo que ha sido necesario encontrar técnicas que llevaran a la obtención de los antígenos y anticuerpos. Para ello se idearon las técnicas de anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales (100).

1.2.4. ANTICUERPOS POLICLONALES

Burnet y sus colaboradores desarrollaron en 1950 la teoría de selección policlonal. Para la obtención de anticuerpos policlonales, inmunizaban un organismo huésped con una molécula específica (inmunógeno), en el que se encuentra el antígeno frente al cual se pretende obtener un anticuerpo (75).

El organismo produce una reacción humoral (linfocitos B) frente al inmunógeno, generando anticuerpos que se pueden recolectar obteniendo suero.

Esta técnica nos lleva a la obtención de unos anticuerpos policlonales, ya que los linfocitos B estimulados de esta forma, producen diversos tipos de anticuerpos derivados del gran número de clones de células B estimuladas.

Los anticuerpos son poliespecíficos, ya que en el antisuero obtenido se encuentran anticuerpos contra distintos determinantes antigénicos o epítomos de una misma estructura. Son poliafines, ya que las fracciones del anticuerpo que reaccionan con el mismo determinante antigénico, se unen a él con distinta afinidad. Son heterogéneos, ya que diferentes anticuerpos contenidos en el antisuero variarán de un animal a otro, o en las distintas extracciones de un mismo animal. Son sensibles, ya que al contener anticuerpos que reaccionan con diferentes determinantes antigénicos de una estructura, resulta difícil que se produzcan falsos negativos. Además son económicos, ya que la infraestructura tecnológica necesaria para su producción, no es costosa.

Sin embargo, a pesar de estas características, los anticuerpos policlonales tienen varios inconvenientes en su empleo para el diagnóstico o terapéutica, como:

- a) La imposibilidad de reproducir los resultados; esto es debido a que la respuesta inmune varía de unos individuos a otros, e incluso dentro de un mismo individuo según el momento en que se encuentra.
- b) Obtención de cantidades limitadas.
- c) Purificación del antisuero se realiza mediante absorción con moléculas o células afines a las empleadas para inmunizar al animal. Tiene por objeto eliminar los Ac que reaccionan de forma cruzada no específica y esto es laborioso.
- d) Incapacidad para discriminar determinantes antigénicos diferentes dentro de una misma molécula o célula (75, 117).

1.2.5. ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1975, Köhler y Milstein desarrollaron la técnica de obtención de Ac (anticuerpos) monoclonales. Realizaron una fusión entre las células de un mieloma murino y los esplenocitos (linfocitos procedentes del bazo) de un ratón

inmunizado, con hematíes de carnero. Los cultivos celulares resultantes de esta fusión, llamados “hibridomas”, son capaces de producir inmunoglobulinas, que reconocen a los antígenos empleados en la inmunización.

El hibridoma tiene dos propiedades fundamentales: tiene capacidad de crecimiento ilimitado, y además capacidad de sintetizar y secretar inmunoglobulinas (Las inmunoglobulinas que producen son del mismo tipo y especificidad que las codificadas por el linfocito B).

El híbrido resultante de la fusión entre la célula de un mieloma murino y un linfocito B específico para un antígeno problema, da origen, después de varias divisiones, a un clon; la totalidad de cuyos híbridos poseen el mismo tipo de inmunoglobulinas (75).

Podemos definir anticuerpo monoclonal como el producto de una sola clona de células secretoras de inmunoglobulinas. Por ello, todas las moléculas de inmunoglobulinas producidas presentan idénticas características inmunológicas: especificidad, afinidad, carga, peso molecular, isotipo y propiedades.

Dentro de las ventajas de los anticuerpos monoclonales debemos destacar:

- Son homogéneos y no varían con cada inmunización o sangría realizada al animal;
- Además no requiere el uso de Ag purificados
- Los cultivos permanentes pueden proporcionar el Ac de forma ilimitada.

Como inconvenientes debemos destacar la poca sensibilidad, ya que al reaccionar con un único determinante antigénico pueden ocasionar falsos negativos, principalmente cuando se trata de reconocer estructuras antigénicas complejas. Además esta técnica resulta cara.

Los anticuerpos monoclonales tienen múltiples aplicaciones en biología. Algunas de las más importantes son comentadas a continuación.

Son útiles para el diagnóstico de laboratorio. Gracias a su homogeneidad y a que se obtienen de forma ilimitada, ha hecho que se utilicen en pruebas de

radioinmunoensayo para la obtención de hormonas, fármacos y enzimas. Se pueden homologar entre los diversos laboratorios, usando el anticuerpo más adecuado. También pueden aplicarse al diagnóstico bacteriológico y virológico, empleando técnicas inmunohistoquímicas. Estos reactivos además son muy importantes en el tipaje de los antígenos HLA (complejo principal de histocompatibilidad humana), de importancia capital en el trasplante de órganos (75, 117).

Investigación básica con los anticuerpos monoclonales se ha podido identificar todas las subpoblaciones linfoides, numerosos marcadores tumorales etc. Este hecho adquiere gran importancia sobre todo porque con los anticuerpos policlonales, no era posible distinguir entre dos proteínas de membrana distintas de un mismo tipo celular.

También tiene gran importancia en el campo de la terapéutica y diagnóstico clínico. (75)

- a) Protección frente al rechazo de órganos, administrando Ac monoclonales frente a células T citotóxicas.
- b) Localización de metástasis, de tumores empleando Ac específicos antitumor marcados radiactivamente.
- c) Tratamiento de tumores si se usan unidos a toxinas o citotóxicos.

1.3. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Las técnicas inmunohistoquímicas sirven para detectar antígenos celulares o tisulares, mediante reacciones Ag-Ac (antígeno contra anticuerpo). Para poder ver el lugar donde se produce la reacción Ag-Ac es preciso emplear un marcador o trazador. El marcaje puede realizarse con fluorocromos, como rodamina, fluoresceína, (técnicas de inmunofluorescencia), enzimas como peroxidasa,

fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, etc. (técnicas inmunoenzimáticas), iones metálicos en forma coloidal (técnicas de inmuno-oro) o isótopos radiactivos (75).

Tanto los anticuerpos monoclonales como policlonales se pueden unir a moléculas marcadoras que permiten visualizar el lugar de reacción con sus respectivos antígenos. El uso de estos Ac marcadores es el fundamento de las técnicas de inmunolocalización, muy útiles en las técnicas de biología en general y del diagnóstico histopatológico.

El Ag puede detectarse tanto por marcaje directo del Ac (técnicas directas), como por algunos de los múltiples métodos secundarios.

Las técnicas de inmunolocalización que utilizan como marcador un enzima, fueron desarrolladas por Nakane y Pierce en 1967, y posteriormente fueron perfeccionadas por Arrameas, Mason, Sternberger *et al*, consiguiendo superar las dificultades que presentaban las técnicas de inmunofluorescencia (117)

Esta técnica nos permite ver el lugar donde se produce la reacción Ag-Ac, al añadir al final de la reacción el sustrato del enzima, más una sustancia llamada cromógeno.

Al actuar la enzima sobre el sustrato, interactúa a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado.

Distintos tipos de enzimas fueron utilizados como trazadores: peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa. Pero de ellas la más utilizada es la peroxidasa por las ventajas que presenta, como ser visualizada fácilmente con microscopio de luz, poder utilizarse en secciones teñidas con tinciones histológicas de rutina, tolerar la deshidratación en alcohol y xilol. (117)

La peroxidasa es un enzima que se obtiene del rábano picante y puede emplearse en técnicas directas, indirectas y sin marcar (técnicas de peroxidasa-antiperoxidasa) (75).

1.3.1. MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS

Diferentes métodos inmunoenzimáticos han sido desarrollados y poco a poco mejorados.

1.3.1.1. Método directo

El método directo es una técnica de anticuerpos marcados. El trazador va unido de forma covalente al anticuerpo (117).

Es el método más simple, pero también el menos sensible para la detección de antígenos. El anticuerpo o antisuero primario se conjuga directamente con la enzima peroxidasa (75).

1.3.1.2. Método indirecto

Esta técnica fue desarrollada por Nakane y Pierce.

En primer lugar, el anticuerpo primario o específico sin conjugar se une con el antígeno presente en la sección del tejido. En una segunda fase, se añade un anticuerpo marcado con el trazador enzimático (peroxidasa), también llamado anticuerpo secundario, obtenido de un animal diferente al primario y específico para el animal y la clase de inmunoglobulina que constituye el anticuerpo primario (75).

El complejo así formado puede visualizarse incubando el corte de tejido con un sustrato cromógeno adecuado.

Este método es más sensible que el método directo, y además, el anticuerpo secundario puede utilizarse para todos los antisueros primarios posibles obtenidos de la misma especie (75).

Ambos métodos, directo e indirecto, tienen una sensibilidad mayor que la inmunofluorescencia.

1.3.1.3. Método Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP)

Este procedimiento fue desarrollado por Sternberger en 1960 (117, 75), como un perfeccionamiento de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (117).

Esta técnica utiliza como trazador inmunocomplejos formados por la enzima peroxidasa, y anticuerpos específicos frente a ella, en lugar de anticuerpos marcados.

La peroxidasa se inocula en un animal para obtener los Anticuerpos dirigidos frente a la enzima. De esta forma, al poner en contacto “in vitro” los Anticuerpos con peroxidasa, se forman complejos Ag-Ac (complejos peroxidasa-antiperoxidasa o complejo PAP), a través de una reacción de precipitación.

Esta técnica consta de tres pasos: en el primero, se pone en contacto el tejido con el Anticuerpo primario semejante a los empleados en las técnicas de inmunoperoxidasa directa e indirecta. En un segundo paso se añade el Anticuerpo secundario, y para terminar, en un tercer paso se añade el complejo PAP a la reacción; estos complejos están formados por tres moléculas de peroxidasa y dos de Anticuerpos antiperoxidasa (75, 117).

Al final, por cada molécula de Anticuerpos primario ligada al Antígeno, existen al menos tres de peroxidasa en el complejo final; esto le da una alta sensibilidad a esta técnica (75).

1.3.1.4. Método de Avidina-Biotina (ABC)

Tratando de solucionar los problemas que la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa producía, Arrameas *et al* en los años setenta introdujeron la técnica Avidina-Biotina pero posteriormente Hsu *et al* en 1980 la perfeccionaron (117).

Es una técnica muy sensible que utilizan anticuerpos marcados, y se basa en la gran afinidad que entre sí poseen las moléculas de Avidina y las de Biotina, de forma que se genera un fuerte enlace no inmune (75).

La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular que está presente en la clara de huevo y en la bacteria *actinomyces avidinii*. En ambos casos la

molécula está formada por cuatro subunidades, que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión con la biotina (75).

La avidina puede unirse covalentemente con una gran variedad de proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, y al oro coloidal (75).

La biotina es una vitamina de bajo peso molecular que pertenece al complejo B (Vitamina H), y se localiza en la yema de huevo. Se conjuga fácilmente con anticuerpos y enzimas marcadoras (75).

La técnica Avidina–Biotina es un proceso que se realiza en tres pasos: en el primero se incuba el tejido con el anticuerpo primario; en el segundo paso se añade el anticuerpo secundario unido a biotina, y en un tercer paso se forma un complejo Avidina-Biotina, conjugado con peroxidasa (117).

Un gran número de moléculas de biotina, pueden unirse a un Anticuerpo único por lo que la proporción trazador/anticuerpo es muy elevada (75). Por esto la sensibilidad de esta reacción es muy alta.

1.4. BASES MOLECULARES DE CÁNCER DE ENDOMETRIO

Como ya sabemos, el factor pronóstico más importante en el carcinoma de endometrio es el estadio quirúrgico, determinado por el nivel de penetración miometrial y el compromiso extracorporal (159). Sin embargo no debemos olvidar la gran importancia del tipo histológico, el grado de diferenciación, la atipia nuclear, etc.

Hay además otros factores que también se han relacionado con el pronóstico del tumor, estos son:

- Presencia de receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP) que van a tener un particular interés en el pronóstico del cáncer de endometrio (estos marcadores se han relacionado con menor grado de malignidad y mejor pronóstico).

- Índice proliferativo Ki-67 (Mib1).
- Presencia de una mutación del gen supresor como el p53.
- Expresión del oncogen Bcl-2.
- Presencia de amplificación de oncogenes como el c-erbB-2.

1.4.1. RECEPTORES ESTEROIDEOS: RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y RECEPTORES DE PROGESTERONA

1.4.1.1. Introducción

Aunque todas las células del organismo humano están expuestas a las hormonas esteroideas, sus acciones fisiológicas se limitan a aquellos tejidos que contienen proteínas de acción intracelular, denominados receptores. Estas proteínas se unen específicamente y con alta afinidad, a clases individuales de hormonas esteroideas y transmiten la señal esteroidea a genes sensibles. El tipo de respuesta inducido es por tanto dependiente del estado de desarrollo y diferenciación del tejido diana. Los receptores también aparecen involucrados en el control de diversas fases finales de proliferación celular, muerte celular, actividad secretora y movilidad celular.

Los receptores hormonales sexuales se han encontrado en muchos tejidos del organismo humano. Además de su presencia en los tejidos efectores clásicos, como la mama, la vagina, el endometrio y la hipófisis, se han identificado actualmente en otros tejidos humanos como el tejido del sistema nervioso, endocrino, cardiovascular, respiratorio, urinario, óseo, piel e hígado (189, 34).

Además, las hormonas esteroideas se han relacionado con diversas enfermedades, resaltando entre ellas el desarrollo de tumores malignos en tejidos sensibles hormonalmente a los esteroides; de forma especial el cáncer de mama, el tracto genital femenino y la próstata (32, 42, 36), así como en otras localizaciones: pulmón, tracto gastrointestinal, páncreas, tumores intracraneales (63).

Dicha peculiaridad, ha sido aprovechada terapéuticamente con drogas que modifican las acciones de las hormonas esteroideas a nivel celular, utilizándose habitualmente en el tratamiento del cáncer de mama, endometrio y próstata (69).

Estos tumores contienen un grado variable de receptores hormonales esteroideos, y su medida durante la fase diagnóstica permite identificar el potencial de respuesta endocrina.

Dado que los cánceres sensibles a los esteroides son relativamente comunes y que transiciones celulares, asociadas a pérdida de sensibilidad hormonal, empeoran invariablemente el pronóstico de los pacientes, deberíamos profundizar en el conocimiento de los receptores esteroideos.

En nuestra revisión bibliográfica sobre el tema, nos encargaremos (más adelante) de la asociación que tienen tanto con el cáncer de mama como con el de endometrio, ya que considero que es de vital importancia en nuestro estudio.

1.4.1.2. Aspectos moleculares de los receptores esteroideos

Los receptores de estrógenos humanos son un miembro de la familia de receptores nucleares de pequeño ligando hidrofóbico, al cual pertenecen también las hormonas esteroideas, las hormonas tiroideas, la vitamina D y el ácido retinóico (153).

El gen de los receptores de estrógenos está localizado en el brazo largo del cromosoma 6 en la banda 24-27 (6q 24-27), y el gen de los receptores de progesterona esta en el cromosoma 11. El gen de los receptores estrogénicos tiene 8 exones, y en el espacio intermedio tiene intrones de al menos 140 Kbases (KB) (153, 151, 196).

El conocimiento de la estructura molecular de los receptores hormonales se inició a partir del clonaje del ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario y del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica los receptores. Esto fue posible a partir de los años 70, cuando aparecieron nuevas técnicas del ADN recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales contra varios tipos de receptores nucleares (189).

La estructura primaria de la molécula de receptor, o sea la que interactúa con la hormona, está formada por una sola cadena polipeptídica en todos los tipos de receptores esteroideos (189).

Los receptores de progesterona presentan dos formas moleculares, A y B, pero son dos productos del mismo gen, cuyo ARNm (ácido ribonucleico mensajero) es traducido a partir de dos codones de iniciación alternativos (189). La proteína A tiene aproximadamente 80 KDa (kilodaltons) y se cree que es una forma mutilada de la proteína B, la cual tiene 110 KDa (203).

La semejanza estructural ha permitido deducir que todos los miembros de la familia de receptores nucleares proceden de un mismo gen ancestral (189).

Los receptores de hormonas esteroideas son factores de transcripción génica. Se activan mediante una reacción de alta afinidad con un ligando (hormona o anti-hormona) que transforma el receptor desde un estado que es genéticamente inactivo, a un estado activado, capaz de identificar los genes susceptibles de responder específicamente a cada receptor. También pueden modificar su expresión a través de varias interacciones con secuencias específicas, situadas en la región promotora del propio gen, y con otras proteínas integrantes del aparato de transcripción génica (189).

Para poder desempeñar estas funciones, la molécula del receptor experimenta plegamientos que la llevan a adquirir una estructura espacial (terciaria) adecuada para interactuar con el ADN o con las otras proteínas (189).

Cada función del receptor se lleva a cabo a través de diversas estructuras espaciales que adquiere cada región de la molécula. A cada una de las estructuras de la molécula que puede realizar una de las funciones que lleva a cabo normalmente todo el receptor, se le denomina DOMINIO MOLECULAR (189).

Toda la familia de receptores esteroideos está caracterizada por una estructura en la cual se pueden apreciar tres dominios principales y varios subdominios o regiones. El dominio de localización central es el que define a esta superfamilia, denominado “dominio de unión al ADN”, el cual está formado por

66-68 aminoácidos, y es codificado por los exones 2 y 3. Otro dominio principal es el de unión carboxiterminal, el cual está codificado por 5 exones: el 4, 5, 6, 7 y parte del 8. Este dominio está a su vez formado por subdominios como el de dimerización y el de activación de la transcripción. El tercer dominio principal es el dominio de unión aminoterminal, codificado por el exón 1 (72, 153).

Entre la hormona y el dominio de unión de ADN al que se fija, hay una zona constituida por aminoácidos que ha sido denominada región bisagra. Esta zona tiene un importante papel, al establecer la asociación alostérica entre la hormona y el dominio regulador, inhibiendo la actividad de la transcripción por el último dominio en ausencia de ligandos (153). Dicha región es codificada por el exón 4.

En ausencia de unión a la hormona, el dominio parece ser inhibido en función de la activación transcripcional.

La codificación genética de los receptores nucleares es como la de cualquier otra proteína. La síntesis del receptor comienza con la transcripción del gen que lo codifica en ácido ribonucleico (ARN) como transcrito primario. Este forma una larguísima hebra que luego es procesada para dar lugar al ARN mensajero maduro (189). El proceso de maduración incluye la eliminación de los intrones (segmentos de ARN que carecen de función codificadora), y la modificación de los extremos de la hebra de ARN (189).

Los genes de los receptores (Rs) nucleares incluyen 7 y 8 intrones, algunos de ellos muy grandes (>26 Kilobases). Al eliminar dichos intrones, el ARNm maduro queda constituido enteramente por los exones.

Estudios sobre mutagénesis han mostrado que ciertos aminoácidos en los dominios de unión esteroideos de receptores de estrógenos y de progesterona son críticas para reconocer las hormonas.

En ocasiones, al eliminar los intrones se producen errores, lo que proporciona una fuente de variantes moleculares del receptor. Los receptores así formados pueden resultar truncados, es decir que les faltan los aminoácidos codificados por alguno de los exones. También pueden aparecer moléculas del

receptor que tienen repetidos los aminoácidos codificados por alguno de los exones. Estos productos de la maduración alternativa del ARN mensajero pueden llevar a la supresión de la unión a esteroides, o reducir la afinidad por los mismos. En ocasiones dichos productos alterados pueden encontrarse en tejidos normales, pero se desconoce su significado funcional (189).

La maduración alternativa del ADN mensajero es frecuente en tejidos tumorales que expresan los receptores. En unos casos dan lugar a Rs truncados, que mantienen la capacidad de unirse a la hormona, pero que han perdido su capacidad como factor de transcripción. También se producen Rs truncados que carecen de capacidad de ligar hormonas y pueden llegar a ser tumorigénicos por estimular la proliferación de las células de manera no controlada por las hormonas. Esta variante de receptores ha sido objeto de estudios exhaustivos en tumores de mama (189).

1.4.1.3. Interacción hormona-receptor

El reconocimiento de cada receptor por su respectiva hormona es un proceso altamente específico, en el que la pequeña molécula del esteroide entra en una cavidad de la molécula del receptor formando una unión a la hormona, y abarca al menos la mitad de la molécula. Los dominios de unión a la hormona poseen unas cortas secuencias de ADN específicas para la respuesta hormonal, las cuales están situadas en la región promotora de cada gen inducible por hormonas que son reconocidas por parte del dímero del receptor. A estas secuencias se les denomina elementos de respuesta hormonal (189).

Los genes que responden a una hormona determinada contienen elementos de respuesta hormonal idénticos.

Los receptores nativos de hormonas esteroideas, en ausencia de hormona, tienen una escasa afinidad por las estructuras nucleares. El contacto con la hormona aumenta extraordinariamente su nucleofilia. Este hecho no revela necesariamente que la hormona haya provocado que los Rs entren en contacto con secuencias específicas de ADN en los genes que responden a la misma (6). Se ha calculado que en la célula diana normal existen sólo unos pocos genes que pueden

responder a una hormona. Cada célula diana contiene 1.000 a 10.000 receptores, que resultan activados en número creciente en función de la concentración que la hormona alcance en la célula (189). En consecuencia la posibilidad de que todos los receptores activados encuentren genes específicos con los que poder interactuar (189).

El exceso de receptor activado, al menos en el caso de la progesterona, se une a proteínas ácidas que funcionan como aceptores. A estas proteínas se les atribuyen dos posibles funciones (que no han sido confirmadas): ser un reservorio de receptor activo y ser las encargadas de dirigir el exceso de Rs hacia la degradación (189).

La etapa final de la acción de las hormonas que utilizan receptores hormonales nucleares estriba en la modificación de la transcripción génica. Ello se debe a su extraordinaria complejidad y a las múltiples variedades específicas del gen o de tejido que presenta (189, 6).

La participación de los Rs nucleares en la maquinaria de transcripción génica tiene lugar mediante dominios específicos de la molécula conocida como transactivador. Estos están formados por secuencias de aminoácidos que interactúan mediante contactos proteína-proteína con otros factores de transcripción. Si se altera dicha secuencia se produce la incapacidad de la hormona para inducir la expresión génica.

La transcripción comienza cuando se estabiliza el complejo transcripcional en la región promotora del gen.

Se han identificado dos dominios transactivadores en la familia de los Rs hormonales nucleares; uno de ellos está situado en la región anterior a la zona de unión al ADN denominado TAF1 (factor activador de la transcripción 1) (244). El otro se localiza en la zona de unión a la hormona, y sólo actúa cuando se forma el complejo hormona-receptor.

Existen otras proteínas que forman parte del proceso transcripcional, denominadas factores intermediarios de la transcripción (TIF), los cuales son

utilizados en la maquinaria transcripcional de diversos genes (170). Los TIF interaccionan con los receptores, con otras proteínas que se asemejan a los receptores o con otra proteína del aparato transcripcional. Este factor es imprescindible que se una a los receptores para que se produzca la transcripción. Si al mismo tiempo que los receptores, hay otra maquinaria transcripcional que capta de forma más eficiente dichos factores intermediarios, no se producirá la transcripción de los genes regulados por las hormonas.

1.4.1.4. Regulación de la intensidad de la respuesta hormonal

A pesar de todos los detalles moleculares que hoy se conocen sobre el mecanismo de acción hormonal, aún quedan numerosas incógnitas sobre el modo en que se regula, célula a célula, minuto a minuto, la intensidad de la respuesta hormonal (189)

Numerosos factores han sido implicados en este proceso encaminado a conseguir el mayor equilibrio funcional del organismo. Desde la entrada de las hormonas en la célula hasta la finalización de la acción hormonal, surge un conjunto de factores que intervienen en el proceso de modo relevante (189).

La entrada de hormonas esteroideas dentro de las células se ha considerado siempre un fenómeno pasivo, basado en su solubilidad en los fosfolípidos de la membrana. Sin embargo, la existencia de fijación específica de hormonas esteroideas a membranas celulares, ha abierto la posibilidad de que su entrada en las células se encuentre mediada por proteínas de membrana (189).

Por otra parte se ha postulado la participación en acciones extragenómicas de las hormonas esteroideas. Se ha propuesto que las proteínas podrían ser enzimas que participan en el metabolismo de las hormonas y también que podrían tratarse de Rs de membrana que medien transducción intracelular de señales (189).

Uno de los factores más importantes en la regulación de la intensidad de la respuesta hormonal es la abundancia de receptores. Ésta depende del grado de

expresión de sus genes respectivos y de la velocidad con que los Rs son eliminados (189).

El número de Rs varía ampliamente entre los diferentes tejidos. Esta distribución celular desigual condiciona la respuesta a la hormona, lo que ha dado pie al concepto de célula diana (189).

La propia hormona actúa regulando negativamente la transcripción del gen del receptor, sobre todo cuando es usada en exceso. Esto hace que disminuya la cantidad de proteína en el interior de la célula. Aunque esto ocurre de manera general, hay algunas excepciones. Así dosis fisiológicas de estrógenos o andrógenos inducen la síntesis de sus propios receptores (189, 26).

Existen numerosos ejemplos de que una hormona puede regular los Rs de otra, como la síntesis de Rs de progesterona que es inducida por los estrógenos en endometrio uterino y en células de cáncer de mama en cultivo. En el endometrio juega un papel decisivo en el proceso que regula la transición de la fase proliferativa a la secretora en el ciclo menstrual. En el cáncer de mama, es una propiedad que se utiliza para determinar la capacidad de respuesta celular a los estrógenos (189).

El destino de los receptores tras su activación es un tema aún sin aclarar. Parece que los receptores sufren un proceso de destrucción (por medio de proteólisis) o procesamiento, inducido por la hormona. También se ha comentado la posibilidad del reciclaje de los Rs, pero sólo ha sido confirmada en el caso de los glucocorticoides (189, 26).

1.4.1.5. Algunas funciones de los receptores hormonales nucleares

Aunque existen algunas diferencias respecto a la organización celular de determinados receptores hormonales esteroides, al final todos actúan estimulando o reprimiendo la producción de ARN de genes sensibles, conduciendo a cambios en la síntesis proteica y de la función celular.

Los receptores hormonales nucleares acumulan en una sola molécula varias funciones:

- Son capaces de reconocer y unirse con alta afinidad a pequeñas moléculas, como los esteroides, con un alto grado de especificidad.
- Son capaces de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN, que están presentes sólo en los genes objeto de su regulación.
- Son capaces de interactuar con otras proteínas que participan en la maquinaria de transcripción genética, e iniciar o modificar la expresión de genes específicos.

1.4.1.6. Técnicas de estudio de los receptores esteroideos

Los receptores hormonales fueron descubiertos a principios de los sesenta, cuando la tecnología para marcar radiactivamente los esteroides fue factible. Así, Elwood Jensen, en Chicago (USA), al obtener estradiol tritiado pudo demostrar la existencia de un componente protéico intracelular que se unía específicamente a esa hormona (116).

Durante muchos años, la única tecnología disponible para determinar la concentración de receptores esteroideos, y poder estudiar sus propiedades estuvo basada en el uso de ligandos (esteroides) marcados radiactivamente. Esto permitió obtener datos bioquímicos acerca del propio receptor, e información acerca de su número y su afinidad (24, 189). Esta técnica tenía un gran inconveniente, se trabajaba con homogenados de tejido donde era imposible discriminar entre receptores en tejido maligno del tejido no maligno. Además este método era laborioso y el equipo necesario caro (94, 203).

Las primeras técnicas inmunohistológicas que se usaron para demostrar RE en secciones de tejido, utilizaron anticuerpos policlonales para estradiol (132) aplicados también en secciones de tejido fresco congelado (37) o en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina (37). Este método tenía algunos inconvenientes, como la falta de especificidad o la dificultad a la hora de ser reproducida, por lo que se buscó una técnica inmunohistoquímica con más especificidad para demostrar receptores estrogénicos.

En los años 80, Green *et al* (88) desarrollaron unos anticuerpos monoclonales altamente específicos para receptores esteroideos y un método inmunoperoxidasa monoclonal, para receptores de estrógenos en secciones congeladas, que ha permitido identificar al receptor sobre cortes de tejido o medirlo directamente a partir de homogenados. Pero este método no permitía realizar estudios retrospectivos debido a que se necesitaba tejido congelado. Por otra parte, esta técnica fue la primera que determinó la localización de los RE en el núcleo (203).

Unos años después, Pascal *et al* (193) desarrollaron una nueva técnica inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos policlonales anti E2, la cual permitía detectar RE en tejido fijado en formol.

Los métodos inmunohistoquímicos posibilitan identificar, sobre un corte de tejido, los tipos celulares que acumulan receptores, e incluso en función de la intensidad de la señal, obtener una valoración semicuantitativa de la población disponible (189, 94, 182). Este dato es muy importante ya que permite monitorizar la expresión del factor en cuestión según las oscilaciones hormonales del ciclo y, por tanto, obtener información de su estatus en función del equilibrio hormonal.

Gracias a esta técnica se puede hacer una valoración semicuantitativa de la intensidad de tinción y del número de células afectadas, y puede emplearse también para la obtención de índices que correlacionarían adecuadamente los datos tradicionales obtenidos a partir de homogenados tisulares (189).

Otra técnica que ha venido a completar la técnica anterior es la genética molecular, que permite valorar la funcionalidad de los receptores identificados (189, 102, 115).

Los métodos inmunohistoquímicos a partir de anticuerpos antirreceptores, sólo permiten informar de la existencia y magnitud de la población de receptores sobre tejidos o células. La disponibilidad de ADN recombinante para cada tipo de receptores ha permitido identificar el ARN específico y, a partir de la construcción

de cadenas apropiadas de nucleótidos, detectar si la transcripción es activa, es decir, si hay expresión funcional.

La hibridación *in situ* es una técnica que permite, sobre cortes de tejido, identificar si en dicho tejido existe ARNm específico del receptor, es decir, si hay transcripción activa.

También la electroforesis ha sido utilizada para identificar el ARN.

1.4.1.7. RE y RP en el endometrio

El sistema genital femenino, al igual que la mama, es un órgano diana primario de las hormonas esteroideas, estrógenos y progesterona. Los receptores esteroideos están representados a lo largo de todo el tracto reproductor en ovarios, útero, cérvix y vulva. La dependencia hormonal es particularmente marcada en el endometrio, con una elevada expresión en la mujer premenopáusica de ambos receptores: estrogénicos y de progesterona.

Al igual que en la mama normal, los receptores en el endometrio varían notablemente su concentración, con las fluctuaciones que ocurren en sus respectivos ligandos a través de todo el ciclo menstrual. En común también con la mama, los receptores de hormonas esteroideas se mantienen en el sistema reproductor femenino durante el proceso neoplásico, y de forma similar desaparecen conforme disminuye la diferenciación tumoral (91).

Gracias a las técnicas inmunohistoquímicas se ha podido estudiar la expresión de RE y RP a través del ciclo menstrual (189).

En relación con los RE, se ha visto que el epitelio glandular expresa mayor intensidad de RE que el estroma, lo que hace que destaquen las glándulas sobre un fondo homogéneo del estroma.

Otra característica que se puede destacar, es la heterogeneidad encontrada entre las glándulas, e incluso dentro de las mismas glándulas; lo que traduce distintos niveles de expresión de RE en áreas vecinas.

En relación a estas características, una observación frecuente es el escalonamiento en la intensidad de tinción, casi siempre a favor del estrato basal del endometrio, con pérdida progresiva de la señal a lo largo del estrato funcional. También las muestras del fundus uterino tienden a presentar una expresión más rica que las obtenidas en áreas cercanas al segmento (189). Los niveles de RE en las glándulas son indetectables a comienzos del ciclo, pero van progresivamente ascendiendo, y resultan máximos al final de la fase proliferativa, después se produce un descenso a lo largo de la fase secretora, con desaparición a partir de la mitad de la misma (189, 175). En situaciones especiales como el embarazo, en que los niveles de progesterona siguen altos, el índice de RE se encuentra bajo (189).

El estroma sigue oscilaciones similares, aunque al comienzo del ciclo acumula RE en mayor medida que el epitelio, y al final de la fase secretora su disminución es menos marcada (189).

El miometrio muestra siempre una tinción leve o negativa (189).

Respecto a los RP tienen un patrón similar que el descrito para los RE. En el estroma y en el miometrio se encuentra homogeneidad, sin embargo a nivel de las glándulas endometriales se puede observar heterogeneidad, aunque con menor frecuencia que para los RE (189).

Se mantiene la diferencia entre la intensidad de tinción en glándulas, estroma y miometrio, y hay una tendencia a mayor intensidad de tinción en la basal endometrial.

El comportamiento a nivel de las glándulas es paralelo al de los RE, cuando la expresión de los RE es alta, también muestra una alta expresión para RP. La heterogeneidad en los casos de los RP hace que en ocasiones puedan aparecer glándulas con áreas negativas y/o con tinción máxima (189)

La expresión de los RP disminuye en la fase luteínica (secretora), e incluso puede llegar a desaparecer a partir del día 21 del ciclo (189).

El estroma muestra un aumento ligero de la tinción sobre lo observado para los RE y también sigue un patrón homogéneo. Se ha observado también una acumulación de tinción en las regiones periglandulares (como ya ocurría con los RE) (189).

A diferencia de lo que ocurría con los RE, los RP no disminuyen significativamente en el estroma al inicio de la fase secretora y sus niveles son altos en la fase final de dicha fase. Estos niveles continúan altos en condiciones especiales como el embarazo o la administración crónica de gestágenos (189).

El miometrio sigue un patrón homogéneo y con tinción más intensa que la encontrada para los RE.

Las paredes de los vasos intramiometriales muestran en general negatividad aunque se encuentra algún caso aislado positivo.

En resumen, podemos decir que la fase proliferativa se acompaña de un enriquecimiento de ambos tipos de receptores, con preponderancia para los RP en glándulas y estroma a lo largo de la fase proliferativa del ciclo, mientras que la fase secretora, ya en un periodo avanzado, se acompaña de pérdida de señal para ambos receptores en el epitelio, pero no en el estroma (189, 182, 20, 154, 216, 19).

El tejido epitelial y estromal del endometrio es influido considerablemente por las hormonas sexuales tanto endógenas como exógenas. A partir de estudios experimentales y de observación parece que los estrógenos endógenos y exógenos pueden asociarse a un mayor riesgo de hiperplasia y carcinoma del endometrio.

Aquellos procesos clínicos que cursan con niveles de estrógenos en suero persistentemente elevados (sin la influencia cíclica de la progesterona) como obesidad, síndrome del ovario poliquístico y tumores de células granulosas, se acompañan de un mayor riesgo de cáncer de endometrio. Mediante la adición cíclica de progestágenos se estimula la maduración y la secreción del endometrio proliferativo. Tras la supresión de la administración del progestágeno, el endometrio maduro se descama dando lugar a la llamada hemorragia por

deprivación. La maduración y la descamación cíclica de la superficie endometrial evitan una proliferación continuada (e hiperplasia), como se observa en el climaterio a través de la estimulación con estrógenos endógenos, y en la postmenopausia a través de la estimulación con estrógenos exógenos (189).

En mujeres no histerectomizadas, la terapéutica de sustitución con estrógenos sólo aumenta el riesgo de cáncer e hiperplasia de endometrio, y por consiguiente, debe añadirse un progestágeno (189).

La frecuencia de hiperplasia en el curso del tratamiento hormonal sustitutivo combinado (THS combinado) depende de la dosis y de la duración del tratamiento con progesterona (189).

Debemos considerar también la importancia de los receptores hormonales esteroideos a la hora del tratamiento endocrino de los adenocarcinomas endometriales. Actualmente se sabe que es esencial la integridad del sistema de receptores hormonales y de los acontecimientos postsrepción para que dichos tumores respondan al tratamiento endocrino. Es posible que algunas pacientes afectadas por adenocarcinoma de endometrio, aun teniendo receptores hormonales positivos, no respondan el tratamiento endocrino, debido a que dichos receptores no son funcionales o a que la transformación neoplásica puede haber producido alteraciones en el proceso después de la interacción hormona-receptor o bien en la función postranscripcional (178, 49).

1.4.1.8. Expresión de RE y RP en tumores de endometrio

La presencia de receptores de hormonas esteroideas ha sido ampliamente estudiada tanto en el endometrio normal como en el patológico. En la mayoría de los casos la presencia del receptor de estrógenos en el tejido endometrial se correlaciona con la diferenciación del mismo, por lo que dicho receptor va desapareciendo a medida que los tumores son más indiferenciados. Así, en el adenocarcinoma de endometrio podría considerarse la presencia de receptores de estrógenos como un indicador de buen pronóstico del desarrollo tumoral (60).

Greastman (86) estudió el valor pronóstico que tenían los receptores hormonales en el cáncer de endometrio. Evaluó los niveles de receptores de esteroides, en 270 pacientes con carcinoma de endometrio en estadio I y II, y comparó con otros factores pronósticos con análisis univariantes y multivariantes. Como resultado obtuvo que las pacientes con receptores positivos tenían una mayor supervivencia que otras pacientes con receptores negativos, por lo que determinó que los receptores hormonales en el carcinoma endometrial parecen ser un importante factor pronóstico.

Igualmente, examinó la relación de los receptores hormonales con otros factores clínico-patológicos como el estadio precoz, el grado histológico, la profundidad de invasión, la afectación del cérvix, la presencia de metástasis extrauterinas o nódulos linfoides o la presencia de células malignas en el lavado peritoneal. Investigó cada uno de los receptores independientemente con cada uno de los factores y vio que la presencia de RE se asociaba significativamente ($P < 0.01$) con diferenciación histológica, diferenciación nuclear, y menor número de metástasis extrauterinas. Sin embargo, no encontró relación significativa entre los RE y la invasión miometrial, la afectación cervical y la citología peritoneal.

También vio que había menos RE positivos en lesiones de los adenocarcinomas papilares y los carcinomas de células claras.

Los RP resultaron tener una asociación significativa ($P < 0.05$) con el subtipo histológico y diferenciación histológica. El resto de los factores clínicos no se asociaron con los receptores de progesterona.

Al estudiar conjuntamente los RE y RP encontró una asociación significativa ($P < 0.05$) con la diferenciación histológica, la citología peritoneal positiva, las metástasis demostradas histológicamente y la categoría histológica.

Al analizar los receptores esteroideos por separado (RE, RP y RE/RP), se vio que cuando las lesiones eran positivas para dichos marcadores, había una mayor supervivencia libre de enfermedad que cuando los receptores eran negativos.

Parece que los niveles de receptores son un importante predictor de cómo responderá el tumor a los tratamientos con progesterona.

Friberg y Norén (70) hicieron un estudio prospectivo sobre el valor pronóstico de los receptores esteroideos para una supervivencia de 5 años en el estadio II del cáncer de endometrio. Se utilizó la técnica de DCC (dextrano coated charcol). Se examinaron 57 pacientes con estadio II de carcinoma de endometrio, de ellas un 16% bien diferenciados (Grado 1), un 45% moderadamente diferenciados (Grado 2) y un 39% pobremente diferenciados (Grado 3). Todas las pacientes recibieron tratamiento radioterápico intracavitario o cobaltoterapia en el canal cervical y vagina durante 4 semanas tras la cirugía o el legrado y 37 de estas pacientes recibieron irradiación externa.

Según este estudio, 3 pacientes mostraron negatividad para los RE (1 de grado 2 y 2 de grado 3) las cuales tenían también RP negativos.

Un total de 19 pacientes mostraron negatividad para los RP (2 de grado 1, 3 de grado 2 y 14 de grado 3).

La supervivencia total a los 5 años fue de 82% (47 de 57 pacientes).

Se encontró correlación entre la concentración de receptores y el grado tumoral, con una diferencia significativa entre grado 1 y 2 con los de grado 3.

Todas las pacientes con RE negativos sobrevivieron al igual que todas las pacientes con RP negativos en los grados 1 y 2.

De las pacientes con grado 3 que murieron, 4 de las 6 tenían RP negativos y de las pacientes con grado 3 que sobrevivieron 10 de las 16 tenían RP negativos.

Como conclusión vieron que no había diferencias significativas entre la concentración de RE y RP entre las mujeres que sobrevivían a los 5 años y las que morían.

Carcangiu (25) y Chambers (30) investigaron la correlación entre los factores clínicos e histológicos con los receptores de estrógenos y progesterona por métodos inmunohistoquímicos. Para el estudio revisaron una serie de 183

casos de carcinoma primario endometrial y se valoró en cada uno de los casos la expresión de RE y RP en el componente benigno y maligno de cada una de las piezas (epitelio benigno, estroma y miometrio), que fue examinado separadamente así como la intensidad de la tinción tumoral.

Los adenocarcinomas endometrioides demostraron tener el más alto grado de positividad para ambos receptores seguido por carcinomas adenoescamosos, carcinoma seroso y carcinoma de células claras.

La positividad para RE y RP del componente maligno fue correlacionado estadísticamente con el estadio de la FIGO ($P < 0.001$) y el grado nuclear ($P < 0.0001$) de los tumores.

No encontró asociación entre la profundidad de invasión miometrial y cada uno de los receptores en el componente maligno. Hubo una asociación significativa entre la presencia de invasión de los vasos linfáticos y la positividad para los receptores de progesterona.

Los resultados de este estudio indican que los análisis inmunohistoquímicos de receptores esteroideos ofrecen una excelente alternativa al proceso bioquímico estándar.

En un estudio realizado por Henrick *et al* (98), examinaron la correlación entre RE y RP, y el tipo histológico, el estadio, la edad de las pacientes, los años desde la menopausia y el uso previo de estrógenos, todo ello en relación al carcinoma de endometrio. Para valorar los RE y RP utilizaron técnicas bioquímicas o inmunohistoquímicas..

Como resultado obtuvieron que los RE y RP determinados por técnicas bioquímicas o inmunohistoquímicas tenían una relación inversa ($P < 0.001$) con respecto a la clasificación de la FIGO y con el grado tumoral. Además encontraron una correlación inversa ($P < 0.0001$) entre el estadio clínico y los valores de receptores por métodos bioquímicos, que fue independiente del grado de la FIGO. La edad de las pacientes, los años transcurridos desde la menopausia

y el tratamiento previo con estrógenos, no se relacionaron con el contenido de receptores.

En la hiperplasia adenomatosa se encontraron altos niveles de receptores de progesterona.

Como conclusión obtuvieron que hay una correlación inversa entre el estadio clínico del carcinoma de endometrio y el contenido de RE y RP, pudiendo reflejar el desarrollo biológico del tumor.

Palmer *et al* (190) estudiaron la importancia de los receptores esteroideos en relación al pronóstico del carcinoma de endometrio. Para ello, estudiaron 349 mujeres con carcinoma endometrial primario con el fin de investigar la importancia pronóstica del contenido de receptores de estrógenos y progesterona.

Además se comparó la importancia pronóstica de dichos receptores con otros parámetros clínico-patológicos como la edad, el estado menopáusico, el grado histológico, la invasión miometrial.

La edad media de las pacientes fue 64'5, años con un rango de edad de 31-89 años. La media de receptores estrogénicos fue 46'5 fmol/mg (rango 0-1274 fmol/mg) y de receptores de progesterona fue 38'6 fmol/mg (rango 0-3022 fmol/mg). El análisis de este estudio confirmó la relación encontrada previamente en otros estudios entre estado de los receptores esteroideos y otros parámetros clínico-patológicos.

En consecuencia se vio que los receptores esteroideos se relacionaban más fuertemente con el grado histológico del tumor y con los tumores bien diferenciados, los cuales tienen un alto contenido de receptores. También se vio que a menor invasión tumoral mayor grado de receptores esteroideos.

Sin embargo para el resto de los parámetros como la edad y el estado menopáusico no se encontró asociación con los receptores.

Igualmente, estudios univariantes confirmaron que los RE y RP se asociaban significativamente y de forma directa con la supervivencia.

Ehrlich *et al* (55) realizaron un estudio en el cual contabilizaban los receptores esteroideos y los relacionaban con algunos parámetros clínico-patológicos en el adenocarcinoma de endometrio. Para ello tomaron una población de 175 pacientes con adenocarcinoma de endometrio y utilizaron la técnica Dextran-Charcol.

Los RE fueron determinados en 138 casos. De ellos, 92 tumores (52'6%) resultaron positivos para RP (>50 fmol/mg) de proteína en el citosol y 111 tumores (80'4%) resultaron tener RE positivos (>6fmol/mg).

La media de seguimiento fue de 27'3 meses (rango 1 a 152 meses).

Los RP se correlacionaron significativamente con el grado, el tipo histológico, la extensión del tumor, la edad, y la recurrencia del cáncer en estadio I. Sin embargo, no se encontró correlación entre los RP y el estadio clínico, la invasión miometrial, la citología peritoneal, los nódulos linfáticos retroperitoneales o la extensión al cérvix.

Los RE se correlacionaron con la extensión fuera del útero y el grado de recurrencia. La recurrencia en pacientes con estadio I de enfermedad fue significativamente más común si el tumor era negativo para RP, que si era positivo. La recurrencia fue también más común si los tumores eran negativos para RE, que si eran positivos.

La supervivencia fue superior para pacientes con RP positivos, con $P=0'001$. Además, la supervivencia en el estadio I y II fue también superior en pacientes con lesiones positivas para RP $P=0'13$, pero no había diferencias significativas entre pacientes supervivientes con RP positivos o RP negativos.

La edad de las pacientes fue determinada de acuerdo a los RP, siendo en pacientes menores de 50 años predominantemente positiva, mientras que en las mayores de 50 años era predominantemente negativa. Respecto a los RE y la edad no se encontraron diferencias.

Biggsby *et al* (15) hicieron un estudio en el que valoraron los RE y RP con el oncogén HER-2/neu en relación con el carcinoma de endometrio. Sus resultados

demonstraron que las células que exhibían tinción HER-2/neu con una intensidad 4+, no mostraban RP; mientras que aquellas que tenían una expresión >3 HER-2/neu mostraban RP positivos.

La inmunotinción de los RE y RP se localizó a nivel nuclear en todos los casos de este estudio. Tanto en las células del endometrio secretor como en las células neoplásicas la tinción epitelial fue heterogénea, había tanto células positivas como negativas y la intensidad de tinción era variable de unas células a otras. Se encontró una relación inversa entre los RE y RP, y el HER-2/neu, en consecuencia las células que sobreexpresaban HER-2/neu eran negativas para RP.

Wang *et al* (252) realizaron un estudio en el que analizaban la sobreexpresión de c-erbB-2, el factor de crecimiento epidermal y los receptores de estrógenos y progesterona, en el carcinoma de endometrio. Sus resultados afirmaron que la expresión de factor de crecimiento junto con la expresión de la proteína c-erbB-2 se expresaba más frecuentemente con estadio avanzado de enfermedad, mientras que la correlación era inversa con el grado de diferenciación y con el grado de expresión de RE y RP.

Bergeron *et al* (14) realizaron un estudio para valorar la distribución de los RE en endometrio normal, hiperplasia de endometrio y tejido neoplásico. Su estudio reveló que los RE eran altos en el endometrio proliferativo y decrecía gradualmente durante la fase postovulatoria del ciclo menstrual, tanto en el epitelio como en el estroma. En los casos de hiperplasia el contenido de RE fue también alto tanto en el epitelio como en el estroma. En los casos de carcinoma se encontró una distribución heterogénea de los RE en el epitelio y el estroma, pero en general los RE fueron más bajos en comparación con la fase proliferativa del tejido normal o el endometrio atrófico. En algunos casos el contenido de RE en el estroma fue alto.

1.4.1.9. Expresión de RE y RP en otros tumores

Silver-Calvera y Salvadó-Usach (227) llevaron a cabo un estudio inmunohistoquímico de los RE en el cáncer de mama y su relación con algunos parámetros morfométricos. Para ello estudiaron 70 casos de carcinoma de mama.

La positividad inmunohistoquímica se localizó en el núcleo de las células con grados variables de intensidad. En los citoplasmas no se encontró generalmente tinción. En algunos casos existían áreas positivas y negativas en el mismo tumor, aunque cuando la intensidad era máxima la positividad solía ser uniforme.

Rayter *et al* (203), realizaron un estudio intentando relacionar el carcinoma de mama con los receptores esteroideos. La expresión de RE se vio que se incrementaba con la edad de las pacientes. Además, se correlacionó con el grado de diferenciación; cuanto mejor diferenciados estaban los tumores, mayor expresión de RE. Ciertos tipos histológicos de tumores menos agresivos, como el carcinoma lobular, el mucinoso y el tubular mostraban alta expresión de RE, mientras que con los tipos más agresivos como el tipo comedo y medular, rara vez contiene RE positivos. Además, opinó que los receptores esteroideos tienen un valor pronóstico limitado, aunque constituye el mejor marcador para predecir la respuesta al tratamiento endocrino.

1.4.2. ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN Ki-67

1.4.2.1. Introducción

En 1983, Gerdes *et al*, investigando la producción de anticuerpos monoclonales específicos para antígenos nucleares de células de Hodgkin y de Reedsternberg, describieron un anticuerpo monoclonal que reaccionaba selectivamente con el núcleo de las células en estadio de proliferación, al cual se le denominó Ki-67 (78).

El antígeno Ki-67, es una proteína nuclear humana de tipo no-histona. Está formada por una doble cadena polipeptídica de 345 y 395 KDa de peso molecular respectivamente. Se comprobó que esta proteína estaba ausente en el lisado de células quiescentes (81).

El estudio de la estructura primaria de ADN de la proteína Ki-67, mostró una secuencia sin homologías significativas con ninguna otra secuencia antes conocida (217); además esta secuencia muestra algunos rasgos inusuales.

El centro del ADN de la proteína está formado por un largo exón de 6.845 pares de bases (pb) compuesto por 16 repeticiones encadenadas (el Ki-67 “repeats”), las cuales contienen a su vez un elemento de 66 pb altamente conservado (el Ki-67 “motif”). Hoy se sabe que este codifica el epítipo reconocido por el anticuerpo Ki-67 (217).

El antígeno Ki-67 es rico en aminoácidos prolina y lisina, y estos están distribuidos al azar; tienen más de 100 sitios potenciales de fosforilación, y un posible punto de unión al ATP/GTP (adenosin trifosfato/guanidin trifosfato) adyacente al carboxilo terminal.

1.4.2.2. Ki-67 y ciclo celular

Diversos autores han demostrado que la distribución topográfica del antígeno Ki-67 es dependiente del ciclo celular (89). En la fase G₁ se localiza en la región perinuclear predominantemente, mientras que en las últimas fases del ciclo celular se localizan dentro del núcleo, sobretodo en la matriz nuclear (248).

En las células en mitosis, cada cromosoma se rodea de una compleja estructura visible al microscopio electrónico, que compone la capa pericromosómica, con una estructura distinta a la de los cromosomas y el citoplasma. Todo el cromosoma está recubierto por esta estructura, a excepción de la región centromérica. La capa pericromosómica está compuesta por proteínas nucleolares, así como por ribonucleoproteínas (RNP), algunas de las cuales han sido identificadas e incluyen: proteínas de la matriz nucleolar (pericromina, periferina), proteínas nucleolares (pericromonucleolina, antígeno Ki-67, proteína B23, fibrilarina, p103, p52) y proteínas ribosomales (S1).

Durante la profase precoz, las proteínas se extienden desde el nucleolo hacia la periferia del núcleo, donde hay unas estructuras que delimitan las áreas donde se condensan los cromosomas.

Durante la telofase, las proteínas se asocian con las partes de los cromosomas que quedan condensados y se acumulan en nucleolos nuevamente formados en regiones donde la cromatina está ya condensada (99).

Utilizando técnicas de inmunomarcaje, al hacer el estudio con microscopía nucleolar con láser confocal, se ha demostrado la acumulación pericromosómica del antígeno Ki-67 (248).

Durante la metafase, el Ki-67 aparece como una estructura reticulada alrededor del cromosoma, y durante la anafase y telofase, su inmunomarcaje disminuye rápidamente. Esto nos indica que la vida media del antígeno detectable es de alrededor de una hora (21).

El antígeno nuclear Ki-67 se ha demostrado su presencia en la fase G₁, S, G₂ y M del ciclo celular. A diferencia de otras muchas proteínas asociadas con el ciclo celular el Ki-67 está ausente en células en reposo G₀ (79), y no es detectable durante el proceso de reparación de ADN (92). El contenido nuclear de la proteína Ki-67 aumenta durante la fase S entre 5 y 6 veces, para posteriormente degradarse durante la fase G₂ del ciclo celular.

Dado que se ha demostrado consistentemente la presencia del antígeno nuclear Ki-67 en todas las fases del ciclo celular, excepto en la fase de reposo; este anticuerpo se ha considerado como un marcador de proliferación que identifica las células activadas o proliferantes y por tanto el grado de actividad proliferativa. Igualmente se ha demostrado que los datos de tinción nuclear para Ki-67 coinciden con la determinación de proliferación celular mediante la incorporación de precursores de ADN marcados radiactivamente (78).

Por lo tanto, podemos decir que la presencia del antígeno Ki-67 está estrictamente asociado con el ciclo celular y confinado al núcleo, habiéndose asociado a esta estructura en el mantenimiento y/o regulación del ciclo de división celular, pudiendo jugar un importante papel, dadas sus características físico-químicas, en la rotura del envoltorio nuclear previo a la mitosis.

1.4.2.3. Determinación del antígeno Ki-67

La técnica que Gerdes et al (78) utilizaron para determinar el anticuerpo, tenía el inconveniente de que sólo podía ser utilizada en tejidos en fresco o en congelación, debido a que el epítipo que reconoce no resiste la fijación rutinaria

mediante formol y parafina. Muchos otros investigadores como Key (127), Shi *et al*, (223), trataron de mejorar la técnica inicial de Gerdes *et al*, pero serían Cattoretti *et al* (27) quienes en 1992, consiguieron teñir los núcleos de las células, en muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina, utilizando un proceso de calentamiento en microondas.

Con las técnicas actuales de inmunohistoquímica, el antígeno Ki-67 se detecta a nivel nuclear independientemente del tipo celular en que se exprese y del punto del ciclo celular en que se encuentre, excepto en las fases de mitosis que el marcaje se extiende al citoplasma y en la fase G₀ de reposo que está ausente.

Actualmente se están utilizando técnicas microscópicas y no microscópicas para estudios de proliferación celular. Entre ellas tenemos:

a) Técnicas no microscópicas:

- Citometría de flujo.
- Medición de incorporación de nucleótidos radioactivos en replicación de ADN por recuento de líquido centelleante.

b) Técnicas microscópicas:

- Autorradiografía.
- Inmunocitoquímica.
- Contaje de mitosis.

En general, las técnicas microscópicas son usadas para determinar en el tejido la cantidad de células y la localización de las células en proliferación. Sin embargo, las técnicas no microscópicas permiten un simple análisis cuantitativo de la proliferación celular y crecimiento celular.

Las técnicas de autorradiografía, emplean fósforo radiactivo y timidina tritiada, que son incorporadas a las células que duplican su ADN (fase S del ciclo celular) y juegan un papel fundamental en el estudio del ciclo celular. Dada su alta sensibilidad, estas técnicas permiten no sólo la localización de las células en

replicación en el tejido, sino que además también determinan varios parámetros cinéticos en células en renovación. Sin embargo las técnicas que utilizan nucleótidos radiactivos tienen algunos inconvenientes, como el peligro que conlleva la manipulación del material, o la imposibilidad de su aplicación en tejido humano.

La identificación de proliferación, relacionado con antígenos, junto con la producción de anticuerpos específicos para su detección, abre nuevas perspectivas en el estudio del ciclo celular. Así, la detección inmunoquímica de antígenos de proliferación es fácil de realizar, rápida y además de alta resolución. Estos métodos también se pueden utilizar para detectar marcadores endógenos de proliferación tales como el antígeno Ki-67 y el antígeno de proliferación nuclear y pueden ser aplicadas en tejidos humanos.

Existen marcadores exógenos de proliferación, como el bromo y el yodo-desoxiyuridina, los cuales han sido utilizados para obtener detalles cinéticos en pacientes terminales, pero los efectos mutagénicos de estos nucleótidos en células eucariotas restringe su aplicación en humanos.

Una interesante posibilidad que ofrecen los métodos inmunohistoquímicos microscópicos es la detección simultánea de múltiples antígenos en el mismo caso o en la misma sección de tejido.

La técnica inmunocitoquímica y la citometría de flujo son técnicas inmunoquímicas complementarias. Las técnicas inmunocitoquímicas demuestran dónde y cuales son las células en proliferación, pero la cuantificación de los resultados puede ser difícil o costar mucho tiempo su realización. La utilización de técnicas de citometría de flujo, permite correlacionar la expresión del ciclo celular relacionado con antígenos, con el contenido nuclear de ADN, el cual es el parámetro básico para evaluar la posición de la célula en el ciclo. Además los análisis de citometría de flujo, proporcionan fácilmente detalles cuantitativos. Sin embargo puede perderse alguna información concerniente a la posición de la célula dentro del tejido.

Método inmunohistoquímico utilizando el anticuerpo Mib-1, reconoce el antígeno Ki67 en material fijado e incluido en parafina, por lo que resulta idóneo para calcular la fracción de proliferación de una población celular. Al utilizar dichos anticuerpos se expresa el antígeno Ki 67 en el núcleo de las células positivas. Este sistema aporta rapidez y sencillez técnica y permite la aplicación de análisis de imagen para cuantificar la fracción de proliferación (41).

Inmunohistoquímicamente actualmente se utiliza el anticuerpo Mib-1 para la demostración del antígeno Ki 67 en secciones incluidas en parafina. La localización de la proteína es a nivel del núcleo independientemente de la extirpe celular en la que se expresa, y del punto del ciclo celular en que se encuentre, a excepción de la fase G₀ en la que como ya hemos señalado se encuentra ausente, y en la fase de mitosis en la que el marcaje se extiende al citoplasma. El patrón de tinción nuclear es habitualmente granular, con reforzamiento nucleolar ocasional (232).

En los últimos años, se están realizando múltiples estudios respecto a la proliferación de diferentes tumores buscando implicaciones tanto diagnósticas como pronósticas.

1.4.2.4. Expresión de Ki-67 en algunos tumores

El marcador de proliferación Ki-67 ha sido demostrado a nivel nuclear en múltiples tumores, como en el carcinoma de mama (4), carcinoma colo-rectal (197), linfoma de Hodgkin (80), tumores de piel (232), el carcinoma de cérvix (76).

El aspecto más interesante del estudio de la determinación de la expresión del antígeno Ki-67, reside en la posibilidad de poderlo establecer como factor pronóstico en diferentes neoplasias. Además también se ha relacionado con otros factores, tanto clínicos como histológicos, que influyen en el pronóstico de los tumores (127).

Al revisar la bibliografía existente sobre el índice de proliferación Ki-67, hemos encontrado algunos estudios en relación con algunos tumores, pero

desgraciadamente no hemos podido localizar ninguno en que estudiara la relación entre este marcador y el carcinoma endometrial, al cual nos referimos en nuestra investigación.

Soyer (232) investigó sobre la relación del índice de proliferación Ki-67 en tumores de piel. Para ello utilizó una muestra de 145 tumores melanóticos, de los cuales 38 eran nevus, 72 melanomas primarios y 35 melanomas malignos con metástasis. Todos ellos fueron teñidos con anticuerpo monoclonal Ki-67 con la técnica de los tres pasos de inmunoperoxidasa y se valoró a nivel de positividad de Ki-67 en el núcleo. Determinó que cuanto mayor es el grado de densidad de Ki-67, mayor es el grado de malignidad de los tumores melanóticos. Encontró también una relación significativa con el índice de Breslow, el nivel de invasión de Clark's y el grado de mitosis.

Por otro lado demostró que existían diferencias significativas entre el índice pronóstico Ki-67 y la supervivencia libre de enfermedad y el mismo índice con la aparición de metástasis.

Después del seguimiento de los pacientes durante 24 meses, encontró que cuanto mayor era la expresión de Ki-67, menor era la supervivencia y además era más frecuente encontrar metástasis

Garzetti *et al* (76) estudiaron el significado pronóstico de la inmunotinción con Mib-1 y el carcinoma cervical escamoso estadio I, con respecto al tamaño tumoral, la propagación linfática y secuencias clínicas.

Por otra parte investigaron también la posible relación entre el índice Mib-1 y la actividad de los Natural Killer. Para su estudio utilizaron 34 casos con carcinoma cervical escamoso estadio I, y encontraron una relación significativa entre la inmunotinción Mib-1 con el tamaño tumoral. En particular, los tumores de tamaño mayor de 3 cm tenían un mayor índice de Mib-1, comparando con los tumores menores de 3 cm. Además se encontró relación significativa entre el índice de proliferación y la extensión linfática. Por el contrario, no se comprobó relación entre el grado de diferenciación histológica y la inmunotinción Mib-1.

Por otra parte, el análisis de Cox mostró una relación significativa entre la inmunotinción y el tiempo de supervivencia libre de enfermedad, independientemente del tumor y la invasión linfática y vascular.

En resumen, se encontró correlación significativa entre tamaño tumoral, invasión vascular y linfática y supervivencia libre de enfermedad. No se demostró relación respecto al grado histológico.

Wintzer *et al* (259) estudiaron la relación entre el marcador de proliferación Ki-67 (Mib-1) y la mama, tanto en la mama sana, como con lesiones benignas y malignas. Sus resultados determinaron que la positividad de Ki-67 era más baja para los tejidos normales y benignos que para los carcinomas. Además, dentro de los carcinomas resultó que la positividad a dicho marcador aumentaba conforme mayor era el tamaño del tumor, mayor era el grado del tumor y cuando los ganglios linfáticos estaban afectados.

Sin embargo no encontraron relación entre el Ki-67 y el tipo histológico, ni con el estado premenopáusico, perimenopáusico o postmenopáusico o con las metástasis.

Por otra parte, sus resultados mostraron que el Ki-67 se correlacionaba inversamente con el nivel de progesterona (RP).

Respecto a la asociación de estos marcadores con la supervivencia no pudieron establecer si había o no asociación, ya que según el método estadístico que utilizaban, obtenían diferentes resultados.

Gerdes (80) relacionó el marcador Ki-67 con los linfomas no-Hodgkin, y determinó que dicho marcador tiene valor pronóstico en dichos linfomas.

Porschen *et al* (197) estudiaron el marcador de proliferación Ki-67 en los carcinomas colorectales, pero no encontraron relación entre dicho marcador y otros parámetros clínico-patológicos, como la edad, el sexo, el tamaño del tumor, la diferenciación tumoral o el estadio del tumor. Tampoco encontraron diferencias entre la zona periférica del tumor, la zona intermedia o la zona central.

1.4.3. *PROTEÍNA SUPRESORA TUMORAL P53*

La molécula P53 fue descrita por primera vez en 1979 por Lane y Crawford (146, 24) como una proteína de 53 KDa de origen no vírico, presente en células transformadas por el virus SV40 (Simian Virus 40), y desde el comienzo se relacionó con la transformación celular (24).

Pronto otros autores como Liezer (24, 162), confirmaron este estudio. Además, también se encontró esta proteína en células infectadas por el virus Epstein Barr (EBV) (24, 164) y por adenovirus (24, 215), así como en células transformadas por medios físico-químicos (24, 47) y en células tumorales primarias (24).

Por otra parte la P53 se encontró en células normales no transformadas como timocitos y células embrionarias. Aunque los niveles son muy bajos en comparación con los encontrados en las células transformadas. Este hallazgo hizo pensar que la presencia de la P53 no sólo se limitaba a la transformación celular, sino que también debía tener una función habitual dentro de la fisiología celular (24).

Esta proteína se expresa en todas las células del cuerpo, encontrándose los niveles más elevados en el timo, los testículos y el ovario (órganos que tienen un sistema activo de recombinación) (158).

La proteína P53 se encuentra en escasa cantidad en las células normales debido a su corta vida, entre 6 y 20 minutos dependiendo del tipo celular (24, 185). Así, la P53 mediadora de la actividad transcripcional se encuentra baja o ausente en células normales (158).

En el año 1983 se clonó y secuenció el gen de la P53 de ratón (24, 186) y un año más tarde se aisló el gen humano (24, 166).

El gen p53 humano, comprende 20 KB de ADN en el brazo corto del cromosoma 17 en posición 17p13.1 (158). Este hallazgo permitió relacionar este

gen con diferentes patologías en las que existía evidencia de alteración de este cromosoma. El gen está formado por 11 exones.

Inicialmente la P53 fue considerada una oncoproteína. A partir de 1989 Green (87) sugirió la posibilidad de que la P53 fuese en realidad un miembro de la familia de los antioncogenes, (tumor supresor de genes, oncogén recesivo o antioncogén), familia integrada básicamente por el gen del retinoblastoma (RB) (24, 87).

La diferencia esencial entre un oncogén y un antioncogén consiste en que mientras en el primer caso es la presencia del producto lo que determina la transformación (oncogén dominante); en el segundo, la causa del proceso de transformación es su ausencia o inactivación (oncogén recesivo) (24).

La existencia de este tipo de genes se sospechaba desde principios de la década de los setenta (24, 131). Esta suposición estaba basada en estudios de genética clásica, ya que los pacientes con retinoblastoma hereditario heredaban un alelo mutante inactivo (24, 132). Por lo tanto, el tumor aparece cuando el alelo normal sufre una delección o una mutación que lo inactive.

A mediados de la pasada década se identificó el gen responsable de la susceptibilidad para padecer retinoblastoma: el gen RB (24, 71). Posteriormente, se demostró que la inactivación del gen RB también puede contribuir a la génesis de otros tipos de neoplasia como osteosarcomas, carcinoma de pulmón, mama y vejiga (24, 71, 108).

La capacidad del p105-RB como antioncogén quedó patente cuando se demostró que la reintroducción de un gen RB normal en células de osteosarcoma y retinoblastoma suprime el fenotipo neoplásico (24, 109).

La p105-RB se identificó como una de las dianas celulares de los virus oncogénicos, principalmente adenovirus y SV40, al igual que ocurre con la P53. En el caso del virus SV40, el antígeno T forma complejos tanto con P53 (24, 146, 162) como con p105-RB (24, 46). Los adenovirus poseen dos oncogenes dominantes, E1A y E1B, que interactúan con p105-RB y P53 respectivamente

(24, 215, 258). Para Green, uno de los mecanismos por los cuales estos virus inducen transformación sería el secuestro de estas proteínas celulares mediante la formación de complejos con ellas.

Al revisar los clones de p53 utilizados en los experimentos de cotransformación (24, 119, 191) se ha demostrado que eran variantes con mutaciones puntuales, lo que ponía en cuestión los experimentos de transformación realizados hasta el momento. Paralelamente, se realizaron otros estudios de transfección, llevados a cabo con las variantes normales no mutadas (Wild-type) que han demostrado ser incapaces de inducir inmortalización o cotransformación con el oncogén ras (24, 171).

Las formas mutantes del gen p53 parecen diferenciarse de las normales en los siguientes aspectos: a) la capacidad de unión al antígeno T de SV40 disminuye o desaparece; b) formación de complejos con la proteína de 70 KDA de la familia heat shock proteins, hsc70, y c) en el caso murino, desaparece el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal Pab246 (24, 65, 236).

Varios grupos han demostrado que estos mismos p53 mutantes que forman complejos con la proteína hsc70 son capaces de formar complejos estables con la P53 normal (24, 57, 135). Las mutaciones se localizan en una de las zonas más conservadas de la proteína, es decir, en una zona de probable importancia para su actividad bioquímica.

1.4.3.1. Estructura de la proteína P53

La P53 es una proteína fosforilada de 53 KDA, de localización nuclear y con una secuencia conocida de 393 aminoácidos. Una característica de esta proteína es su alto contenido en prolina (10%), que es responsable de la diferencia observada entre el peso molecular real (43-45 KDa) y su movilidad electroforética, mucho más lenta que la que le correspondería por su peso (50-54 KDa) (24, 267).

La proteína P53 humana es heterogénea, mientras que la P53 murina tiene una movilidad electroforética homogénea. La P53 humana se presenta bajo la

forma de dos proteínas que migran con diferente movilidad, pudiendo coexistir ambas formas en una misma célula, como ocurre con ciertas líneas celulares linfoides (24, 37, 240).

Posteriormente se descubrió que la diferencia observada en la movilidad electroforética de la P53 humana es debida a la existencia de dos alelos, que se distinguen por la presencia de una arginina o una prolina a nivel del residuo 72. La presencia de una prolina en esta posición hace que la proteína migre más lentamente que cuando se trata de una arginina (24, 95, 167), mientras que la presencia de un doblete de P53 en la misma célula se explica por la coexistencia de dos alelos diferentes en ella.

Los 393 aminoácidos están distribuidos en 11 exones. Las regiones que codifican las proteínas se extienden desde el principio del exon 2 hasta el primer tercio del 11 (93, 24). En las regiones codificantes se encuentran cinco dominios altamente conservados que están codificados por los exones 2, 4, 5, 7 y 8, que son esenciales para la actividad funcional de la P53 y es donde se producen la mayoría de las mutaciones.

Posee un núcleo hidrofóbico altamente conservado, flanqueado en los terminales amino y carboxi por otros dominios de mayor carga. La porción central tiene una conformación flexible y es donde se localiza el lugar de unión para el antígeno T del SV40. Los dominios de unión al ADN, localizados en el carboxi terminal y encargados de la transcripción, probablemente, quedan fuera de las zonas donde más frecuentemente se producen las mutaciones, pero seguramente, con estas se altera la conformación nativa de la proteína, la cual es esencial para una función apropiada de la misma (68).

La proteína P53 tiene la capacidad de formar polímeros por sí misma, función que reside en el término carboxilo, de interactuar con algunas oncoproteínas víricas (proteína T del virus Simio 40 o SV 40, la E1 del adenovirus, la E6 del virus papiloma humano) y de interactuar con proteínas celulares (la proteína del shock por calor 70 o hsp70, la murina double minute 2 o MDM-2). Estas interacciones afectan a la actividad de la P53 y/o a su degradación.

Al ser la P53 una proteína fosforilada tanto en el término amino como carboxilo, la fosforilación en los diferentes residuos aminos se realiza mediante varias proteinkinatas. Los diferentes fenotipos inmunológicos de la P53 hallados en las células tumorales humanas podrían estar causados por diferencias en la fosforilación de la P53.

La P53 se ha encontrado en todos los vertebrados estudiados pero no en otras especies (156).

La proteína P53 está dividida en tres estructuras y dominios funcionales. El residuo del aminoácido terminal 1-42 interactúa con la maquinaria transcripcional de la célula. Cuando los residuos 1-42 se unen con una proteína (gal 4) que contiene un dominio de unión al ADN, la proteína híbrida intensifica la transcripción de un gen test, conteniendo secuencias de gal4, unido a ADN. Los residuos de P53 aminoácidos 22 y 23 que mediante este contacto con los componentes de la transcripción basal en una célula son residuos los cuales se unen a una TATA uniendo factores asociados a proteínas o TAF de 31,000 MN (TAF-31). Así, el residuo amino terminal P53 contacta el componente de la proteína TAF-31 de la TFIID factor basal de la transcripción y regula positivamente la transcripción de esta forma.

1.4.3.2. Funciones de la proteína P53

La proteína P53 se ha asociado con múltiples funciones a parte de su papel oncogénico. Se le ha implicado en casi todas las formas de estimulación e inhibición del crecimiento celular con funciones específicas, dependiendo de las especies y tejidos estudiados.

Parece ser que la P53 es requerida en los pasos más precoces de la inducción de la proliferación celular (147).

También es una proteína reguladora de la transcripción, capaz tanto de estimular como reprimir la expresión de diversos genes (148, 157).

Además, la P53 se une directamente al ADN, en una forma específica, lo que influye indirectamente, en la expresión génica mediante la interacción con otros factores de transcripción.

El gen supresor es muy importante en la inducción de apoptosis, (muerte celular programada). La P53 actúa a nivel del ciclo celular permitiendo la reparación del ADN cuando este ha sido dañado. En el caso de que no sea posible la reparación, las células dañadas son inducidas hacia la apoptosis (105).

Sin embargo la P53 mutada es inefectiva para producir apoptosis y se puede detectar en gran número de tumores principalmente carcinoma, y además se asocia con un peor pronóstico.

Bajo la influencia de citoquinas propias, también se ha asociado con la inducción de la diferenciación (233). Según estudios *in vitro*, podría regular el envejecimiento celular o senescencia (222).

Una de las principales funciones con que se ha relacionado la P53 consiste en una superimposición sobre otros niveles del control del ciclo celular. Esto ha sido sugerido por el hecho de que la P53 se encuentra sólo en vertebrados y además por su aparente falta de función, esencial durante el desarrollo embrionario normal.

Debemos señalar también, algunas de las acciones de la P53 en su papel de monitor de la proliferación celular y del ciclo celular y como determinante de la respuesta al daño del ADN, como son:

- Activación transcripcional de diversos genes: *mdm-2* (murine double minute), el cual realiza un control de realimentación negativa y neutraliza un aumento de los niveles de p53, el *gadd-45*, el *waf-1/cip-1*, gen que codifica la proteína p21, capaz de detener el ciclo celular.
- Unión a proteína murina double minute-2 (MDM-2) para formar un complejo inactivo.
- Activación de la creatinquinasa muscular.

- Posible supresión de la transcripción de una serie de genes mediante la inactivación de factores de transcripción.
- Unión no específica a diversas regiones del ADN de cadena única, como el que existe en regiones de reparación de ADN o en horquillas de replicación, favoreciendo la reparación de los pares de bases.

A pesar del gran número de funciones asignadas a la P53 aún queda por establecer la relevancia de cada una de ellas.

1.4.3.3. Mutaciones del gen p53

Las mutaciones del gen p53 actualmente se considera que es la alteración genética más frecuente en la patología tumoral humana.

Mutaciones de este gen se han encontrado en diversos tumores como, mama (241), pulmón (181, 17), colon (10, 201), esófago (251), hígado y vejiga (58), ovario y cerebro (116) y endometrio (22, 235). Además, se ha encontrado esta aberración genética en algunas lesiones premalignas (139).

La mutación del gen lleva consigo la síntesis de una P53 mutante sin control alguno sobre la proliferación celular. La delección del gen con ausencia de síntesis de p53 tiene consecuencias similares. Una de las particularidades del gen p53 es el carácter dominante de sus mutaciones/delecciones.

Los genes supresores tumorales se caracterizan de forma genérica por su carácter recesivo, por ello precisan mutación y/o delección de ambos alelos para dejar de ejecutar su acción. Sin embargo, el gen p53 es una excepción a esta norma porque la alteración de uno de los alelos es suficiente para perder su funcionalidad; incluso la mutación de uno solo de sus 393 aminoácidos puede alterar su capacidad vigilante (134).

Actualmente se cree que sólo las mutaciones que alteran la función supresora de la P53 de forma recesiva y además se acompañan de la pérdida de otro alelo, o las mutaciones en un solo alelo con efecto dominante oncogénico o

dominante negativo, podrán tener una influencia significativa en el fenotipo celular.

La importancia de la P53 radica en la estructura de la proteína y el efecto de mutaciones con sentido alterado (*missense mutations*) en su actividad. Es decir, en la mayoría de las proteínas la sustitución de un solo aminoácido conlleva, una disminución o una pérdida total de actividad, en cambio mutaciones puntuales en sitios específicos de la P53 pueden producir tanto un aumento de su actividad como la aparición de nuevas funciones, y en concreto funciones potencialmente oncogénicas (237). Por tanto, la probabilidad de que se active este gen como resultado de una mutación al azar, es mucho mayor que en otros genes, los cuales requieren mutaciones múltiples independientes para que se desarrolle su actividad o capacidad oncogénica.

Como ya hemos dicho la mayoría de las mutaciones de la P53 son mutaciones puntuales (*missense*) (94) a nivel de los dominios más altamente conservados del gen, localizados entre los exones cuarto al noveno.

Se ha planteado la posibilidad de que precisamente las mutaciones que proporcionan sentido alterado (*missense*) en estas localizaciones, se correlacionarían con una mayor expresión en la determinación inmunohistoquímica de la proteína P53 mutada.

Además, dentro de la proteína, se ha demostrado que hay una secuencia de aminoácidos localizados entre los residuos 234 y 258, que son particularmente sensibles a mutaciones relacionadas con la carcinogénesis (106, 194).

Las mutaciones se encuentran localizadas preferentemente en algunos de estos exones, aunque varían según las áreas geográficas (64). Así, en Estados Unidos, la mayoría de las mutaciones se han encontrado en el exón 7; en el Reino Unido en el exón 4 y en Japón en los exones 5 y 8. Estas diferencias podrían ser debidas a carcinógenos diferentes según las regiones, así como a diversos cofactores ambientales.

También se han encontrado diferencias en la mutación puntual de los aminoácidos. En el carcinoma hepatocelular, es frecuente la mutación del codón 249 en la que se produce una transversión guanina = tirosina (G = T), la cual se sabe que es causada por la exposición a la aflatoxina B1, mutágeno específico del hígado.

Esta alteración se ha observado en un 81% de los pacientes con hepatocarcinoma de China, Indonesia, Africa, y Thailandia, pero sólo en un 11% de los pacientes con hepatocarcinoma de Alemania, Japón, Estados Unidos y Taiwan (158, 106).

En el carcinoma de pulmón es frecuente la mutación del aminoácido 157 en donde se produce una transversión G = T que se cree es debida a la exposición a benzopirina, un componente de los cigarrillos (158).

Otras alteraciones encontradas en las mutaciones puntuales de los aminoácidos han sido: en el carcinoma de colon a nivel del codón 175, en el ovario a nivel del codón 273, y en el carcinoma de mama a nivel del codón 175 (158).

En la mayoría de los tumores con un alelo mutante del p53, el estudio del brazo corto del cromosoma 17 revela que durante el desarrollo del tumor el alelo normal del p53 se pierde, mientras que el alelo mutante se conserva (pérdida de heterocigocidad), lo que indica que se requiere la inactivación completa de la función del p53 normal para la transformación maligna y que la forma mutante del gen da una ventaja sobre el crecimiento de las células malignas (68).

Los lugares en los que se detecta una mayor frecuencia de mutaciones se denominan “manchas calientes de mutación” (“hot spots”). Se ha visto que existe relación entre las “manchas calientes” de daño del ADN, la capacidad para reparar el ADN y las manchas calientes de mutación (220).

Una mutación del gen p53 puede también ser heredada y en algunas familias pasa a través de su línea germinal. Estas familias tienen una alta incidencia de cánceres y han sido identificados algunos tumores como el sarcoma, en edad

temprana. También se ha visto en sujetos con síndrome de Li-Fraumeni, el cual se manifiesta en familias enteras con múltiples tumoraciones en diferentes tejidos (156, 158, 130).

En estudios con ratones a los que se ha inducido la mutación en todos sus genes p53, se ha visto que todos ellos han desarrollado cáncer en un periodo entre 3 y 6 meses (158, 53).

Todos estos datos han llevado a afirmar la posibilidad de que puede haber mutación del gen p53 de forma heredada o constitucional, lo que podría explicar la predisposición de algunos individuos a desarrollar cánceres (54, 68).

A pesar de todos los estudios realizados aún no se puede descartar que las mutaciones heredadas tengan diferentes propiedades que las adquiridas.

1.4.3.4. El ciclo celular y la proteína P53

El ciclo celular está regulado por una compleja asociación de moléculas reguladoras, entre las cuales se identifica a las ciclinas como las principales proteínas, así como sus enzimas las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs, CDK inhibidoras y otras proteínas).

La proteína P21 se une a las kinasas inhibiendo su acción mediante la inhibición de la activación de la ADN polimerasa delta, de esta manera, impide la liberación del factor de transcripción que permite la síntesis del ADN y la división celular (165, 200). Esta unión permite reparar el ADN antes de que la célula se divida y previene la replicación de un ADN dañado.

La proteína fundamental responsable de activar el gen que codifica la P21, el waf 1/cip1, es la P53 (165, 40). La síntesis de P21 (waf 1/cip1) es inducida por la acumulación de la proteína P53, en respuesta al daño del ADN (256).

A la P53, dentro del ciclo celular, se le ha considerado como un sensor molecular de la regulación del crecimiento celular.

La acción principal de la P53 se desarrolla a nivel de la fase G_1 del ciclo celular, impidiendo la entrada en la fase S (síntesis de ADN) y ayudando a asegurar únicamente la replicación del ADN intacto.

Se han encontrado niveles elevados de estas proteínas y de su RNAm en la fase tardía de G_1 o incluso en los periodos de transición G_0/G_1 y G_1/S , sugiriendo un papel importante en la progresión celular desde su estado de reposo G_0 , a una división activa S y por tanto en la síntesis del ADN (206, 169). En fases posteriores es difícil la valoración, ya que la proteína se deteriora rápidamente.

La integridad del genoma se mantiene gracias al trabajo de las actividades celulares que evalúan el estado mismo en un determinado punto y en un determinado momento, emitiendo señales para continuar o parar la progresión del ciclo celular y permitir la reparación del ADN dañado.

En el ciclo celular hay al menos dos puntos que se encuentran bajo control genético y se regulan en respuesta al daño del ADN. Estos son las transiciones entre las fases G_1 -S y entre las fases G_2 -M (149).

En estas transiciones hay puntos de control en los cuales las células retrasan su progresión en el ciclo celular para permitir la reparación antes de entrar en la fase S (en los casos en los que el daño pudiera ser perpetuado), o bien en la fase M (si la rotura pudiera resultar en la pérdida de material genético) (256).

Los puntos de control del ciclo celular son, por tanto, mecanismos de control de vigilancia que pueden detectar el daño del ADN y caminos de transducción de señales que transmiten y amplifican la señal hacia la replicación o la segregación de mecanismos y actividades en la célula.

Muchos de los hechos que conllevan la progresión hacia el punto de control G_2 son intracelulares, como por ejemplo, la terminación de la síntesis del ADN. Sin embargo, el paso G_1 a S está controlado por procesos extracelulares tanto en sentido positivo como negativo, como por ejemplo, la unión de proteínas reguladoras del crecimiento a receptores de la membrana celular (5, 149).

La P53 no es esencial para la progresión de la célula a través del ciclo celular y tampoco tiene un papel relevante en los procesos de desarrollo y diferenciación celular en condiciones fisiológicas. Esto se ha demostrado mediante la obtención de ratones genéticamente modificados en los que no se expresa este gen y la observación de que su desarrollo es normal (96). Sin embargo, la P53 regula negativamente el crecimiento y la división celular (165).

La gran diferencia observada entre los ratones que no expresan P53 y los ratones normales es que los primeros son mucho más susceptibles al desarrollo de tumores y poseen un comportamiento probablemente más agresivo del esperado (96).

Esto confirma el papel de la proteína P53 como supresora de la transformación neoplásica celular. La P53, mediante su unión a secuencias específicas de ADN, es capaz de inhibir la transcripción de genes adyacentes y así prevenir la proliferación celular incontrolada (82).

Un exceso de P53 normal en la fase G₁ tardía del ciclo celular impediría el paso a la fase S. También es posible que niveles normales de P53 puedan actuar en otros momentos del ciclo celular regulando negativamente la división celular. A pesar de esta influencia reguladora parece poco posible que la ausencia o pérdida de la P53 normal por sí sola, sea suficiente para desencadenar una división celular incontrolada. De hecho, algunas células tumorales pueden presentar una pérdida de su integridad genómica a pesar de tener los dos alelos del P53 normales, lo que sugiere que debe haber vías alternativas que permitirían saltar el papel de guardián del genoma de la P53.

La expresión de la proteína P53 está regulada en células no transformadas, por el propio “turnover” de la proteína y por los niveles de su RNAm. Las células transformadas tienen alterada esta regulación lo que supondría una alteración del control de la división de dichas células.

1.4.3.5. *Determinación inmunohistoquímica de la P53*

La proteína P53 ha sido objeto de numerosos estudios inmunohistoquímicos en los últimos años. Ello se ha debido principalmente a la disponibilidad de varios anticuerpos monoclonales y policlonales, la mayoría de ellos con posibilidad de uso en tejidos incluidos en parafina.

De forma genérica se ha aceptado que la proteína detectada con estos anticuerpos era la forma mutante, ya que el incremento en su vida media es capaz de causar una acumulación nuclear detectable con métodos inmunohistoquímicos (255).

Poseemos muchos anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, frente a epítomos diferentes de la proteína P53, y su reconocimiento puede verse afectado en gran medida por la conformación de la proteína.

Algunos anticuerpos tienen más afinidad por la proteína normal (Mab 421), otros por algunas formas mutadas (Pab 240 y Mab 240) y otros reconocen ambas (Pab 1801, Mab 1801, Pab 421, CM-1, DO-1,2 y 7, BP53-12).

Hay que tener en cuenta, que al igual que en todos los procedimientos de laboratorio, y en concreto en inmunohistoquímica, las condiciones de fijación y procesamiento de la muestra, el anticuerpo utilizado y la técnica empleada pueden inducir variaciones en el resultado final (66).

1.4.3.6. *Estudios de la expresión de la proteína P53 en carcinomas de endometrio*

Ito *et al* (114) investigaron la posible relación entre la sobreexpresión de la proteína P53 y el pronóstico del carcinoma de endometrio. Para ello estudiaron 221 casos de cáncer endometriode. Encontraron una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de P53 y la recurrencia de enfermedad.

Al realizar un estudio multivariante, se encontró que la sobreexpresión de P53 era un factor de riesgo independiente cuando lo comparaban con el estado clínico, el grado nuclear y la edad de las pacientes.

Para estos autores sus descubrimientos indican que la sobreexpresión de P53 puede ser un importante instrumento para identificar pacientes con alto riesgo de recurrencia, quienes de otra forma no son detectados por la clínica general y la evaluación patológica, especialmente en tumores en estado precoz. Por tanto, podría servir para planear el seguimiento y tratamiento de estos tumores.

Hamel *et al* (93) estudiaron el valor pronóstico de la expresión de P53 y del antígeno de proliferación nuclear celular (PCNA). Revisaron 221 casos de carcinoma de endometrio. En su estudio no encontraron evidencias que concluyan que la supervivencia libre de enfermedad difiera con respecto a la expresión de PCNA.

Por el contrario, la intensa expresión de P53 (66% o más del área nuclear teñida) fue significativamente asociada con compromiso del tiempo de supervivencia libre de enfermedad. Además la intensa expresión de P53 fue significativamente asociada con otros indicadores pronósticos, incluyendo el estadio, el grado, la profundidad de invasión miometrial, el subtipo histológico, la ploidia del ADN y la expresión de HER-2/neu.

Estudios multivariantes realizados identificaron cuatro factores pronósticos independientes para el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el carcinoma de endometrio: la intensa expresión de p53, el subtipo histológico, el estado de ploidia de ADN y la expresión de HER-2/neu.

Llegaron a la conclusión de que cuando ninguno de estos cuatro factores pronóstico estaban presentes de forma independiente, la supervivencia a los cuatro años era del 96%. Por el contrario, la supervivencia es del 63% cuando uno de estos factores está presente ($P < 0.001$) y del 40% cuando dos o más factores están presentes ($P < 0.001$).

Yu *et al* (265) estudiaron también la expresión del antígeno de proliferación celular nuclear y de la proteína P53 en el endometrio humano con alteraciones benignas y malignas. La inmunotinción del PCNA mostraba que la proporción media de células epiteliales glandulares era significativamente menor en hiperplasia atípica que en adenocarcinoma invasivo. La inmunorreactividad de P53 fue detectada en el 47% de los adenocarcinomas invasivos, y en una pequeña proporción de endometrios que mostraban hiperplasia simple e hiperplasia atípica, en estos casos de hiperplasia la tinción sólo fue focal.

Strang *et al* (235) estudiaron la mutación de la proteína P53 como un predictor de supervivencia en cáncer de endometrio. Estudiaron 183 mujeres con carcinoma de endometrio, de ellas un 55% fueron negativas, un 15% mostraron tinción débil, un 2% tinción moderada y un 28% fuerte.

La expresión fuerte de P53 (>75% de tinción celular) fue más frecuente en carcinomas papilares serosos de útero y en carcinomas de células claras que en otros subtipos de tumores de endometrio ($P < 0.001$).

También mostraron una fuerte expresión de P53 los tumores pobremente diferenciados ($P < 0.01$) y los tumores con grado nuclear 3 ($P < 0.0001$). En análisis multivariantes la fuerte expresión de P53 fue altamente predictivo de peor supervivencia con una $P = 0.006$.

Así, encontraron tanto en estudios univariantes como multivariantes que la fuerte expresión de la P53 nos indica un peor pronóstico.

Kohler *et al* (133) estudiaron la sobreexpresión y mutación de la P53 en el cáncer de endometrio. Para ello estudiaron 107 pacientes y vieron que se producía sobreexpresión de la proteína P53 en el 20% de los adenocarcinomas de endometrio. En los tumores que expresaban P53, la mayoría de las células epiteliales malignas mostraron tinción nuclear y las células del estroma que rodean al tumor eran siempre negativas.

En los casos con endometrio benigno no se observó sobreexpresión de P53. Se vio que la sobreexpresión era mayor en los casos de peor pronóstico: con

citología peritoneal positiva, tumor con extensión dentro del endocérvix, metástasis extrauterinas, etc.

Bur *et al* (22) también estudiaron la expresión de P53 en neoplasias del cuerpo uterino. Encontraron que la P53 se expresa en carcinomas endometriales y sarcomas y encontraron que los casos de fuerte expresión de P53 correspondían a los casos con estadio avanzado y alto grado. Además, observaron que detectaron más frecuentemente en carcinomas papilares serosos que en carcinomas endometrioides de cuerpo.

Riethdorf *et al* (208) evaluaron la presencia y distribución de la P53 en adenocarcinomas endometrioides de diferentes grados y estadios, y la compararon con endometrio normal y con varios grupos con diferentes grados de hiperplasia. Los casos de endometrio normal fueron negativos para la P53. Con el incremento de grado de malignidad aumenta el acúmulo de P53. Encontraron un rango de positividad del 9% al 18% en hiperplasias, hasta un 25% en carcinomas de grado bajo o G.1, y hasta un 69% en carcinomas de alto grado G.3. Este incremento también se vio cuando se estudiaba por estadios (Ia 17%, Ic 72%).

Kihana *et al* (128) estudiaron la relación entre la mutación y la pérdida de alelos del gen p53 en el carcinoma de endometrio. Investigaron la alteración del gen p53 en resecciones quirúrgicas de carcinoma de endometrio y demostraron que el gen p53 era un marcador genético significativo de un peor pronóstico para pacientes con este tumor. Examinaron la incidencia de ambas mutaciones del gen p53 entre el exon 5 al 8, y la pérdida del alelo del locus del gen p53. Sólo examinaron la mutación del gen p53 en el exon 5-8 porque el 95% de las mutaciones se encuentran en esta región.

Como conclusión estos autores sugieren que la alteración del gen p53, las mutaciones y la pérdida de heterocigocidad, pueden acumularse a través de varios pasos de la tumorigénesis endometrial, con genes alterados que causan mayor agresividad en el desarrollo del tumor y peor pronóstico.

Por otro lado, Zheng *et al* (268), hicieron un estudio para ver la sobreexpresión de P53 y la persistencia de bcl-2 en carcinoma de endometrio.

Compararon el carcinoma papilar seroso y el carcinoma endometriode. Para ello recogieron 42 casos, de los cuales 21 eran carcinomas papilar serosos y otros 21 carcinomas endometrioides. Para cada uno de los 42 casos utilizaron técnicas inmunohistoquímicas para P53 y bcl-2.

Al comparar los carcinomas endometrioides (28´6% positivos) y los carcinomas papilares serosos (71% positivos), se vio una diferencia significativa en la sobreexpresión de P53 ($P=0´005$). No se encontraron diferencias significativas al comparar el grado nuclear de ambos tumores con la sobreexpresión de P53. Sin embargo sí que se apreció que en los carcinomas papilares serosos había un brusco cambio en las glándulas morfológicamente benignas que no se teñían, en comparación con las regiones intraepiteliales del carcinoma con una positividad nuclear de P53 uniforme.

Por otra parte se observó en los carcinomas endometriales que había diferencias significativas en la inmunotinción con P53 entre tumores en estadio precoz y estadio tardío ($P=0´01$).

Estos autores sugirieron que las alteraciones de P53 pueden ser un suceso precoz en el desarrollo de carcinomas papilares serosos, y pueden también relacionarse con su agresividad clínica. En cambio, esto es un acontecimiento tardío en los carcinomas endometrioides. La detección precoz de acúmulo de P53 nuclear puede ayudar a identificar lesiones precursoras de carcinoma papilar seroso.

Respecto a lo referente a la proteína bcl-2 en relación con el carcinoma de endometrio nos referiremos en su capítulo específico.

Tashiro *et al* (239) estudiaron la relación entre la mutación del gen p53 y el carcinoma seroso. El carcinoma seroso es un tipo raro de carcinoma endometrial altamente agresivo, el cual se ha asociado con rápida progresión y peor pronóstico. El carcinoma seroso y su precursor el carcinoma intraepitelial, demostraron una fuerte sobreexpresión de p53 con técnicas de inmunohistoquímica, lo que sugiere que las alteraciones del gen p53 están relacionadas con su patogenia.

En este estudio analizaron 21 carcinomas serosos y 9 carcinomas intraepiteliales y examinaron la mutación del gen p53. Encontraron que el 90% de los carcinomas serosos y el 78% de los carcinomas intraepiteliales contenían esta mutación. La presencia de mutación del gen p53 en el carcinoma endometriode sugiere además, que la alteración de p53 juega un papel importante en la patogenia hacia el carcinoma seroso, posiblemente justificando el comportamiento biológico agresivo.

Berchuck *et al* (11) estudiaron la mutación de P53 en el carcinoma de endometrio. Encontraron que en su estudio se producía sobreexpresión de la proteína mutada P53 en 20% de los adenocarcinomas endometriales. Además, se observó que la sobreexpresión de P53 se asociaba a un estadio avanzado y una peor supervivencia. Sin embargo, no se encontró sobreexpresión de P53 en los casos de hiperplasia. Esto nos hace pensar que la sobreexpresión de P53 es un acontecimiento tardío en la carcinogénesis endometrial.

Reinartz *et al* (207) hicieron un estudio en el que examinaban la expresión de la P53, el factor de transformación de crecimiento alfa (TGF alfa), el receptor del factor de crecimiento epidermal (TGF) y el c-erbB-2 en carcinomas de endometrio. Encontraron que el aumento de la tinción de p53 y TGF mostraba una correlación estadísticamente significativa con la disminución de la supervivencia ($P < 0.0017$ y $P < 0.0013$ respectivamente).

Además, la inmunoreactividad de P53 se correlacionaba con el tipo tumoral, el grado y el estadio. El factor de crecimiento transformado no se correlacionó con la duración de supervivencia u otras variables pronósticas. El marcador c-erbB-2 se correlacionó con el grado de tumor.

En el análisis multivariante, la tinción con P53 y TGF alfa no fue un factor predictor de supervivencia independiente cuando otras variables eran tenidas en cuenta (grado, estadio, tipo tumoral, presencia de invasión vascular y profundidad de invasión). El grado y el estadio fueron los únicos predictores independientes de supervivencia cuando se utilizaba el modelo de Cox. Estos resultados fueron compartidos por Bur (22) y Kohler (133).

1.4.3.7. Relación de la proteína P53 con otros tumores

Purdie *et al* (201) estudiaron la expresión de P53 en tumores de colon. Vieron que había una asociación entre la aparición de expresión de P53 y el comportamiento infiltrativo del tumor, pero no con el grado de progresión del mismo (incluyendo metástasis).

Wibstuba *et al* (260) estudiaron la sobreexpresión de la proteína P53 en lesiones premalignas y carcinomas invasores de vejiga, y además correlacionaron la expresión de P53 con el tipo histológico, el grado de diferenciación y el nivel de invasión del tumor. Para el estudio se utilizaron 52 carcinomas de vejiga, 47 carcinomas *in situ*, 34 displasias y 10 sujetos con tejido normal con colecistitis.

La sobreexpresión de P53 fue encontrada en el 65´4 % de los carcinomas, en 44´7% de carcinomas *in situ* y en 32´4 % de las displasias. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de P53 en lesiones premalignas asociadas con carcinoma invasivo y otros que no lo eran. El epitelio normal y metaplásico no expresaron proteína P53. En adenocarcinomas, no se encontró correlación entre la sobreexpresión de proteína P53 y el subtipo histológico, el grado de diferenciación o el nivel de invasión.

La alta incidencia de sobreexpresión en carcinomas de vejiga y su presencia en displasia, incluso en especímenes sin carcinoma invasor, sugieren que esta anomalía es un importante y precoz acontecimiento en la patogénesis del tumor.

El progresivo incremento en la incidencia de sobreexpresión de P53 observada de lesiones premalignas a tumores invasivos, proporciona una ayuda añadida para ver que es una ruta normal para el desarrollo de carcinoma de vejiga infiltrante.

1.4.4. ONCOPROTEÍNA Bcl-2

El gen *bcl-2* fue originalmente identificado en el punto de la translocación entre los cromosomas 14 y 18, t(14; 18) comúnmente encontrada en linfomas de

células B (83, 33). En estudios posteriores se detectó también el gen *bcl-2* en estos tumores aun sin dicha translocación (38).

Mediante técnicas de Southern Blot, se vio que esta anomalía citogenética se localiza en el brazo largo del cromosoma 18, en el segmento 21 (18q21) (33).

La proteína que este gen codifica es estructural y funcionalmente única, y no tiene homología significativa con otras proteínas celulares conocidas (188, 152). Además se ha visto que contribuye a la expansión de células malignas primarias, por prolongar la supervivencia celular, más que por incrementar la proliferación celular (16).

El mecanismo específico por el cual la proteína Bcl-2 prolonga la supervivencia celular es aún un enigma. Lo que sí se ha podido comprobar es que el alto nivel de proteína Bcl-2 retarda o bloquea en varias circunstancias la muerte celular programada (apoptosis) (103).

1.4.4.1. Apoptosis

El concepto de apoptosis nació en Australia en 1971, refiriéndose a una forma de muerte celular observada en la atrofia. Pero fueron Kerr, Wyllie y Currie quienes juntos, en 1972, propusieron el término apoptosis para un tipo de muerte celular diferente a la necrosis (126, 174).

La apoptosis es una forma activa de suicidio o muerte celular, la cual ocurre tanto en condiciones fisiológicas (en las que la apoptosis es esencial), embriogénesis, crecimiento y diferenciación, como en condiciones patológicas, daño tóxico, infecciones virales, respuesta inmune o en tumores (254).

La cantidad de células que hay en los tejidos es regulada por un equilibrio balanceado entre proliferación, diferenciación y pérdida celular por apoptosis. Cuando este equilibrio se pierde, aparecen alteraciones de los mecanismos de apoptosis o de diferenciación terminal, causantes de la aparición de atrofia, hiperplasia y cáncer.

Actualmente se conocen dos mecanismos operativos en la activación de la apoptosis:

- Muerte por defecto: en este caso la muerte se produce por un método pasivo, cuando faltan los contactos intercelulares requeridos o por ausencia de factores tróficos necesarios para suprimir la apoptosis.
- Suicidio activo: en este caso la activación de la apoptosis es un proceso activo, mientras que las señales que aumentan con el grado apoptótico inducen la muerte celular rápida.

El proceso de la apoptosis se ha subdividido en tres diferentes fases: fase de iniciación, fase efectora y fase de degradación. La familia de la Bcl-2 parece que está implicada en la fase efectora de la apoptosis (138).

La regulación genética de la apoptosis aún no se conoce con exactitud. Los genes más conocidos implicados en su control son el c-myc, p53 y bcl-2 (18).

La expresión de Bcl-2 va unida a una resistencia a la apoptosis (205).

La familia de la Bcl-2 incluye a un grupo de proteínas que pueden ser divididas en dos clases. Un grupo que son antagonistas de la muerte celular al sufrir la apoptosis (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, BraG.1, Mcl-1 y A-1) y otro grupo que son agonistas de la misma (Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bid, Bik y Hrk) (138, 31, 104).

La dimerización parece que es esencial en la función de estas proteínas como antagonista o agonista de la muerte celular. Por tanto, es la proteína derivada del oncogén Bax, la que permite la activación de otros genes para inducir apoptosis. Además, cuando se producen asociaciones de algunos genes, como BaG.1 o Raf-1, con Bcl-2 se facilita la presencia de mutaciones y la transformación maligna.

La proteína Bax es capaz de formar heterodímeros con Bcl-2 que inhiben la apoptosis. El Bax homodímero promueve la apoptosis, sin embargo el

heterodímero Bax/ Bcl-2 inhibe la apoptosis, y éste a su vez, es probablemente regulado por el p53, gen supresor tumoral (38, 234).

La sobreexpresión de bcl-2 puede bloquear la apoptosis inducida por c-myc y E2F (16), sin embargo c-myc y E2F en ausencia de Bcl-2 activan el programa de apoptosis e inducen la apoptosis cuando las células están desprovistas de factores de supervivencia.

La expresión de Bcl-2 ha sido descrita en numerosos tumores sanguíneos, como en linfomas foliculares (246, 77, 221), linfoma de Hodgkin (121) y en otros tumores como carcinomas de pulmón tanto de células pequeñas como de células no pequeñas (9, 195), carcinoma de próstata, carcinoma de mama (28) y carcinoma de endometrio (29).

Además, se ha encontrado también expresión de bcl-2 en tejido normal a nivel embrionario del germen del cabello.

El aumento de expresión del Bcl-2 en algunos tumores, principalmente carcinomas de mama, pulmón y colon, tiene importancia sobre todo en lo que se refiere a la respuesta al tratamiento.

La Bcl-2 se ha visto que se expresa preferentemente en tumores de origen muscular, en los que curiosamente no se correlaciona con la expresión de P53 (231).

1.4.4.2. Estructura de la proteína Bcl-2

La proteína bcl-2 humana es una proteína intracelular que forma parte de las membranas celulares y tiene una masa molecular de aproximadamente 26 KDa (61, 91, 103).

La capacidad de p26-Bcl-2 para asociarse con las membranas ha sido atribuida a una extensión hidrofóbica de aminoácidos localizados cerca del carboxi terminal (231).

Es importante llegar a concretar donde se encuentra localizada esta oncoproteína, ya que podría ser importante para descifrar su mecanismo de acción

(137). Muchos autores han estudiado su localización exacta dentro de la membrana intracelular, pero todavía es un tema polémico.

Hockenbery *et al* (103) publicaron que la Bcl-2 se encontraba principalmente en el interior de la membrana mitocondrial.

Chen-Levy *et al* (61), utilizando otros métodos, vieron que la mayoría del residuo Bcl-2 reside en la membrana perinuclear, con la mitad de proteínas asociadas al núcleo y el resto con otras membranas intracelulares.

Jacobson *et al* (174, 137) han obtenido evidencias de que la proteína Bcl-2 puede estar dentro de las membranas del retículo endoplasmático, puede envolver al núcleo e incluso formar parte de la membrana mitocondrial.

Recientemente, en un estudio publicado por Kroemer en 1997, afirma que la mayoría de las proteínas que son codificadas por la familia del gen Bcl-2 se localizan preferentemente en el exterior de la membrana mitocondrial, como son Bcl-2, Bcl-X_L, Bax. Además observó que la Bcl-2 también se encuentra en la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático (204, 262). También descubrió que la bcl-2 en la membrana mitocondrial tenía una distribución parcheada en el punto de contacto entre la membrana externa e interna (138).

Pero a pesar de todos los estudios realizados, debemos tener en cuenta que los diferentes resultados observados, podrían ser debidos al empleo de diversos métodos de estudio y a los diferentes anticuerpos empleados.

1.4.4.3. Mecanismo de acción de la proteína Bcl-2

El mecanismo específico por el cual la proteína bcl-2 prolonga la supervivencia celular es aún un enigma. Lo que sí se ha podido comprobar es que el alto nivel de proteína Bcl-2 retarda o bloquea la muerte celular programada (apoptosis) (103).

La sobreexpresión de bcl-2 se ha asociado a múltiples cambios asociados a la apoptosis entre ellos se incluye la alteración del estado celular redox (la cual lleva a deplección de glutatión y generación y acción de radicales de oxígeno),

cambios en la membrana, cambios en la distribución de iones subcelulares (Ca^{2+} , H^+), activación de caspasas y rotura en la transmembrana mitocondrial (138).

De acuerdo con las diferentes teorías, se ha formulado que la Bcl-2 puede actuar como un antioxidante (104), como un regulador intracelular de iones (143), como un inhibidor de proteasas y como un agente mitocondriótico (138).

1.4.4.4. Expresión de la proteína Bcl-2 en carcinomas endometriales

Chan *et al* (29) estudiaron la relación entre la proteína Bcl-2 y el endometrio, tanto con la hiperplasia típica (simple y compleja) como con la hiperplasia atípica y con el adenocarcinoma de endometrio. Los resultados que obtuvieron fueron los que comentamos a continuación.

Para la hiperplasia típica (simple y compleja), de los 10 casos estudiados todos mostraron tinción citoplasmática uniforme dentro de las glándulas, mientras que en el estroma endometrial sólo dos casos fueron positivos.

De los 10 casos de hiperplasia atípica, 8 demostraron expresión de bcl-2 en las glándulas aunque, comparada con la de los casos de hiperplasia no atípica, la intensidad era más débil y de distribución más parcheada. Esta diferencia era especialmente evidente cuando había áreas adyacentes con zonas de hiperplasia atípicas y típicas. El estroma fue bcl-2 negativo en la mayoría de los casos.

Fueron estudiados un total de 25 adenocarcinomas de endometrio, los cuales fueron divididos en 10 bien diferenciados, 8 moderadamente diferenciados y 7 poco diferenciados.

La expresión de bcl-2 mostró una clara correlación con el grado del tumor. Así 9 de los 10 tumores bien diferenciados tenían una moderada tinción y 6 de los 7 poco diferenciados eran negativos. Los moderadamente diferenciados formaban un grupo indeterminado.

En los casos positivos para Bcl-2 la tinción tendía a ser variable y parcheada, al igual que en los casos de hiperplasia atípica.

Zheng *et al* (268) hicieron un estudio referente a la sobreexpresión de P53 y Bcl-2 en el carcinoma de endometrio, comparando la expresión en el carcinoma papilar seroso y en el carcinoma endometriode.

En la inmunotinción de Bcl-2, se vio que los carcinomas endometrioides tenían una tinción significativamente mayor que los carcinomas papilares serosos ($P=0'0002$). La intensidad de tinción de Bcl-2 era mayor en la fase proliferativa que en la secretora. Conforme las alteraciones del endometrio aumentaban la malignidad, disminuían su intensidad de la tinción, llegando a ser negativa en el carcinoma papilar seroso.

Gompel *et al* (83), hicieron en 1994 el primer estudio sobre la expresión de bcl-2 en el endometrio, relacionándolo con las diferentes fases hormonales del ciclo menstrual.

En la fase folicular vieron que la inmunolocalización de bcl-2 estaba confinada al epitelio glandular, situándose la tinción predominantemente en la capa basal. La tinción fue uniforme por todo el citoplasma. Las glándulas eran positivas con alguna rara excepción. Conforme avanzaba esta fase del ciclo el número de glándulas positivas y la intensidad de las mismas se incrementaba gradualmente. El epitelio superficial fue negativo.

En la fase luteínica, la tinción para bcl-2 desaparecía del epitelio glandular tan pronto como aparecían características secretoras. En zonas donde las glándulas eran aún proliferativas mostraban positividad.

De 2 a 3 días después de la ovulación hasta el final del ciclo, las células del epitelio glandular no mostraban tinción, en cambio durante los últimos días de esta fase del ciclo aparecía una positividad irregular. La tinción era granular distribuida en grupos y confinada a ciertas partes del citoplasma.

En esta fase el estroma era positivo sobre todo alrededor de las arterias espirales y en la periferia de las glándulas, pero esta tinción era más débil que la observada en las glándulas durante la fase proliferativa. Las arterias espirales mostraban también tinción positiva.

En los casos de hiperplasia se observó expresión de Bcl-2 en todos los casos. El nivel de expresión era de mayor intensidad que en el tejido normal, incluso al final de la fase folicular. Todas las células epiteliales eran positivas con una intensidad máxima.

En el miometrio las células captaban tinción intensamente. Las células del miometrio tenían alta intensidad de tinción, y era granular en el área perinuclear.

Otsuki *et al* (188) estudiaron la distribución de la proteína bcl-2 y los receptores hormonales esteroideos en el útero humano a través del ciclo menstrual. Al igual que Gompel, observaron un incremento en la expresión de Bcl-2 desde la fase proliferativa precoz a la tardía, comenzando a disminuir a partir de la fase secretora precoz y desapareciendo su expresión en la fase tardía secretora y la menstruación.

El patrón de expresión de bcl-2 en las células de las glándulas endometriales era relativo a los cambios en los RE y RP a través del ciclo, y se relacionaba sobre todo con los receptores estrogénicos.

1.4.4.5. *Expresión de la proteína Bcl-2 en otros tumores*

Monsier *et al* (174) hicieron un estudio inmunohistológico en el que analizaban la expresión simultánea de bcl-2 y la oncoproteína P53 en tumores epiteliales de colon y recto, comparándola con factores pronóstico-histopatológicos, como el grado o la clasificación TNM (tumor, nódulos metástasis). Para ello estudiaron 6 pólipos hiperplásicos de colon, 33 adenomas y 61 carcinomas.

La Bcl-2 se expresó en el 85% de los adenomas, mientras que la P53 sólo se expresó en un adenoma, el cual tenía áreas de carcinoma *in situ*. El 50% de los carcinomas colorectales coexpresaron las dos oncoproteínas. Se vio que no había correlación entre el número de células que expresaban Bcl-2 y las que expresaban P53 en un carcinoma determinado. Tampoco hubo correlación entre la expresión de Bcl-2 o P53 y los factores pronósticos establecidos.

Como conclusión, estos autores demostraron que la expresión de la oncoproteína Bcl-2 aparecía más precozmente que el acúmulo de P53 en la carcinogénesis colo-rectal. Este estudio sugiere que hay más de una secuencia y mecanismos del gen Bcl-2 y P53 en la regulación del carcinoma colo-rectal.

Crowson *et al* (38) realizaron un estudio en el que buscaban la asociación que había entre la proteína Bcl-2 y los carcinomas basales (basaliomas). Para ello estudiaron 30 casos con dicho tumor y observaron que 28 expresaban la proteína bcl-2 (93%). Además, pudo comprobar que la expresión del tumor era mayor en la superficie del tumor (parte de menor agresividad del tumor), mientras que en la parte de crecimiento más agresivo la expresión era menor (38).

1.4.5. ONCOGÉN *c-erbB-2*

El oncogén *c-erbB-2* fue descubierto en los años ochenta por tres diferentes vías de investigación (153).

El oncogén *neu* fue detectado como un gen mutado, en estudios experimentales con fetos de rata a las que se les inducía un neuroblastoma (153).

El gen humano *c-erbB-2* fue descubierto por su homología al gen retroviral *v-erbB* y el HER-2. Fue aislado por screening en el ADN humano también por homología al *v-erbB*. Cuando se estudiaron las secuencias de ADN se vio que el *c-erbB-2*, HER-2 y el *neu* representaban el mismo gen (153).

1.4.5.1. Estructura del proto-oncogén *c-erbB-2*

El proto-oncogén *c-erbB-2* está localizado en el cromosoma 17 en la banda 21 (17q21) (124, 3, 153) y codifica la síntesis de una proteína transmembrana p 185 (42).

Esta proteína es un componente normal de la membrana citoplasmática. El oncogén *c-erbB-2* es homólogo, pero no idéntico al *c-erbB-1* (124, 42, 107, 153, 404), el cual se localiza en el cromosoma 7 y codifica el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (3, 107, 153).

La proteína c-erbB-2 es una proteína transmembrana con actividad tirosina-quinasa extracelular, transmembrana e intracelular (153, 42) y se expresa en todas las células epiteliales (153).

La activación del gen para la producción de neoplasias en las ratas parece deberse a una simple mutación puntual, un cruce de A-T (adenina-timidina) (52, 3, 42).

Sin embargo, en tumores humanos se ha visto que se produce una alteración en la amplificación y en la expresión del c-erbB-2 (42, 52, 228), aunque casi siempre compromete casi exclusivamente la amplificación del gen (153).

La amplificación del gen nos lleva a una repetida duplicación de una secuencia del gen, dando lugar a múltiples copias del mismo dentro de cada célula (153), lo que nos lleva a la sobreexpresión del gen. Por ello se dice que hay una buena correlación entre la amplificación del c-erbB-2 y la sobreexpresión (59, 85, 153).

1.4.5.2. Técnicas de estudio del C-erbB-2

El c-erbB-2 puede ser estudiado por varias técnicas: la amplificación del gen puede ser detectada por Southern Blot (153, 176, 229), Slot Blot (153, 229), PCR (protein chain reaction) (153, 163), etc. La sobreexpresión RNA puede ser detectada por Northern Blot, RT-PCR, etc. (153, 176, 163, 230); mientras que la sobreexpresión de proteínas es más conveniente detectarla con técnicas de inmunohistoquímica o Western Blot y citometría de flujo (153, 176, 198, 160).

1.4.5.3. Expresión del oncogén C-erbB-2 en el carcinoma de endometrio

Respecto al endometrio muchos estudios han ido encaminados a demostrar su asociación con la expresión del oncogén c-erbB-2 (42, 207, 252).

Berchuck *et al* (13) fueron los primeros que estudiaron la expresión del HER 2/neu en el endometrio. En este estudio se comparó el nivel de expresión del HER 2/neu en el carcinoma de endometrio con el endometrio normal. También se

examinó la relación entre el nivel de expresión del HER 2/neu y los factores clínico-patológicos del cáncer. Como resultado encontraron que la alta expresión del HER 2/neu se asociaba a una menor supervivencia. Igualmente se vio que la alta expresión del HER 2/neu era inversamente proporcional a los valores de receptores de estrógenos. En este estudio todas las pacientes con alta expresión del HER 2 /neu tenían receptores de estrógenos ausentes. Sin embargo no se encontró relación aparente con los receptores de progesterona.

Bigsby *et al* (15) estudiaron la expresión del HER 2/neu, de receptores esteroideos y de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tanto en endometrio normal como en endometrio maligno. Respecto a la expresión del HER 2/neu en endometrio normal, no encontraron diferencias significativas entre la expresión en fase secretora y en fase proliferativa, debido al pequeño número de muestras estudiadas.

Al contrario que Berchuck *et al*, Bigsby *et al* explicaron que la alta expresión del HER 2/neu aparecía en carcinomas de endometrio bien diferenciados, en comparación con los pobremente diferenciados, estadíos III y IV, cuya expresión era baja. Por este motivo, apuntaron que la sobreexpresión de la oncoproteína HER 2/neu puede ser importante en el inicio y en la rápida progresión de algunos cánceres de baja malignidad, al igual que para los de alto grado de malignidad.

Además, Bigsby *et al* observaron una relación inversa entre la expresión de HER-2/neu y los receptores de progesterona.

Monk *et al* (172) relacionaron la sobreexpresión de la proteína HER-2/neu con estadio avanzado del tumor, con la disminución de la supervivencia y un intervalo más corto libre de enfermedad en pacientes con cáncer de endometrio.

Reinantz *et al* (207) correlacionaron el c-erbB-2 con el tipo de tumor y encontraron que había asociación, sobre todo, con el carcinoma de células claras, pero no encontraron relación con el pronóstico ni con la supervivencia.

Wang *et al* (252) realizaron un estudio en el que se intentaba ver la correlación de la expresión de la proteína c-erbB-2 y el EGFR con los factores clínico-patológicos y los receptores esteroideos. No se encontraron diferencias significativas entre el estadio quirúrgico del cáncer de endometrio y la sobreexpresión del c-erbB-2.

Además, en los casos de endometrio hiperplásico, las glándulas también mostraban una fuerte expresión de la proteína c-erbB-2. Estos hallazgos sugirieron que la expresión de la proteína c-erbB-2, normalmente se mantiene durante el proceso de carcinogénesis endometrial, y que el significado de la alta expresión de c-erbB-2 en el cáncer de endometrio aún resulta indeterminada.

En un estudio realizado por Czerwenka (42) se estudiaron tres grupos de mujeres, uno con endometrio normal, otro con hiperplasia de endometrio y otro grupo con carcinoma de endometrio. Se encontró que conforme mayor grado de malignidad presentaban estos tumores mayor expresión del c-erbB-2 tenían, incluso, dentro del grupo de hiperplasia, fue más prevalente en la hiperplasia compleja y atípica que en la hiperplasia simple. En los casos de hiperplasia compleja y atípica la amplificación del c-erbB-2 estaba próxima a la de los casos con carcinoma de endometrio.

Esteller *et al* (59) buscaban la relación entre la amplificación del c-erbB-2 y el adenocarcinoma de endometrio, pero no encontraron una asociación directa entre la amplificación del gen con sobreexpresión y la progresión del tumor.

Berchuck *et al* (11) estudiaron la sobreexpresión del oncogén Her-2/neu con respecto al carcinoma de endometrio. En su estudio vieron que un 10% de los carcinomas endometriales mostraban sobreexpresión de Her-2/neu y además se correspondía con casos con menor supervivencia.

Todos estos hallazgos nos llevan a pensar que, aunque aún faltan muchos estudios que confirmen estas conclusiones, la sobreexpresión de HER-2/neu o c-erbB-2 parece ser un factor pronóstico en los cánceres del aparato reproductor femenino: de mama, de ovarios y de endometrio.

1.4.5.4. Expresión del oncogén del C-erbB-2 en otros tumores

Debido al gran interés que todo esto ha provocado, diversos estudios han ido dirigidos a ver la relación entre la expresión y amplificación del c-erbB-2 con algunos tumores tanto del aparato genital femenino, como el de mama (153, 202, 52, 238), de ovario (90, 214, 226, 122, 63), de endometrio (42); como en otras localizaciones como el estomago (264), la próstata (253), el pulmón (125), etc.

Slamon (228) fue el primero que sugirió que la amplificación del c-erbB-2 constituía un marcador de mal pronóstico en pacientes con carcinoma de mama y glangios linfáticos axilares afectados. Mostró que el oncogén c-erbB-2 se encuentra amplificado en aproximadamente un 30% de carcinomas primarios de mama y esta amplificación es un factor pronóstico independiente, de baja supervivencia e intervalos libres de enfermedad cortos en pacientes con nódulos linfáticos afectados.

Posteriormente, múltiples trabajos han encontrado resultados variables y en ocasiones contradictorios entre la amplificación del gen y niveles altos de expresión de oncoproteínas y parámetros morfológicos (261, 97).

Algunos de los parámetros estudiados han sido: el tipo histológico (para el cual muchos autores han encontrado alta positividad inmunohistoquímica para c-erbB-2 en carcinomas intraductales sobre todo comedocarcinoma) (12, 18), el tamaño del tumor, el grado histológico mayor, el alto grado de mitosis, la alta actividad proliferativa, las metástasis, etc. (238).

La mayoría de los estudios están de acuerdo en que los carcinomas de mama con alta expresión de c-erbB-2, se asocian a un peor pronóstico de supervivencia (42, 52, 238).

Todos estos estudios nos llevan a la conclusión de que a pesar de asociarse en muchas ocasiones el c-erbB-2 con factores pronósticos desfavorables y con una supervivencia global disminuida (238), por si mismo, en el cáncer de mama no es un factor de peor pronóstico (153, 238).

La sobreexpresión del c-erbB-2 es también un predictor de la respuesta al tratamiento habiéndose visto que responden peor a la quimioterapia (153).

Otro carcinoma que ha sido correlacionado con la amplificación del c-erbB-2 ha sido el de ovario. Autores como Slamon (229), Berchuck (12) y Felip (63), encontraron en sus estudios una correlación de la amplificación del c-erbB-2 con una menor supervivencia en tumores de ovario. Sin embargo otros autores no obtuvieron estos resultados, Haldane (90), Kacinsky (122), Singleton (226) y Rubin (214).

**HIPÓTESIS DE TRABAJO,
JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y
OBJETIVOS**

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

El cáncer, enfermedad de aparición altamente frecuente en nuestra sociedad, es objeto de continuos estudios, guiados actualmente desde una perspectiva molecular. Esto nos permite realizar nuevas aproximaciones a la patología tumoral, buscando criterios de correlación entre los parámetros útiles conocidos, y los recién instaurados.

De estos últimos surge el concepto actual del cáncer, encuadrado como la enfermedad genética más común en el hombre.

El término genética se utiliza en un sentido restrictivo, referido a los cambios que tienen lugar en distintos genes, los cuales aparecen involucrados en la transformación de una célula normal a maligna.

El resultado de la acumulación de dichas alteraciones estructurales genéticas, implica la aparición de productos que juegan un papel esencial en el control del crecimiento y diferenciación celular.

Según esta hipótesis, el balance entre protooncogenes y antioncogenes (o genes supresores del crecimiento) es destruido por la acumulación de mutación en estos tipos de genes.

El estudio de la expresión de oncogenes y marcadores de proliferación, nos pareció especialmente interesante en el cáncer de endometrio (primer tumor más frecuente ginecológico sin contar la mama), en los que el papel de los receptores de estrógenos y progesterona en los mecanismos de desarrollo tumoral es bien conocido.

Por todo ello, nos propusimos realizar este trabajo tratando de cumplir los siguientes objetivos.

2.2. OBJETIVOS

En nuestro trabajo nos propusimos estudiar y valorar en 99 carcinomas endometriales, procedentes de biopsias de enfermas cuyo estudio anatomopatológico había sido realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza, los siguientes parámetros:

1. Estudio de los receptores hormonales en la fase diagnóstica: receptores de estrógenos y progesterona y correlación entre ambos.
2. Valoración del marcador de proliferación Mib-1 (Ki-67) y de la proteína supresora P53 en las distintas áreas tumorales y no tumorales.
3. Expresión de oncogenes, Bcl-2 y C-erbB-2, en patología tumoral de endometrio, valorando el grado de positividad y porcentaje en los distintos grupos neoplásicos.
4. Trataremos de obtener un patrón de diferenciación de la expresión tanto en endometrio tumoral como no tumoral, de los distintos marcadores.
5. Intentaremos relacionar estos patrones de expresividad con la mayor o menor malignidad tumoral. Correlacionando los datos anatomopatológicos con los obtenidos por inmunohistoquímica.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de nuestro estudio, se han revisado los informes de todas las biopsias realizadas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza, desde Enero del año 1994 hasta Diciembre de 1996 inclusive.

De ellos se han seleccionado 99 casos diagnosticados de adenocarcinoma de endometrio anatomopatológicamente. El diagnóstico se realizó tras el estudio de material procedente de legrados fraccionados y/o piezas quirúrgicas de hysterectomías realizadas en este mismo hospital, que fueron fijadas, procesadas e incluidas en parafina según las técnicas histológicas habituales (168).

Para nuestro estudio hemos agrupado los 99 carcinomas de endometrio según la clasificación de la FIGO quedando distribuidos de la siguiente forma:

- G.1. 60 casos
- G.2. 26 "
- G.3. 7 "
- E. 6 "

Según el tipo de carcinomas de endometrio, el diagnóstico anatomopatológico de los 99 casos, fue el siguiente:

- Carcinomas Endometrioides (CE): 93 casos
 - Adenoacantoma (AAD) 6 casos
 - Carcinoma adenoescamoso (CAE) 4 "
 - Carcinoma endometriode simple (CES) 80 "

•Carcinoma mucinoso (CM)	2 "
•Carcinoma secretor (CS)	1 casos
- Carcinoma de células claras (CCC)	2 casos
- Carcinoma papilar seroso (CPS)	4 "

De cada uno de los casos, y de los diferentes cortes realizados para el diagnóstico de la pieza operatoria, se seleccionó un bloque correspondiente a la zona de mayor infiltración miometrial y también, en el caso de que lo hubiera, otro bloque con el límite de endometrio no afectado.

De cada uno de los 99 bloques, se estudiaron 8 cortes, dos de ellos con técnicas histológicas convencionales y los otros seis con técnicas inmunohistoquímicas.

De esta manera en nuestro trabajo hemos estudiado y valorado un total de 1376 secciones, de las cuales 792 secciones correspondían a tumores endometriales (99 bloques), y 584 secciones correspondientes a mucosa endometrial no tumoral adyacente al tumor (73 bloques). Sólo pudo ser evaluada la mucosa de 73 bloques, debido a que 26 casos pertenecían a legrados endometriales.

3.1.2. REACTIVOS DE LABORATORIO

3.1.2.1. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios monoclonales o policlonales utilizados frente a los antígenos humanos han sido:

- **Antisuero receptor estrógenos (DAKO).**
 - Casa comercial: DAKO, Denmark. Code nº M 7047. Lot 013.
 - Anticuerpo monoclonal frente a los receptores esteroideos.
 - Clon: 1D5.

- Presentación: Líquido sobrenadante del cultivo tisular.
 - Solvente: 0'05M Tris/HCl, 15mMNaN₃, pH 7'2.
 - Isotipo: Ig G.1 Kappa.
 - Inmunógeno: Proteína recombinante de receptores estrogénicos humanos.
 - Especificidad: Este anticuerpo reacciona con el dominio N-terminal (región A/B) del receptor. En inmunolocalización, el anticuerpo reacciona con el polipéptido 67 KDa que se obtiene por transformación de E. Colli y transfección de células COS con vectores plasmáticos expresando receptores hormonales.
 - Aplicación: Los receptores hormonales contenidos en el tejido de algunos tumores, son un importante parámetro en la predicción del pronóstico y la respuesta al tratamiento hormonal.
 - Concentración: 13'2 gr/L.
 - Disolución utilizada: Buffer fosfato salino. PBS: 1/50-1/100.
- **Antisuero receptor progesterona (DAKO).**
- Casa comercial: DAKO, Denmark. Code nº A 0098. Lot 035.
 - Anticuerpo monoclonal frente a Receptores de Progesterona.
 - Clon: PR AT 4.14.
 - Presentación: Inmunoglobulina del antisuero de conejo.
 - Solvente: 0'1 M NaCl, 15 mM NaN₃.
 - Inmunógeno: Péptido sintético del dominio ADN (aminoácido 533-547) de receptores de progesterona humanos. Proteína transportadora (Carrier), ovoalbúmina.

- Especificidad: El anticuerpo reacciona con el dominio ADN (región B) de los receptores de progesterona humanos.
- Aplicación: Los receptores hormonales contenidos en algunos tumores, es un importante parámetro en la predicción del pronóstico y la respuesta a los tratamientos hormonales.
- Concentración: 1³ gr/L.
- Dilución utilizada: Buffer fosfato salino. PBS: 1/25-1/50.

- **Antisuero Ki 67.**

- Casa comercial: INMUNOTECH. Cat 0505.
- Anticuerpo monoclonal frente al antígeno Ki-67 nuclear.
- Clon: Mib-1.
- Isotipo: Ig G.1 (mouse).
- Presentación: Líquido ascítico purificado.
- Solvente: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7´6.
- Inmunógeno: Péptido recombinante correspondiente a 1.002 bp Ki-67 c ADN.
- Especificidad: El anticuerpo monoclonal Mib-1 reacciona con el antígeno nuclear Ki-67 (345 y 395 KDA) asociado con proliferación celular y encontrada en las fases proliferativas del ciclo celular (G₁, S, G₂, M) y ausente en fase (G₀).
- Aplicación: Estudio de poblaciones celulares en fase proliferativa.
- Concentración: 2mg/ml
- Dilución utilizada: Buffer fosfato salino. PBS: 1/50.

- **Antisuero p53 (DAKO).**

- Casa comercial: DAKO, Denmark, Code nº M 7001. Lot 075.
- Anticuerpo monoclonal frente al antígeno P53 nuclear.
- Clon: DO-7
- Isotipo: Ig G.2b, Kappa.
- Presentación: Líquido sobrenadante del cultivo tisular.
- Solvente: 0'05 M Tris/HCl, 15mM NaN₃, pH 7'2.
- Inmunógeno: Recombinación de la proteína humana p53 expresada en E. Colli.
- Especificidad: El anticuerpo reconoce un epítipo de la porción N-terminal de la proteína humana p53. El epítipo del anticuerpo está localizado entre el aminoácido 19 y 26. El anticuerpo reacciona tanto con la forma normal, como con la mutante de la proteína p53.
- Aplicación: Alteración más frecuente en neoplasias malignas, relacionada con mal pronóstico.
- Concentración total de la proteína: 14'5gr/L.
- Dilución utilizada: Buffer fosfato salino. PBS: 1/50-1/100.

- **Antisuero bcl-2 (DAKO).**

- Casa comercial: DAKO, Denmark. Code nº M 887. Lot 123.
- Anticuerpo monoclonal frente a la proteína bcl-2 citoplasmática.
- Clon: 124.
- Presentación: Líquido sobrenadante del cultivo tisular.

- Solvente: 0'05 M Tris/HCl, 15 mM NaN₃, pH 7'2.
- Isotipo: Ig G, Kappa.
- Inmunógeno: Secuencia de péptido sintético que compromete a la secuencia de aminoácidos 41-54 de la proteína bcl-2.
- Especificidad: Este anticuerpo reacciona específicamente con la oncoproteína bcl-2 en técnicas de inmunoprecipitación e inmunolocalización. La proteína bcl-2 es codificada por un gen incluido en la translocación cromosómica (14, 18). Esta anomalía citogenética se encuentra frecuentemente en el linfoma folicular. La bcl-2 es una proteína esencial de membrana.
- Aplicación: Esta proteína juega un papel importante en el control del mecanismo de la muerte celular programada (apoptosis).
- Concentración: 13'5 gr/L.
- Dilución: Buffer fosfato salino. PBS: 1/10-1/80.

- **Antisuero c-erbB-2 (DAKO).**

- Casa comercial: DAKO, Denmark. Code nº A 0485. Lot 035.
- Anticuerpo policlonal frente a la proteína c-erbB-2 de la membrana citoplasmática.
- Presentación: El anticuerpo anti-humano c-erbB-2, es un anticuerpo purificado oncoproteico aislado por afinidad y purificado por inmovilización del péptido oncoproteico c-erbB-2.
- Solvente: 0.05 M Tris/HCl, 0'1 M NaCl, 15mM NaN₃, pH 7'2.
- Inmunógeno: La oncoproteína peptídica c-erbB-2 sintética humana de la parte intracitoplasmática de la oncoproteína c-erbB-2.

- Especificidad: El anticuerpo reacciona con la oncoproteína c-erbB-2 cuando es probado en tejido fijado en formol e incluido en parafina. El anticuerpo marca células epiteliales aproximadamente en un 20% de los casos de adenocarcinoma de varios tipos. La tinción es fuerte y se localiza en la membrana celular y ocasionalmente en el citoplasma de las células neoplásicas.
- Aplicación: La presencia de oncoproteína c-erbB-2 puede ser un indicador usado en el pronóstico de carcinomas humanos.

Concentración de proteína: 0.7 gr/ L.

- Dilución utilizada: Buffer fosfato salino. PBS: 1/100-1/200.

3.1.2.2. Anticuerpos secundarios

- Complejo Avidina-Biotina (ABC)

- ABC complex HRP. Dakopatts, code K 355.
- Kit para preparación del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa que contiene los siguientes reactivos:
 - Reactivo A (Avidina), diluido en PBS, con pH 7.2.
 - Reactivo B (Biotina ligada a peroxidasa), diluido en PBS, con pH 7.2.

- Diaminobencidina (DAB)

- 3,3'- Diaminobencidina tetrahidroclorido. Sigma D-5637.
- Cromógeno usado en la solución final del revelado.

- **Hidroximetilaminometan (TRIS)**

- Meck, 8382.
- Reactivo líquido usado en la preparación de la solución final del revelado.

- **Buffer Citrato**

- Solución empleada para el procesamiento de las piezas en el microondas. Se obtiene mezclando una solución 0'1 M de ácido cítrico con otra solución, también 0'1 M, de citrato sódico.

- **Bacto FA Buffer-Dried (PBS)**

- Difco code 231433-8. Es una mezcla de buffer fosfato-NaCl que, una vez rehidratada, proporciona una solución tamponada salina compensada al 0'85%, a un pH de 7'2.

3.1.3. SOLUCIONES DE LABORATORIO

3.1.3.1. Preparación de la solución para el gelatinado de los portaobjetos

Para la preparación de la solución para el gelatinado de los portaobjetos son necesarias las siguientes sustancias:

- Gelatina: 0'50 gr.
- Alumbre de cromo: 0'40 gr.
- Agua bidestilada: 100 ml.

Se calienta los 100ml de agua bidestilada a 40 °C, y se disuelven los 0'50 gr. de gelatina. Después se añaden los 0'40 gr. de alumbre de cromo. Se introducen los portaobjetos en el interior de la solución preparada, se sacan de la solución y se dejan secar apoyados en una rejilla a temperatura ambiente.

3.1.3.2. *Procesado de las preparaciones en horno microondas*

El proceso de las preparaciones en horno microondas se lleva a cabo en tres fases consecutivas:

1°. Colocar las preparaciones en recipientes de plástico termo resistentes, las cuales contienen buffer citrato 10mM, pH 6'0:

- (Solución stock:
 - a) Solución de ácido cítrico 0'1 M/21.01 gr $C_6H_8O_7 \cdot 2H_2O$ en 1000 ml.
 - b) Solución de citrato sódico 0.1 M/29.41 gr $NaC_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ en 1000 ml.
- Solución de trabajo: 9ml de a + 41 ml de b, diluido en un total de 500 ml.).

2°. Procesar las preparaciones en horno microondas, en tres ciclos de 5 minutos, cada uno de ellos a 750W. (Las preparaciones no deben secarse durante la incubación).

3°. Dejar enfriar las reacciones a temperatura ambiente durante 20 minutos. Lavar las preparaciones en TBS (50mM, TRIS; 150mM, NaCl , pH 7'6).

3.1.3.3. *Preparación de la solución tamponada de fosfatos (PBS)*

En un litro de agua bidestilada se añade el contenido de un vial de 10 g. de Bacto FA Buffer Dried, agitando hasta su disolución. Una vez preparada la solución debe conservarse a 2-8 °C.

3.1.3.4. *Preparación de la solución Buffer Citrato*

Requiere la preparación de dos soluciones:

- Solución A: Se obtiene añadiendo 21'01 g. de ácido cítrico a 1 litro de agua bidestilada, obteniéndose una solución 0'1 M.
- Solución B: Se obtiene añadiendo 29'41 g. de citrato sódico a 1 litro de agua bidestilada, obteniéndose una solución 0'1 M.

El Buffer citrato resulta de la mezcla de 9ml de A con 41ml de B, diluyéndolo hasta un total de 500 ml con agua bidestilada. La solución resultante tiene un pH de 6'0.

3.1.3.5. Preparación de la solución substrato cromógeno (DAB)

A 100 ml de TRIS clorhídrico con comprobación del pH a 7'6, se añaden 50 mg. de DAB. Después se añade a la solución 0'06 ml. de agua oxigenada.

Se aconseja manipular esta sustancia con guantes y mascarilla, ya que se ha informado de su posible potencial cancerígeno.

3.1.3.6. Preparación de hematoxilina de Mayer

Necesitamos:

- Hematoxilina: 0'10 g.
- Agua bidestilada: 100 ml.
- Yodato potásico: 0'2 g.
- Sulfato alumínico potásico: 5 g.

Disolver la Hematoxilina en 20 ml. de agua bidestilada. Disolver el yodato potásico y el sulfato alumínico potásico en 80 ml. de agua bidestilada. Mezclar a continuación las dos soluciones (168).

3.1.3.7. Preparación del ácido per-iódico de Schiff (P.A.S)

Se precisa:

- Ácido Per-iódico al 0'5 por 100, en agua destilada.

- Reactivo de Schiff:
- Fucsina básica: 1gr.
- Agua destilada: 200 ml.
- Acido clorhídrico N (98'3 ml. HCl, P.E. 1'16 y agua destilada hasta completar 1 litro): 20 ml.
- Bisulfito sódico anhidro: 1 gr.

Se ponen a hervir los 200 ml de agua destilada, se añade la fucsina y se agita. Lo dejamos enfriar hasta 50°C y se filtra. Después añadimos el HCl 1N, y se deja enfriar hasta 25°C y se añade bisulfito. Debe mantenerse en la oscuridad (168).

3.1.4. OTROS MATERIALES QUE HAN SIDO UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

3.1.4.1. Material para valorar resultados

Microscopio óptico binocular con lentes adaptables para luz polarizada.

Marca: Olympus AH-2. VANOX-T.

3.1.4.2. Material informático

Utilizamos un ordenador de marca Packard Bell Pentium 133 MHZ, modelo 2020 VGA, con las siguientes aplicaciones:

- Microsoft Word 97, como procesador de textos.
- Microsoft Excel 97, como hoja de cálculo para el diseño de tablas y gráficos.
- Stat View, para el estudio estadístico y diseño de los gráficos.
- JMP 3.1, para la realización de estudios multivariantes.

- Microsoft Power Point 97, para el diseño de las diapositivas.
- Impresora Hewlett Packard, modelo Deskjet serie 690 C.

3.1.4.3. *Material Fotográfico*

Para obtener el material fotográfico de nuestro trabajo, se ha utilizado un microscopio marca Olympus AH-2 VANOX-T, con cámara fotográfica incorporada, marca Olympus C-35AD-4.

Los carretes fotográficos utilizados han sido del tipo Kodak Ektachrome 64 ASA.

3.2. *MÉTODOS*

De los 99 bloques de parafina seleccionados correspondientes al tumor endometrial, se realizaron secciones de 5 micras de espesor empleando un microtomo tipo LEICA BIOCUT JUNG, obteniéndose de cada uno de ellos un total de 8 secciones.

Con el fin de aumentar la adherencia de las secciones a los portas y evitar su desprendimiento durante las técnicas de inmunohistoquímica, fueron utilizados portaobjetos gelatinados.

Sobre las secciones obtenidas de cada uno de los 99 bloques de parafina, se realizaron las siguientes técnicas:

3.2.1. *TÉCNICAS DE RUTINA*

Se realizaron tinciones con Hematoxilina–Eosina (HxE) y con ácido periódico de Schiff (P.A.S.) para examen histológico de rutina, siguiendo los habituales procesos de tinción. (168).

3.2.2. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Sobre las 6 secciones restantes se aplicó la técnica inmunohistoquímica para la demostración de los siguientes marcadores.

- RE
- RP
- Ki 67
- P 53
- Bcl-2
- C-erbB-2

Antes de comenzar con las técnicas inmunohistoquímicas se procede a un desparafinado de las secciones. Para ello colocamos los portaobjetos en canastillas especiales para portaobjetos, y los hacemos pasar por baños de Xilol y por una serie de alcoholes en orden decreciente de graduación. Posteriormente se introduce en agua destilada, y para terminar se da un baño de PBS.

Tras el proceso de desparafinado ya se pueden aplicar las técnicas de inmunohistoquímica.

- En primer lugar debemos inhibir la actividad enzimática endógena de los tejidos a analizar. Una vez que las secciones han sido desparafinadas el siguiente paso va a ser incluirlas en una solución de 100 cc. de alcohol metílico + 1'5 cc. de agua destilada durante 30 minutos.
- Hidratación progresiva:
 - Alcohol 70°C durante 5 minutos.
 - Agua destilada durante 5 minutos.

3.2.2.1. Técnica de avidina-biotina peroxidasa (ABC)

- Se introducen los portaobjetos en jarras plásticas termorresistentes con solución Buffer Citrato tal como hemos explicado anteriormente, y se lleva al microondas tres ciclos durante 5 minutos cada uno.
- Tras sacarlo del microondas dejamos enfriar 20 minutos.
- Una vez se hayan enfriado hacemos tres lavados con tampón PBS (solución tamponada de fosfatos).
- Incubación en suero de conejo normal, diluido en PBS 1/5 durante 30 minutos a temperatura ambiente (evita reacciones inespecíficas).
- Se decanta (sin lavar).
- Se añade el anticuerpo primario. En nuestro estudio un corte de cada caso se incuba con cada uno de los siguientes antisueros:

- Antisuero Receptores de estrógenos:

Incubación durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti receptores de estrógenos, clon 1D5 (DAKO M- 7047), diluido en PBS 1/100, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

- Antisuero Receptores de progesterona:

Incubación durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti receptores de progesterona, clon PR AT 4.14 (DAKO A-0098), diluido en PBS 1/50, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

- Antisuero Ki67:

Incubación durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti Ki 67, clon Mib-1 (Immunotech 0505), prediluido de forma comercial, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

•Antisuero P53:

Incubación durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti p53, clon DO-7, (DAKO M-7001), diluido en PBS 1/100, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

•Antisuero bcl-2:

Incubación durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti bcl-2, clon 124 (DAKO M-887), diluido en PBS 1/80, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

•Antisuero c-erbB-2:

Incubación durante 60 minutos con el anticuerpo primario anti c-erbB-2, (DAKO A-0485), diluido en PBS 1/100, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

- Se elimina el sobrante y se hacen tres lavados de 5 minutos cada uno, con tampón PBS disuelto en agua.
- Secamos las preparaciones a mano y procedemos a la incubación con el anticuerpo secundario biotilado (anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón, ligado a biotina (Dakopatts E-354), a dilución 1:300 en PBS) durante 30 minutos, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.
- Se elimina el sobrante y se hacen tres lavados con tampón PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Incubación con el complejo ABC (Dakopatts X-335), durante 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente. El complejo ABC debe prepararse 30 minutos antes de su uso, añadiendo a 5 ml. de PBS una

gota del reactivo “A” y una gota del reactivo “B” en este orden, agitándolo después.

- Se elimina el sobrante y se lava en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado con TRIS tampón al 10%. Medimos el pH, que debe ser 7.6.
- Revelado:

1.- 100 Tris + 50 mgr de DAB + 60 microl de H₂O₂.

2.- Lavar en agua y mirar al microscopio.

- Como tinción de fondo, hemos utilizado Hematoxilina. Se introducen las preparaciones en la hematoxilina durante 10 segundos; luego lavamos en agua durante 10 minutos.
- Deshidratamos para el montaje de las preparaciones:

Alcohol 70° Durante 3-4 minutos.

Alcohol 96° Durante 5 minutos.

Alcohol 100° Dos ciclos de 5 minutos.

- Xilol.
- Montaje de las preparaciones con gelatina-glicerina.

3.2.3 MÉTODO PARA LA VALORACIÓN DE RESULTADOS

Tras la realización de las técnicas anteriormente descritas, los resultados han sido valorados mediante el estudio de las secciones con microscopía óptica (OLYMPUS AH-2 VANOX-T). Las microfotografías de éstas se realizaron con un fotomicroscopio OLYMPUS AH-2 VANOX-T, CAMARA FOTOGRÁFICA INCORPORADA OLYMPUS C-35AD-4, utilizando película KODAK EKTACROME.

3.2.3.1. Criterios de valoración en las técnicas de rutina

Sobre las secciones teñidas con HxE y P.A.S. se realizó el estudio histopatológico rutinario en las que se valoraron los siguientes parámetros:

- Tipo histológico de carcinoma de endometrio. (adenoacantoma, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células claras, carcinoma endometriode simple, Carcinoma mucinoso, carcinoma secretor, y carcinoma papilar seroso).
- Estadio según la clasificación de la FIGO (G.1, G.2, G.3).
- Grado nuclear (1, 2, 3).
- Invasión miometrial (My 0, My 1, My 2, My 3, My 4).
- Invasión vascular (Si/ No/ No Valorable).
- Hiperplasia endometrial en la mucosa adyacente al tumor (Si/ No/ NO Valorable).

3.2.3.2. Criterios de valoración de las técnicas inmunohistológicas

En el revelado de la reacción inmunohistoquímica se utilizó una sustancia cromógena, la Diaminobencidina. Con este reactivo, las áreas donde se ha producido reacción entre el antígeno investigado y el anticuerpo primario muestran una coloración marronacea.

La valoración porcentual de células inmunoteñidas para cada uno de los marcadores oncogénicos, receptores hormonales y de proliferación, fue subjetivamente analizada con un rango de aproximación del 5%. Todas las muestras fueron evaluadas independientemente por dos observadores. Consideramos como positivo aquellos elementos con intensidad media/alta y de distribución selectiva. Una media de 10 campos de gran aumento (x40) fue valorada en las secciones tumorales. Las áreas necróticas y artefactadas fueron obviadas del estudio.

3.2.4. MÉTODO ESTADÍSTICO

El estudio estadístico ha sido realizado tanto con variables cuantitativas como con variables cualitativas. En primer lugar se ha realizado un estudio estadístico descriptivo de los resultados. Los datos han sido agrupados y presentados por medio de tablas y gráficos estadísticos utilizando la hoja de cálculo Microsoft Excel 97.

Además, hemos realizado un estudio estadístico de la relación existente entre el inmunomarcaje y las variables histológicas para, lo que hemos utilizado el análisis de la varianza (ANOVA).

La comparación entre la inmunotinción de cada uno de los marcadores dentro de la mucosa adyacente al tumor y el propio tumor, fue realizada con el test de comparación de medias pareadas.

Para estudiar la correlación existente entre los diferentes marcadores inmunohistoquímicos fue utilizado el test de correlación de matrices de Pearson (Programa Stat View).

Por otra parte realizamos estudios multivariantes para establecer la relación entre cada uno de los marcadores, el tipo histológico y la clasificación de la FIGO. (Programa JMP 3.1.).

En todos los casos el nivel de significación elegido ha sido de $P < 0.05$.

RESULTADOS

4.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

De los 99 casos estudiados, obtuvimos 2 casos con edad comprendida entre 30-39 años, 3 con edad entre 40-49 años, 15 entre 50-59 años, 48 entre 60-69 años, 26 entre 70-79 años y 5 entre 80-89 años (Tabla 1.1).

La edad media de las 99 pacientes ha sido de 65´43 años, siendo el rango entre 35-88 años (Tabla 1.1).

La edad media de las pacientes para cada uno de los grupos establecidos por la clasificación de la FIGO, ha sido la siguiente: las del grupo G.1 65´83 años, las del grupo G.2 de 64´53 años, las del grupo G.3 63´42 años y las del grupo de tumores especiales 67´66 años (Tabla 1.2).

Según el tipo de toma de muestra en nuestro estudio, tenemos 73 casos en los que utilizamos la pieza obtenida de histerectomía, y 26 casos procedentes de legrado (Tabla 2).

Según la clasificación de la FIGO, obtuvimos 60 casos para el grado G.1, 26 casos para el grado G.2 y 7 casos para el grado G.3 (Tabla 3).

Según el tipo anatomopatológico los 99 casos se dividieron en: 80 carcinomas endometrioides simples, 6 adenoacantomas, 4 carcinomas adenoescamosos, 4 carcinomas papilares serosos, 2 carcinomas de células claras, 2 carcinomas mucinosos, y 1 carcinoma secretor (Tabla 4).

Al estudiar la relación entre la clasificación de la FIGO y los diferentes tipos histológicos de los tumores, hallamos para el grado G.1: 4 adenoacantomas (6´67%), 2 carcinomas adenoescamosos (3´33%), 52 carcinomas endometrioides simples (86´67%), 1 carcinoma mucinoso (1´67%) y 1 carcinoma secretor (1´67%). Para el grado G.2 obtuvimos: 2 adenoacantomas (7´69%), 2 carcinomas adenoescamosos (7´69%), 21 carcinomas endometrioides simples (80´78%), 1

carcinoma mucinoso (3'85%), y ningún carcinoma secretor. En el grado G.3 los 7 casos eran carcinomas endometrioides simples (Tabla 5).

Los resultados obtenidos al estudiar los casos según el grado nuclear, han sido: 43 casos de grado nuclear 1, 41 casos de grado nuclear 2 y 15 casos con grado nuclear 3. En este caso hemos incluido los casos especiales. (Tabla 6).

La invasión miometrial también ha sido valorada. De los casos analizados, 48 han mostrado invasión miometrial My 1, 10 casos invasión My 2, y 15 casos invasión My3. No pudieron ser valorados 27 casos por corresponder a las muestras obtenidas por legrados o por el mal estado (Tabla 7). En la Figura 7 podemos observar un caso de invasión miometrial.

Otro parámetro valorado ha sido la invasión vascular, habiendo obtenido 24 casos con invasión vascular y 47 casos sin invasión. Sin embargo, 28 casos no han podido ser valorados (Tabla 8). (Figura 32).

También se ha valorado la hiperplasia endometrial. Como resultado hemos hallado 25 casos con hiperplasia, 20 casos sin hiperplasia y 54 casos no han podido ser valorados (Tabla 9).

De los 93 casos que hemos estudiado, 60 (64'52%) correspondían a un estadio G.1, 26 (27'96%) a un estadio G.2 y 7 (7'53%) a estadio G.3 de la clasificación de la FIGO. Creemos conveniente recordar que para el resto de la investigación sólo hemos utilizado los carcinomas endometrioides, dejando fuera del estudio estadístico los 6 casos de carcinomas especiales, 4 carcinomas papilares serosos y 2 carcinomas de células claras (Tabla 1.1).

4.2. RESULTADOS DE LA ZONA TUMORAL

4.2.1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

- La positividad para receptores estrogénicos fue del 41'42% de media para los tumores de estadio G.1 (como se puede observar en las Figuras 11b y 12b), del 30'23% para los de estadio G.2 (Figura 18b) y del

24'29% para los G.3 (en algunos casos la expresión ha sido negativa como en el caso de la Figura 21b) (Tabla 2.2 y Gráfico 10).

- Las diferencias de positividad para los receptores estrogénicos en la zona tumoral, tanto entre los grupos G.1 y G.2, como entre los G.1 y G.3 y los G.2 y G.3, no han resultado significativas (Tabla 2.3).

4.2.2. RECEPTORES DE PROGESTERONA

- La positividad para los receptores de progesterona encontrada para la zona tumoral del endometrio, alcanzó para el estadio G.1 una media del 45'12%, para G.2 una media del 27'88% (siendo heterogénea la expresión de RP en las células tumorales como muestra la Figura 17) y para G.3 una media del 7'86% (Tabla 3.2 y Gráfica 11).
- Las diferencias de positividad en la zona tumoral obtenidas entre los grupos G.1-G.2 y G.1-G.3 para los receptores de progesterona, han sido significativas ($P < 0'0202$ y $P < 0'0034$ respectivamente), mientras que entre G.2-G.3 no han sido significativas (Tabla 3.3).

4.2.3. PROTEÍNA MIB-1 (KI-67)

- La positividad para el marcador Mib-1 en la zona tumoral de las muestras, ha sido para el estadio G.1 una media del 9'52% (Figuras 12a, 13b y 14), para el estadio G.2 del 27'58% y para el estadio G.3 del 71'43% (Figuras 20b, 25) (Tabla 4.2 y Gráfico 12).
- Las diferencias de positividad obtenidas para la zona tumoral entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 para el marcador Mib-1, han sido significativas con una $P < 0'001$ en cada uno de los grupos (Tabla 4.3).

4.2.4. PROTEÍNA P53

- La positividad para la proteína P53 en la zona tumoral, fue de una media del 7'42% para los tumores de estadio G.1 (Figura 22a), del 32'35% para los de estadio G.2 y del 58'57% para los de estadio G.3 (elevada reactividad para P53 en la Figura 22b) (Tabla 5.2 y Gráfico 13).

- Las diferencias de positividad para la proteína P53 en la zona tumoral de las muestras, entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 han resultado significativas con una $P < 0'0001$, $P < 0'0001$ y $P < 0'0181$ respectivamente (Tabla 5.3).

4.2.5. *PROTEÍNA bcl-2*

- La positividad para la proteína bcl-2 en la zona tumoral, siguiendo la clasificación de la FIGO, ha sido para G.1 una media del 33'92% (la Figura 15 nos muestra la expresión citoplasmática focal de bcl-2), para G.2 una media del 27'15% y para G.3 una media del 21'43% (Figura 23) (Tabla 6.2 y Gráfico 14).
- Las diferencias de positividad para la proteína bcl-2 en la zona tumoral, entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 no han resultado significativas (Tabla 6.3).

4.2.6. *PROTEÍNA c-erbB-2*

- La positividad para la proteína c-erbB-2 en la zona tumoral, fue de media 21'92% para el estadio G.1 de la clasificación de la FIGO (Figura 16a), del 37'15% para el estadio G.2 (Figura 19) y el 60% para el estadio G.3 (Figura 24) (Tabla 7.2 y Gráfico 15).
- La diferencia de positividad para la proteína c-erbB-2 en la zona tumoral de la muestra ha sido significativa para los grupos G.1-G.2 y G.1-G.3 ($P < 0'0361$ y $P < 0'0024$ respectivamente), mientras que entre G.2-G.3 no hemos encontrado diferencias significativas (Tabla 7.3).

4.3. *RESULTADOS EN LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR*

En el estudio de la mucosa endometrial han sido omitidos 26 casos debido a que corresponden a legrados y no a histerectomías.

4.3.1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

- La positividad para los receptores estrogénicos en la mucosa de las muestras fue de media el 80´45% para el estadio G.1, el 80´71% para el estadio G.2 y el 76´67% para el estadio G.3 de la clasificación de la FIGO (Tabla 8.2 y Gráfico 16).
- Las diferencias de positividad para los receptores estrogénicos en la mucosa de las muestras, entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 no han sido significativas (Tabla 8.3).

4.3.2. RECEPTORES DE PROGESTERONA

- En el estudio de la mucosa adyacente al tumor, la positividad para los receptores de progesterona fue el 82´50% de media para el estadio G.1 de la clasificación de la FIGO, el 74´41% para el estadio G.2 y el 70´00% para el estadio G.3 (Tabla 9.2 y Gráfico 17).
- Las diferencias de positividad para los receptores de progesterona en la mucosa adyacente al tumor, no han sido significativas en ninguno de los casos, ni entre G.1-G.2, ni G.1-G.3 ni G.2-G.3 (Tabla 9. 3).

4.3.3. PROTEÍNA MIB-1 (Ki-67)

- La positividad para la proteína Mib-1 encontrada en la mucosa adyacente al tumor ha sido para el estadio G.1 de 1´32% de media, para el G.2 de 0´53% y para el G.3 de 0´83% (Tabla 10.2 y Gráfico 18).
- Las diferencias de positividad para la proteína Mib-1 en la mucosa de las muestras entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 no han sido significativas (Tabla 10.3).
- La tabla de percentiles nos relaciona el marcador Mib-1 con la hiperplasia de endometrio en la mucosa adyacente al tumor. En este estudio hemos observado que la mayoría de los casos, con y sin hiperplasia de endometrio, se encuentran en el percentil 0 con respecto al marcador Mib-1, mientras que sólo unos pocos casos sin hiperplasia

de endometrio están en el percentil 5 y algunos de hiperplasia se encuentran en los percentiles 5, 10 y 20 (Gráfico 19).

4.3.4. *PROTEÍNA P53*

- Al hacer el estudio de la expresión de la proteína P53 en la mucosa adyacente al tumor no hemos encontrado ningún caso que exprese dicha proteína.

4.3.5. *PROTEÍNA bcl-2*

- La positividad para el marcador bcl-2 en la mucosa adyacente al tumor presentó para el estadio G.1 una media del 76´70%, para el estadio G.2 del 74´12% y para el estadio G.3 del 78´33% (Tabla 11.2 y Gráfico 20).
- No se han encontrado diferencias significativas al estudiar la positividad de bcl-2 en la mucosa adyacente al tumor entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 (Tabla 11.3).

4.3.6. *PROTEÍNA c-erbB-2*

- La positividad para la proteína c-erbB-2 en la mucosa adyacente al tumor ha sido nula en todos los casos estudiados.

4.4. *COMPARACIÓN DE MEDIAS PAREADAS*

Hemos considerado la expresión de cada uno de los marcadores en el tumor como la variable independiente, mientras que dichos marcadores en la mucosa los hemos consideramos la variable dependiente.

4.4.1 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ENTRE LA ZONA TUMORAL Y LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR

Hemos encontrado diferencias significativas al comparar los receptores de estrógenos en la mucosa con los del tumor, ya que $P < 0'0001$. Esto quiere decir que mientras en la zona de mucosa hay abundantes receptores de estrógenos, en la zona tumoral disminuyen significativamente estos receptores (Intervalo de confianza (-52'50, -35'92)) (Tabla 13 y Gráfico 22).

4.4.2. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE PROGESTERONA ENTRE LA ZONA TUMORAL Y LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR

Al comparar los receptores de progesterona en la mucosa adyacente al tumor con los del propio tumor, estadísticamente podemos decir que se han obtenido diferencias significativas ya que $P < 0'0001$. Esto quiere decir que mientras en la zona de mucosa hay abundantes receptores de progesterona en la zona tumoral disminuye significativamente la positividad de dichos receptores (Intervalo de confianza (-48'34, -31'36)) (Tabla 14 y Gráfico 23).

4.4.3. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MIB-1 (Ki-67) ENTRE LA ZONA TUMORAL Y LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR

Respecto a la proteína Mib-1, hemos observado diferencias significativas al comparar la mucosa adyacente al tumor y el propio tumor, ya que $P < 0'0001$. Esto quiere decir que mientras en la zona de la mucosa existe muy baja positividad para dicha proteína, en la zona tumoral la expresión de la proteína Mib-1 es alta (Intervalo de confianza (13'73-25'07)) (Tabla 15 y Gráfico 24).

4.4.4. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P53 ENTRE LA ZONA TUMORAL Y LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR

Al comparar la expresión de la proteína P53 en la mucosa adyacente al tumor con la expresión del propio tumor, podemos decir que estadísticamente obtuvimos diferencias significativas, ya que $P < 0'0001$. Esto quiere decir que mientras en la mucosa adyacente al tumor no hemos encontrado ningún caso con expresión de P53, en la zona tumoral sí que es elevada la expresión de dicha proteína (Intervalos de confianza (7'16, -20'75)) (Tabla 16.1-y Gráfico 25).

4.4.5. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA bcl-2 ENTRE LA ZONA TUMORAL Y LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR

Estadísticamente, hemos encontrado diferencias significativas al comparar la expresión de la proteína bcl-2 en la mucosa adyacente al tumor y el propio tumor, ya que $P < 0'0001$. Esto quiere decir que mientras en la mucosa hay una alta expresión de proteína bcl-2, en la zona tumoral disminuye significativamente dicha proteína (Intervalo de confianza (-57'66, -41'15)) (Tabla 17.1 y Gráfico 26).

4.4.6. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA c-erbB-2 ENTRE LA ZONA TUMORAL Y LA MUCOSA ADYACENTE AL TUMOR

Respecto a la expresión de la proteína c-erbB-2, hemos obtenido resultados estadísticamente significativos al comparar entre la mucosa adyacente al tumor y el propio tumor, ya que $P < 0'0001$. Esto quiere decir que mientras en la mucosa hay muy baja expresión de c-erbB-2 en la zona tumoral la expresión de dicha proteína es más elevada (Intervalo de confianza (16'63, -30'86)) (Tabla 18.1 y Gráfico 27).

4.5. MATRIZ DE CORRELACIÓN

Con la matriz de correlación intentamos investigar grados significativos de correlación estadística entre variables pareadas una a una. De su observación, encontramos que entre los RE y RP hay una correlación de 0´65, entre RE y Mib de -0´02, entre RE y Bcl-2 de 0´22, entre RE y P53 de -0´07, entre RE y C-erbB-2 de 0´02, entre RP y Mib-1 de -0´22, entre RP y Bcl-2 de 0´31, entre RP y P53 de -0´25, entre RP y C-erbB-2 de -0´08, entre Mib-1 y Bcl-2 de -0´07, entre Mib-1 y P53 de 0´50, entre Mib-1 y c-erbB-2 de 0´41, entre Bcl-2 y P53 de -0´01, entre Bcl-2 y C-erbB-2 de 0´21 y entre P53 y c-erbB-2 de 0´45. Sólo hemos obtenido valores que se aproximan a ser significativos en la correlación estadística entre RE y RP con un coeficiente de correlación de Pearson de 0´65, y entre P53 y Mib-1 con un coeficiente de correlación de 0´50 (Tabla 19).

Al realizar la recta de regresión no hemos encontrado relación significativa entre la correlación de RE-RP y Mib-1-P53 (Gráfico 29 y 28).

4.6. ESTUDIOS MULTIVARIANTES

En el estudio multivariante asociamos los diversos grupos de tumores según la clasificación de la FIGO (G.1, G.2 y G.3) y los tipos anatomopatológicos de tumores de endometrio: adenoacantoma (AAC), carcinoma adenoescamoso (CAE), carcinoma endometriode simple (CES), carcinoma mucinoso (CM), y carcinoma secretor (CS). También hemos estudiado como se expresan los diferentes marcadores.

Debemos recordar que todos estos tumores pertenecen al grupo de los carcinomas endometrioides, pero en este estudio hemos querido ver como se comportan cada uno de ellos de una forma más específica.

Algunos subtipos histológicos en la población general son muy poco frecuentes. Por ello al escoger nuestra muestra hemos podido obtener muy pocos

casos de los mismos. Este hecho nos lleva a que los resultados encontrados sólo nos permitirán observar la tendencia obtenida para cada uno de los tumores, tanto en la zona tumoral como en la mucosa adyacente al tumor.

4.6.1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Para los RE, en los carcinomas endometrioides simples (CES) (de los cuales tenemos el mayor número de tumores), la tendencia que sigue este tipo de tumor es, a menor grado tumoral (según la clasificación de la FIGO), mayor expresión de RE.

Sin embargo, para los tipos adenoacantoma (AAC) y carcinoma mucinoso (CM) a menor grado tumoral, menor expresión de RE. En los carcinomas mixtos debemos destacar que los carcinomas de grado G.2 tuvieron una alta expresión de RE. Debemos recordar que el número de tumores de AAC y CM son escasos, además no tenemos ninguno del grado G.3 de estos últimos. En el carcinoma adenoescamoso (CAE) los tumores de grado G.1 expresan RE, y el carcinoma secretor (CS) no ha presentado expresión de RE (Gráfico 30.1.).

En la zona de mucosa adyacente al tumor hemos encontrado una alta expresión de RE. No podemos decir que cada uno de los tumores según su grado de malignidad sigan una tendencia determinada, pero sí que podemos afirmar que en la mucosa sana, los RE muestran niveles elevados en cualquier grado tumoral (Gráfico 30.2).

4.6.2. RECEPTORES DE PROGESTERONA

Los RP en el carcinoma endometriode simple (CES) siguen una tendencia similar a los RE, es decir, a menor grado tumoral mayor expresión de RP. Lo mismo sucede en los carcinomas adenoescamoso (CAE) y en el adenoacantoma (AAC), no siendo así en el carcinoma mucinoso (CM), en el cual a menor grado tumoral, menor expresión de RP. Debemos destacar que los carcinomas mucinosos (CM) de grado G.2 mostraron el mayor nivel de RP. En el carcinoma secretor (CS) no se ha demostrado expresión de receptores de progesterona (Gráfico 31.1).

Los RP en la mucosa adyacente al tumor siguen la misma tendencia que los RE. Tienden a ser elevados en todos los tipos anatomopatológicos de tumor y además en todos los grados. En los carcinomas endometrioides simples (CES) siguen una tendencia similar a la de la zona tumoral pero menos elevada, teniendo mayor expresión de RP en los tumores de menor grado y siendo similar en el adenoacantoma (AAC). Por el contrario en el carcinoma adenoescamoso (CAE) y en el carcinoma mucinoso (CM), a menor grado tumoral, menor expresión de RP. El carcinoma secretor (CS) se comporta con RP altos en la mucosa (Gráfico 31.2).

4.6.3. *PROTEÍNA MIB-1 (KI-67)*

El marcador Mib-1 en el carcinoma endometrioide simple (CE) sigue una tendencia directamente proporcional al grado de malignidad tumoral según la clasificación de la FIGO. Es decir, a menor grado de malignidad, menor marcador de Mib-1. Podemos observar como en el grado G.3 la expresión de Mib-1 es muy elevada con respecto al resto de los grados y los diversos tipos. Lo mismo ocurre con los carcinomas mucinosos (CM). Sin embargo, no es así en los adenoacantomas (AAC), en los que la tendencia que siguen es a menor grado de malignidad, mayor tinción. Tampoco en el carcinoma adenoescamoso (CAE) que es igual para los grados G.1 y G.2. Los carcinomas secretores (CS) no se pueden valorar (Gráfico 32.1).

En la mucosa adyacente al tumor, la expresión de Mib-1 sólo se ha demostrado en los carcinomas endometrioides simples (CES). La mayor expresión ha correspondido a los tumores de grado G.1, después a los de grado G.3 y la mínima expresión mostrada ha sido para los de G.2, aunque no se puede decir que marque una tendencia concreta. También se ha demostrado en el caso del carcinoma secretor (CS), en el que la expresión en la mucosa es muy alta en el grado G.1 (Gráfico 32.2).

4.6.4. *PROTEÍNA P53*

La expresión de la proteína P53 en el carcinoma endometrioide simple (CES) sigue una tendencia directamente proporcional al grado tumoral de la clasificación de la FIGO, esto es, a menor grado tumoral, menor expresión de la

proteína P53. Los adenoacantomas (AAC) mostraron el mismo nivel (bajo) de expresión en el grado G.1 que en el G.2, mientras que de los carcinomas mucinosos (CM) sólo mostraron expresión baja de P53 los de grado G.1. Por otro lado los carcinomas secretores no mostraron expresión (Gráfico 33.1).

En la mucosa adyacente al tumor, no observamos expresión de P53 en ningún tipo, ni grado tumoral de los carcinomas endometriales que hemos estudiado.

4.6.5. *PROTEÍNA bcl-2*

La expresión de la proteína bcl-2 en el carcinoma endometriode simple (CES) sigue una tendencia inversamente proporcional al grado tumoral según la clasificación de la FIGO, es decir, a menor grado de malignidad, mayor expresión de bcl-2. Igual ocurre con los adenoacantomas (AAC) y con el carcinoma adenoescamoso (CAE). El carcinoma mucinoso (CM) tiene muy poca expresión en el grado G.1, al contrario que el carcinoma secretor (CS) que muestra una expresión elevada en el grado G.1, la cual ha resultado ser la máxima expresión en nuestro estudio (Gráfico 34.1).

En la mucosa adyacente al tumor, la expresión de bcl-2 en los carcinomas endometrioides simples (CES) es alta en todos los grados de la clasificación de la FIGO, aunque muestra escasas diferencias entre los tres grados tumorales. Los adenoacantomas (AAC) tienden a expresar mayor tinción de bcl-2 en el grado G.1 que en el grado G.2, al igual que en el carcinoma adenoescamoso (CAE), no siendo así en los carcinomas mucinoso (CM) en los que el G.1 expresa menor Bcl-2 que el grado G.2. Respecto al carcinoma secretor (CS) la expresión de Bcl-2 fue alta para el grado G.1 (la máxima) (Gráfico 34.2).

4.6.6. *PROTEÍNA c-erbB-2*

La expresión de la proteína c-erbB-2 en los carcinomas endometrioides simples (CES), ha seguido una tendencia directamente proporcional al grado tumoral de la clasificación de la FIGO, es decir, a menor grado de malignidad, menor expresión. Lo mismo ocurre en los adenoacantomas (AAC), no siendo así

en los carcinomas adenoescamosos (CAE), los cuales muestran mayor expresión en el grado G.1 que en el grado G.2. Respecto al carcinoma mucinoso (CM) sólo los de grado 2 han mostrado expresión de c-erbB-2. Los carcinomas secretores (CS) no han mostrado expresión (Gráfico 35.1).

En la mucosa adyacente al tumor, hemos encontrado expresión de c-erbB-2 tan sólo en algún caso aislado.

4.7. MANOVA

4.7.1. MEDIA DE LOS MARCADORES CONSIDERANDO TODOS LOS CASOS

Hemos realizado un estudio multivariante en el que analizamos la expresión media de cada uno de los marcadores en todos los grados de la FIGO en conjunto y hemos obtenido los siguientes valores: para RE en el tumor hemos hallado una expresión media aproximada del 38%, para los RP una media aproximada de 39%, para Mib-1 una media aproximada del 20%, para bcl-2 una media aproximada del 31%, para P53 del 19% y para la proteína c-erbB-2 una media aproximada de 29% (Tabla 22.1 y Gráfico 36.1).

4.7.2. MEDIA DE LOS MARCADORES SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DE LA FIGO

Al estudiar la media de expresión de cada uno de los marcadores en cada uno de los grados de la clasificación de la FIGO por separado, hemos obtenido para el grado G.1, una expresión media de RE del 41'41%, de RP del 45'11%, de Mib-1 del 9'51%, de Bcl-2 del 33'91%, de P53 del 7'41% y de C-erbB-2 del 21'91%. En el grado G.2, encontramos una expresión media de RE del 30'23%, de RP del 27'88%, de Mib-1 del 27'57%, de Bcl-2 del 27'11%, de P53 del 32'34% y de C-erbB-2 del 37'15%. Para el grado G.3, obtuvimos una expresión media para los RE del 24'28%, para RP del 7'85, para Mib-1 del 71'42%, para Bcl-2 del 21'42%, para P53 del 58'57%, y para C-erbB-2 del 60%.

Al estudiar cada uno de los marcadores en los tres grados de la clasificación de la FIGO, comprobamos que tanto los RE como los RP y la proteína Bcl-2 son inversamente proporcionales al grado tumoral, por lo tanto a menor índice tumoral, mayor expresión de dichos marcadores. Por el contrario la proteína Mib-1, la proteína P53 y el oncogén c-erbB-2 son directamente proporcionales al grado de malignidad, esto es, a mayor grado de malignidad, mayor expresión de dichos marcadores (Tabla 22.2 y Gráfico 36.2).

4.8. MEDIA DE LOS MARCADORES RESPECTO A CADA UNO DE LOS SUBTIPOS ANATOMOPATOLÓGICOS

4.8.1. MEDIA DE RE Y RP EN CADA SUBTIPO HISTOLÓGICO

Dentro de los carcinomas endometrioides, hemos valorado cada uno de los subtipos histológicos.

De este modo, los adenoacantomas han mostrado en la zona tumoral una expresión media de RE del 25'0% y para los RP del 26'6%, mientras que en la zona de mucosa próxima al tumor unos RE con expresión media del 72% y de RP del 80%.

Para los carcinomas adenoescamosos hallamos una expresión media de RE del 12'5% y de RP del 20'5%; estos resultados no son significativos debido a que sólo uno de estos carcinomas ha mostrado positividad para estos receptores, y por tanto puede alterar los valores reales. Mientras que en la mucosa encontramos una expresión media de RE del 73'33% y de RP del 56'67%.

Para los carcinomas endometrioides simples la expresión media de RE en la zona tumoral ha sido del 39'45% y para los RP del 39'63%. Mientras que en la zona adyacente al tumor, ha sido del 80'75% para los RE y del 80'63% para los RP.

Los carcinomas mucinosos han mostrado una expresión media de RE en la zona tumoral de 42'50% y de RP de 37'50%, y en la zona de mucosa ha sido del 90% para los RE y del 70% para los RP. Los carcinomas de tipo secretor, sólo hemos encontrado un caso, el cual mostraba una expresión nula tanto para los RE como para los RP.

Respecto a los carcinomas especiales, los carcinomas de células claras no mostraron positividad para los RE y RP en la zona tumoral, sin embargo presentaron alta positividad de tinción tanto para los RE (95%) como para los RP (85%). En los carcinomas papilares serosos sólo hemos encontrado un caso, de los cuatro que teníamos, que haya mostrado positividad para dichos receptores en la zona tumoral, con lo cual hemos obtenido una expresión media para los RE del 2'50% y del 1'25%. Por el contrario, en la zona de mucosa hemos encontrado positividad en todos los casos habiendo sido la media para los RE de 75% y para lo RP de 75% (Tabla 23).

4.8.2. MEDIAS DE P53 Y Mib1 EN CADA SUBTIPO HISTOLÓGICO

Hemos analizado también la expresión del marcador de proliferación P53 y la proteína Mib-1 en los diferentes subtipos histológicos, tanto en la mucosa como en la zona tumoral.

De esta manera en la zona tumoral, los adenoacantomas mostraron una expresión media del 15%, los carcinomas adenoescamosos del 5'50%, los carcinomas de células claras del 8'50%, los carcinomas endometrioides simples del 19'68%, los carcinomas mucinosos del 5%, los carcinomas papilares serosos del 57'50% y en los carcinomas secretores la expresión fue nula. En la mucosa, ninguno de los carcinomas presentó expresión de la proteína P53 (Tabla 24).

Respecto a la proteína Mib-1, en la zona tumoral los adenoacantomas presentan una expresión media del 10'33%, los carcinomas adenoescamosos de 10'00%, los carcinomas de células claras del 47'50%, los carcinomas endometrioides simples del 20'58%, los carcinomas mucinosos del 17'50%, los carcinomas papilares serosos del 66'25% y los carcinomas secretores del 5%. En

la zona de mucosa solamente mostraron algo de expresión los carcinomas de células claras, los carcinomas endometrioides simples, los carcinomas papilares serosos y los carcinomas secretores, siendo en todos ellos muy baja (Tabla 24).

4.8.3. MEDIAS DE *bcl-2* Y *c-erbB-2* EN CADA SUBTIPO HISTOLÓGICO

También hemos valorado la expresión media de los oncogenes Bcl-2 y c-erbB-2 en los diferentes tipos histológicos, y los resultados obtenidos han sido los siguientes: para el oncogén Bcl-2, en la zona tumoral los adenoacantomas mostraron un expresión media del 15'83%, los carcinomas adenoescamosos del 22'50%, los carcinomas endometrioides simples del 32'50%, los carcinomas mucinosos del 2'50%, los carcinomas papilares serosos del 7'50%, los carcinomas secretores del 100% y en los carcinomas de células claras la expresión fue nula. En la mucosa, la expresión ha sido alta en todos los casos, entre el 72% y el 100%, excepto en los carcinomas mucinosos en los que la expresión fue del 17'50% (Tabla 25).

La expresión de la oncoproteína c-erbB-2 en la zona tumoral ha sido para los adenoacantomas del 32'50%, los carcinomas adenoescamosos del 50%, los carcinomas de células claras del 75%, los carcinomas endometrioides simples del 29'31%, los carcinomas mucinosos del 20'00%, los carcinomas papilares serosos del 73'75% y en los carcinomas secretores la expresión fue nula. En la mucosa adyacente al tumor la expresión fue nula en todos los casos, excepto en los carcinomas endometrioides que fue mínima con 1'43% (Tabla 25).

4.9. DIAGRAMA EN PIRÁMIDE

En este gráfico reflejamos cómo se expresan los RE y los marcadores de proliferación P53 y Mib-1 con respecto a la invasión miometrial que se produce en nuestros casos.

La zona de la pirámide que no se colorea, se debe a los casos en los que únicamente se ha estudiado el legrado, como es obvio en estos casos no se ha podido valorar el miometrio y su posible afectación.

La zona central corresponde a los tumores con mayor invasión miometrial (>3'00), y vemos que dicha variable se relaciona directamente tanto con el marcador de proliferación P53 como con el Mib-1. Sin embargo la relación obtenida ha sido inversa entre los RE y la invasión miometrial.

Así, la expresión de P53 en la zona de máxima invasión miometrial está entre 0'2 y 1, la expresión de Mib-1 se encuentra entre 0'4 y 0'75, mientras que para los RE la expresión ha sido baja, situándose entre 0 y 0'4.

Alrededor de la zona central de la pirámide, van apareciendo los diferentes niveles de invasión que son marcados con distintos colores. Conforme nos vamos alejando del centro, encontramos menor invasión. (Gráfico 37).

TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

5.1 Tablas y Gráficos

En la tabla 1 hemos recogido todos los datos de cada uno de los casos estudiados. Así, hemos apuntado el número de biopsia, la edad, el tipo de toma, el grado según la clasificación de la FIGO, el subtipo histológico, el tipo tumoral, el grado nuclear, la invasión miometrial, la invasión vascular, la expresión de cada uno de los marcadores por una parte en la zona tumoral y por otra en la mucosa adyacente al tumor, y además la existencia o no de hiperplasia endometrial.

Algunos de las abreviaturas que hemos empleado:

- L/H: Legrado/Histerectomía.
- C. FIGO: Clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.
- E: Carcinomas especiales
- G.1, G.2, G.3: Grado 1, 2, 3.
- AAC: Adenoacantoma.
- CAE: Carcinoma adenoescamoso.
- CCC: Carcinoma de células claras.
- CES: Carcinoma endometriode simple.
- CM: Carcinoma mucinoso.
- CPS: Carcinoma papilar seroso.
- CS: Carcinoma secretor.

- GCE: Grupo de carcinomas especiales.
- CE: Carcinoma endometriode.
- G.N.: Grado Nuclear.
- I. MIO: Invasión miometrial.
- I. VASC: Invasión vascular.
- T.----: Tumor.
- ¥: No valorable.

Gráfico 1. DISTRIBUCIÓN POR EDADES DE LA MUESTRA

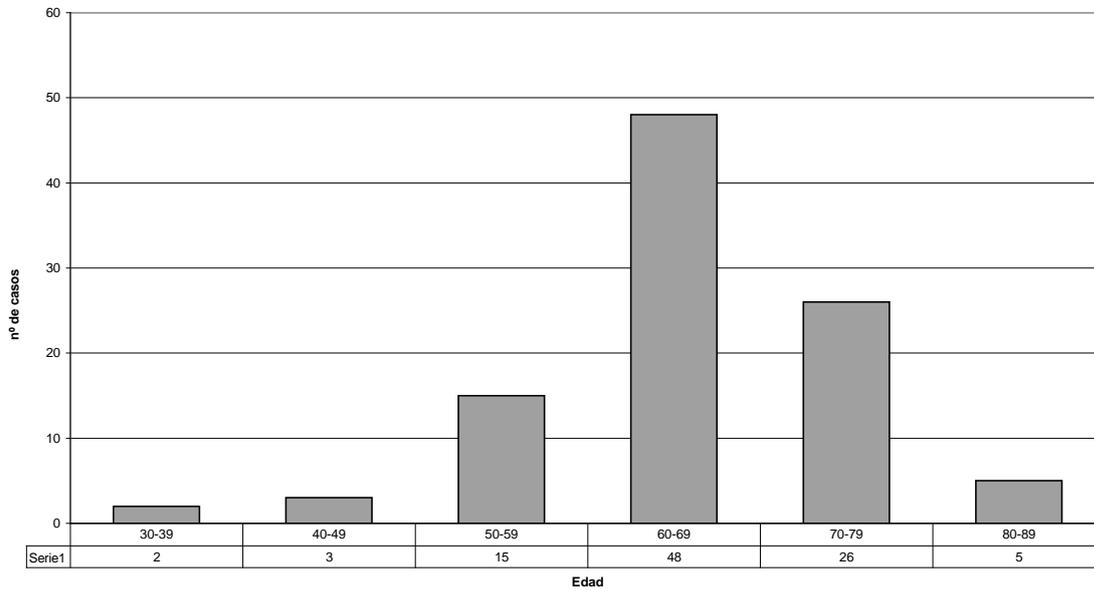


Tabla 1.1. Edad media

Edad media: 65,434
 Desviación standard: 8,952
 Error Standard: 0,900
 N° de casos: 99
 Rango:[35;88]

Tabla 1.2. Edad media según la C. FIGO

CI Figo	N° de casos	Edad media	Desviación Edad
E	6	67,67	6,41
G1	60	65,83	7,76
G2	26	64,54	10,64
G3	7	63,43	14,02
Total general	99	65,43	8,95

Gráfico 2. TIPO DE TOMA DE MUESTRA

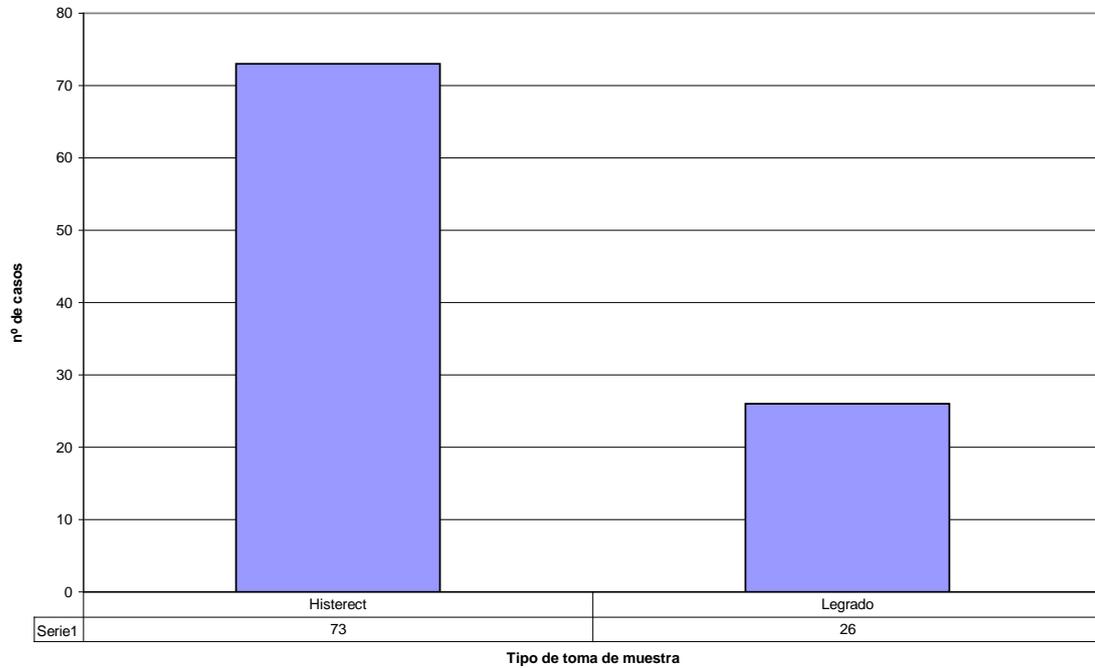


Gráfico 3. CASOS SEGÚN CLASIFICACIÓN DE LA FIGO

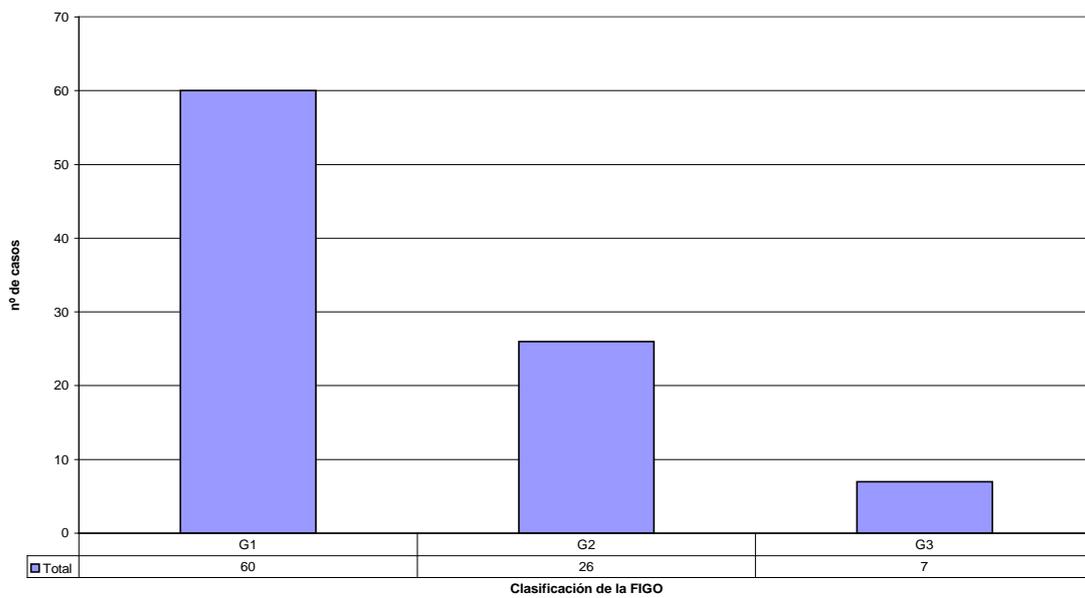


Gráfico 4. TIPO HISTOLOGICO

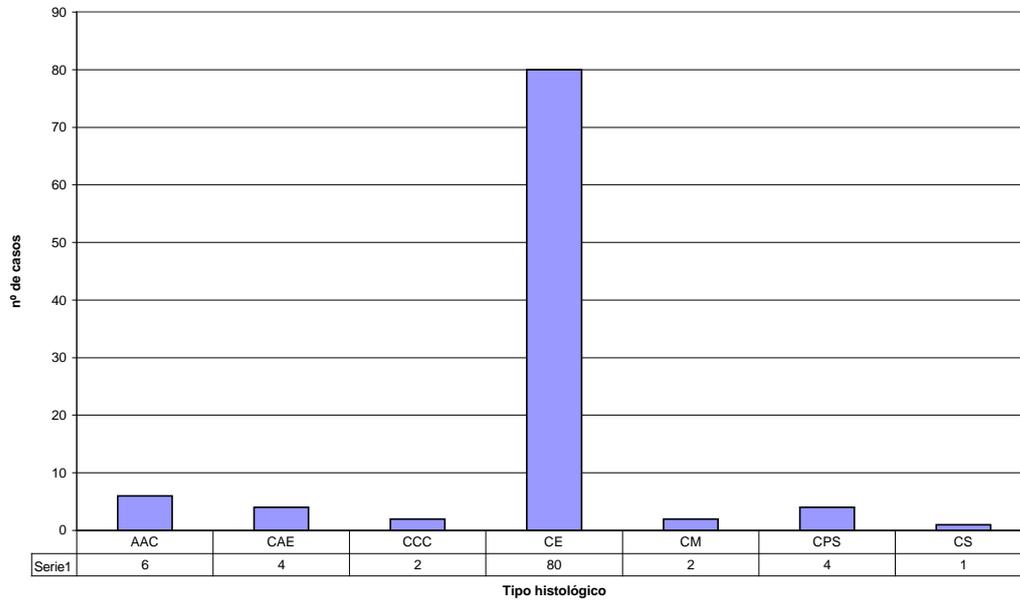


Tabla 26. Número de casos de los subtipos histológicos según la C. FIGO

	G1	G2	G3	
AAC	4	2	0	6
	6,67	7,69	0,00	
CAE	2	2	0	4
	3,33	7,69	0,00	
CE	52	21	7	80
	86,67	80,77	100,00	
CM	1	1	0	2
	1,67	3,85	0,00	
CS	1	0	0	1
	1,67	0,00	0,00	
	60	26	7	93

Gráfico 5. CLASIFICACIÓN FIGO - TIPO HISTOLÓGICO

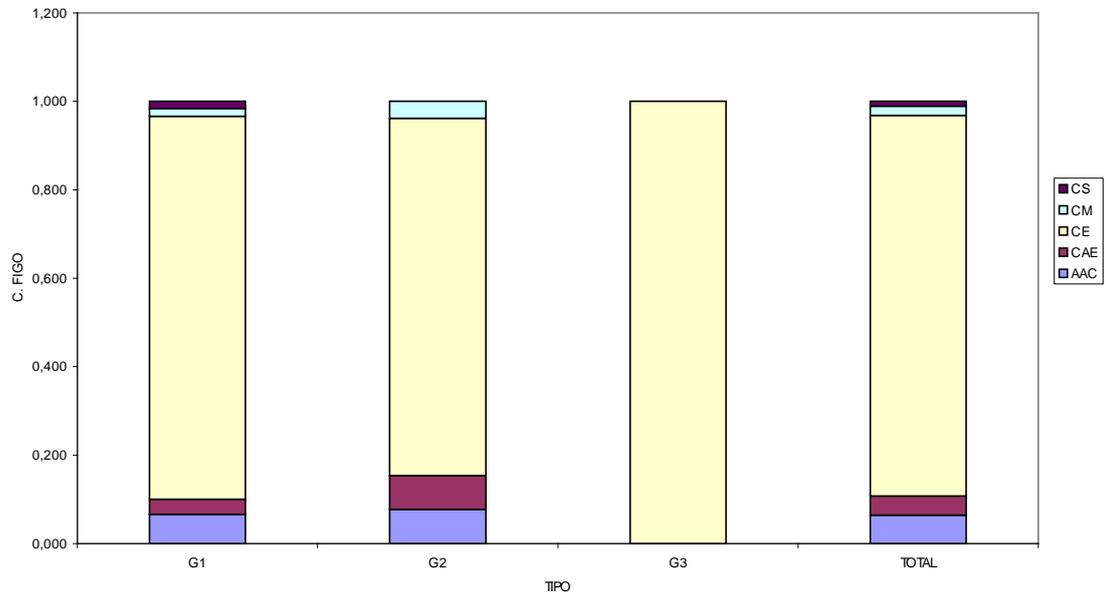


Gráfico 6. GRADO NUCLEAR

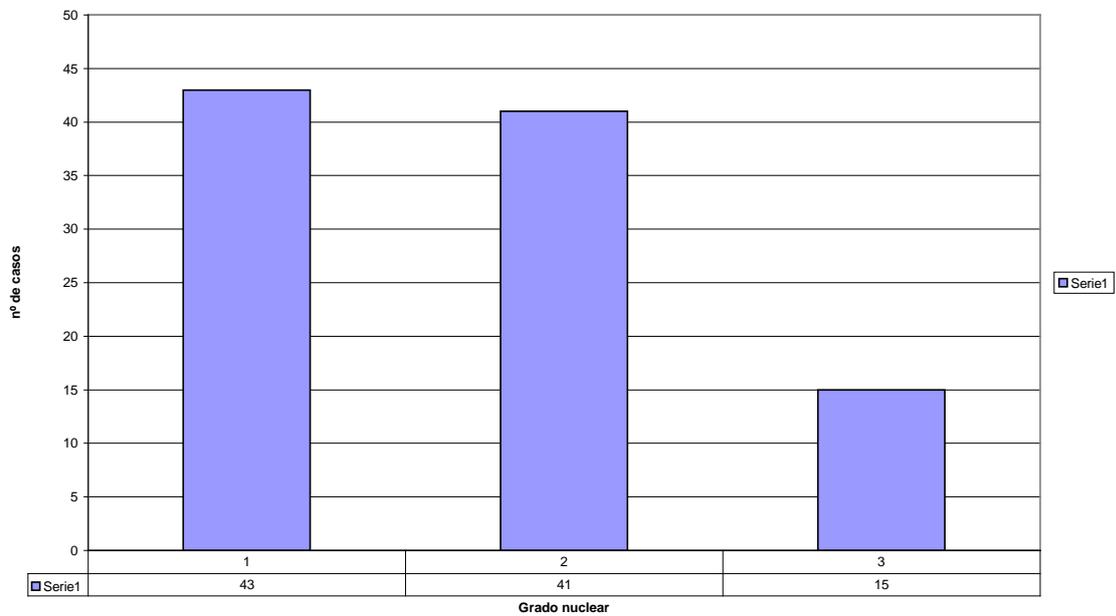


Gráfico 7. INVASIÓN MIOMETRIAL

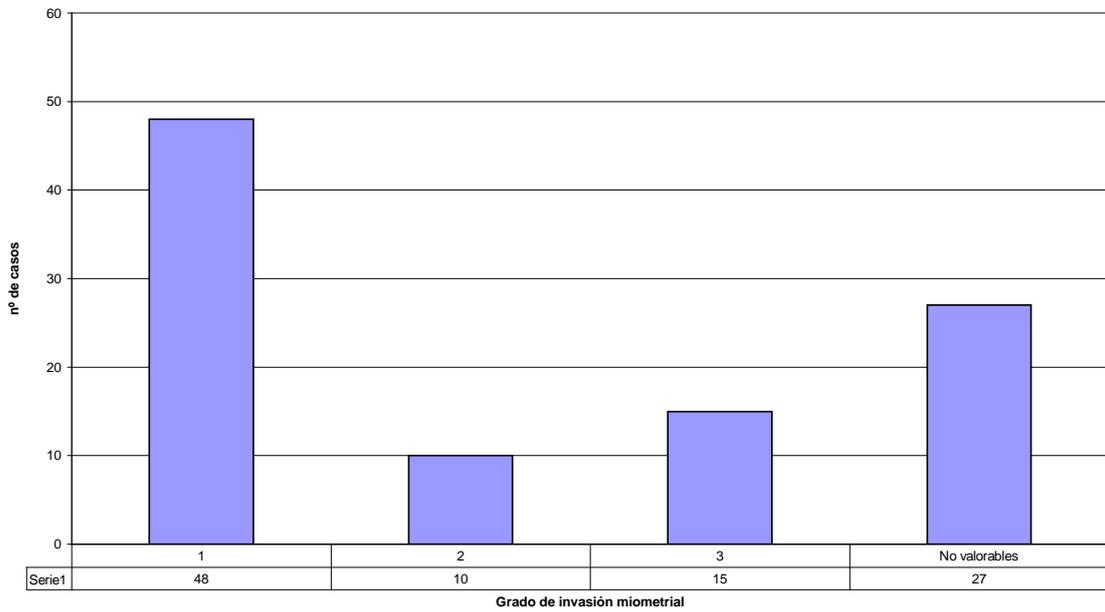


Gráfico 8. INVASIÓN VASCULAR

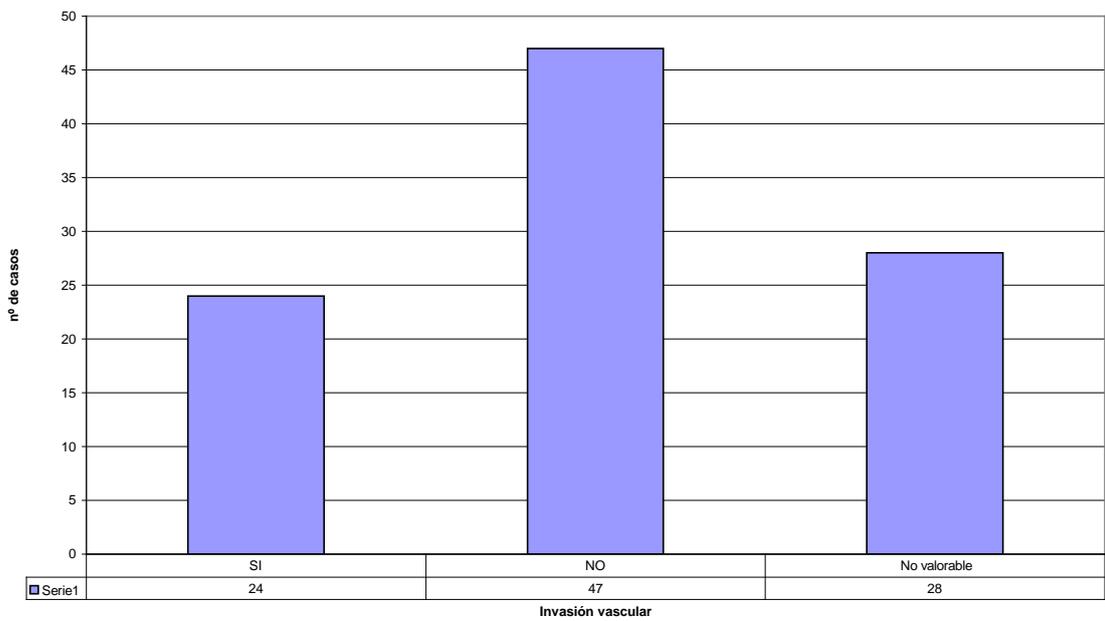


Gráfico 9. HIPERPLASIA ENDOMETRIAL

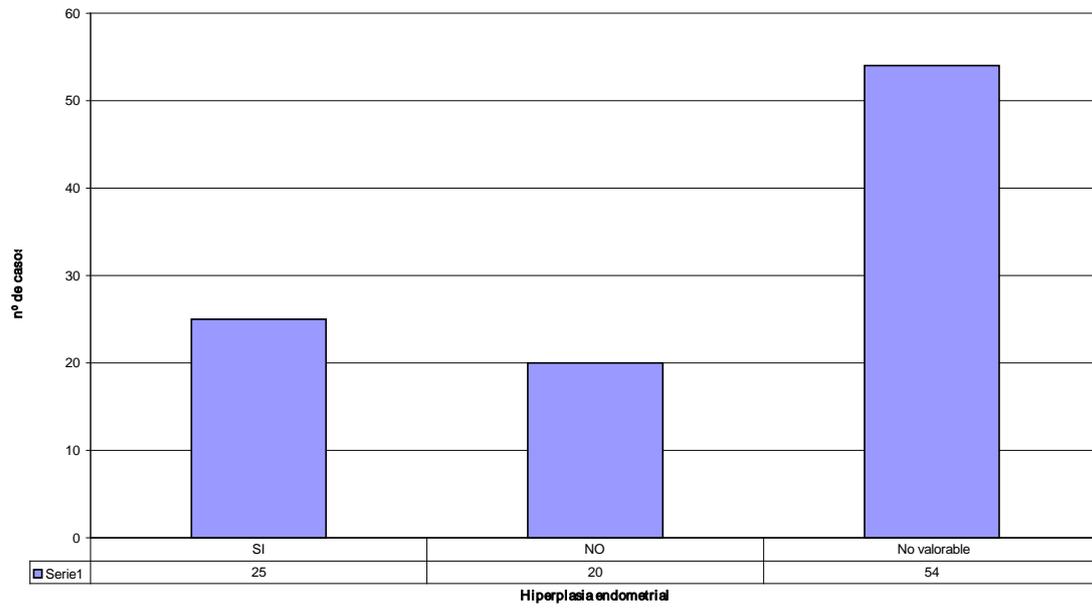


Tabla 2.1. Análisis de la varianza de los RE en la zona tumoral.

ANOVA Table for T. RE

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	3493,37	1746,69	1,45	,2396
Residual	90	108290,63	1203,23		

Model II estimate of between component variance: 23,38

Tabla 2.2. Expresión de RE según C. FIGO.

Means Table for T. RE
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	60	41,42	35,00	4,52
G2	26	30,23	34,56	6,78
G3	7	24,29	32,07	12,12

Tabla 2.3. Diferencia de expresión de RE entre los grupos de C. FIGO.

Fisher's PLSD for T. RE
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
G1, G2	11,19	16,18	,1730
G1, G3	17,13	27,52	,2195
G2, G3	5,95	29,34	,6883

Gráfico 10. Expresión media de RE según la C. FIGO.

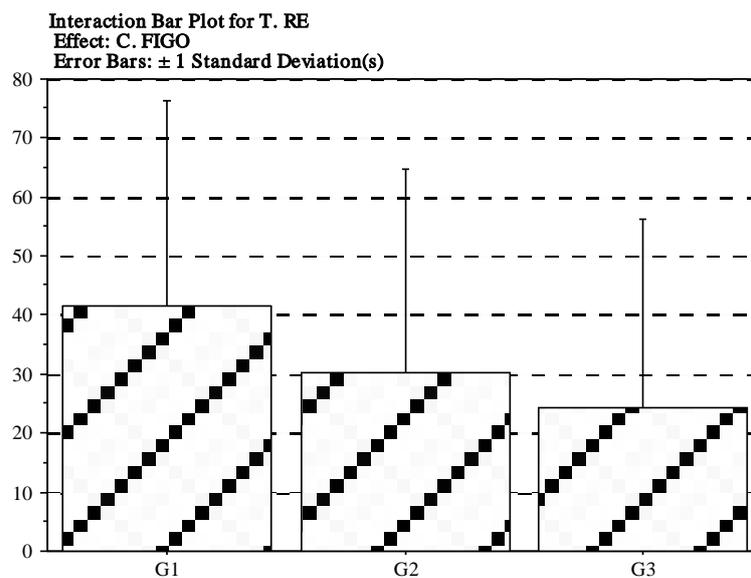


Tabla 3.1. Análisis de la varianza de los RP en la zona tumor.

ANOVA Table for T. RP

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	12035,55	6017,78	6,25	,0029
Residual	90	86649,69	962,77		

Model II estimate of between component variance: 217,44

Tabla 3.2. Expresión de RP según C. FIGO.

Means Table for T. RP
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	60	45,12	33,02	4,26
G2	26	27,88	29,54	5,79
G3	7	7,86	9,06	3,43

Tabla 3.3. Diferencia de expresión de RP entre los grupos de C.FIGO.

Fisher's PLSD for T. RP
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
G1, G2	17,23	14,47	,0202	S
G1, G3	37,26	24,62	,0034	S
G2, G3	20,03	26,25	,1331	

Gráfico 11. Expresión media de RP según la C. FIGO.

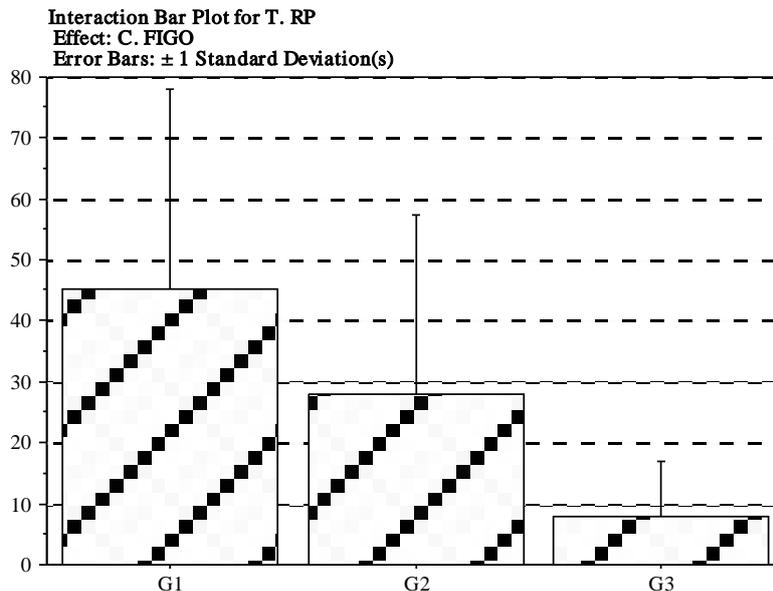


Tabla 4.1. Análisis de la varianza del Ac. Mib-1 en la zona tumoral.

ANOVA Table for T. MIB

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	26545,21	13272,61	57,43	<,0001
Residual	90	20801,04	231,12		

Model II estimate of between component variance: 560,99

Tabla 4.2. Expresión de Mib según C. FIGO.

Means Table for T. MIB
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	60	9,52	10,18	1,31
G2	26	27,58	23,67	4,64
G3	7	71,43	10,69	4,04

Tabla 4.3. Diferencias de expresión de Mib entre los grupos de C. FIGO.

Fisher's PLSD for T. MIB
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
G1, G2	-18,06	7,09	<,0001	S
G1, G3	-61,91	12,06	<,0001	S
G2, G3	-43,85	12,86	<,0001	S

Gráfico 12. Expresión media de Ac. Mib-1 según la C. FIGO.

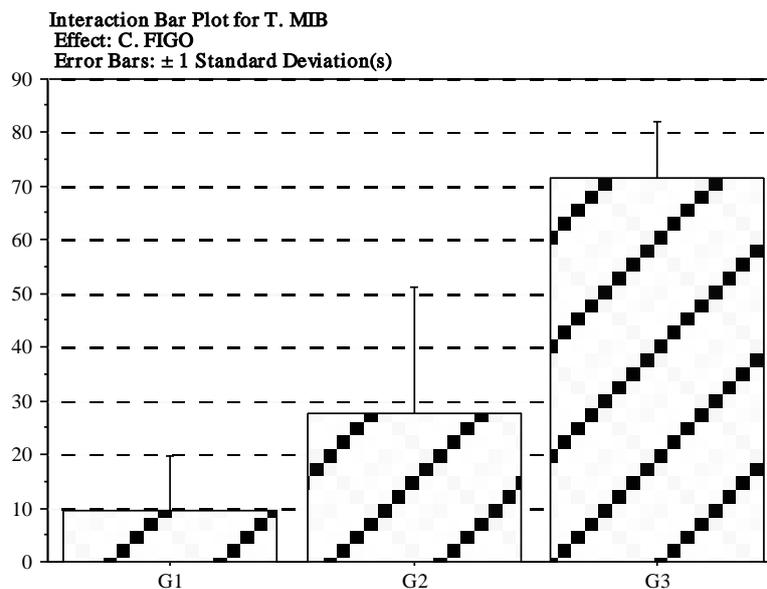


Tabla 5.1. Análisis de la varianza de la proteína P53 en la zona tumoral.

ANOVA Table for T. p53

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	23588,61	11794,31	18,04	<,0001
Residual	90	58848,18	653,87		

Model II estimate of between component variance: 479,21

Tabla 5.2. Expresión de P53 según C. FIGO.

Means Table for T. p53
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	60	7,42	16,94	2,19
G2	26	32,35	37,35	7,33
G3	7	58,57	34,24	12,94

Tabla 5.3. Diferencias de expresión de P53 entre los grupos de C. FIGO.

Fisher's PLSD for T. p53
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
G1, G2	-24,93	11,93	<,0001	S
G1, G3	-51,15	20,29	<,0001	S
G2, G3	-26,23	21,63	,0181	S

Gráfico 13. Expresión media de la proteína P53 según la C. FIGO.

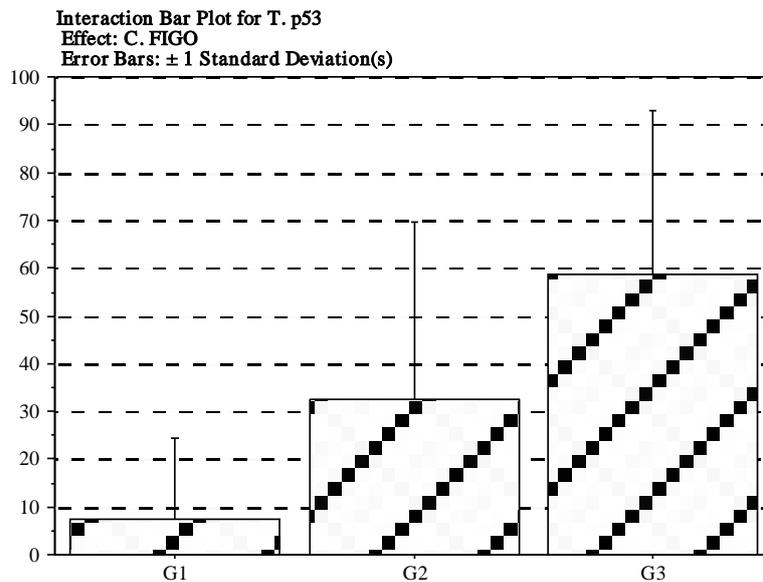


Tabla 6.1. Análisis de la varianza de la proteína bcl-2 en la zona tumoral.

ANOVA Table for T. bcl-2

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	1543,52	771,76	,59	,5582
Residual	90	118348,95	1314,99		

Model II estimate of between component variance: •

Tabla 6.2. Expresión de bcl-2 según C. FIGO.

Means Table for T. bd-2
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	60	33,92	35,99	4,65
G2	26	27,12	38,08	7,47
G3	7	21,43	30,78	11,64

Tabla 6.3. Diferencias de expresión de bcl-2 entre los grupos de C. FIGO.

Fisher's PLSD for T. bcl-2
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
G1, G2	6,80	16,92	,4265
G1, G3	12,49	28,77	,3909
G2, G3	5,69	30,68	,7135

Gráfico 14. Expresión media de la proteína bcl-2 según la C. FIGO.

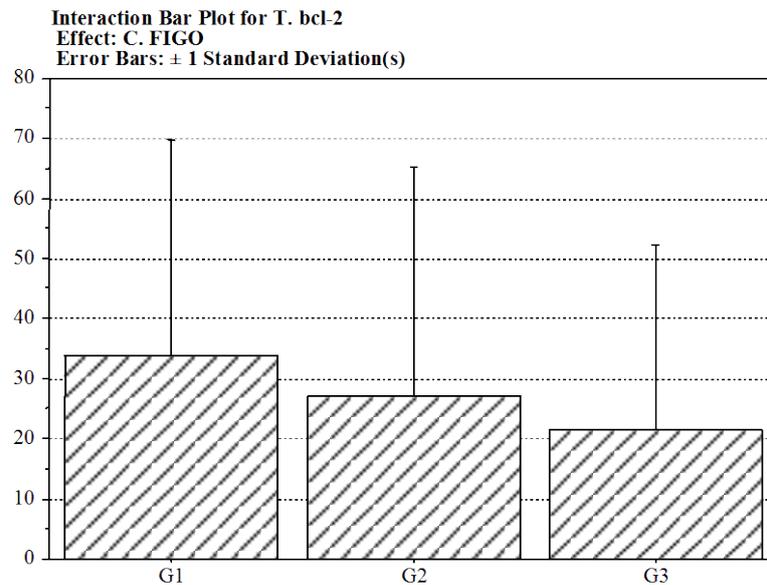


Tabla 7.1. Análisis de la varianza de la oncoproteína C-erbB-2 en la zona tumoral.

ANOVA Table for T. cerb-2

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	11465,86	5732,93	6,17	,0031
Residual	90	83689,97	929,89		

Model II estimate of between component variance: 206,61

Tabla 7.2. Expresión de C-erbB-2 según C. FIGO.

Means Table for T. cerb-2
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	60	21,92	28,04	3,62
G2	26	37,15	34,34	6,74
G3	7	60,00	36,06	13,63

Tabla 7.3. Diferencias de expresión de C-erbB-2 entre los grupos de la C.FIGO.

Fisher's PLSD for T. cerb-2
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value	
G1, G2	-15,24	14,22	,0361	S
G1, G3	-38,08	24,20	,0024	S
G2, G3	-22,85	25,80	,0819	

Gráfico 15. Expresión media de C-erbB-2 según la C. FIGO.

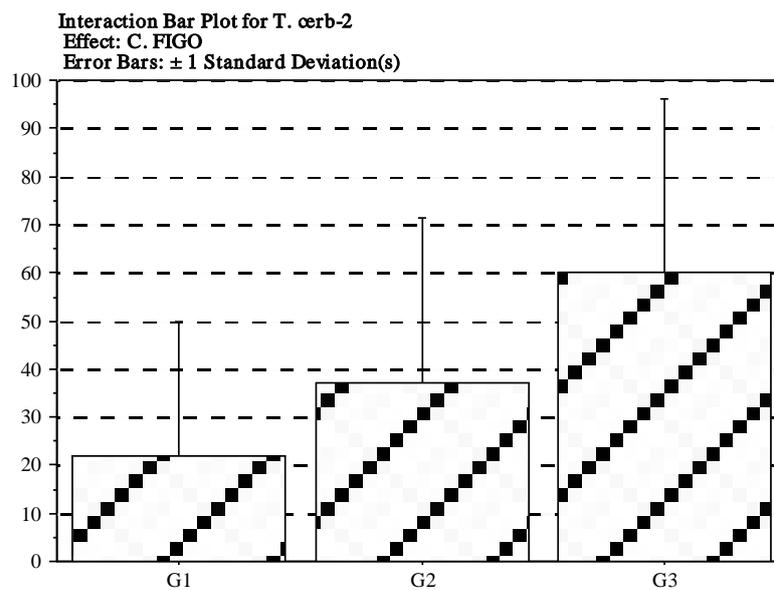


Tabla 8.1. Análisis de la varianza de RE en la mucosa.

ANOVA Table for M. RE

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	82,08	41,04	,10	,9084
Residual	64	27299,77	426,56		

Model II estimate of between component variance: •
26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 8.2. Expresión de RE según C. FIGO.

Means Table for M. RE
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	44	80,45	19,16	2,89
G2	17	80,71	23,15	5,61
G3	6	76,67	24,22	9,89

26 cases were omitted due to missing values.

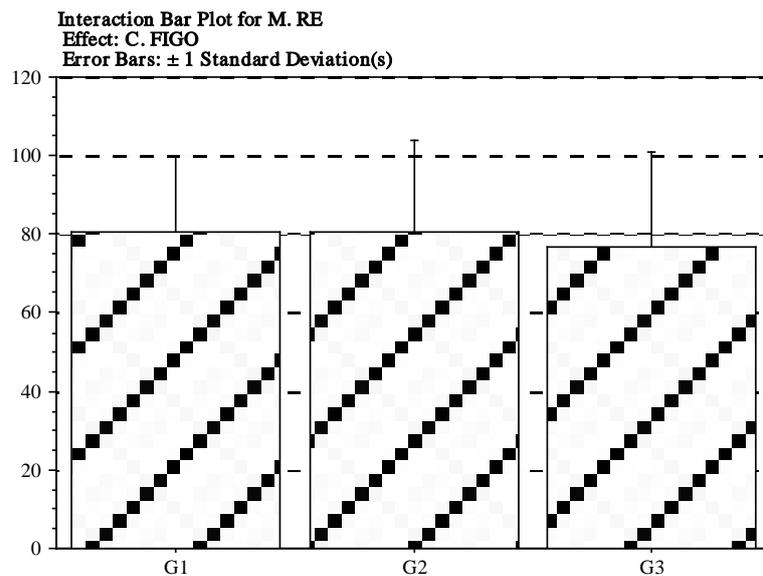
Tabla 8.3. Diferencias de expresión de RE entre los grupos de la C. FIGO.

Fisher's PLSD for M. RE
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
G1, G2	-,25	11,78	,9661
G1, G3	3,79	17,96	,6749
G2, G3	4,04	19,59	,6818

26 cases were omitted due to missing values.

Gráfico 16. Expresión media de RE en la mucosa según la C. FIGO.



26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 9.1. Análisis de la varianza de RP en la mucosa.

ANOVA Table for M. RP

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	1375,66	687,83	1,67	,1959
Residual	64	26319,12	411,24		

Model II estimate of between component variance: 16,64
26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 9.2. Expresión de RP según C. FIGO.

Means Table for M. RP
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	44	82,50	16,44	2,48
G2	17	74,41	27,27	6,61
G3	6	70,00	23,66	9,66

26 cases were omitted due to missing values.

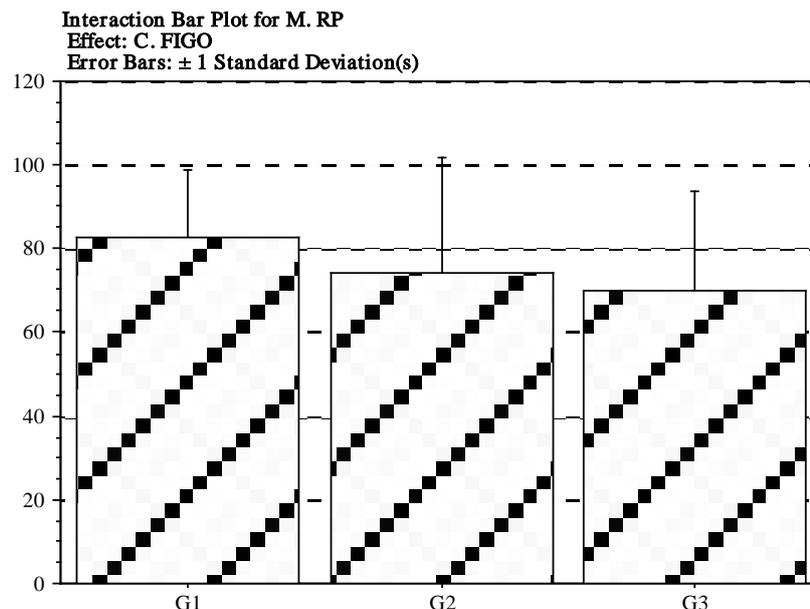
Tabla 9.3. Diferencias de expresión de RP entre los grupos de la C. FIGO.

Fisher's PLSD for M. RP
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
G1, G2	8,09	11,57	,1673
G1, G3	12,50	17,63	,1615
G2, G3	4,41	19,24	,6484

26 cases were omitted due to missing values.

Gráfico 17. Expresión media de RP en la mucosa según la C. FIGO.



26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 10.1. Análisis de la varianza del Ac Mib-1 en la mucosa.

ANOVA Table for M. MIB

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	8,01	4,01	,41	,6642
Residual	64	622,61	9,73		

Model II estimate of between component variance: •
26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 10.2. Expresión de Mib según C. FIGO.

Means Table for M. MIB
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	44	1,32	3,65	,55
G2	17	,53	1,33	,32
G3	6	,83	2,04	,83

26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 10.3. Diferencias de expresión de Mib entre los grupos de la C. FIGO.

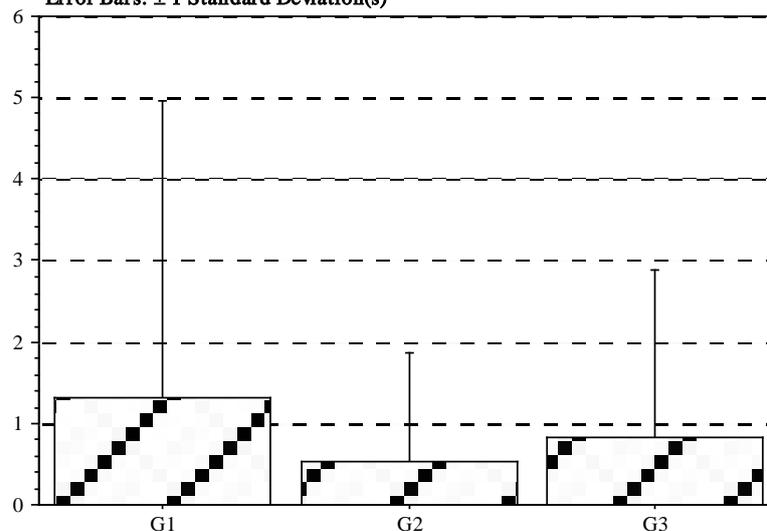
Fisher's PLSD for M. MIB
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
G1, G2	,79	1,78	,3792
G1, G3	,48	2,71	,7221
G2, G3	-,30	2,96	,8381

26 cases were omitted due to missing values.

Gráfico 18. Expresión media de Ac. Mib en mucosa según la C. FIGO.

Interaction Bar Plot for M. MIB
Effect: C. FIGO
Error Bars: ± 1 Standard Deviation(s)



26 cases were omitted due to missing values.

Gráfico 19. Expresión de Ac. Mib-1 en la mucosa tanto normal como hiperplásica.

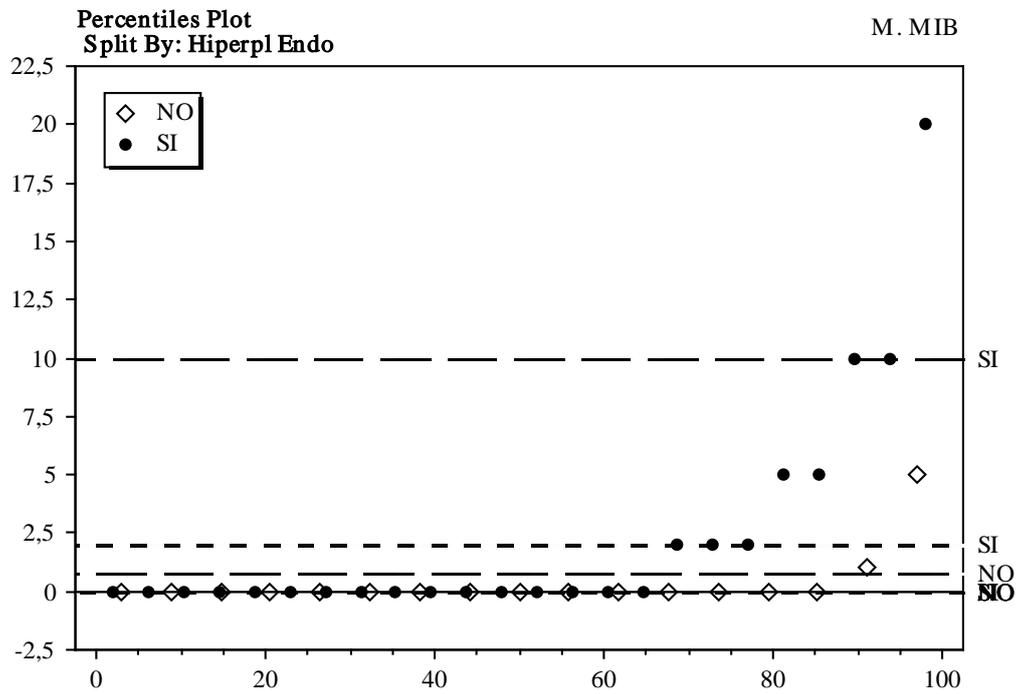


Tabla 11.1. Análisis de la varianza de la oncoproteína bcl-2 en la mucosa.

ANOVA Table for M. bcl-2

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
C. FIGO	2	112,22	56,11	,14	,8737
Residual	64	26542,26	414,72		

Model II estimate of between component variance: •
26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 11.2. Expresión de bcl-2 según C. FIGO.

Means Table for M. bcl-2
Effect: C. FIGO

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
G1	44	76,70	21,27	3,21
G2	17	74,12	20,33	4,93
G3	6	78,33	9,83	4,01

26 cases were omitted due to missing values.

Tabla 11.3. Diferencias de expresión de bcl-2 entre los grupos de la C. FIGO.

Fisher's PLSD for M. bcl-2
Effect: C. FIGO
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	P-Value
G1, G2	2,59	11,62	,6579
G1, G3	-1,63	17,71	,8548
G2, G3	-4,22	19,32	,6643

26 cases were omitted due to missing values.

Gráfico 20. Expresión media de la proteína bcl-2 en la mucosa según la C.FIGO.

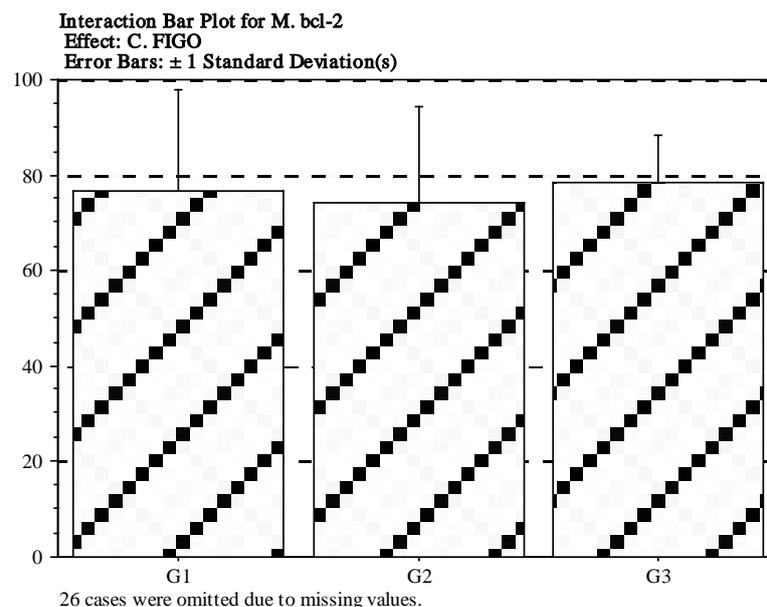


Tabla 13.1. Comparación entre la zona mucosa y la zona tumoral de la expresión de RE.

Paired Means Comparison
Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value	95% Lower	95% Upper
T. RE, M. RE	-44,21	66	-10,65	<,0001	-52,50	-35,92

Gráfico 22.

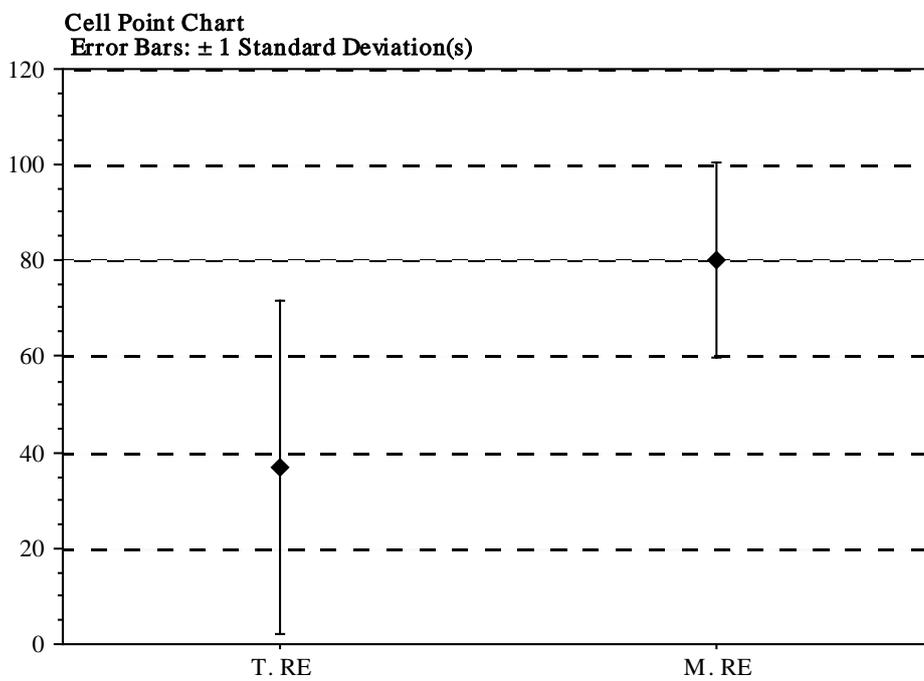


Tabla 14.1. Comparación entre la zona mucosa y la zona tumoral de la expresión de RP.

Paired Means Comparison
Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value	95% Lower	95% Upper
T. RP, M. RP	-39,85	66	-9,37	<,0001	-48,34	-31,36

Gráfico 23.

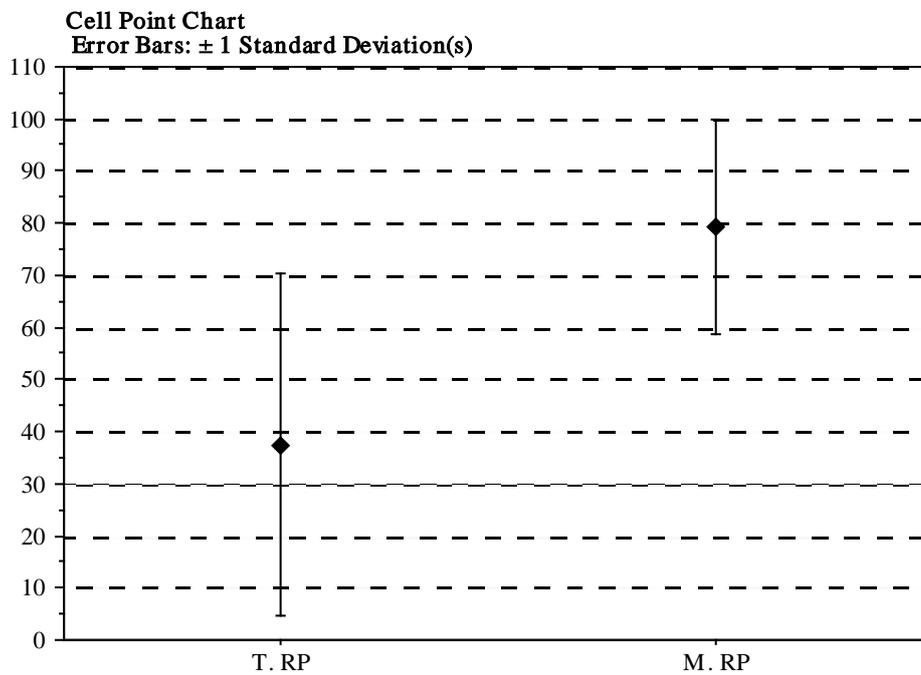


Tabla 15.1. Comparación entre la zona mucosa y la zona tumoral de la expresión de Mib.

Paired Means Comparison
Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value	95% Lower	95% Upper
T. MIB, M. MIB	19,40	66	6,83	<,0001	13,73	25,07

Gráfico 24.

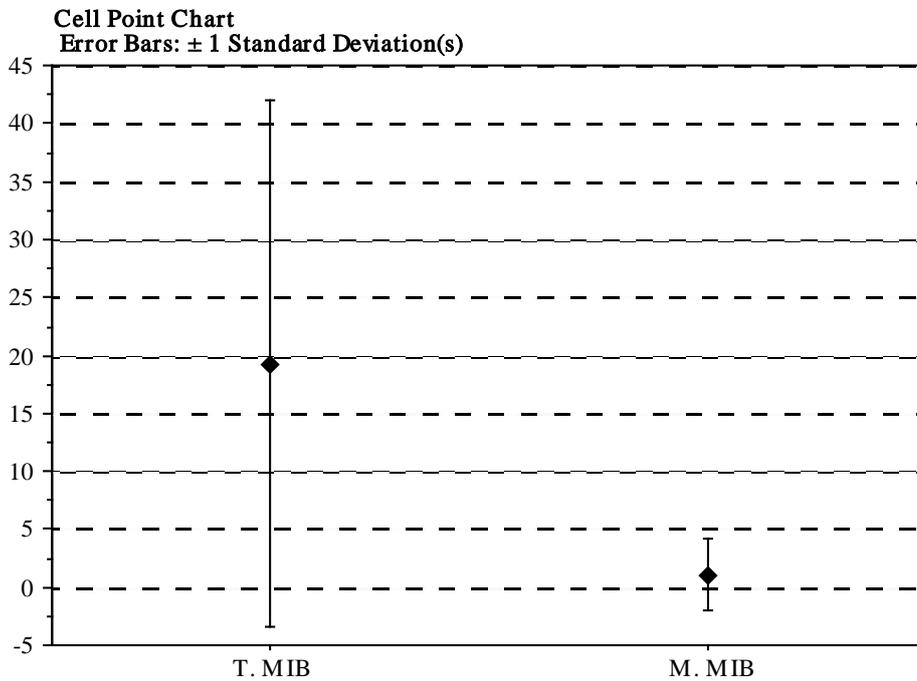


Tabla 16.1. Comparación entre la zona mucosa y la zona tumoral de la expresión de P53.

Paired Means Comparison
Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value	95% Lower	95% Upper
T. p53, M. p53	13,96	66	4,10	,0001	7,16	20,75

Gráfico 25.

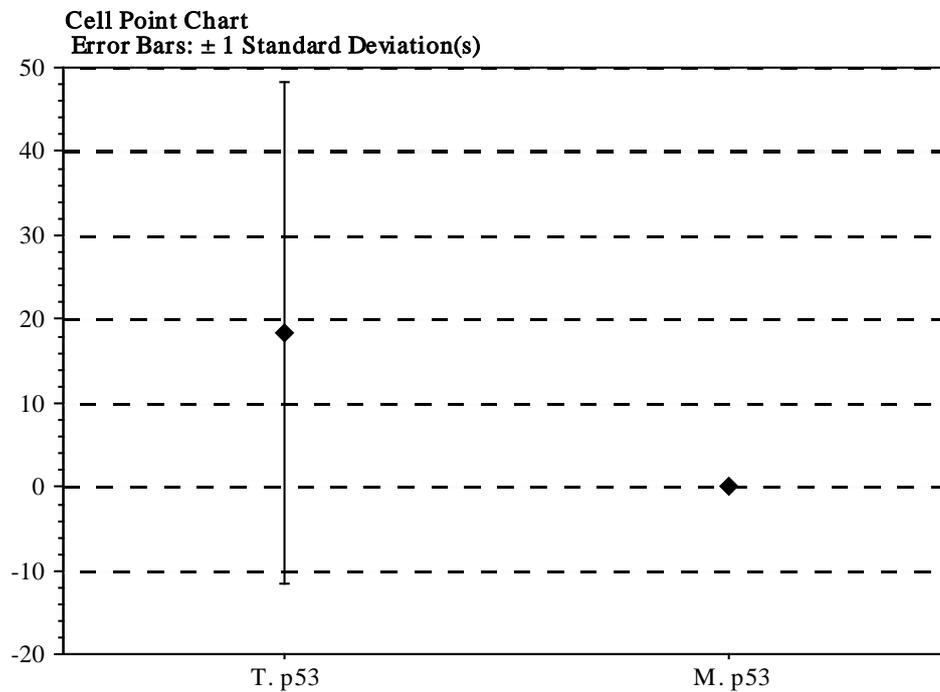


Tabla 17.1. Comparación entre la zona mucosa y la zona tumoral de la expresión de bcl-2.

Paired Means Comparison
Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value	95% Lower	95% Upper
T. bcl-2, M. bcl-2	-49,40	66	-11,95	<,0001	-57,66	-41,15

Gráfico 26.

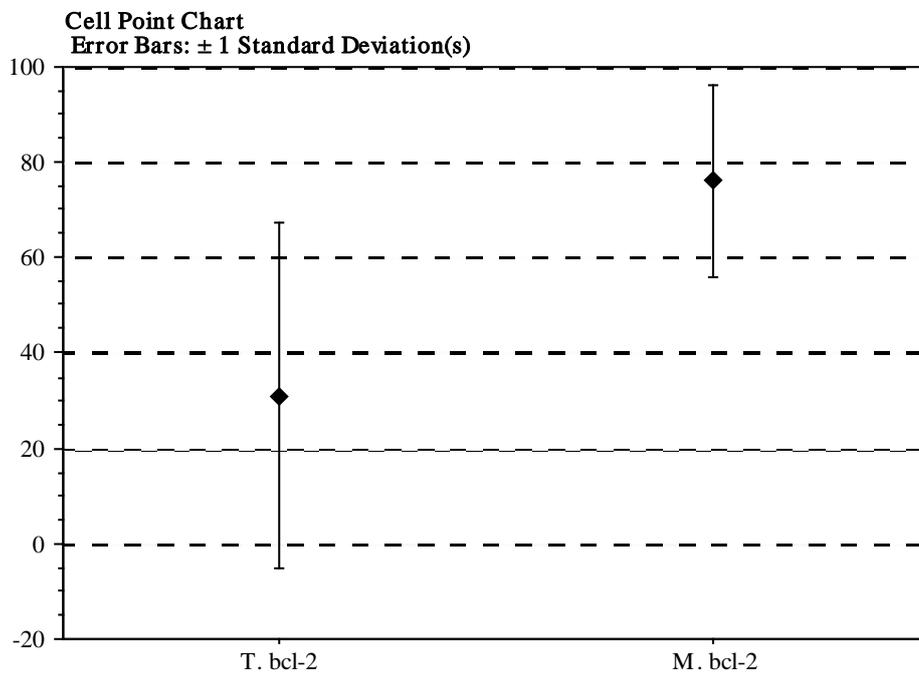


Tabla 18.1. Comparación entre la zona mucosa y la zona tumoral de la expresión de C-erbB-2.

Paired Means Comparison
Hypothesized Difference = 0

	Mean Diff.	DF	t-Value	P-Value	95% Lower	95% Upper
T. cerb-2, M. cerb-2	23,75	66	6,66	<,0001	16,63	30,86

Gráfico 27.

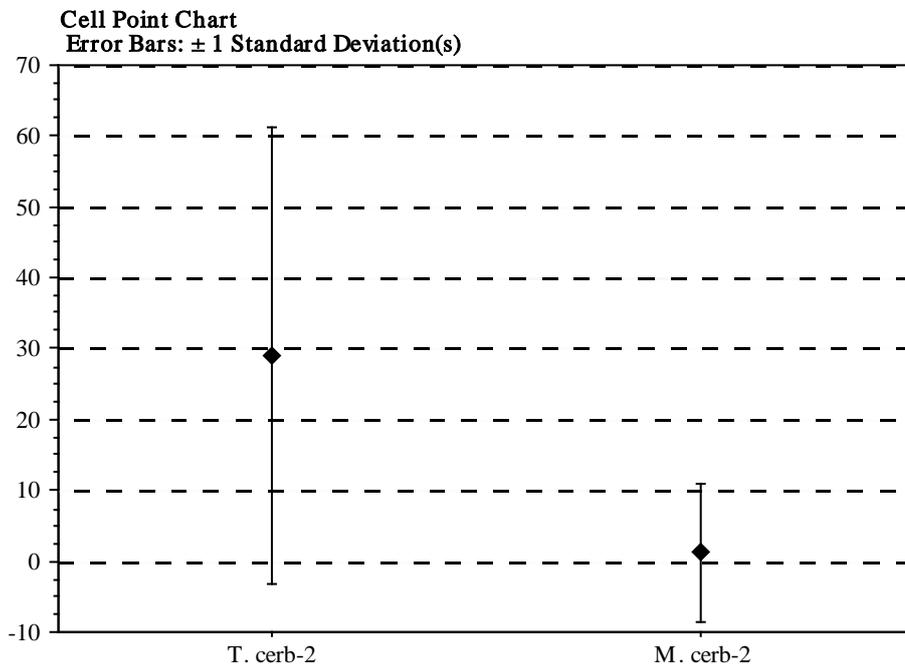


Tabla 19. Matriz de correlación de los diferentes marcadores.

Correlation Matrix

	T. RE	T. RP	T. MIB	T. bcl-2	T. p53	T. cerb-2
T. RE	1,00	,65	-,02	,22	-,07	,02
T. RP	,65	1,00	-,22	,31	-,25	-,08
T. MIB	-,02	-,22	1,00	-,07	,50	,41
T. bcl-2	,22	,31	-,07	1,00	-,01	,21
T. p53	-,07	-,25	,50	-,01	1,00	,45
T. cerb-2	,02	-,08	,41	,21	,45	1,00

93 observations were used in this computation.

Tabla 20.1. Correlación entre Mib y P53.

Regression Summary
T. MIB vs. T. p53

Count	93
Num. Missing	0
R	,50
R Squared	,25
Adjusted R Squared	,24
RMS Residual	19,78

Tabla 20.2.

ANOVA Table
T. MIB vs. T. p53

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Regression	1	11737,30	11737,30	30,00	<,0001
Residual	91	35608,96	391,31		
Total	92	47346,26			

Gráfico 28.

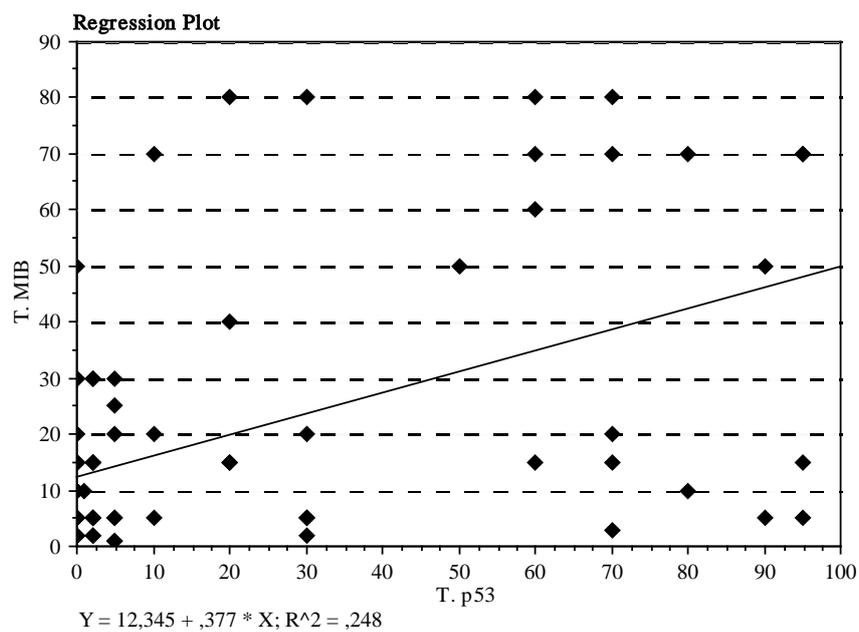


Tabla 21.1. Correlación entre RP y RE.

Regression Summary
T. RP vs. T. RE

Count	93
Num. Missing	0
R	,65
R Squared	,43
Adjusted R Squared	,42
RMS Residual	24,90

Tabla 21.2.

ANOVA Table
T. RP vs. T. RE

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Regression	1	42259,63	42259,63	68,15	<,0001
Residual	91	56425,62	620,06		
Total	92	98685,25			

Gráfico 29.

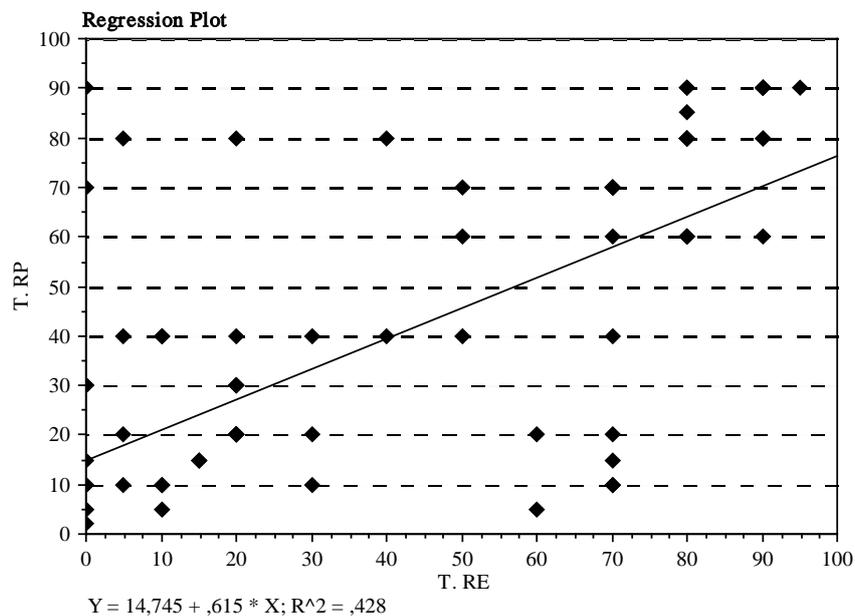


Gráfico 30.1. Expresión de los RE en la zona tumoral en cada tipo histológico según la C.FIGO.

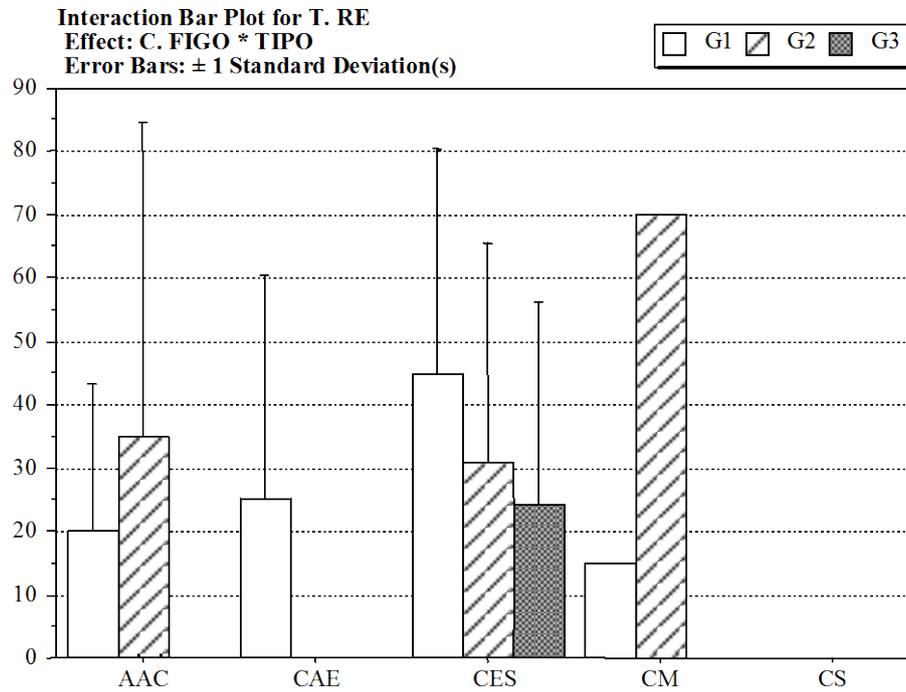


Gráfico 30.2. Expresión de los RE en la zona de mucosa en cada tipo histológico según la C. FIGO.

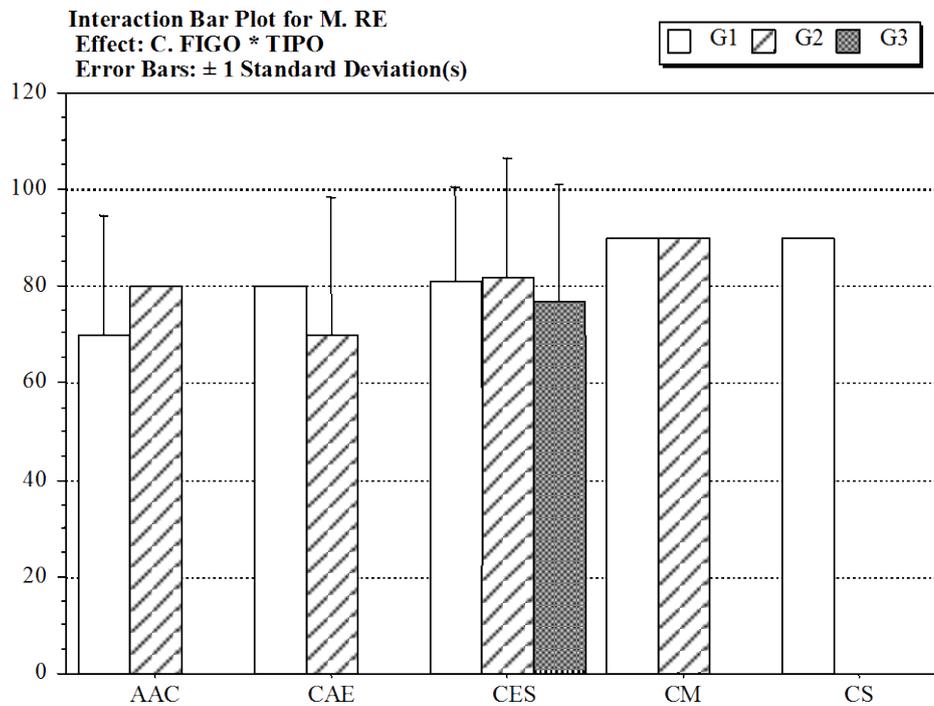


Gráfico 31.1. Expresión de los RP en la zona tumoral en cada tipo histológico según la C.FIGO.

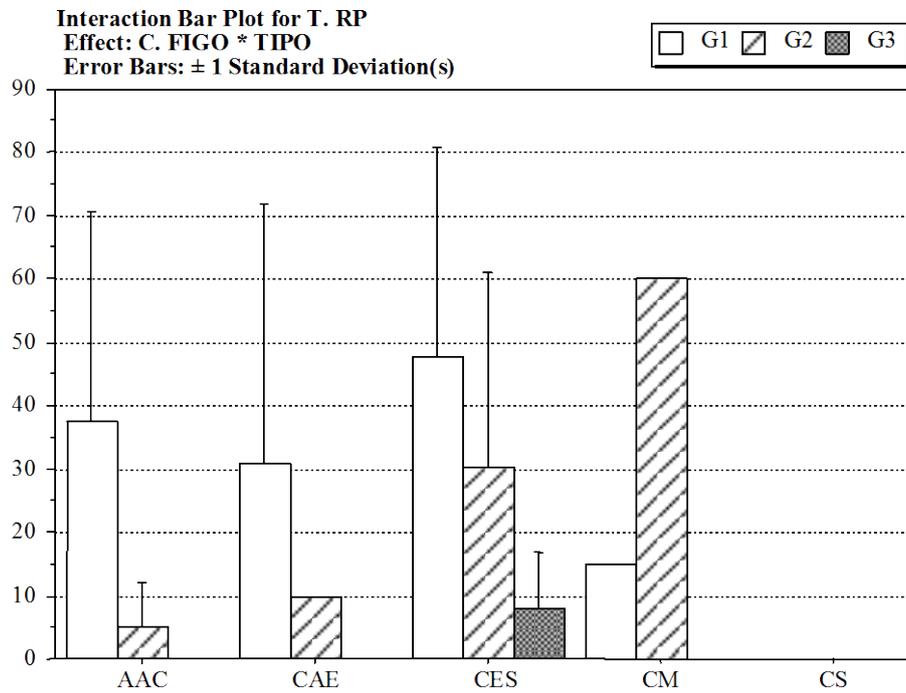


Gráfico 31.2. Expresión de los RP en la mucosa en cada tipo histológico según la C.FIGO.

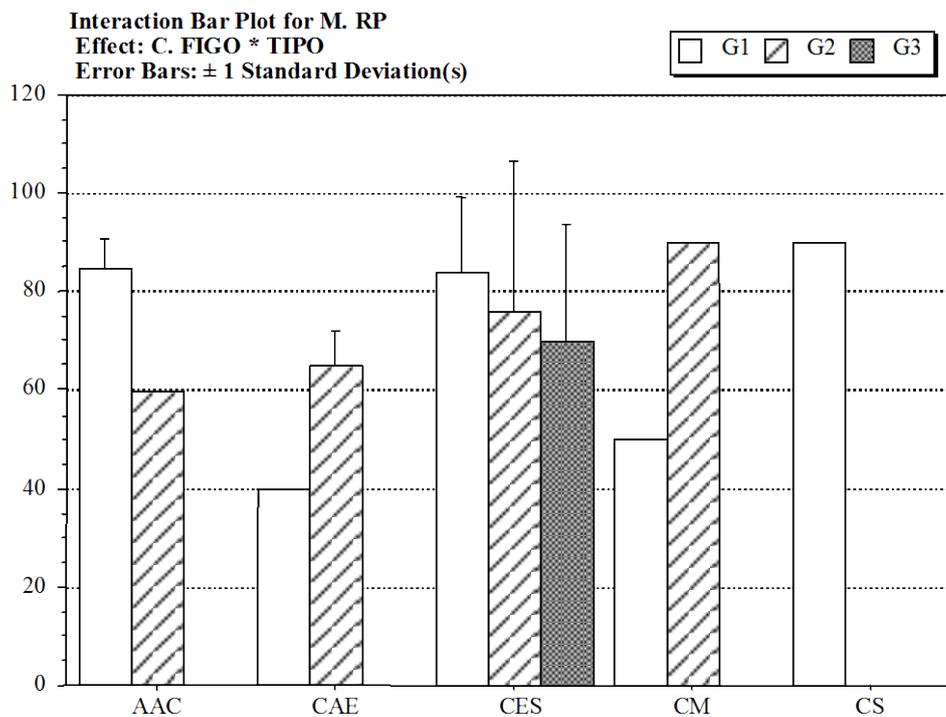


Gráfico 32.1. Expresión de Mib en la zona tumoral en cada tipo histológico según la C. FIGO.

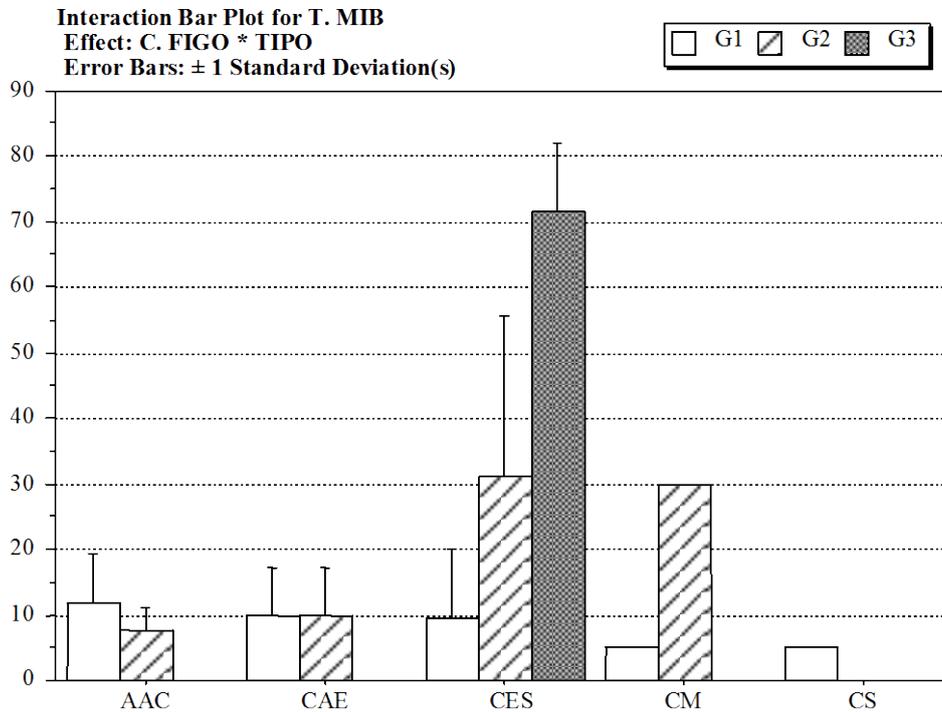


Gráfico 32.2. Expresión de Mib en mucosa en cada tipo histológico según la C.FIGO.

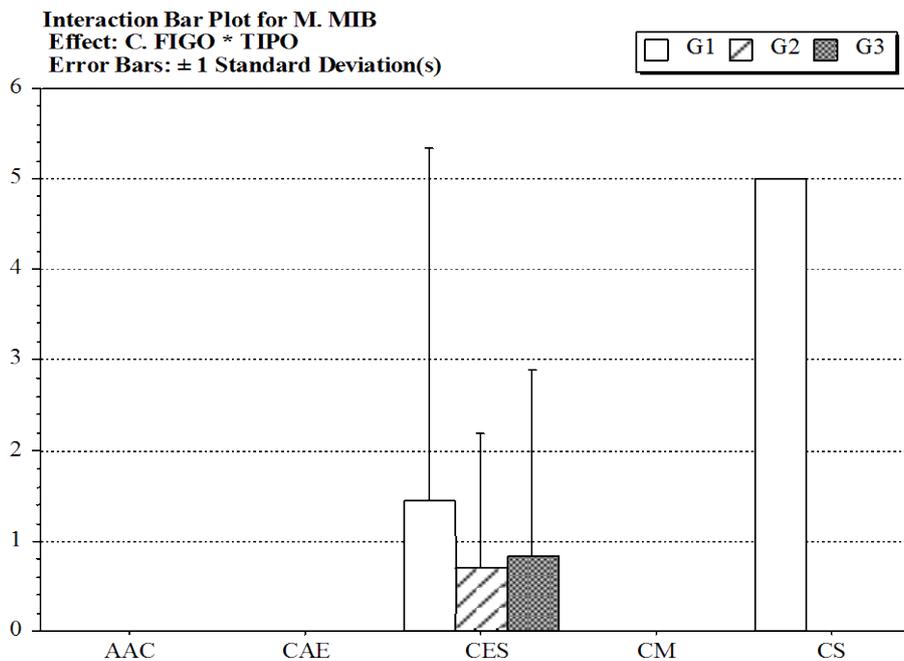


Gráfico 33.1. Expresión de P53 en la zona tumoral en cada tipo histológico según la C. FIGO.

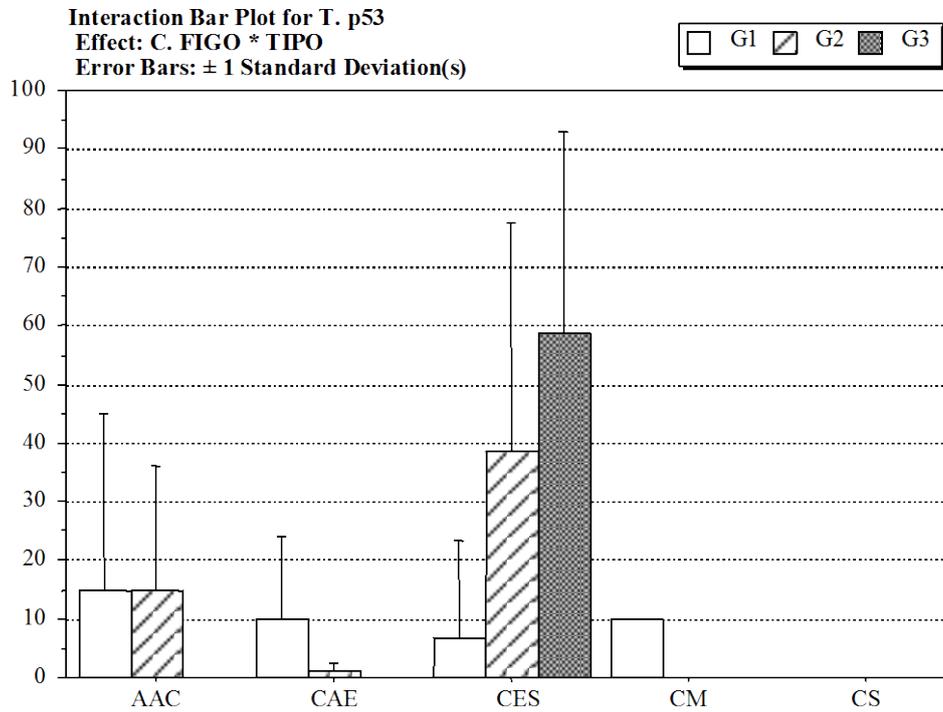


Gráfico 34.1. Expresión de bcl-2 en la zona tumoral en cada tipo histológico según la C. FIGO.

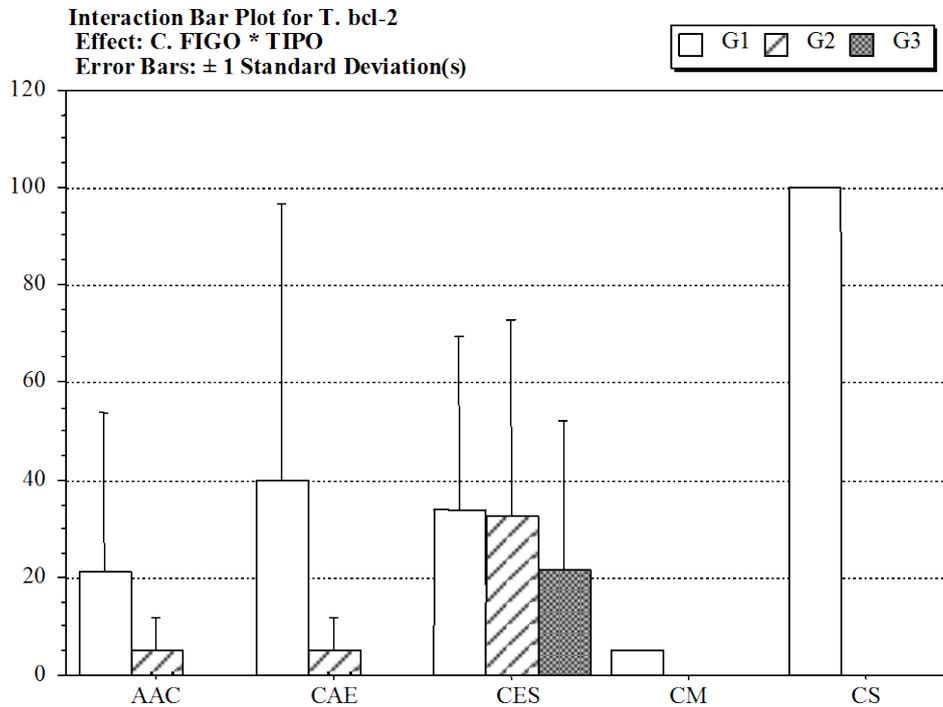


Gráfico 34.2. Expresión de la bcl-2 en la mucosa en cada tipo histológico según la C. FIGO.

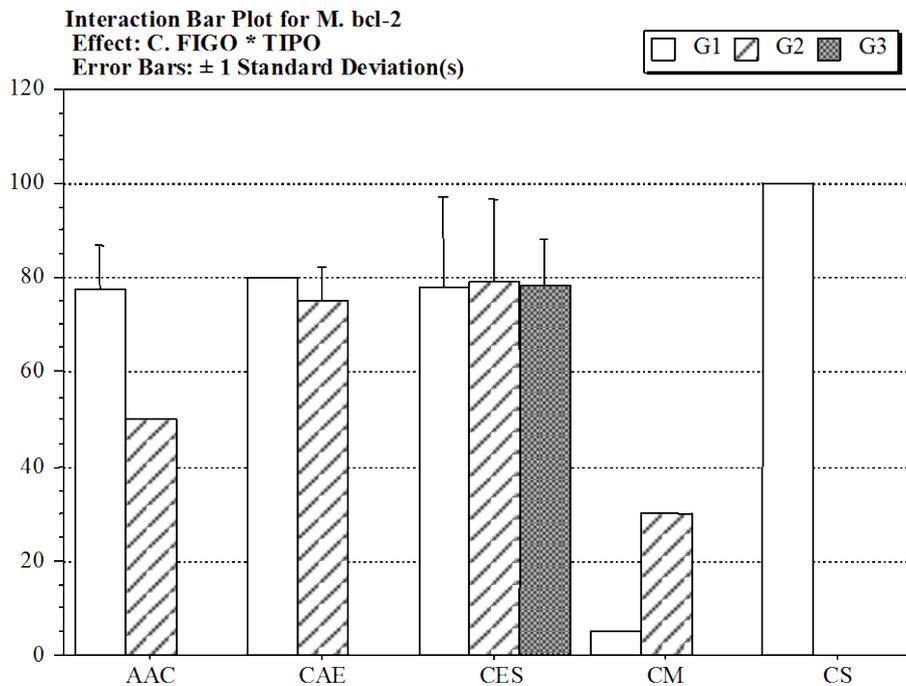


Gráfico 35.1. Expresión de C-erbB-2 en la zona tumoral en cada tipo histológico según la C. FIGO.

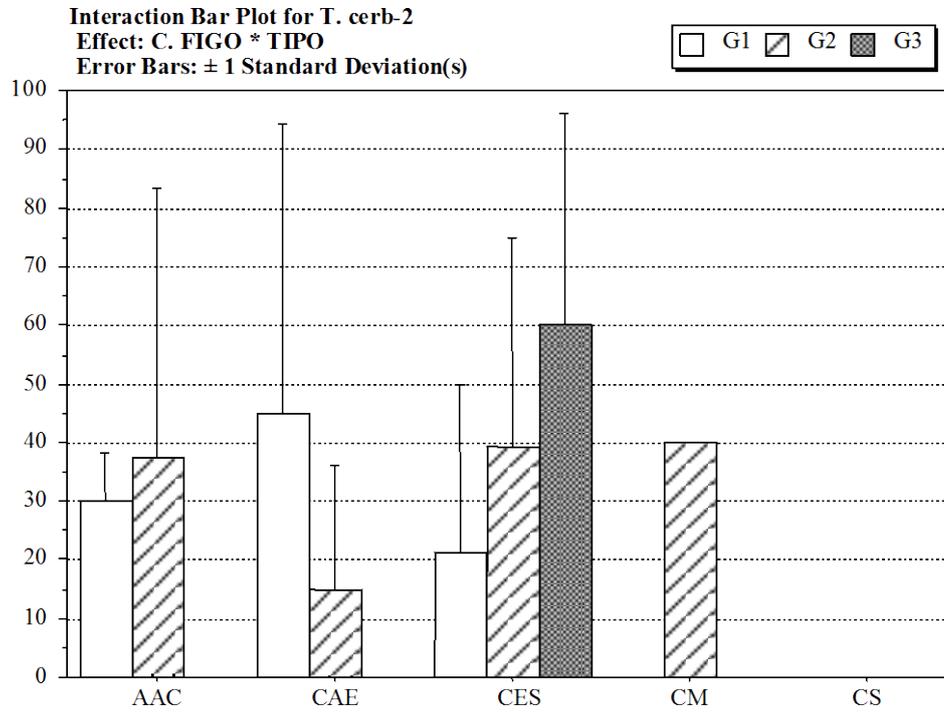


Tabla 22.1.

MANOVA						
Parameter Estimates						
	T. RE	T. RP	T. MIB	T. bcl-2	T. p53	T. cerb-2
Intercept	31,9777167	26,9528083	36,1740537	27,4868742	32,778083	39,6901709
C. FIGO[G1-G3]	9,43994994	18,1639584	-26,657387	6,42979243	-25,361416	-17,773504
C. FIGO[G2-G3]	-1,7469475	0,93180708	-8,5971306	-0,3714896	-0,4319292	-2,5363248

Gráfico 36.1. Media de los marcadores.

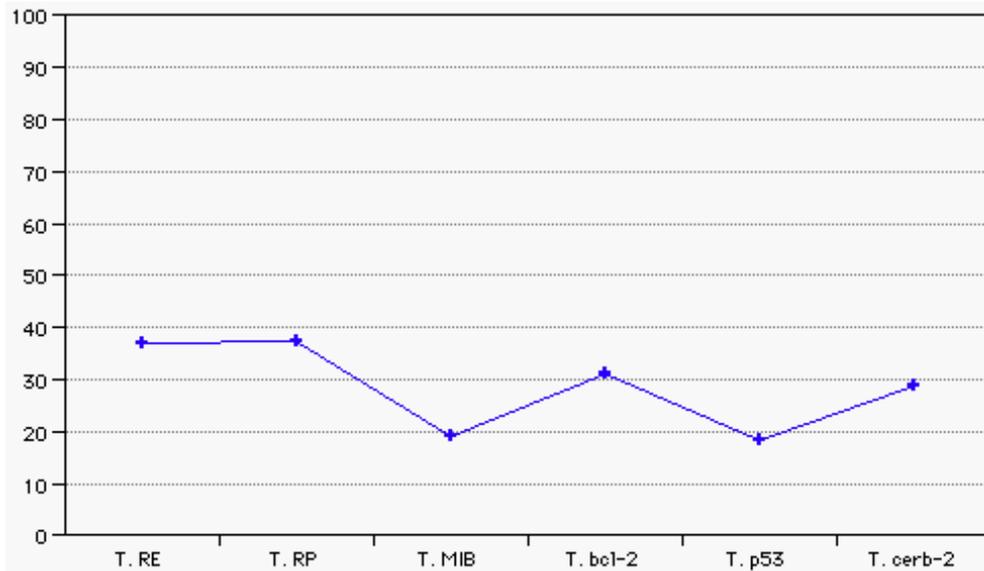


Tabla 22.2. Media de los marcadores según la C. FIGO.

C. FIGO	T. RE	T. RP	T. MIB	T. bcl-2	T. p53	T. cerb-2
G1	41,4166667	45,1166667	9,51666667	33,9166667	7,41666667	21,9166667
G2	30,2307692	27,8846154	27,5769231	27,1153846	32,3461538	37,1538462
G3	24,2857143	7,85714286	71,4285714	21,4285714	58,5714286	60

Gráfico 36.2. Media de los marcadores según la clasificación de la FIGO.

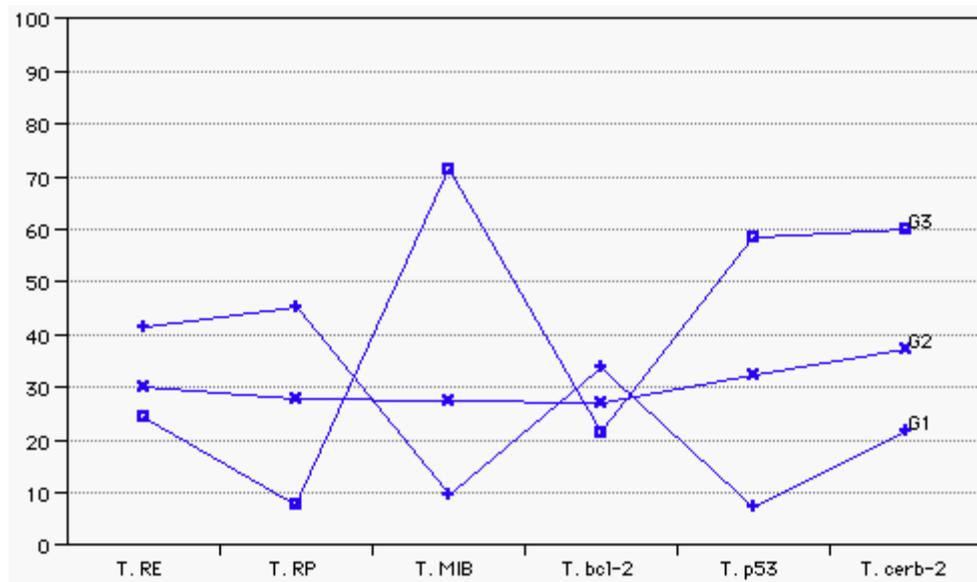


Tabla 23. Medias de RE y RP en los subtipos histológicos.

	T. RE	T. RP	M. RE	M. RP
AAC	25.00	26.67	72.00	80.00
CAE	12.50	20.50	73.33	56.67
CCC	0.00	0.00	95.00	85.00
CES	39.45	39.63	80.75	80.63
CM	42.50	37.50	90.00	70.00
CPS	2.50	1.25	75.00	75.00
CS	0.00	0.00	90.00	90.00

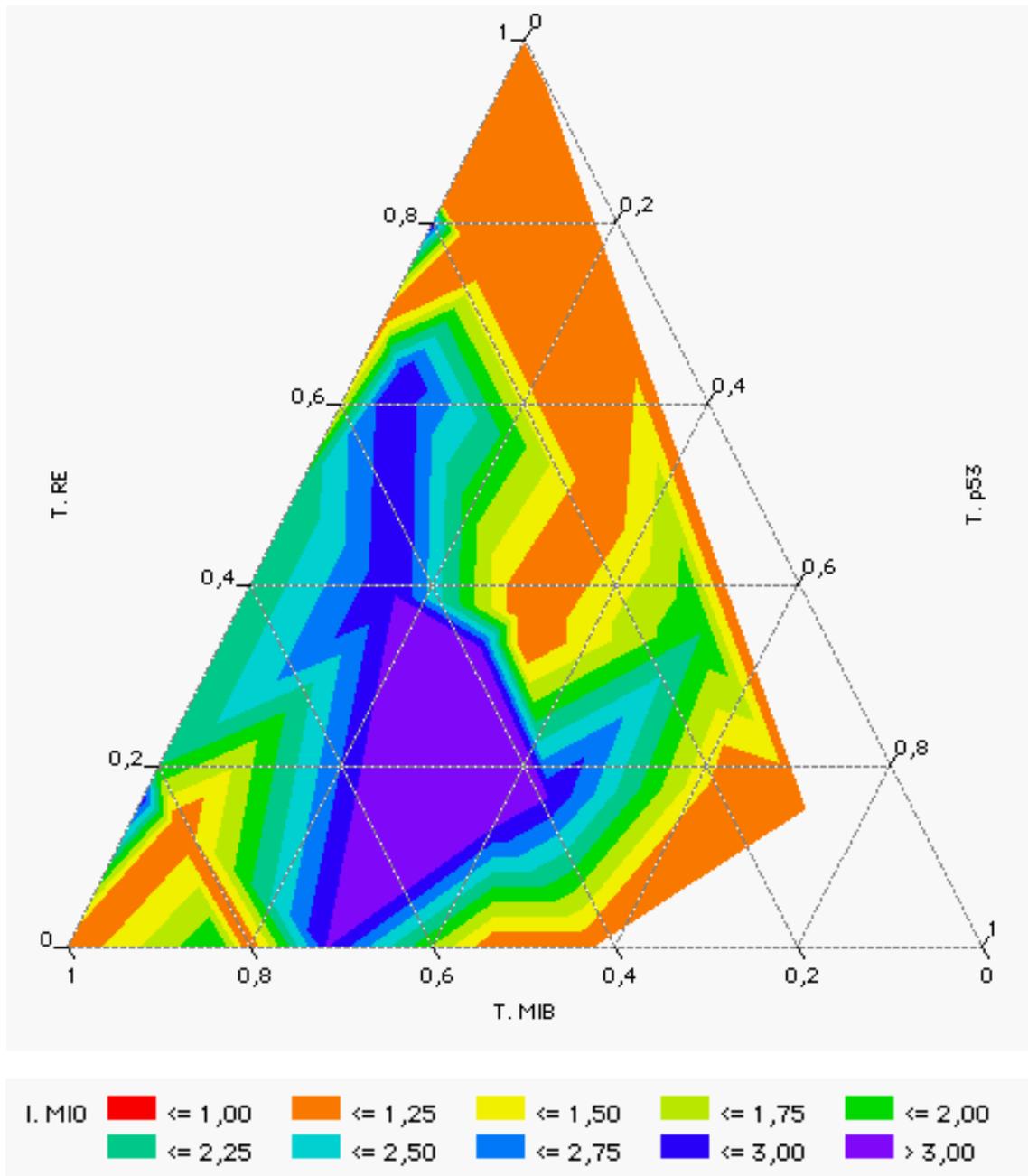
Tabla 24. Medias de P53 y MIB en los subtipos histológicos.

	T. p53	T. MIB	M. p53	M. MIB
AAC	15,00	10,33	0,00	0,00
CAE	5,50	10,00	0,00	0,00
CCC	8,50	47,50	0,00	2,00
CES	19,68	20,58	0,00	1,20
CM	5,00	17,50	0,00	0,00
CPS	57,50	66,25	0,00	1,00
CS	0,00	5,00	0,00	5,00

Tabla 25. Medias de bcl-2 y C-erbB-2 en los subtipos histológicos.

	T. bcl-2	T. c-erbB-2	M. bcl-2	M. c-erbB-2
AAC	15,83	32,50	72,00	0,00
CAE	22,50	30,00	76,67	0,00
CCC	0,00	75,00	75,00	0,00
CES	32,50	29,33	78,21	1,43
CM	2,50	20,00	17,50	0,00
CPS	7,50	73,75	80,00	0,00
CS	100,00	0,00	100,00	0,00

Gráfico 37. Expresión de RE, proteína P53 y marcador de proliferación Mib-1 según el grado de invasión miometrial.



5.2. FIGURAS

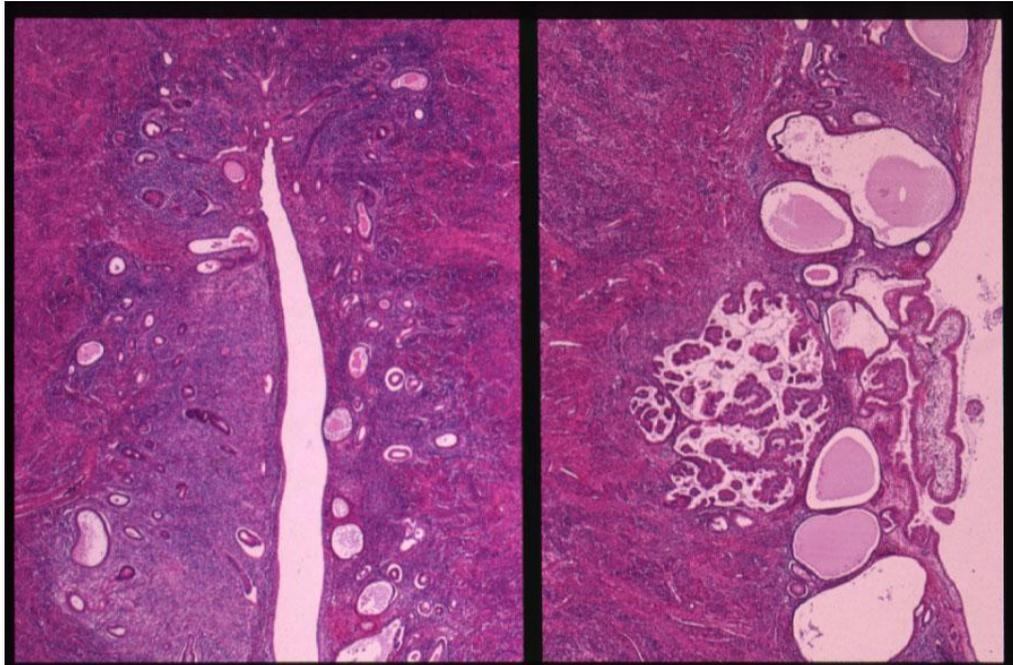


Figura 1. a) Endometrio atrófico quístico. HxE. 2x.
b) Adenocarcinoma bien diferenciado de endometrio tipo endometriode. G1 con patrón papilar. HxE. 4x.

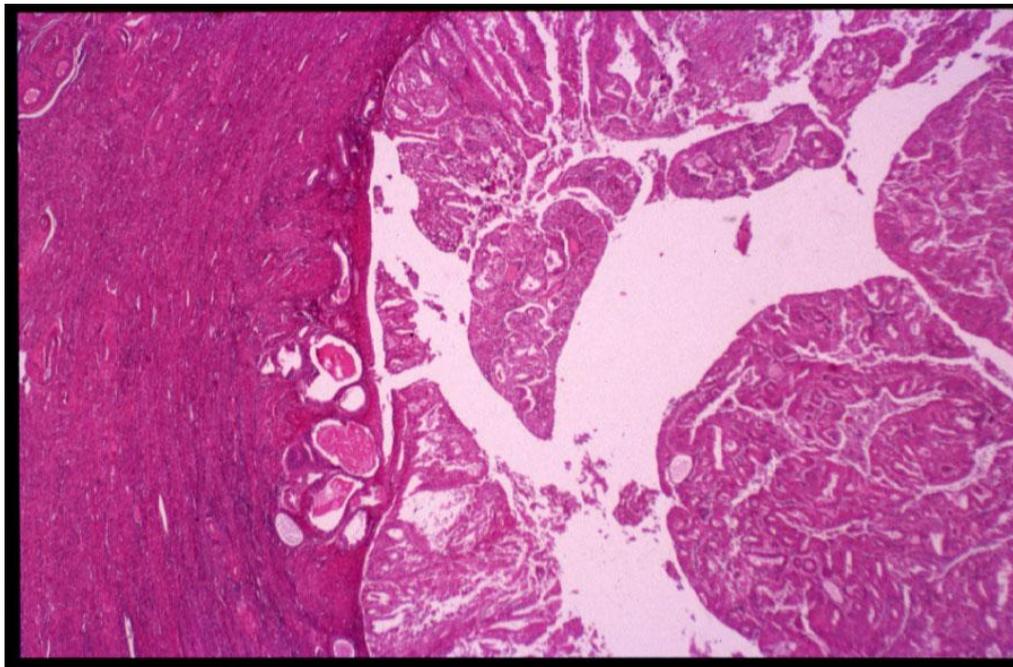


Figura 2. Carcinoma endometroide. G1. Crecimiento exofítico polipoide intracavitario. HxE 4x.

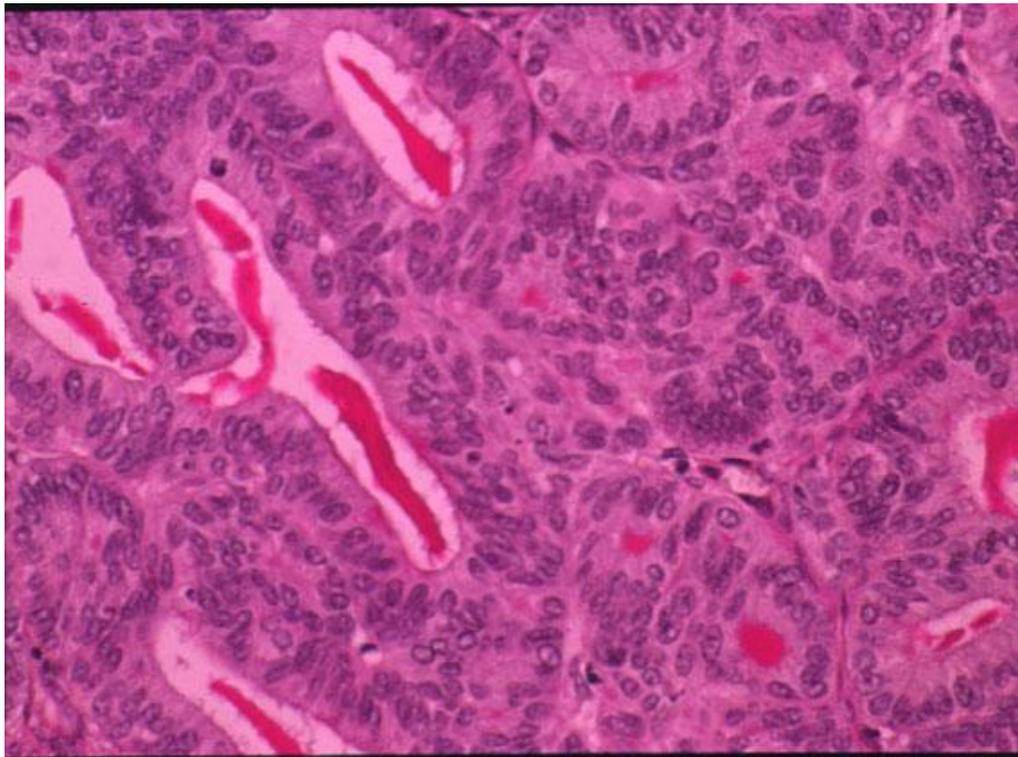


Figura 3. Carcinoma endometrioide G1. Patrón glandular y grado nuclear bajo. P.A.S. 20x.

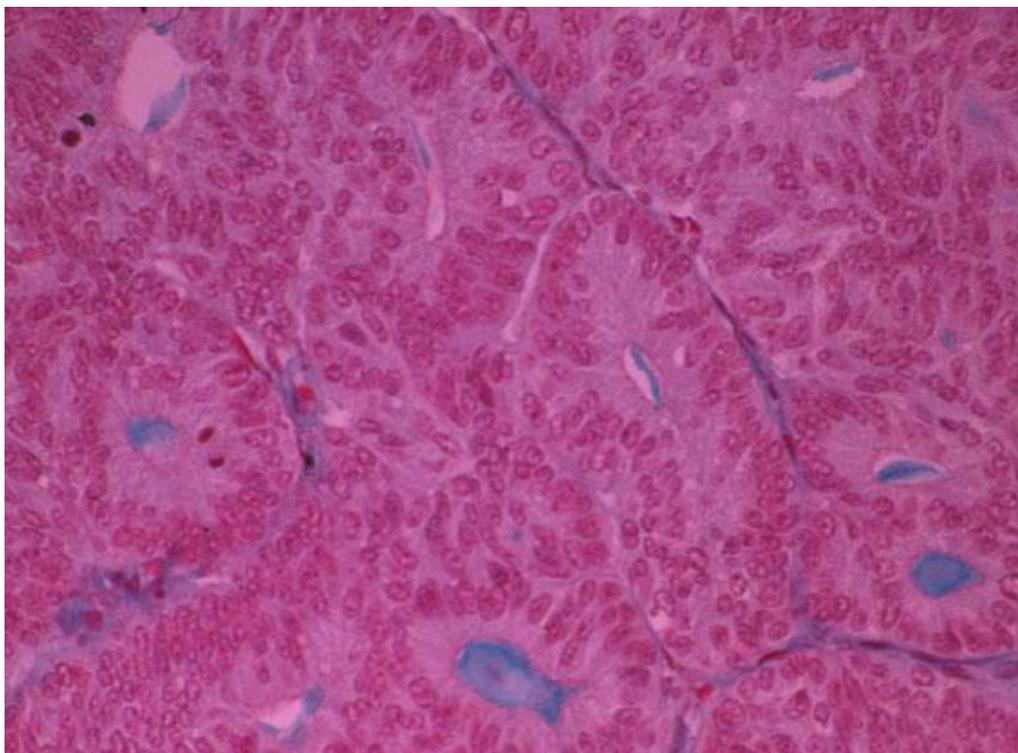


Figura 4. Carcinoma endometrioide. G1. Patrón glandular y grado nuclear bajo. Tricrómico. 20x.

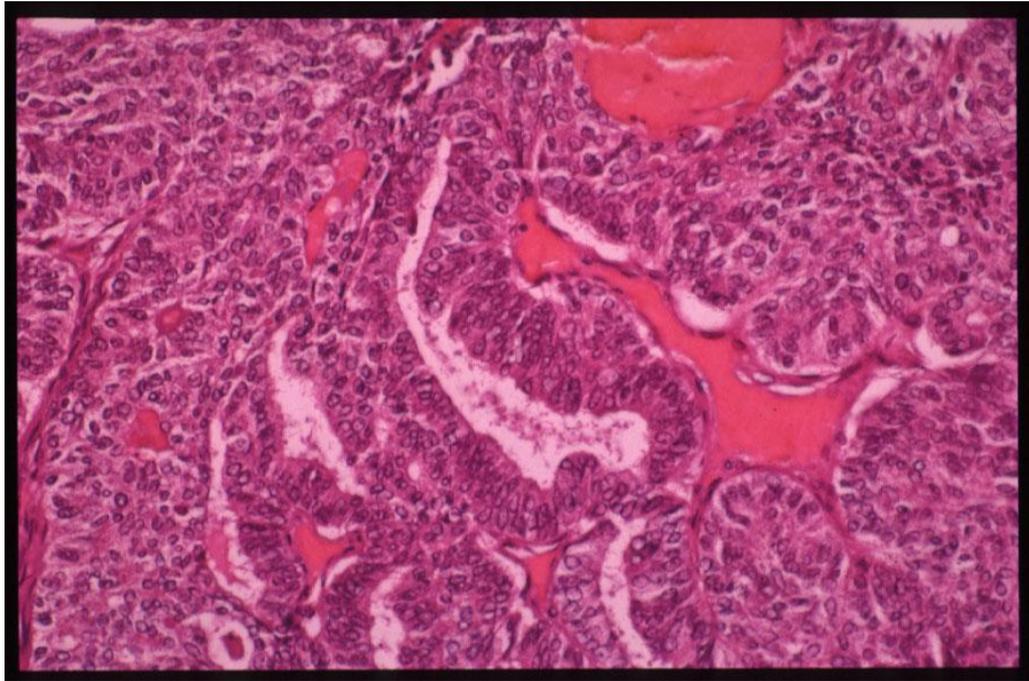


Figura 5. Estructuras glandulares y zonas sólidas tumorales. G2. HxE. 20x.

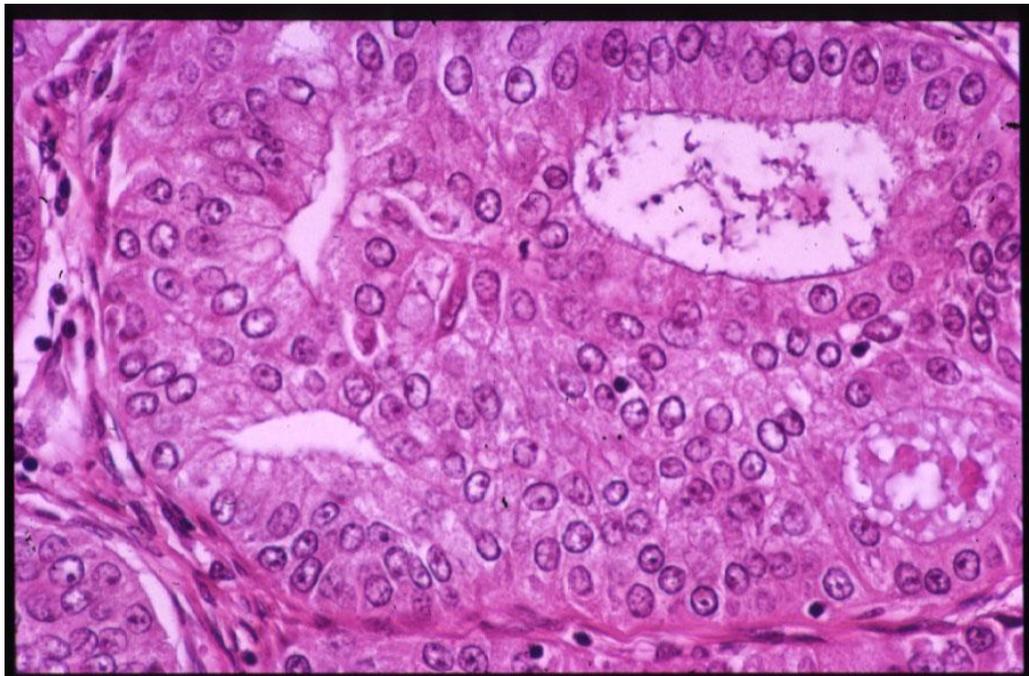


Figura 6. Diferenciación glandular y áreas consolidadas con grado nuclear 2. HxE. 40x.

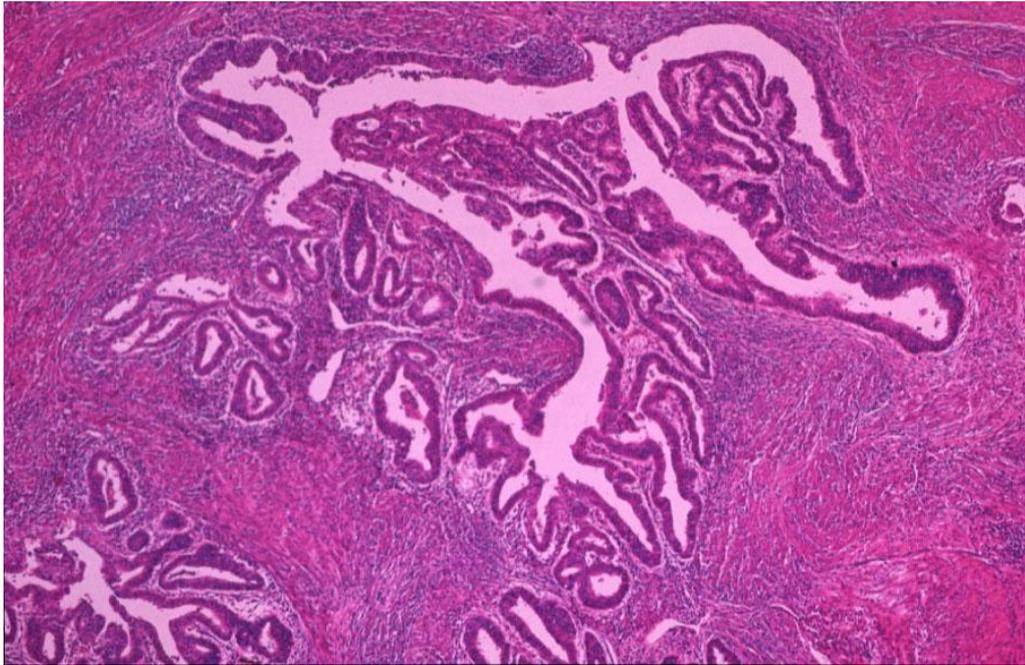


Figura 7. Invasión miometrial por adenocarcinoma endometrial. G2. HxE. 10x.

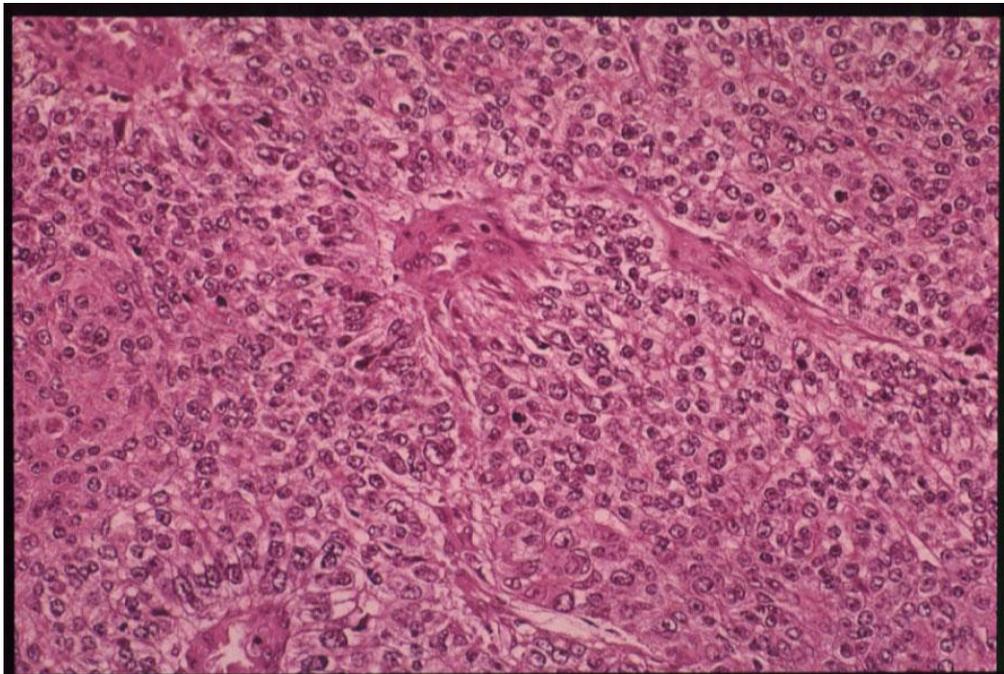


Figura 8. Carcinoma endometrial. Patrón de crecimiento sólido > 50%, no morular o escamoso. G3. HxE. 20x.

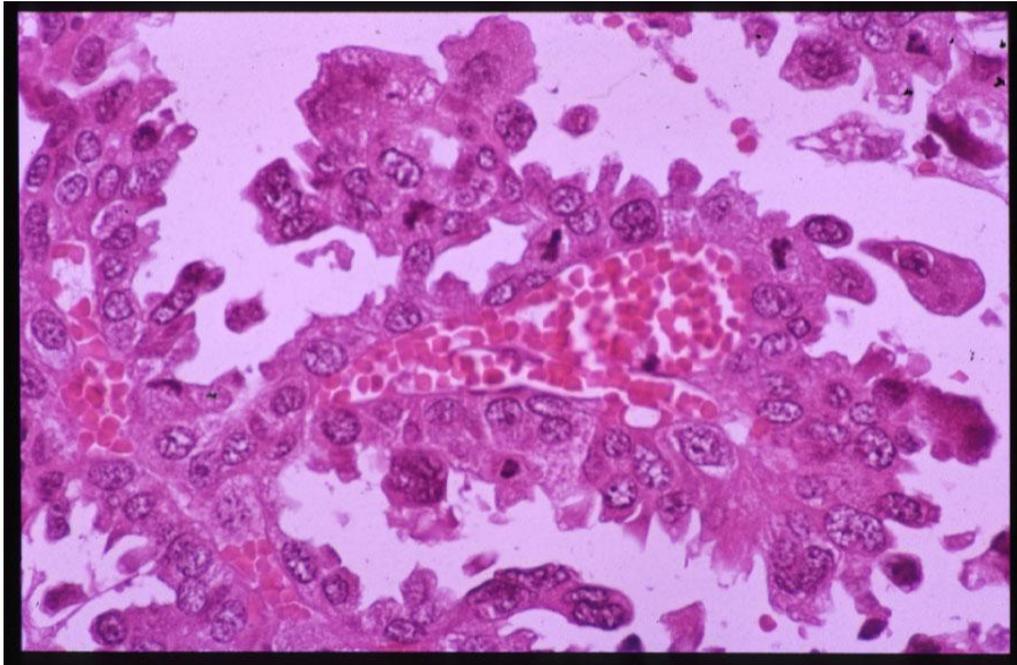


Figura 9. Carcinoma papilar seroso. Formaciones papilares con marcada atipia celular. Aspecto mesonefroide. HxE. 40x.

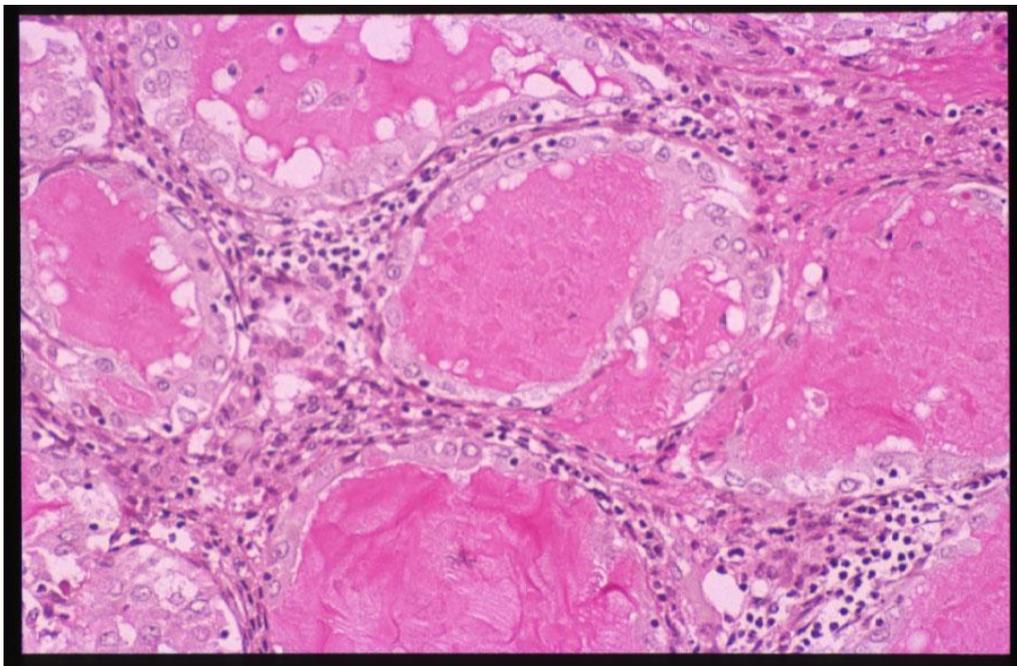


Figura 10. Carcinoma mucinoso. Abundante secreción mucinosa. P.A.S. positiva 20x.

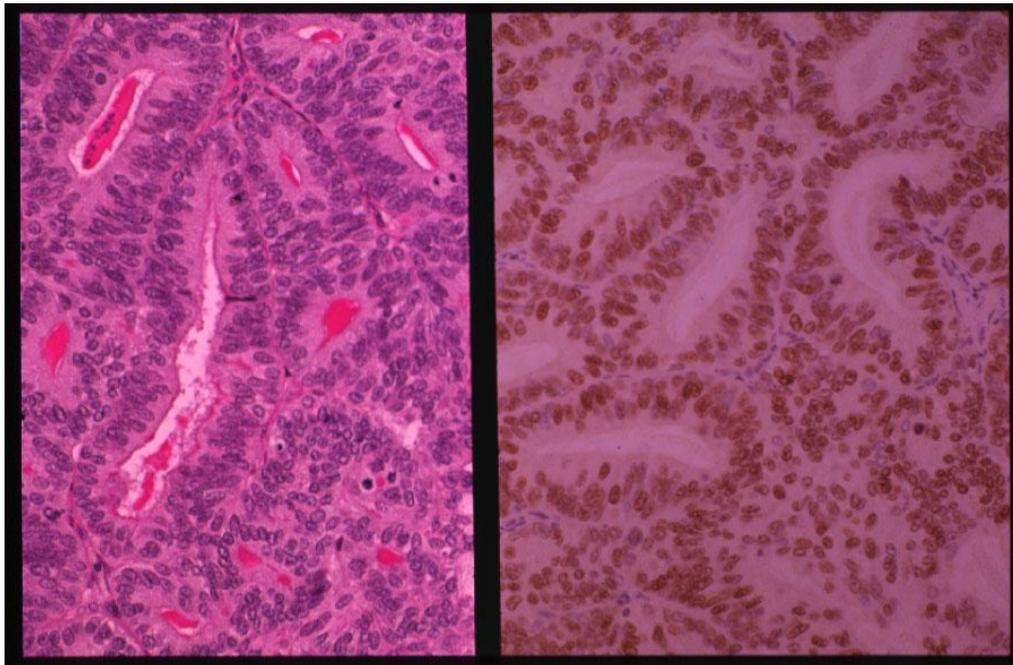


Figura 11. Carcinoma endometroide. G1.
a) P.A.S. 20x.
b) Elevada e intensa positividad nuclear para receptores estrogénicos. IH (ABC-DAB) RE. 20x.

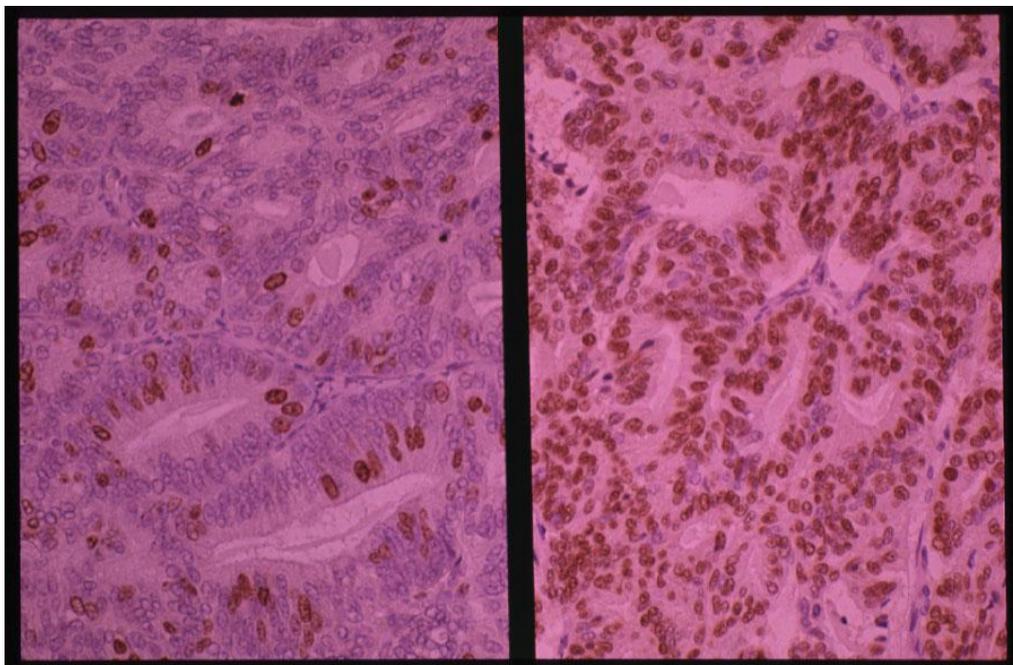


Figura 12. Carcinoma endometroide G1.
a) Índice proliferativo poco elevado Mib-1 IH (ABC-DAB) Mib-1. 20x.
b) Receptores estrogénicos. IH (ABC-DAB) RE. 20x.

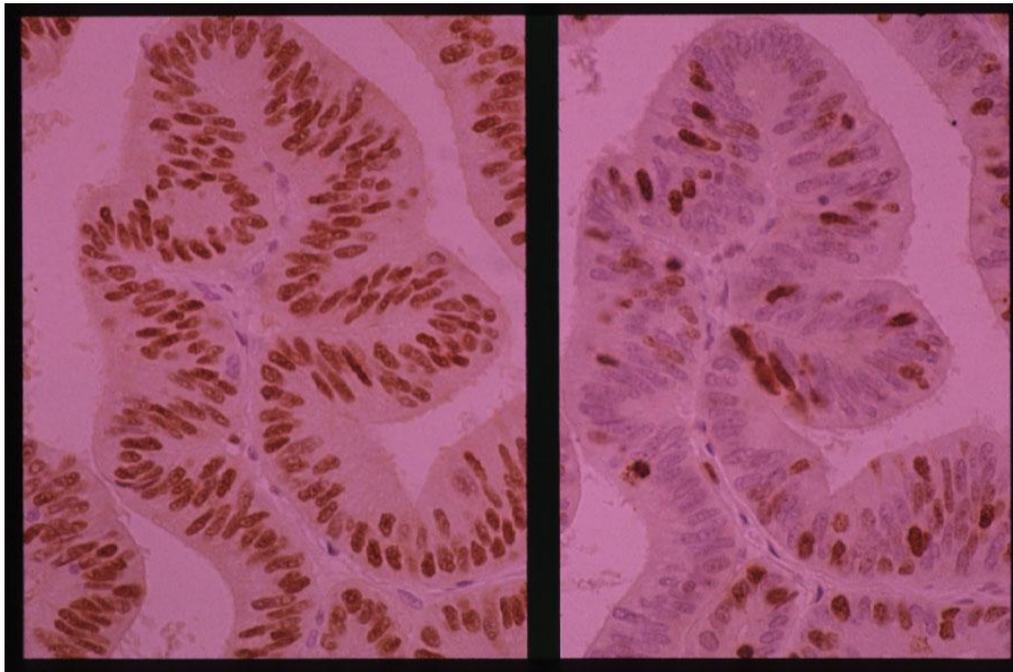


Figura 13. Carcinoma endometroide. G1.
a) IH (ABC-DAB) RE. 20x.
b) IH (ABC-DAB) Mib-1. 20x.

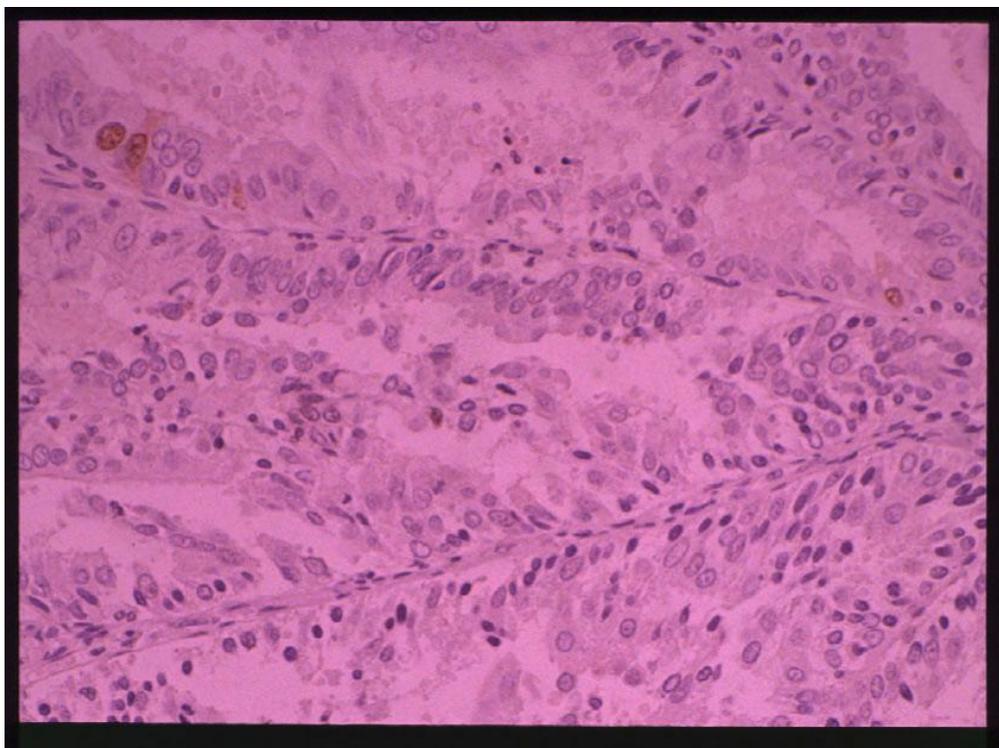


Figura 14. Mínima actividad proliferativa en adenocarcinoma endometroide con formaciones villoglandulares. G1. IH (ABC-DAB) Mib-1. 20x.

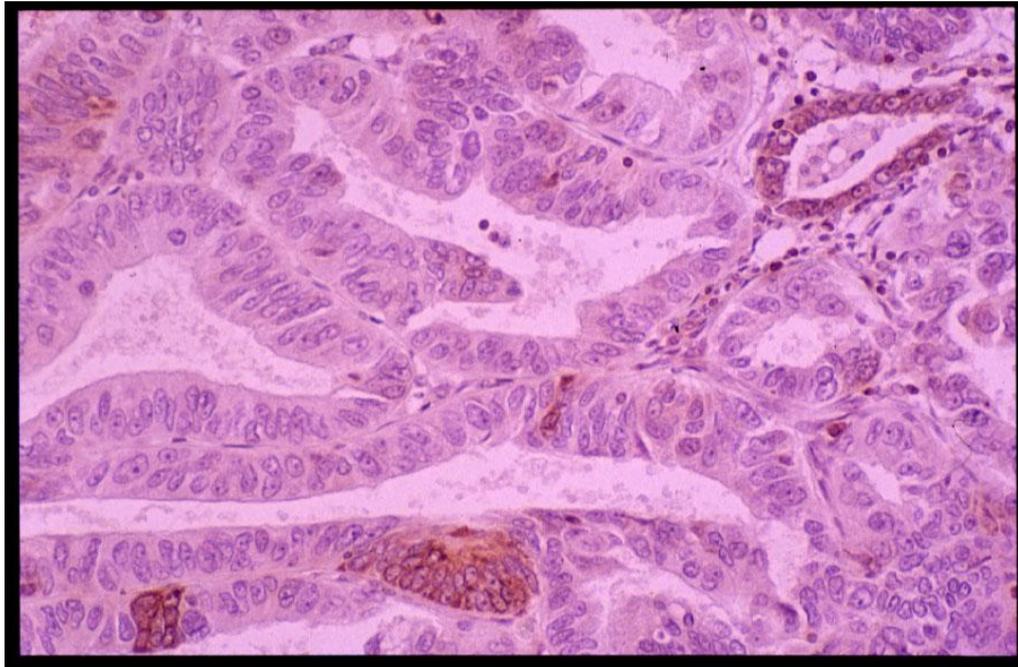


Figura 15. Carcinoma endometroide. G1. Expresión citoplasmática focal. IH (ABC-DAB) bcl-2. 20x.

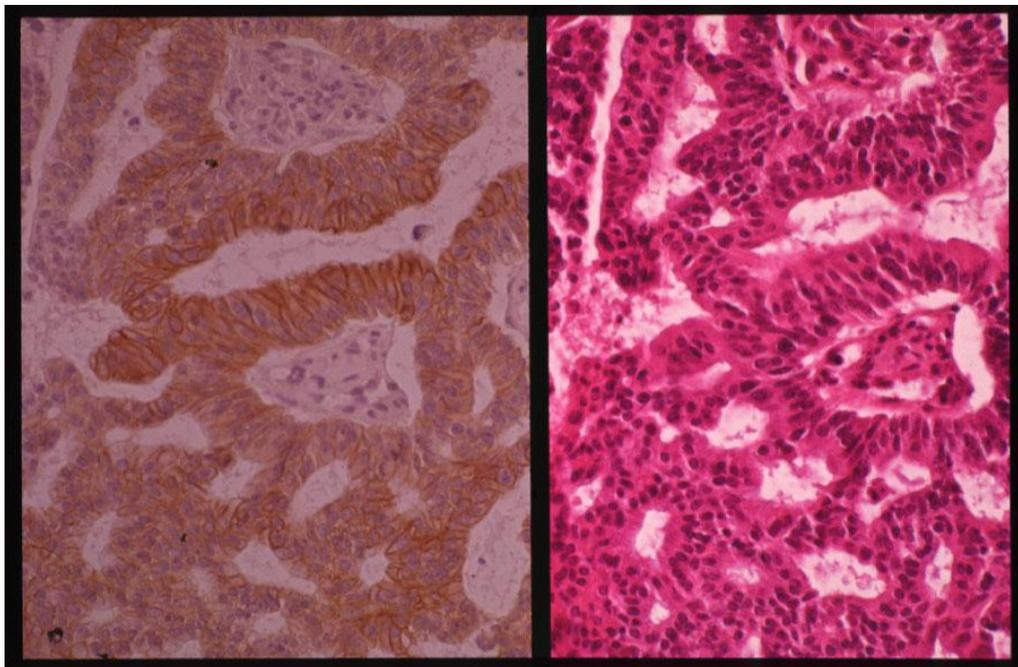


Figura 16. Carcinoma endometroide G1.
a) Elevada positividad de los elementos tumorales con reacción citoplasma/membrana. IH (ABC-DAB) C-erbB-2. 20x.
b) Hx&E. 20x.

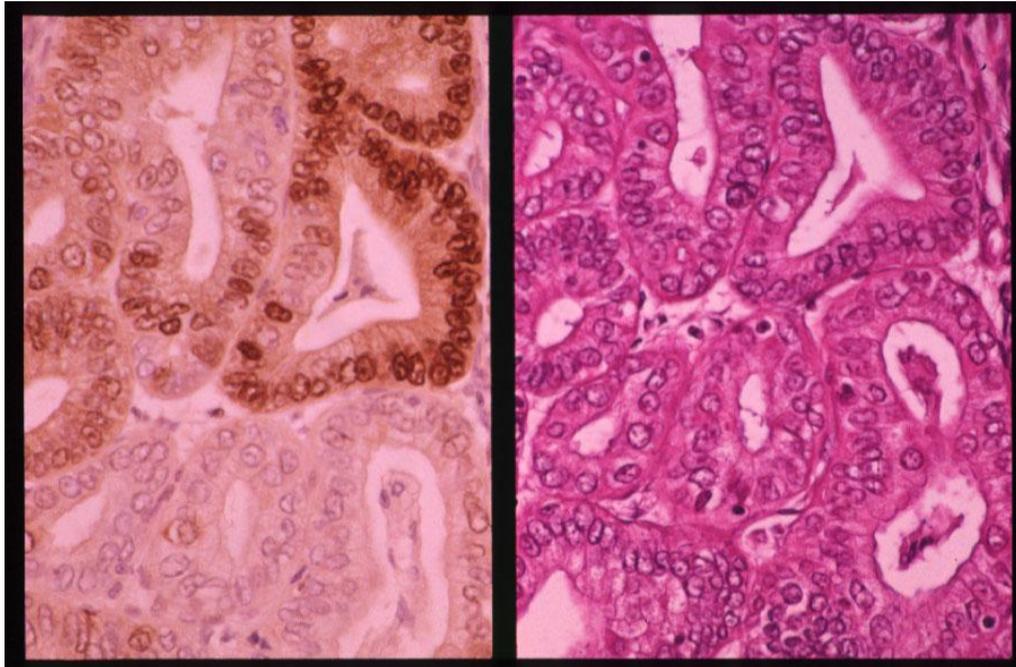


Figura 17. Carcinoma endometroide. G2.
a) Heterogeneidad en la expresión de RP en las células tumorales. IH (ABC-DAB) RP. 20x.
b) P.A.S. 20x.

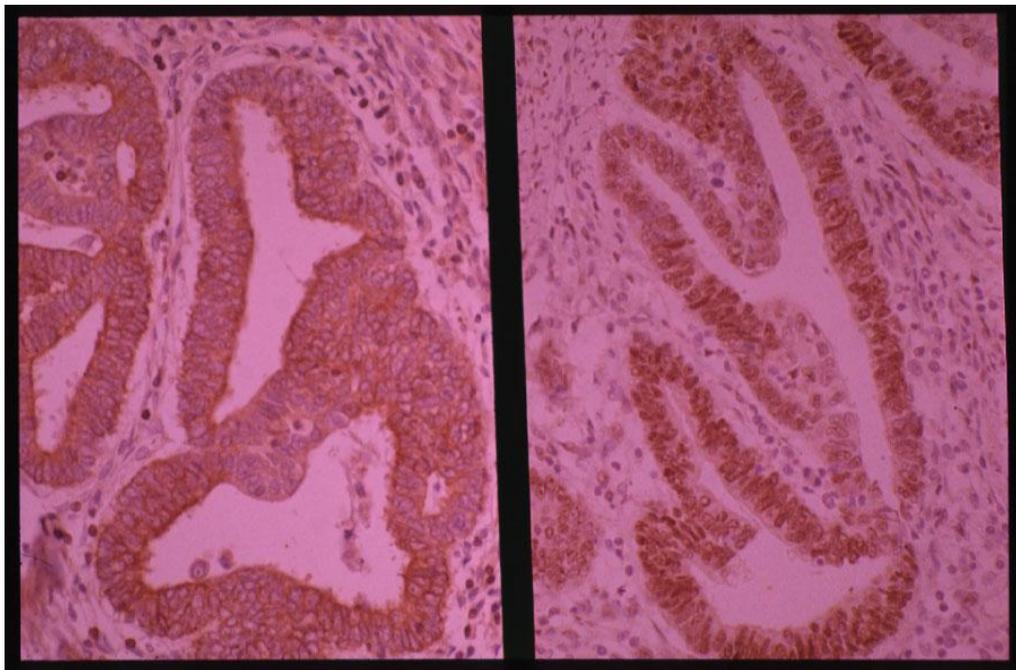


Figura 18. Carcinoma endometroide G2.
a) Uniformidad en la expresión de bcl-2. IH (ABC-DAB) bcl-2. 20x.
b) Uniformidad en la expresión de RE. IH (ABC-DAB) RE. 20x.

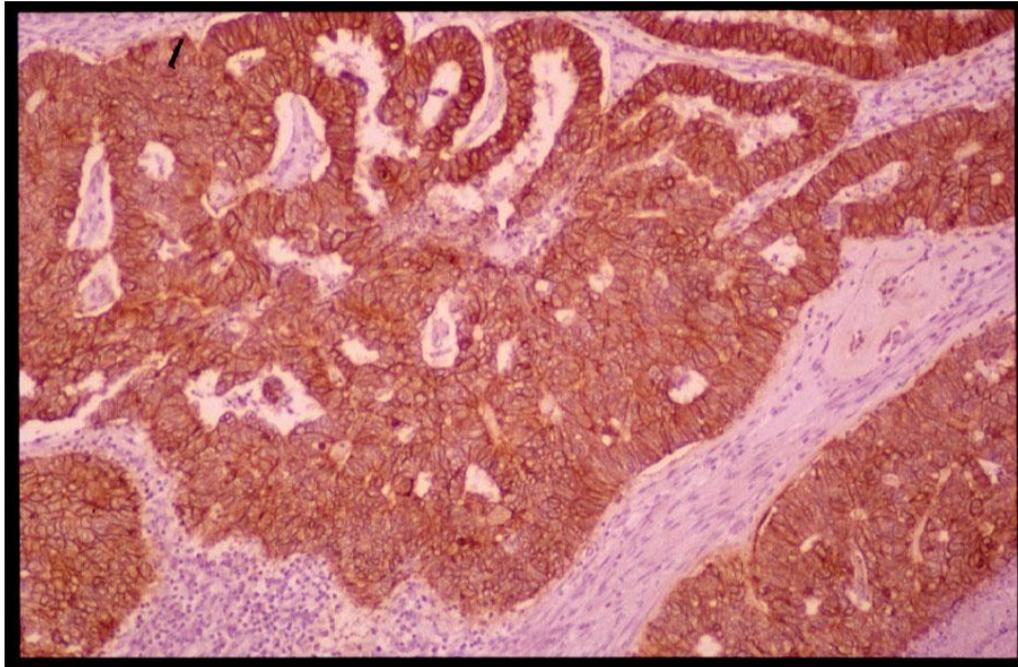


Figura 19. Carcinoma endometroide. G2. Reactividad intensa en la población tumoral de C-erbB-2. IH (ABC-DAB) C-erbB-2. 10x.

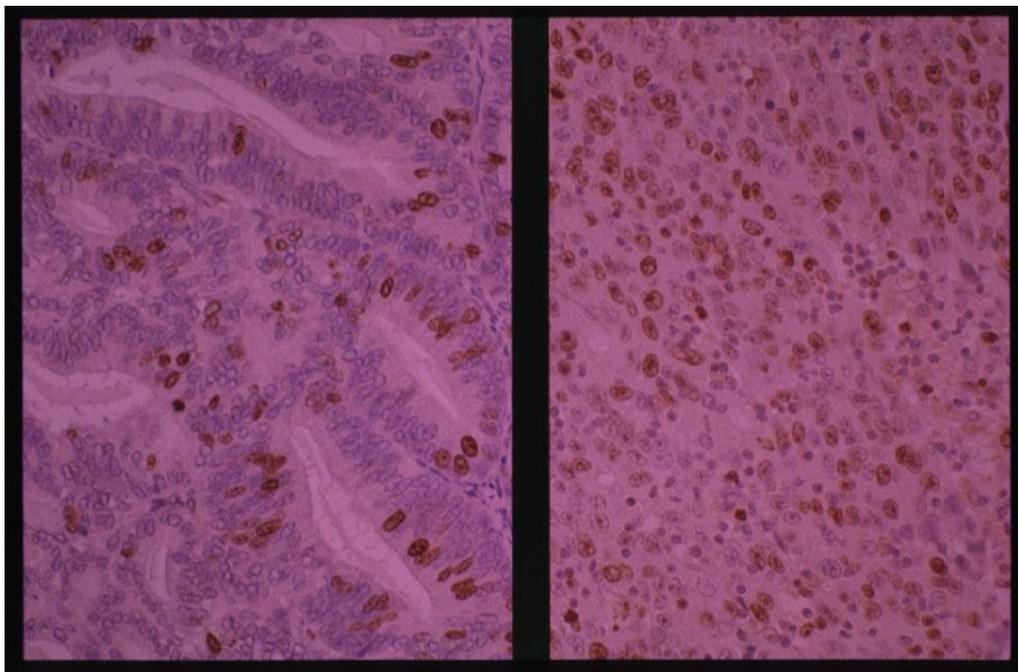


Figura 20. Carcinoma endometroide. Diferencias porcentuales notables para Mib-1 entre G1/G3. IH (ABC-DAB) Mib-1. 20x. a) G.1 y b) G.3

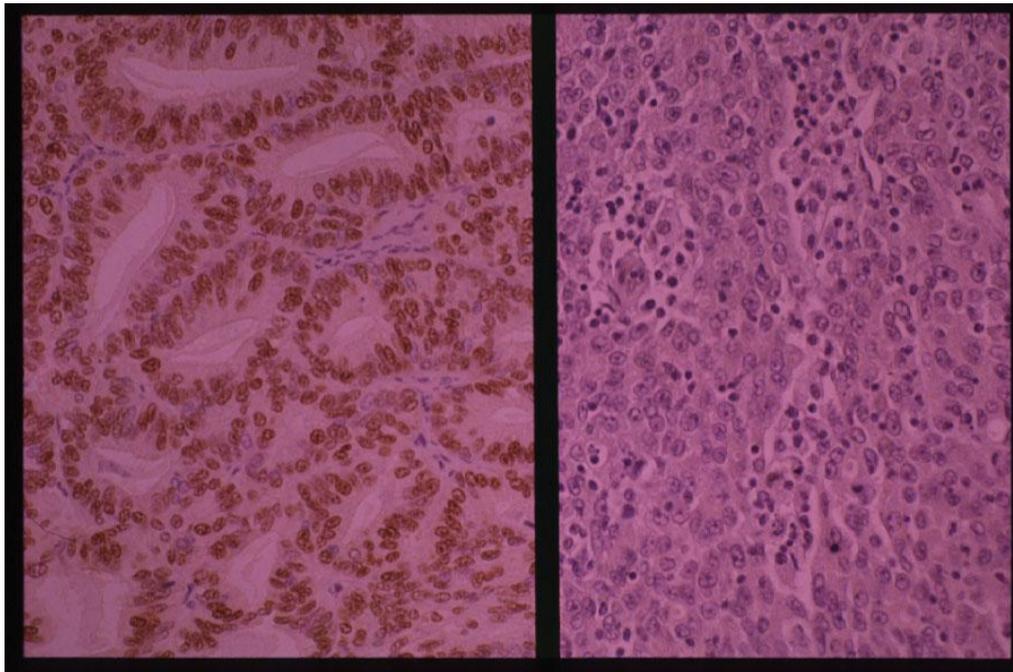


Figura 21. Carcinoma endometroide. IH (ABC-DAB) RE. 20x.
a) Alta positividad IH para RE en carcinoma endometroide G1.
b) Ausencia de RE en G3.

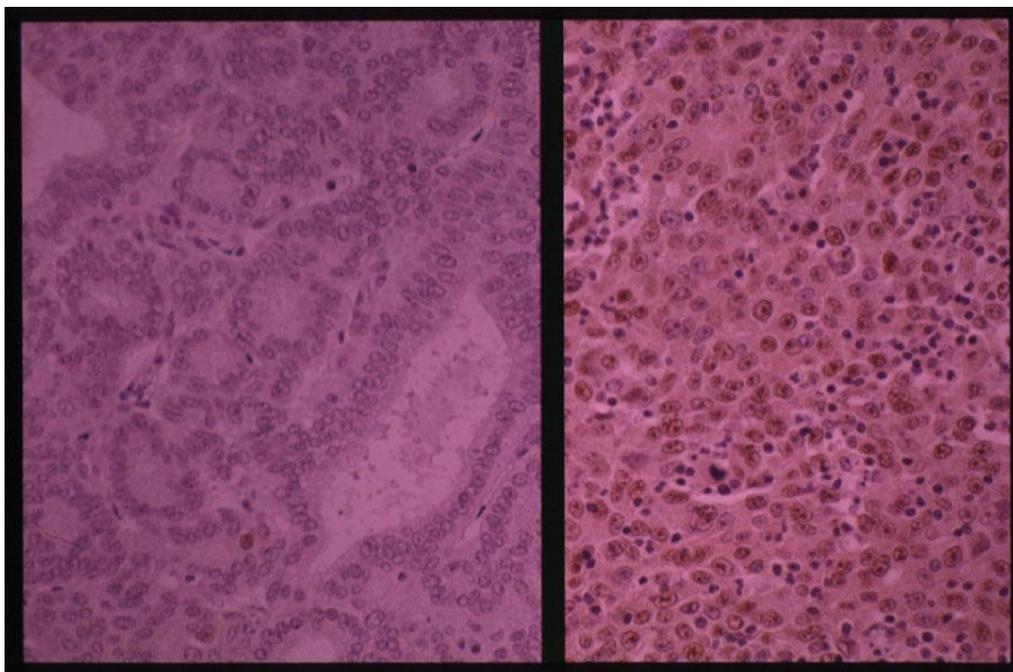


Figura 22. Carcinoma endometroide reactividad para P 53. IH (ABC-DAB) P 53. 20x.
a) Ausencia de expresión en G1.
b) Elevada reactividad en G3.

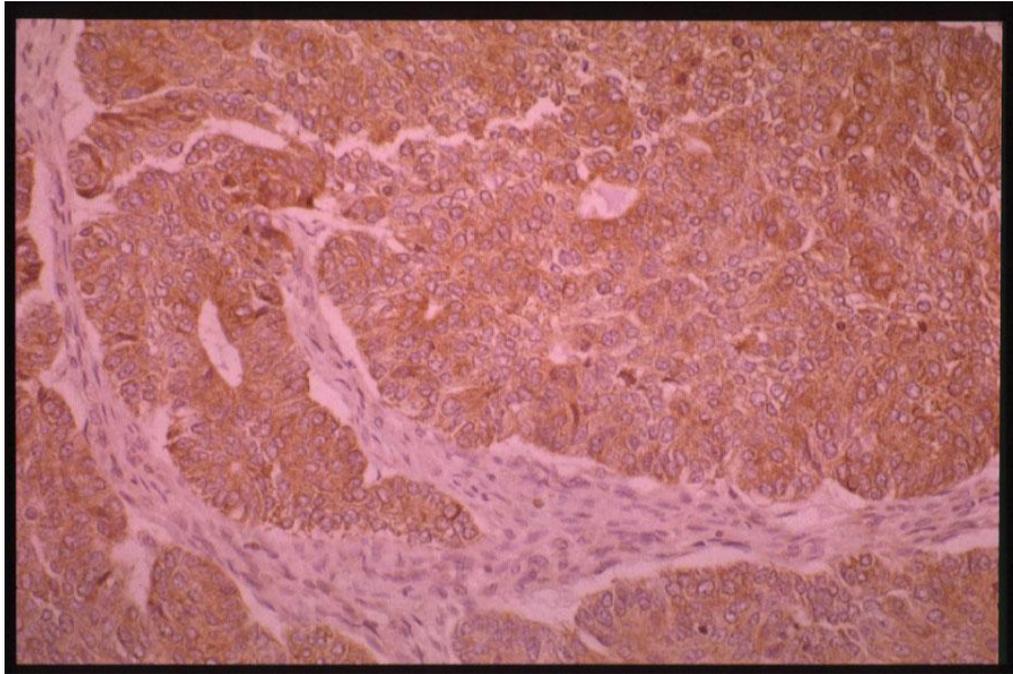


Figura 23. Carcinoma endometroide G3. IH (ABC-DAB) bcl-2. 10x.

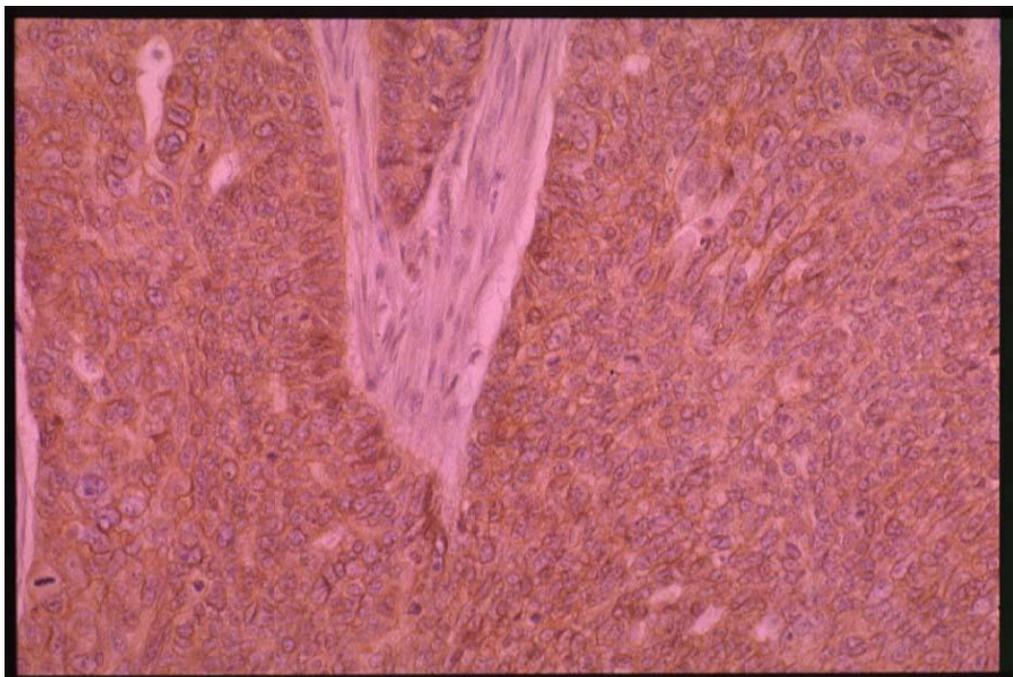


Figura 24. Carcinoma endometroide. G3. IH (ABC-DAB) C-erbB-2. 10x.

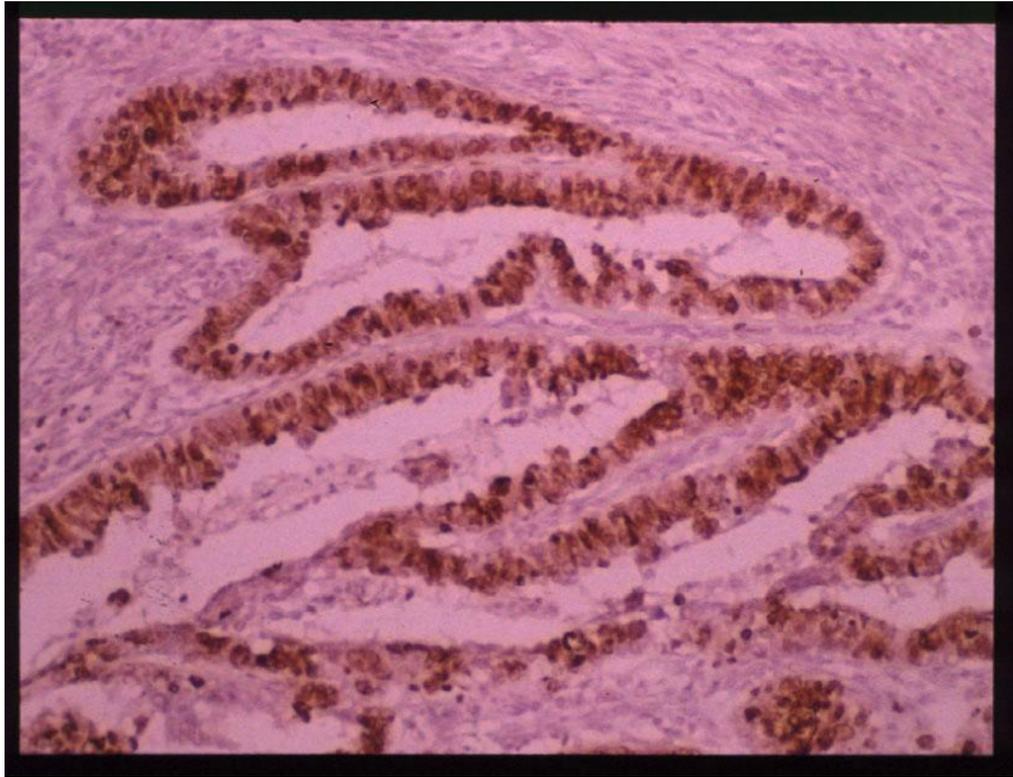


Figura 25. Carcinoma endometroide G3. IH (ABC-DAB) Mib-1. 20x.



Figura 26. Carcinoma papilar seroso. G3. IH (ABC-DAB) Mib-1. 20x.

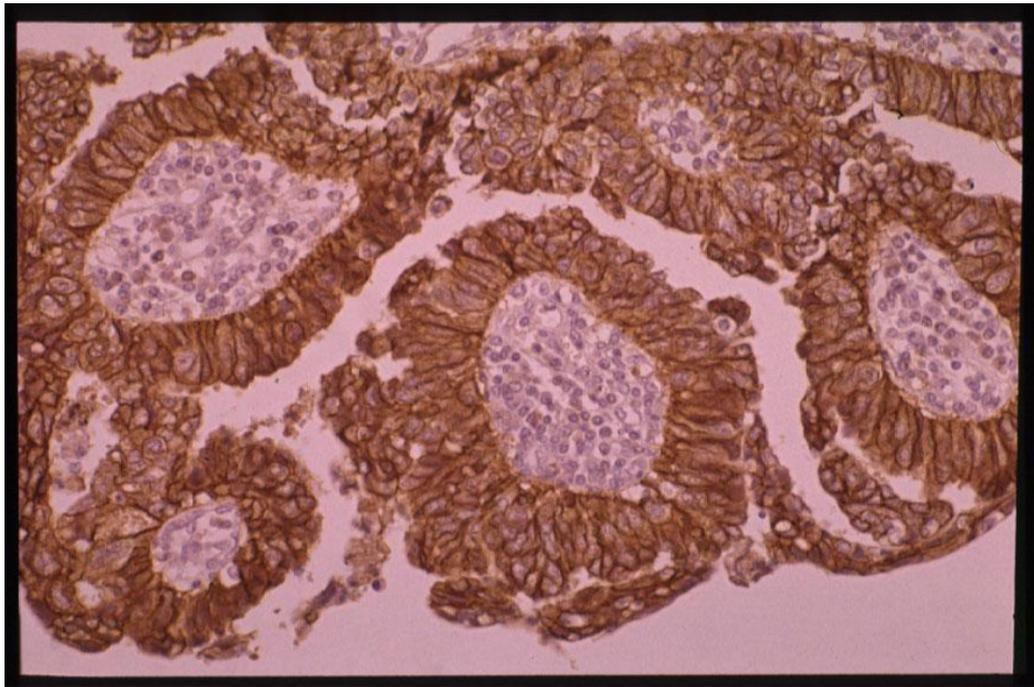


Figura 27. Carcinoma papilar seroso. IH (ABC-DAB) C-erbB-2. 20x.

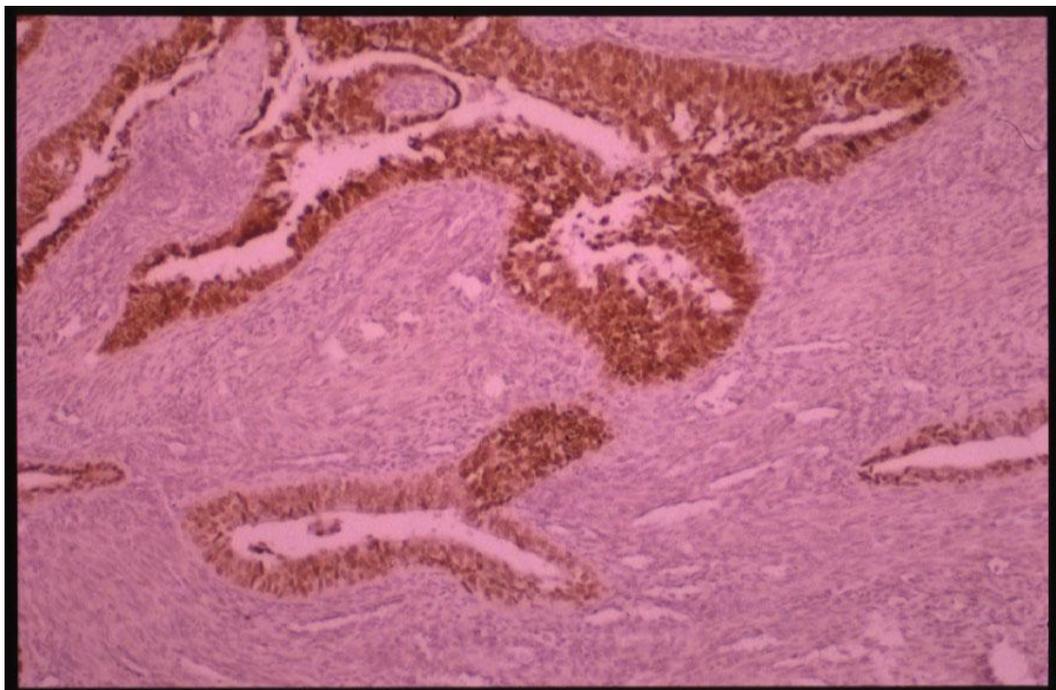


Figura 28. Carcinoma papilar seroso. G3. IH (ABC-DAB) P53. 10x.



Figura 29. Carcinoma papilar seroso. Extensión contigua en las glándulas endometriales. Tumor RP negativo. Glándulas normales RP positivo. IH (ABC-DAB) RP. 10x.

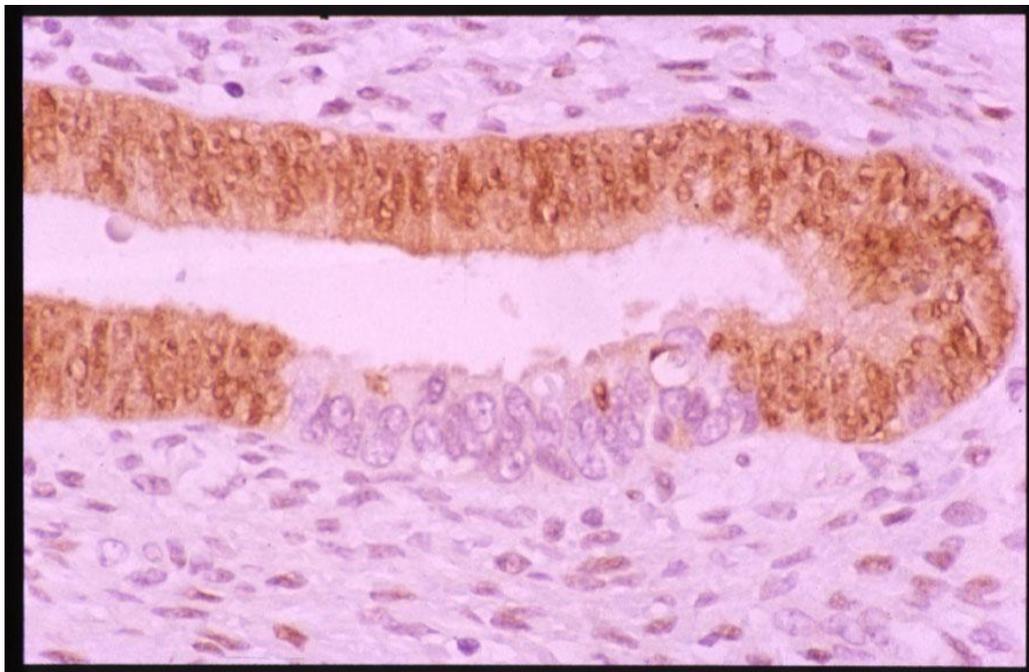


Figura 30. Carcinoma papilar seroso. Negatividad de las células tumorales para RP. IH (ABC-DAB) RP. 40x.

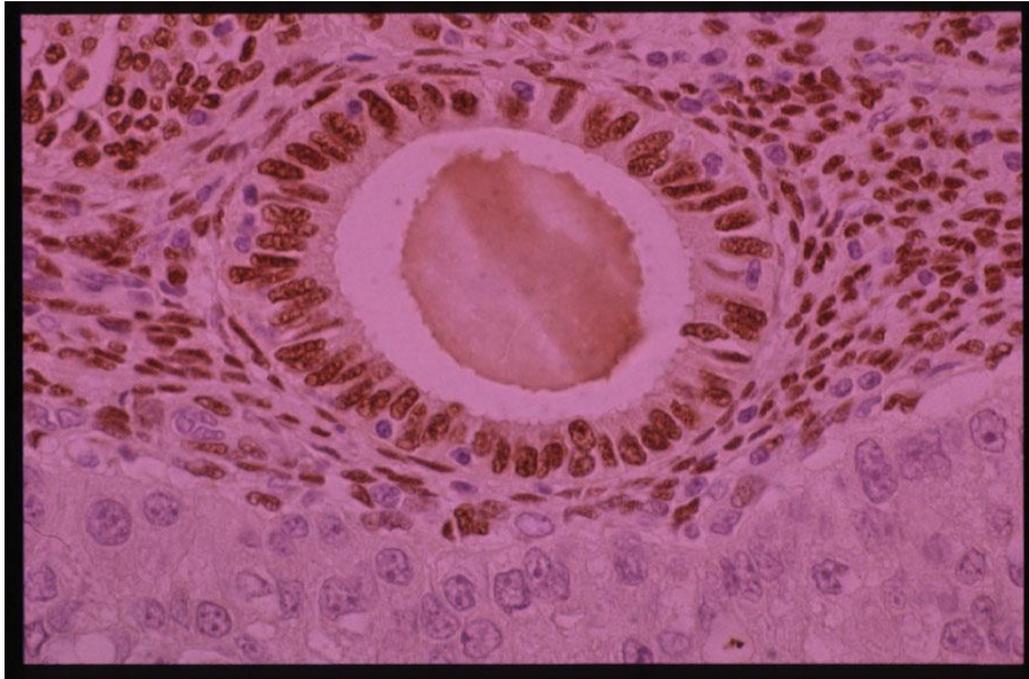


Figura 31. Carcinoma papilar seroso. Expresión negativa para RE en células tumorales y alta positividad tanto en células glandulares como estromales. IH (ABC-DAB) RE. 40x.

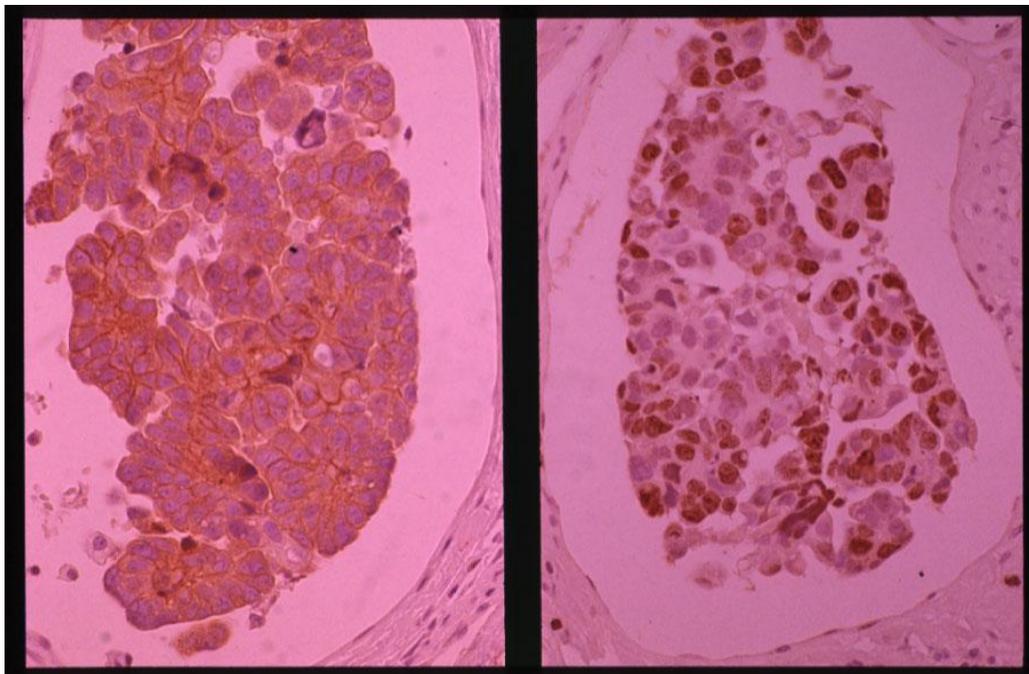


Figura 32. Carcinoma papilar seroso. Invasión vascular.
a) IH (ABC-DAB) C-erbB. 20x.
b) IH (ABC-DAB) Mib-1. 20x.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En nuestro estudio la edad media de las 99 pacientes ha sido de 65'43 años, encontrándose el rango de edad entre 35 y 88 años (Tabla 1). Los resultados que hemos obtenido son similares a los encontrados por otros autores como Friberg (70), Carcangiu (25), Nyholm (98), Palmer (190), Riethdorf (208), Hamel (93) etc.; quienes encontraron una edad media entre 64 años y 67 años.

Ehrlich (55) fue el único de los autores revisados que se alejaba un poco de esta media de edad, ya que en su estudio obtuvo una media de 57 años, pero debemos tener en cuenta que su rango de edad comprendía de 25 a 88 años, y probablemente este caso de 25 años hace bajar la media.

Al estudiar el grado histológico de nuestra muestra según la clasificación de la FIGO, observamos un predominio de casos grado G.1 de la clasificación de la FIGO, seguido de los carcinomas de grado G.2 y alguno de grado G.3 (Tabla 3). Debido a esta diferencia en el número de casos de cada grado, nos ha llevado a no poder establecer pruebas definitivas en algunos de nuestros estudios.

Lo mismo nos ha ocurrido al valorar el tipo histológico, donde obtuvimos un predominio de los carcinomas endometrioides simples respecto al resto de los carcinomas endometrioides y de los especiales. Debemos recordar que para algunas pruebas señaladas del estudio estadístico, no se han incluido los carcinomas de células claras, ni los carcinomas papilares serosos (un total de 6 tumores especiales) (Tabla 5).

Al escoger los casos para nuestro estudio nos encontramos que en 26 de nuestras pacientes sólo se había realizado legrado dentro de nuestro hospital, por lo que no pudimos disponer de estos casos para algunos de los estudios como la invasión miometrial, los marcadores en la mucosa, etc. (Tabla 2).

6.1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA

Al igual que en otros estudios realizados con técnicas inmunohistoquímicas, en nuestra investigación la localización de los RE y RP ha sido a nivel del núcleo con grandes variables de intensidad.

En algunos casos existían áreas positivas y negativas en el mismo tumor, tanto entre las diferentes glándulas, como entre las células epiteliales de las mismas.

En nuestro estudio hemos observado un escalonamiento en la intensidad de la tinción casi siempre a favor del estrato basal del endometrio, con pérdida progresiva de la señal a lo largo del estrato funcional, tanto en la parte sana del endometrio como en la zona tumoral. Palacios (189) en su estudio también nos habla de la distribución especial de la tinción celular a nivel del endometrio.

Al analizar nuestros datos hemos podido confirmar los resultados de otros estudios previamente publicados, en los cuales se relacionaba el estado de los RE y RP con otros parámetros clínico-patológicos.

Hemos encontrado que los RE y RP están relacionados con el grado tumoral según la clasificación de la FIGO. Para los RE la expresión media más alta ha sido para los tumores en G.1 (41´42%), algo menor (30´23%) en los de G.2, e inferior (24´29%) en los de G.3. Como puede observarse, hay una relación inversa entre la media de expresión de los RE y el grado tumoral, es decir, a mayor grado de expresión menor grado de malignidad. En la Figura 21a podemos apreciar la alta positividad para los RE en los tumores de grado G.1. (Tabla 2.2, Gráfico 10).

Sin embargo al estudiar la relación entre los diferentes grados tumorales, las diferencias encontradas entre G.1-G.2, G.1-G.2 y G.2-G.3 no han sido significativas en ninguno de los casos (Tabla 2.3).

En este aspecto hemos coincidido con la mayoría de los autores que hemos revisado, como Carcangiu (25), Nyholm (98), Palmer (190) y Wang (252).

Sin embargo, Ehrlich (55) mostró que en su estudio los RE eran independientes del estadio, el grado histológico, la edad, la profundidad de invasión y la presencia o ausencia de metástasis linfáticas.

Respecto a los receptores de progesterona también hemos encontrado una relación inversa entre dichos receptores y el grado tumoral, habiendo obtenido una expresión media de receptores de progesterona para los tumores en grado G.1 de 45'12%, para el grado G.2 de 27'88% y para el grado G.3 de 7'86%. Por otra parte, hemos encontrado diferencias significativas al examinar la positividad de los RP entre los grupos G.1-G.2 y G.1-G.3 (con $P < 0'0202$ y $P < 0'0034$ respectivamente). No hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos G.2-G.3 (Tablas 3.2, 3.3 y Gráfico 11).

Autores como Greastman (86), Carcangiu (25), Nyholm (98), Palmer (190), Wang (252) y Ehrlich (55), han coincidido con nosotros en la existencia de una relación inversa de los RP con el grado de diferenciación tumoral, esto es a mayor expresión de RP menor grado tumoral.

Al valorar la mucosa próxima al tumor, hemos encontrado una elevada positividad para los receptores de estrógenos, habiendo sido pequeñas las diferencias en los diferentes grados de tumor. Así, para el grado G.1, hemos obtenido una media de 80'45%, para el G.2 de 80'71% y para el G.3 de 76'66%. Las diferencias de positividad entre G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 no han sido significativas (Tablas 8.2, 8.3 y Gráfica 16).

Respecto a la expresión de los RP en la mucosa adyacente al tumor, los resultados obtenidos han sido similares, siendo elevada en todos los casos y con pocas diferencias entre ellos. Hemos encontrando una expresión media para G.1 de 82'50%, para G.2 de 74'41% y para G.3 de 70'00%. En este caso las diferencias de positividad entre G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 no han sido significativas en ninguno de los casos (Tabla 9.2, 9.3 y Gráfica 17).

Entre los autores consultados, no hemos encontrado ningún estudio en el que se haya valorado la mucosa adyacente al tumor. Sin embargo, bien es sabido que en condiciones fisiológicas, el endometrio tiene una gran dependencia

hormonal, tanto de estrógenos como de progesterona, por lo que a nivel del endometrio, podemos encontrar RE y RP con mayor o menor variación en la positividad

Al comparar globalmente la expresión media de los RE y de los RP en el tumor y en la mucosa adyacente al mismo, hemos encontrado diferencias significativas, ya que $P < 0.0001$. Esto quiere decir que mientras en la zona de mucosa hay abundantes RE, en la zona tumoral disminuyen significativamente (Tabla 13.1, 14.1 y Gráfico 22, 23).

En nuestro estudio observamos que los tumores con mayor índice de RE y RP han sido los carcinomas endometrioides simples, seguidos de los adenoacantomas, carcinomas adenoescamosos, y finalmente de los carcinomas de células claras y los carcinomas secretores que han mostrado expresión nula. (Tabla 23). Además, en los diferentes subtipos histológicos se observa una disminución de la expresión en la zona tumoral en relación con la mucosa no tumoral, la cual es estadísticamente significativa. Carcangiu (25) realizó un estudio en el que valoraba la relación entre el nivel de RE y RP en los diferentes subtipos histológicos del carcinoma de endometrio y encontró valores semejantes a los nuestros. Para él la mayor expresión, tanto de RE como de RP, se producía en los carcinomas endometrioides simples, seguido de los adenoacantomas, después por los serosos y finalmente por los carcinomas de células claras.

Al estudiar la relación entre la expresión de los receptores estrogénicos y la invasión miometrial obtuvimos una relación inversa entre ambos. Sin embargo no hemos encontrado asociación con los RP, ni entre la invasión vascular y ambos receptores. En este aspecto he coincidido en parte con Palmer (190) quien si observó relación directa entre los RE y los RP con la invasión miometrial. Greastman (86) y Ehrlich (55) no encontraron asociación entre los RP y la invasión miometrial. Carcangiu (25) tampoco observó asociación entre la invasión miometrial con los RE ni con los RP, sin embargo sí que demostró relación entre la invasión vascular y los RP.

En el estudio de correlación de las diferentes variables hemos observado correlación entre los RE y los RP, con un coeficiente de correlación de Pearson de

0'65. Al hacer la curva de regresión hemos obtenido una gran dispersión entre los dos parámetros. Es decir ambos receptores se comportan de una forma semejante, perdiendo capacidad de expresión cuando la agresividad del tumor es mayor (Tabla 19 y Gráfico 29).

Bigsby (15) realizó un estudio en el que demostró una relación inversa entre la expresión de C-erbB-2 y los RE y RP. Cuando la expresión de C-erbB-2 era máxima los tumores no mostraban RE y RP. Sin embargo cuando la expresión de C-erbB-2 era media o baja sí que encontró presencia de RE y RP.

6.1.1. ESTUDIOS MULTIVARIANTES

En los estudios multivariantes, hemos correlacionado los diferentes tipos tumorales con su respectivo grado histológico, y hemos valorado la expresión de los RE. En los mismos se observa que la tendencia que siguen los carcinomas endometrioides simples es a mayor grado tumoral, menor expresión de RE.

Sin embargo, los adenoacantomas y los carcinomas mucinosos han seguido una tendencia diferente, a menor grado menor expresión (no debemos olvidar los pocos casos de los que disponemos de este subtipo).

Por otro lado, el carcinoma secretor no ha expresado RE. En la mucosa adyacente al tumor se ha observado alta expresión en todos los casos, sin que haya diferencias significativas (Gráfico 30.1 y 30.2).

Al valorar los RP con este mismo método, los carcinomas endometrioides simples, los adenoescamosos y los adenoacantomas han presentado una relación inversa entre el grado de malignidad, y la expresión de RP.

Sin embargo, en los carcinomas mucinosos la relación entre ambos ha sido directa (aunque debemos considerar que G.2 nos ha dado el máximo nivel de RP, por lo que hace cambiar la media y la relación). El carcinoma secretor ha resultado negativo para los RP.

En la mucosa adyacente al tumor, tienden a estar elevados los RP en todos los tipos anatomopatológicos, y además en todos los grados (Gráfico 31.1-31.2).

Podemos decir que el tipo histológico del tumor influye también en la expresión de RE y RP siendo mayor la expresión en aquellos tipos de menor agresividad. Conforme va aumentando la agresividad del tumor, los receptores van disminuyendo hasta desaparecer en los tipos de peor pronóstico.

La expresión media de los RE en la totalidad de los casos, ha resultado del 38% aproximadamente, siendo similar la expresión para los RP, con un 39%. (Gráfico 36.1).

Al valorar la expresión media de dichos receptores en cada uno de los grados de la clasificación de la FIGO, hemos encontrado que para los tumores de grado G.1 la expresión media de RE es algo menor que la media de los RP, siendo 41'41 y 45'11 respectivamente. Sin embargo, en los tumores grado G.2 la expresión de RE ha sido algo mayor que para los RP, siendo de 30'23 y 27'88% respectivamente. De la misma manera, en los tumores G.3 hemos obtenido una expresión de RE mayor que de los RP, 24'28% y 7'85% respectivamente. (Gráfico 36.2 y Tabla 22.2).

Otros parámetros han sido valorados por los autores consultados, como por ejemplo la supervivencia de los pacientes.

En este sentido, Greastman (86) observó en sus pacientes que cuanto mayor era la expresión de los RE y RP, mayor era la supervivencia. Palmer (190) solamente encontró relación entre los RE y la supervivencia, siendo también de carácter directo. Ehrlich (55) sin embargo sólo asoció la supervivencia a los RP, resultando que a mayor expresión de los RP mayor era la supervivencia. Sin embargo, Friberg y Noren (70) no encontraron diferencias significativas entre la correlación de RE y RP, en las mujeres que sobrevivían y en las que morían. Como vemos aún deberá estudiarse más profundamente esta relación

Otros aspectos valorados por estos autores han sido: el grado de recurrencias, las metástasis, la afectación linfática, etc. Aunque los hallazgos encontrados no han sido definitivos.

Rayter (203) estudió la relación entre el carcinoma de mama y los RE, y obtuvo como resultado que la expresión elevada de los RE se relacionaba con un menor grado de diferenciación, con una edad más avanzada y con algunos tipos histológicos de carcinoma de mama, como el carcinoma lobular, el mucinoso y el tubular. Sin embargo, observó que los carcinomas comedo y medular, rara vez expresaban RE.

6.2. ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN Ki-67

En nuestra investigación, hemos intentado definir el significado de la expresión de inmunotinción con el marcador de proliferación Ki-67, el cual creemos que está directamente correlacionado con otros parámetros, como el grado de agresividad de los carcinomas de endometrio, y el desarrollo de dicho tumor, al igual que se ha descrito ya en otros tumores.

Como ya sabemos, la proteína Ki-67 aparece específicamente en las células en proliferación y en todas las fases del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M), excepto en la fase de reposo (G_0); y parece ser un índice de agresividad neoplásica.

Para nuestro estudio hemos utilizado el anticuerpo monoclonal Mib-1, el cual reacciona con el antígeno Ki-67, y tiene la ventaja de que puede ser utilizado en secciones incluidas en parafina. La inmunotinción se ha localizado a nivel del núcleo en todos los casos (Figura 12a).

La positividad de Mib-1 en los carcinomas de endometrio va a estar en relación directa con la diferenciación tumoral. Así, en nuestro estudio la expresión media en G.1 ha sido del 9'52%, en G.2 del 27'58% y en G.3 del 71'43%.

Además la diferencia de positividad entre G.1-G.2, G.1-G.3, y G.2-G.3 ha sido significativa en todos los casos ($P < 0'001$) (Tablas 4.2 y 4.3 y Gráfico 12).

No hemos hallado en la revisión bibliográfica ningún trabajo en el que se haya estudiado la expresión del marcador Ki-67 (Mib-1) en los carcinomas

endometriales, pero sí en otros tumores como el de piel (232), en linfomas no-Hodgkin (80), en carcinomas de mama (259), en carcinoma colo-rectal (197) y en carcinoma cervical (76), etc.

Wintzer (259) valoró la expresión del marcador de proliferación Ki-67 en la mama, tanto sana como con lesiones benignas y malignas. Obtuvo que la positividad para Ki-67 era menor en los tejidos normales o benignos que en los carcinomas, y dentro de los carcinomas aumentaba conforme mayor era el grado del tumor. También Soyer (232), quien estudió la expresión de Ki-67 en los tumores melanocíticos, tanto benignos como malignos, observó una asociación de dicho marcador con el grado de malignidad, el índice de Breslow y el índice de Clark.

A nivel de la mucosa adyacente al tumor la positividad para Mib-1 ha sido muy baja. en G.1 fue del 1'2%, en G.2 del 0'53% y en G.3 del 0'83%, no habiendo encontrado diferencias significativas en la positividad entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 (Tabla 10.2, 10.3 y Gráfico 18).

En la mayoría de nuestros casos la mucosa adyacente al tumor es atrófica y el percentil en la expresión de Mib-1 es 0, aunque algún caso aislado es de 5. Sin embargo, cuando la mucosa adyacente es hiperplásica el percentil en la expresión de Mib-1 puede ser de 5, 10 ó 20 (Gráfico 19).

En algunos casos en los que existe hiperplasia las células tienden a presentar cambios de proliferación, por lo que sí expresan el anticuerpo Mib-1.

Ninguno de los artículos consultados han valorado la expresión de Mib-1 en el tejido adyacente al tumor, pero algunos autores han valorado la expresión de Mib-1 en tejidos normales, como la mama (259) o la piel (232), encontrando en ambos estudios una menor positividad de Ki-67 que en los tumores que se estudiaron paralelamente.

Al comparar (medias pareadas) la expresión de la proteína Mib-1 entre la mucosa adyacente al tumor y el propio tumor, hemos obtenido diferencias significativas, ya que $P < 0'0001$. Este resultado es el esperado puesto que ya

hemos comentado la expresión mínima de Ki-67 en la mucosa, y además siempre que aparece dicha expresión es sobre la mucosa hiperplásica, en la cual hay proliferación; mientras que en los tumores, la expresión ha sido inversamente proporcional a la diferenciación, es decir, cuanto mayor es la expresión, menor es la diferenciación (Tabla 15.1 y Gráfico 24).

En los carcinomas especiales que se obtuvieron en nuestro estudio, resultó una expresión media de Mib-1 de 60%.

Al estudiar cada uno de los carcinomas especiales por separado, observamos una media del 47'50% para los carcinomas de células claras, habiendo sido para cada uno de los dos casos que tenemos de 15% para uno y de 80% para el otro; lo que trae como consecuencia que la media no sea muy alta. Por otro lado, en los carcinomas papilares serosos la media ha sido de 66'25% (Figura 26). La expresión media de los adenoacantomas fue de 10'33%, de los carcinomas adenoescamosos de 10'00%.

Al comparar los carcinomas endometrioides en general con los especiales, podemos confirmar que en la expresión de Mib-1 influye el subtipo histológico, siendo más elevada en los casos de mayor agresividad. (Tabla 24).

Wintzer (259) en su estudio sobre la mama, no encontró relación entre la expresión de Ki-67 y el tipo histológico del tumor.

Al valorar la expresión de la invasión miometrial en el diagrama de pirámides, encontramos que a una mayor expresión de Mib-1 le corresponde una mayor invasión miometrial. Respecto a la invasión vascular sin embargo no hemos encontrado relación con este marcador (la Figura 32.b nos muestra un caso de invasión vascular con expresión de Mib-1 en un carcinoma papilar seroso).

Algunos autores como Garzetti (76), quien estudió la expresión de Ki-67 en el carcinoma de cérvix escamoso, sí que observó una asociación entre este marcador y la invasión vascular y linfática. Al igual que Wintzer (259) en el carcinoma de mama, también encontró relación con la afectación de los ganglios linfáticos.

Al hacer la matriz de correlación hemos encontrado que el único marcador con el que tiene cierta correlación nuestro marcador de proliferación Mib-1 (Ki-67) ha sido con el gen supresor p53, con una correlación de 0'50 (Tabla 19). Sin embargo al hacer la curva de regresión no hemos encontrado asociación entre ambas variables (Gráfico 28).

Wintzer (259), en su estudio del cáncer de mama vio que había una relación inversa entre la expresión del Ki-67 y los receptores de progesterona.

6.2.1. ESTUDIOS MULTIVARIANTES

En el carcinoma endometriode simple la expresión de Ki-67 sigue una tendencia directamente proporcional al grado de malignidad, lo mismo ocurre en el carcinoma mucinoso.

En los carcinomas adenoescamosos la expresión es igual en G.1 y G.2, mientras que en los adenoacantomas a menor grado de malignidad hay mayor expresión (Gráfico 32.1). Esto nos indica que también el tipo histológico influye en la expresión de Ki-67, siendo mayor en aquellos tumores más agresivos.

En la mucosa adyacente al tumor sólo se ha demostrado una mínima expresión en los carcinomas endometrioides, y el único caso de carcinoma secretor curiosamente presenta una expresión de Mib-1 alta (Gráfico 32.2).

La expresión media en la totalidad de los casos del marcador Mib-1 ha sido aproximadamente del 20% (Gráfico 36.1). Al valorar el marcador Mib-1 en cada uno de los grados según la clasificación de la FIGO, hemos encontrado una expresión media para el G.1 del 9'51% para G.2 del 27'57% y para el grado G.3 del 71'42%. (Gráfico 36.2, Tabla 22.2). Este estudio nos muestra que hay una gran diferencia de expresión en los tres grados, siendo directamente proporcional la expresión de Mib-1 al grado tumoral.

Varios autores han relacionado la expresión de Ki-67 (Mib-1) con la supervivencia en diferentes carcinomas. Por ejemplo Soyer (232) confirmó en su estudio que la alta expresión de Ki-67 se relacionaba con una menor supervivencia de los pacientes con melanomas malignos. Garzetti (76) también encontró relación entre la alta expresión de Ki-67 y la menor supervivencia en los carcinomas de cérvix. Sin embargo Wintzer (259) no llegó a ninguna conclusión con respecto a estos parámetros.

6.3. *PROTEÍNA SUPRESORA TUMORAL P53*

La expresión de la proteína supresora tumoral P53 se ha relacionado con una mayor agresividad y evolución en algunos tumores, entre ellos el carcinoma endometrial. En nuestro estudio la expresión del anticuerpo P53 ha sido localizada a nivel del núcleo, coincidiendo con otros autores como Hamel (93).

En nuestro trabajo la expresión de la proteína P53 guarda relación con el grado de diferenciación histológica, siendo ésta baja (7'2%) en tumores de grado 1, moderada (32'2%) en los de grado 2 y alta (58'55) en los tumores de grado 3 (en algunos casos de grado 1 se ha visto que hay ausencia de expresión de P53, como muestra la figura 22a).

Por otro lado, han resultado significativas las diferencias de positividad entre G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 (Tablas 5.2, 5.3 y Gráfico 3).

Nuestros resultados coinciden con Riethdorf (208), Bur (22), Kohler (133), Yu (265), Strang (235), Berchuck (11) y Reinartz (207); para todos ellos la expresión de P53 aumenta con el grado histológico de malignidad.

En la mucosa adyacente al tumor no encontramos expresión de P53 en ninguno de los tumores: ni en los carcinomas endometrioides, ni en los especiales (carcinoma papilar seroso y carcinoma de células claras). Por este motivo no hemos realizado ningún gráfico. Estos resultados han sido adecuados, ya que esta proteína se ha relacionado solamente con las células transformadas.

Al comparar la expresión de la proteína P53 entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor, como ya decíamos en nuestros resultados, muestra unas diferencias significativas, ya que $P < 0.0001$. Esto quiere decir que en el tejido tumoral la expresión de P53 es elevada, mientras que en la mucosa adyacente siempre es negativa (Tabla 16.2, 16.3 y Gráfico 25). Debemos recordar que la proteína P53 mutada (la cual aparece en células tumorales) es detectada por los medios normales de inmunohistoquímica, ya que su vida media es mayor y se acumula en los núcleos, sin embargo la P53 en cantidad normal (mucosa normal) no se detecta.

Algunos autores como Kohler (133) y Riethdorf (208), coinciden con nosotros en que en sus respectivos estudios la expresión de la proteína P53 en la mucosa fue también negativa. Berchuck (11) analizó tanto la mucosa endometrial normal como hiperplásica y también encontró negatividad en ambas.

Respecto a los carcinomas papilares serosos hemos obtenido una media de expresión de P53 del 57.5%, siendo el caso con menor expresión del 30% y el de máxima expresión del 80% (Figura 28 y Tabla 24).

Los carcinomas de células claras han mostrado una expresión media de P53 del 8.5%, siendo el caso con menor expresión del 2% y el de máxima del 15% (Tabla 24).

La expresión media de P53 en los diferentes subtipos de carcinoma endometriode ha oscilado desde una expresión nula para los carcinomas secretores, hasta una expresión del 19.68% para los carcinomas endometrioides simples.

Al comparar las medias de expresión en los carcinomas endometrioides y los especiales vemos como la expresión de P53 está relacionada también con la mayor agresividad de algunos subtipos histológicos. (Tabla 24).

Zheng (268) realizó un estudio en el cual comparó la expresión de P53 en los carcinomas endometrioides y los carcinomas papilares, y obtuvo una media de

expresión para los primeros del 28´6%, mientras que para los carcinomas papilares obtuvo una media del 71%.

Según el diagrama en pirámide hemos encontrado que existe asociación entre el marcador de proliferación P53 y la invasión miometrial. En dicha gráfica podemos observar que la zona central de la pirámide, que indica invasión miometrial $> 3´00$, corresponde a la zona de mayor expresión del marcador de proliferación P53. Concéntricamente van rodeando a esta zona, los grados de invasión miometrial progresivamente menores. Respecto a la invasión vascular sin embargo no hemos encontrado relación con este marcador (Gráfico 37).

Coincidimos con Bur (22) y Kohler (133) para los que la mayor expresión de esta proteína corresponde a tumores de alto grado y gran agresividad.

En nuestro estudio la correlación entre las diferentes variables no ha sido significativa en ningún caso para la proteína P53, habiendo sido la más cercana la correlación entre P53 y Mib-1, para la cual, el coeficiente de correlación ha sido de 0´50. Al hacer la curva de regresión no hemos encontrado asociación entre ambos parámetros. (Tabla 19 y Gráfico 28). Sin embargo, sí hemos encontrado un cierto paralelismo entre la expresión de la P53 y Mib-1, ya que ambas aumentan cuanto mayor es la agresividad de los tumores, aunque estadísticamente no hemos podido demostrarlo.

6.3.1. ESTUDIOS MULTIVARIANTES

Al estudiar cómo se expresa la proteína P53 en cada uno de los tipos tumorales según la clasificación de la FIGO, observamos que en los carcinomas endometrioides simples sigue una tendencia proporcional al grado tumoral de la clasificación de la FIGO, es decir a mayor grado mayor expresión de la proteína P53. Coincidimos con Strang (235) y Riethdorf (208), para los que los tumores pobremente diferenciados tuvieron fuerte expresión.

Tanto los adenoacantomas como los carcinomas adenoescamosos mostraron un nivel bajo de expresión. El carcinoma mucinoso tiene una baja expresión en uno de los casos 10% y en el otro es negativa, no estando en relación con la

agresividad, ya que en el caso en que la expresión es negativa existe invasión vascular e infiltración miometrial grado G.3 (Gráfico 33.1).

La expresión media de la proteína P53 ha sido aproximadamente de 19% en la totalidad de los casos estudiados. Al estudiar los diferentes grados tumorales por separado, hallamos una relación directa entre el grado tumoral y la expresión de dicha proteína.

Si comparamos la expresión de P53 y la del marcador de proliferación Mib-1 en los diferentes grados descubrimos que tanto en el grado G.1 como en el G.2 la expresión de Mib-1 es mayor que la de P53 (siendo en G.1 la expresión de Mib-1 de 9'51% y de P53 de 7'41 y en G.2 para Mib-1 de 71'42% y P53 de 58'57%). Sin embargo en el grado G.3 la expresión de Mib-1 ha sido algo menor que la de la proteína P53 (27'57% y 32'34% respectivamente) (Gráfica 36.1, 36.2 y Tabla 22.2). Podemos decir que la expresión de estos dos marcadores va paralela y marcan la agresividad tumoral. Sin embargo la expresión de estos marcadores es inversa con el oncogén Bcl-2 y con los RE y RP, ya que dichos marcadores se expresan en condiciones de menor malignidad.

Diversos estudios han sido realizados en relación con la P53. Así, Hamel (93) relacionó la intensa expresión de P53 con el compromiso de la supervivencia. Por otro lado, Ito (114) encontró una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de P53 y la recurrencia de la enfermedad.

En nuestro estudio no hemos valorado el tiempo de supervivencia ni la recurrencia de la enfermedad. Dichos parámetros los dejamos para un estudio posterior, debido a que el tiempo transcurrido desde el diagnóstico histológico hasta el comienzo de nuestro estudio ha sido corto en muchos de los casos.

Otros tumores han sido también asociados con una fuerte correlación entre la expresión de P53 y el estadio avanzado de la enfermedad, como el carcinoma de mama (142), de colon (201), de pulmón (142) y de vejiga (260).

Esto puede indicar que la mutación del gen p53 es un precoz acontecimiento para la progresión del tumor. Los tumores que adquieren mutación P53 pueden

progresar rápidamente y, por esto, frecuentemente se escapan de un diagnóstico precoz.

Así, en el cáncer de mama, la sobreexpresión de P53 se incrementa dramáticamente con los estadios avanzados. En el cáncer de colon encontraron que existía una asociación entre la aparición de expresión de P53 y el comportamiento infiltrativo del tumor, pero no con el grado de progresión del tumor (incluyendo metástasis). En los carcinomas de vejiga se vio que la alta expresión de P53 era un importante y precoz acontecimiento en la patogenia del tumor, llevando al desarrollo de un carcinoma de vejiga infiltrante.

6.4. ONCOGÉN *Bcl-2*

La proteína bcl-2 se ha relacionado con una supervivencia celular mayor, sin saber aún cual es su mecanismo específico. Lo que sí se ha comprobado es que dicha proteína cuando se encuentra a niveles altos, bloquea la muerte celular programada (apoptosis).

El papel fisiológico del gen Bcl-2 en la regulación de la muerte de las células en el endometrio, podría implicar que alteraciones en la expresión del gen formaran parte de la historia natural de las neoplasias endometriales.

La expresión del oncogén Bcl-2 se considera positiva cuando el marcaje se produce a nivel del citoplasma celular (Figura 19).

En nuestro estudio hemos podido demostrar lo anteriormente dicho. El menor grado histológico, según la clasificación de la FIGO, se ha relacionado con una mayor expresión de la proteína bcl-2. Así, hemos encontrado en los carcinomas G.1, una expresión media de 33´92%, siendo algo menor para los de grado G.2, con una media de 27´15% y menor para los de grado G.3 habiendo sido de 21´43%. Por otro lado, no hemos encontrado diferencias significativas en la positividad entre G.1-G.2, G.1-G.3 y G.2-G.3 (Tablas 6.2, 6.3 y Gráfico 14).

Nuestros resultados han coincidido con las investigaciones de Chan (29), quien también estudió la expresión de la proteína bcl-2 en los diferentes grados de la FIGO, habiendo encontrado la máxima expresión de bcl-2 en aquellos carcinomas de grado G.1, una expresión intermedia en los de grado G.2 y negativa para los de grado G.3.

Estos estudios nos llevan a asociar la proteína bcl-2 con un menor grado de malignidad tumoral. Todo ello nos hace pensar que los carcinomas con baja expresión de dicha proteína se encuentran en un estadio más avanzado o más agresivo.

En la mucosa adyacente al tumor encontramos una alta expresión en todos los casos, siendo la media para los tumores de grado G.1 de 76´70%, para los de grado G.2 de 74´12%, y para los de grado G.3 de 78´33%. Debemos tener en cuenta que la mucosa próxima al tumor es tejido sano, y como ya hemos dicho esta proteína aparece de forma fisiológica en las células. No se han encontrado diferencias significativas al estudiar la expresión de Bcl-2 en la mucosa, entre los grupos G.1-G.2, G.1-G.2 y G.2-G.3 (Tabla 11.2, 11.3 y Gráfico 20).

Chan (29), en su estudio, además de valorar casos de carcinomas endometriales, también valoró endometrios hiperplásicos, tanto con hiperplasias típicas como atípicas. Sus resultados demostraron que la expresión de bcl-2 citoplasmática era fuerte en las glándulas de las hiperplasias típicas (tanto simples como complejas), mientras que en las hiperplasias atípicas la expresión era de intensidad más débil y además de distribución parcheada.

Al examinar los carcinomas, observó que la tinción era menos intensa en los citoplasmas de las células tumorales que en las células de las hiperplasias. Además, esta tinción sólo se encontraba en los tumores de grado histológico bajo, mientras que desaparecía en los de grado más alto.

En nuestro estudio sólo hemos valorado casos de carcinoma de endometrio, pero creemos muy interesante mencionar los resultados de este estudio, ya que nos hace pensar en la posibilidad de que una menor expresión de bcl-2 puede formar parte de la evolución precoz del carcinoma de endometrio.

La adquisición de otras anomalías genéticas pueden entonces disminuir la dependencia de células anormales a bcl-2 para la supervivencia, asociando la aparición de clones negativos con un fenotipo más agresivo. Esta hipótesis se confirma por la asociación de positividad de bcl-2 con tumores mejor diferenciados, mientras que los carcinomas pobremente diferenciados muestran negatividad para bcl-2.

Es interesante comentar cómo ha sido la expresión de la proteína bcl-2 en los tumores especiales de nuestro estudio: carcinomas papilares serosos y carcinomas de células claras. Así, en la zona tumoral hemos encontrado una expresión media del 75% para los carcinomas papilares serosos, mientras que para los de células claras ha sido nula.

Por otro lado, en los carcinomas endometrioides simples la expresión media de bcl-2 ha sido del 32,5%, que como vemos es mayor que para los carcinomas especiales. Esto debe hacernos pensar que la mayor agresividad de los subtipos histológicos (como los carcinomas especiales) también está relacionada con una menor expresión del bcl-2. En la mucosa, la expresión de esta proteína ha sido alta en todos los casos (Tabla 25).

Estos resultados coinciden con los de Zheng (268), que también encontró diferencias significativas $P < 0,0002$ entre la expresión en los carcinomas endometrioides, que para los carcinomas papilares serosos, habiendo sido mayor la expresión para los carcinomas endometrioides.

Al comparar en nuestro estudio la expresión de bcl-2 entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor, hemos descubierto diferencias significativas ($P < 0,0001$). Estos resultados los podemos interpretar afirmando, que mientras en la zona de mucosa hay una alta expresión de bcl-2, en la zona tumoral disminuye significativamente tal expresión (Tabla 17.1 y Gráfico 26).

Al valorar la relación entre el grado de invasión miometrial y vascular con respecto a la expresión de bcl-2, no hemos observado dependencia alguna, ya que en casos con mínima invasión o ausencia de invasión la expresión de bcl-2 podía

ser alta, baja o nula; y al contrario en casos de invasión muy alta encontramos también expresión en todos los niveles.

En nuestro estudio, no hemos hallado correlación de la proteína bcl-2 con ninguna de los demás marcadores que hemos estudiado (Tabla 19).

Sin embargo, Otsuki (188) estudió la correlación entre la proteína bcl-2 y los receptores de estrógenos y receptores de progesterona, y sí que encontró relación entre estos parámetros, sobre todo con los receptores de estrógenos.

Es obvio pensar que todos estos parámetros deberían estar correlacionados de alguna manera, debido a que todos ellos aparecen en estadíos precoces de malignidad. Probablemente, si en nuestra investigación hubiéramos tomado una muestra mayor de casos, los resultados respecto a la correlación entre las diferentes variables habrían sido diferentes.

6.4.1. ESTUDIO MULTIVARIANTE

Al estudiar cómo se expresa el marcador bcl-2 según la clasificación de la FIGO y el tipo histológico, observamos que tanto los carcinomas endometrioides simples, como los adenoescamosos y adenoacantomas, siguen la tendencia esperada, es decir, a menor grado, mayor expresión de bcl-2. En los carcinomas mucinosos vemos que tienen muy poca expresión mientras que en el carcinoma secretor muestra una elevada expresión en el grado G.1, la cual ha resultado ser la máxima expresión en nuestro estudio (Gráfico 34.1). Según estos resultados podemos decir que la expresión de la proteína bcl-2 esta asociada a los tipos histológicos menos agresivos.

Al estudiar la mucosa adyacente al tumor de los diferentes tipos histológicos y los diferentes grados de la FIGO, vemos que la expresión de bcl-2 es alta en todos los carcinomas endometrioides simples, habiendo pocas diferencias entre los diferentes grados. Lo mismo sucede con los adenoacantomas y los carcinomas adenoescamosos, no ocurriendo igual en los carcinomas mucinosos que muestran menor expresión de bcl-2 en los G.1 que en los G.2. No debemos olvidar que tenemos tan solo dos casos de carcinomas mucinosos, por lo tanto nuestros

resultados sólo expresan lo que ocurre en estos casos, pero no podemos sacar conclusiones determinantes. Respecto al carcinoma secretor la expresión de bcl-2 que presentó fue la más alta dentro de nuestro estudio (Gráfico 34.2).

Al valorar la expresión del oncogén Bcl-2 en la totalidad de los casos hemos obtenido una media de aproximadamente el 31%. Al valorar la expresión media de dicha proteína en cada uno de los grados tumorales observamos una pequeña diferencia entre ellos, habiendo sido de 33'91% para el G.1, de 27'11% para el G.2 y de 21'42% para el grado G.3. La expresión del oncogén Bcl-2 sigue la misma tendencia que los RE y RP, mientras que su relación es inversa con el Mib-1, la P53 y el C-erbB-2. (Gráfico 36.1, 36.2 y Tabla 22.2).

Crowson *et al* (38) valoraron en su estudio la relación de la proteína bcl-2 en los carcinomas basales de piel (basaliomas). Observaron que la mayoría de los casos expresaban dicha proteína. Además pudieron comprobar que la expresión de bcl-2 era mayor en la zona más superficial del tumor que en la parte de crecimiento más agresivo, donde la expresión era menor.

Monsier *et al* (174) sugirieron que había correlación entre los mecanismos del oncogén Bcl-2 y la regulación del carcinoma colo-rectal.

6.5 ONCOGÉN C-erbB-2

El c-erbB-2 es un oncogén que ha sido asociado con la iniciación y progresión de tumores en la especie humana. Su mecanismo de acción aún no se ha conseguido comprender por completo, aunque sí que se sabe que grandes cantidades de esta proteína específica juegan un papel importante en la progresión de algunos tumores sólidos. La expresión del oncogén c-erbB-2 se considera positiva cuando marca la membrana citoplasmática, aunque también es normal encontrarlo dentro del propio citoplasma (Figura 27).

En nuestra investigación la expresión del oncogén c-erbB-2 ha sido mayor según la agresividad de los tumores. Así, podemos observar una expresión media

del 21'92% en los tumores grado G.1, una media del 37'15% para los de grado G.2 y una media del 60% para los de grado G.3 (Tabla 7.2 y Gráfico 15).

Las diferencias de expresión para el oncogén c-erbB-2 en la zona tumoral de la muestra han sido significativas entre los grados G.1-G.2, con una $P < 0'0361$ y entre G.1-G.3 con una $P < 0'0024$, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los grados G.2-G.3 (Tabla 7.3). en consecuencia, podemos afirmar que la expresión de c-erbB-2 está directamente asociada al mayor grado de malignidad.

Hemos coincidido en este aspecto con Monk (172), quien también encontró relación entre la mayor sobreexpresión de la proteína y un estado más avanzado del tumor.

Además, Czerwenka (42) también confirmó con su estudio estos resultados y estudió también la expresión de este oncogén en la hiperplasia endometrial, viendo que la expresión de c-erbB-2 era mayor en la hiperplasia atípica que en la hiperplasia típica simple.

Sin embargo Bigsby (15) y Esteller (59) no coinciden ni con nosotros ni con los otros autores. Así, Bigsby apuntó que la expresión alta de c-erbB-2 aparecía en carcinomas altamente diferenciados, mientras que en los tumores pobremente diferenciados la expresión era baja. Además, Esteller no encontró relación directa entre la amplificación del gen con la sobreexpresión y la progresión del tumor.

Al estudiar la mucosa adyacente al tumor encontramos una expresión nula del oncogén c-erbB-2 en los tres grados de la clasificación de la FIGO.

Al comparar la expresión de c-erbB-2 entre la zona tumoral y la mucosa adyacente al tumor, hemos encontrado diferencias significativas, siendo $P < 0'0001$. Así, mientras en la mucosa existe muy baja expresión de c-erbB-2, en la zona tumoral la expresión de dicho oncogén es más elevada (Tabla 18 y Gráfico 27).

En la zona tumoral de los tumores especiales, la expresión media de c-erbB-2 ha sido del 73'75% para los carcinomas papilares serosos (Figura 27) y

del 75% para los carcinomas de células claras; mientras que en la zona de mucosa la expresión ha sido nula en ambos casos. En los carcinomas endometrioides simples la expresión media ha sido del 29'33%. Estos resultados podrían confirmar la suposición de que la expresión de este oncogén guarda relación con la mayor agresividad de los diferentes subtipos histológicos. (Tabla 25).

Reinantz (207) estudió la relación del marcador c-erbB-2 en los carcinomas de células claras, y obtuvo unos resultados muy similares a los nuestros, siendo la media de expresión en su estudio del 75%.

Respecto a la invasión miometrial y vascular, no obtuvimos resultados que puedan hacernos pensar en cualquier tipo de asociación con el oncogén c-erbB-2 (la Figura 32a nos muestra un caso de invasión vascular con expresión de c-erbB-2 en un carcinoma papilar seroso).

En el estudio de correlación de los diferentes marcadores entre sí no hemos obtenido ningún resultado significativo del oncogén c-erbB-2 con ninguno de los otros marcadores (Tabla 19).

Sin embargo otros autores como Bigsby (15) sí que ha podido relacionar el oncogén c-erbB-2 con los receptores de progesterona, habiendo obtenido una relación inversa entre ambos. Además, Berchuck (13) encontró en su estudio que la expresión de c-erbB-2 era inversamente proporcional a los valores de los receptores de estrógenos, siendo los tumores con más alta expresión de c-erbB-2 los que mostraban negatividad para los receptores de estrógenos. Sin embargo, este autor no encontró relación con respecto a los receptores de progesterona.

6.5.1. ESTUDIO MULTIVARIANTE

Al realizar el estudio multivariante teniendo en cuenta el tipo tumoral y el grado según la clasificación de la FIGO, observamos que para los tumores endometrioides simples y los adenoacantomas, el oncogén c-erbB-2 sigue una tendencia directamente proporcional a la malignidad del tumor, siendo más alta la expresión en los tumores de mayor grado.

Para los carcinomas adenoescamosos, los resultados han mostrado mayor expresión en los de grado G.1 que en los de grado G.2, aunque estos valores no son objetivos debido al pequeño número de casos de este tipo de tumor.

Respecto a los carcinomas mucinosos sólo los de grado G.2 han mostrado expresión de c-erbB-2, mientras que el único caso de carcinoma secretor no ha mostrado expresión (Gráfico 35.1). Podemos decir que el tipo histológico también está asociado a la expresión de c-erbB-2, siendo mayor en aquellos tumores más agresivos.

En la mucosa adyacente al tumor no hemos encontrado ningún caso que mostrara expresión de c-erbB-2.

Al estudiar todos los casos en su conjunto, obtuvimos una expresión media del oncogén c-erbB-2 del 29% aproximadamente. Al estudiar cada uno de los grados por separado encontramos que la expresión de G.1 ha sido del 21'91%, para G.2 del 37'15% y para G.3 del 60%. Este oncogén ha seguido la misma tendencia que los marcadores de proliferación Mib-1 y los P53. Sin embargo es inverso a los RE y RP y al oncogén Bcl-2 (Gráfico 36.1, 36.2 y Tabla 22.2).

Berchuck (13) estudió la relación entre la expresión de c-erbB-2 y la supervivencia. En su estudio vió que una expresión más alta de c-erbB-2 se relacionaba con una menor supervivencia.

Diversos autores han estudiado este oncogén en otros tumores. Así respecto al cáncer de mama, Sundbland (238) y Domínguez-Iglesias (52), observaron que la sobreexpresión de c-erbB-2 se asociaba a un peor pronóstico de supervivencia. Por otro lado, Fresno (69), Heintz (97) y Smith (230) lo han asociado con una alta expresión en carcinomas intraductales, sobre todo en los de tipo comedocarcinoma. Además, afirmaron que la expresión de c-erbB-2 es predictor de la respuesta a la quimioterapia, siendo los tumores con alta expresión de dicho oncogén los que peor responden a este tratamiento.

Los carcinomas de ovario también han sido un punto de mira para muchos autores en relación con este marcador C-erbB-2. En este sentido hemos descubierto discrepancias entre los diversos autores.

Así, Slamon (229), Berchuck (12) y Felip (63) encontraron correlación entre la amplificación de c-erbB-2 y el acortamiento de la supervivencia en tumores de ovario. Sin embargo Haldane (90), Kacinsky (112), Singleton (226) y Rubin (214) no obtuvieron estos resultados.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los carcinomas endometrioides tienen en general un alto grado de positividad para receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP). Los grados de positividad del componente tumoral están relacionados inversamente respecto a la clasificación histológica de la FIGO, estadísticamente para RP ($P < 0.0029$). No existe asociación con invasión miometrial en profundidad, ni con invasión vascular.
2. Los mecanismos proliferativos (Ki-67), constituyen el parámetro de diferenciación más significativo en la graduación histológica. Su estrecha correlación, en los tumores de alto grado, con la expresión elevada de P53, implica a ésta proteína oncogénica como factor genético o epigenético asociado en ciertas formas de carcinoma endometrial.
3. La sobreexpresión de proteína bcl-2, está significativamente elevada en los tumores de bajo grado, al igual que sucede en las glándulas de la mucosa endometrial. Deducimos por ello que existe un predominio de los factores antiapoptóticos, sobre los proliferativos en los tumores de bajo grado y probablemente en las fases incipientes de la oncogénesis de carcinoma endometrioide.
4. La proteína P53 y las proteínas oncogénicas bcl-2 y c-erbB-2, exhiben con frecuencia inmunoreactividad variable entre los componentes de una población neoplásica, indicándonos la complejidad biológica y heterogeneidad subyacente a un mismo patrón morfológico.

5. Los parámetros inmunohistoquímicos mejor relacionados estadísticamente entre mucosa endometrial normal y carcinoma endometrial son:
 - a) Disminución porcentual de receptores estrogénicos y de proteína bcl-2.
 - b) Presencia o incremento de actividad proliferativa (Ki-67), así como de c-erbB-2 y P53. Dicha tendencia queda también reflejada en la graduación creciente del carcinoma endometriode.

6. Los criterios de graduación histopatológica del carcinoma endometrial (FIGO), están estadísticamente relacionados con los parámetros inmunohistoquímicos elegidos en nuestro estudio de forma global. Sin embargo no reflejan las variaciones individuales.

Dadas las posibles medidas terapéuticas presentes y futuras, su valoración nos parece aconsejable.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AKCALI K., KHAN SA., MOULT BC. Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* 1996; 137 (7): 3123-3130.
2. ARCOS F., JOU P., VANRELL JA. Pólipo endometrial con hiperplasia compleja con atipia en una paciente tratada con tamoxifeno. *Clin Invest Gin Obst* 1997; 24 (1): 2-4.
3. BARGMAN CI., HUNG MC., WEINBERG RA. The neu oncogene encodes a epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319: 226-230.
4. BARNARD NJ., HALL PA., LEMOINE NR., *et al.* Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki 67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 1987; 152: 287. D20.
5. BASERGA R., PORCU P., SELL C. Oncogenes, growth factors and control of the cell cycle. *Cancer Surv* 1993; 16: 201-213.
6. BEATO M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; 56: 335-344.
7. BECKNER ME., MORI T., SILVERBERG SG. Endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1985; 4: 131-145.
8. BENITO N., BRIONES I., RUBIO P., *et al.* Estudio inmunohistoquímico de receptores de estrógenos y progesterona en biopsias de cáncer de mama congeladas *Patología* 1995; 28 (3): 245-248.
9. BEN-EZRA JM., KORNSTEIN MJ., GRIMES MM., *et al.* Small cell carcinomas of the lung express the bcl-2 protein. *Am J Pathol* 1994; 53: 29-35.
10. BELL SM., SCOTT N., CROSS D., *et al.* Prognostic value of p53 overexpression and c-ki-ras gen mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993; 104: 57-64.

11. BERCHUCK A., BOYD J. Molecular basis of endometrial cancer. *Cancer Supplement* 1995; 76 (10): 2034-2040.
12. BERCHUCK A., KAMEL A., WHITAKER R., *et al.* Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 4087-4091.
13. BERCHUCK A., RODRIGUEZ G., KINNEY RB., *et al.* Overexpression of HER.2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 167: 15-21.
14. BERGERON C., FERENCZY A., SHYAMALA G. Distribution of estrogen. Receptors in various cell types of normal hyperplastic human endometrial tissues. *Laboratory Investigation* 1988; 58 (3): 338-345.
15. BIGSBY RM., LI A., BOMALISKI J., *et al.* Immunochemical study of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, and steroid receptor expression in normal and malignant endometrium. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 95-100.
16. BISSONNETE RP., ECHVERRI F., GREEN MD. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.
17. BODNER SM., MINNA JD., JENSEN SM., *et al.* Expression of mutant p53 protein in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 1992; 7: 743-748.
18. BOISE LH., GONZÁLEZ-GARCÍA M., POSTEMS CE., *et al.* Bcl-X a bcl-2 related gene that function as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
19. BOUCHARD P., MARRAQUI J., MASSAI MR., *et al.* Immunocytochemical localization of oestradiol and progesterone receptors in human endometrium: a tool to asses endometrial maturation. *Clin Obstet Gynecol* 1991; 5: 107-115.

20. BRENNER RM., WEST NB., MCCLELLAN MC. Estrogen and progesterin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol Reprod* 1990; 42: 11-19.
21. BRUNO S., DARZYNKIEWICZ Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992; 25: 31-40.
22. BUR ME., PERLMAN C., EDELMANN L., *et al.* P53 expression in neoplasms of the uterine corpus. *Am J Clin Pathol* 1992; 98 (1): 81-87.
23. BURKE TW., TORTOLERO-LUNA G., MALPICA A., *et al.* Endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996; 23 (2): 411-456.
24. CALLE O., ROMERO M., YAGÜE J. Aspectos biológicos y moleculares del oncogén / antioncogén p53. *Inmunologia* 1990; 9 (2): 39-49.
25. CARCANGIU ML., CHAMBERS JT., VOYNICK IM, *et al.* Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma (part. I). *Am J Clin Pathol* 1990; 94 (3): 247-253.
26. CASTELLANO-DIAZ E., GONZALE -QUIJANO MI., LIMIÑANA JM., *et al.* Tamoxifen decreases the estradiol induced progesterone receptors by interfering with nuclear estrogen receptor accumulation. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 133-143.
27. CATTORETTI G., BECKER MHG., KEY G., *et al.* Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (Mib 1 y Mib 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168: 357-363.
28. CHAN WK., POULSOM R., LU QL., *et al.* bcl-2 expression in invasive mammary carcinoma: correlation with apoptosis, tumour grade and hormone receptor status. *J. Pathol* 1992; (Abstract).

29. CHAN WK., MOLE MM., LEVISON DA., *et al.* Nuclear and cytoplasmic bcl-2 expression in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *J Pathol* 1995; 177 (3): 241-246.
30. CHAMBERS JT., CARCANGIU ML., VOYNICK IM., *et al.* Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone (part II). *Am Clin Pathol* 1990; 94 (3): 255-260.
31. CHENG EH., LEVINE B., BOISE LH., *et al.* Bax inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 1996; 379: 554-556.
32. CLEARM ML., SMITH SD., SKARL J. Cloning structural analysis of cDNA for Bcl-2 and Bcl Ig transcrip resulting from the t (18, 14) translocation. *Cell* 1986; 47: 19-28.
33. CLEARY ML., SMITH SD., SKLAR J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t (14; 18) translocation. *Cell* 1986; 47: 19-28.
34. CLOCCE DR., VARGAS-ROIG LM. Estrogen receptors in human nontarget tissues biological and clinical implications. *Endocr Reviews* 1995; 16: 35-62.
35. COLDITZ GA., HANKINSON SE., HUNTER DJ, *et al.* The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New Engl J Med* 1995; 332: 1589-1593.
36. COTTER E. The role of the Bcl-2 lymphoma. *Br. Haematol* 1990; 75: 449-453.
37. CRAWFORD LV., PIM DC., GURNEY EG., *et al.* Detection of a common feature in several human tumor cell lines: a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 41-45.
38. CROWSON AN., MAGRO CM., KADIN ME., *et al.* Differential expression of the bcl-2 oncogene in human basal cell carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27: 355-359.

39. CUDAMY TJ., BOERYD BR., FRANLUND BK., *et al.* A comparison of three different methods for the determination of estrogen receptors in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 583-590
40. CULOTTA E., KOSHLAND D. P53 sweeps through cancer reseach. *Science* 1993; 262: 1958-1961.
41. CURIEL I., GOMEZ F., CORCUERA MT., *et al.* Adaptación del anticuerpo MIB-1 a una técnica de inmunohistoquímica basada en transporte capilar de reactivos. *Patología* 1996; 29 (4): 341-343.
42. CZERWENKA K., LU Y., HEUSS F. Ampliation and expression of the c-erb B-2 oncogen in normal, hyperplatic and malignant endometrio. *Int J of Gynecol Pathol* 1995; 14 (2): 98-106.
43. DABBS DJ., STURTZ K., ZAINO RJ. The immunohistochemical discrimination of endometrioid adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27 (2): 172-177.
44. DANIELL HW. More advanced-stage tumors among smokers with endometrial cancer. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 439-443.
45. DARJ E., AXELSSON O., NILSSON S., *et al.* Ki67 immunostaining of endometrial biopsies with special reference to hormone replacement therapy. *Gynecol obstet Invest* 1995; 39: 120-124.
46. DE CAPRIO JA., LUDLOW JW., FRIGGE J., *et al.* SV 40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; 54: 275-283.
47. DELEO AB., JAY G., APELLA E., *et al.* Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2420-2429.
48. DELIGDISCH L., COHEN CJ. Histologic correlates and virulence implications of endometrial carcinoma associated with adenomatous hyperplasia. *Cancer* 1985; 56: 1452-1455.

49. DELL'ACQUA., DE CICCO NARDONE F., SCAMMBIC G., *et al.* New markers of hormonal responsiveness in the endometrial adenocarcinoma. In: Fiorenti P, Flamigni C, Jasonni VH, Melis GB. eds Postmenopausal hormonal therapy. New York, Raven 1987; 169-172.
50. DÍAZ-CANO SJ., WOLFE HJ. Apoptosis. De la morfología a los mecanismos. *Patología* 1995; 28 (3): 255-257.
51. DIPPOLD WG., JAY G., DE LEO AB., *et al.* P53 transformation-related protein: Detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 1695-1698.
52. DOMÍNGUEZ-IGLESIAS F., RIERA-VELASCO JR., JUNCO-PETREMENT P., *et al.* Long-term survival prognostic significance of immunohistochemical detection of c-erbB-2 oncoproteina in breast carcinoma. *Patología* 1994; 27: 1975-204.
53. DONOHOWER LA., HARVEY M *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992; 356: 215-221.
54. EELES RA., WARREN W., KNEE W., *et al.* Constitutional mutation in exon 8 of the p53 gene in a patient with multiple primary tumours: molecular and immunohistochemical findings. *Oncogene* 1993; 8: 1269-1276.
55. EHRLICH CE., YOUNG PCM., STEHMAN FB., *et al.* Steroid receptors and clinical outcome in patients with adenocarcinoma of the endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 796-805.
56. ELIADU., MICHALOVITC., OREN. Over production of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* 1985; 316: 158-160.
57. ELIYAHU D., GOLDFINGER N., PINHASIKIMHI O., *et al.* Meth a fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogen* 1988; 3: 313-321.

58. ESRIG D., ELMAJIAN D., GROSHEN S., *et al.* Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 1259-1264.
59. ESTELLER M., GARCIA A., MARTINEZ J., *et al.* Detection of c-erb B-2/neu and fibroblast growth factor-3/int-2 but not epidermal growth factor receptor gene amplification in endometrial cancer by differential polymerase chain reaction. *Cancer* 1995; 75 (8): 2139-2146.
60. ESTELLER M., REVENTÓS J. Introducción a la biología molecular del cáncer endometrial. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 175-177. H1.
61. FANIDI A, HARRINGTON EA, EVAN HG. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogen. *Nature* 1992; 359: 554-556.
62. FARIÑA J. Anatomía Patológica. Salvat Barcelona 1990.
63. FELIP E., DEL CAMPO JM., RUBIO D., *et al.* Overexpression of c-erb B-2 in epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1995; 75 (8): 2147-2152.
64. FIELD JK., PAVELIC ZP., SPANDIDOS DA., *et al.* The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 1118-1122.
65. FINLAY CA., HINDS PW., TAN TH., *et al.* Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms and hsc 70- p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 531-539.
66. FISHER CJ., GILLETT CE., VOJTESEK B., *et al.* Problems with p53 immunohistochemical staining: The effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994; 69: 26-31.
67. FORNANDER T., RUTQVIST LE., WILKING N., *et al.* Oestrogenic effect of adjuvant-tamoxifen in postmenopausal breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A (4): 497-500.

68. FREBOURG T., FRIEND SH. The importance of p53 gene alterations in human cancer: is there more than circumstantial evidence?. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1554-1557.
69. FRESNO MF., SECO MA., HERRERO A. Estudio inmunohistoquímico de c-erbB-2 en carcinoma intraductal y lesiones benignas de mama. *Patología* 1993; 26: 199-204.
70. FRIBERG LG., NOREN H. Prognostic value of steroid hormone receptors for five year survival in stage II endometrial cancer. *Cancer* 1993; 71 (1): 3570-3574.
71. FRIEND SM., BERNARDS R., ROGELJ S., *et al.* A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323: 643-646.
72. FULLER PJ. The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *Faseb J* 1992; 5: 3092-3099.
73. FUNG HYM., WONG YL., WONG FWS., *et al.* Oestrogen and progesterone receptors in normal human endometrium: comparison of immunohistochemical analysis on frozen and paraffin sections with or without enzymatic pretreatment. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 39: 262-265.
74. GAMBRELL RD. Prevention of endometrial cancer with progestagens. *Maturitas* 1986; 8: 159-168.
75. GARCIA DEL MORAL R. Laboratorio de Anatomía patológica. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. España 1993.
76. GARZETTI GG., CIAVATTINI A., LUCARINI G., *et al.* Mib 1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer cell activity. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 28-33.

77. GAULARD P., D'AGAY MF., PEUCHMAUR M., *et al.* Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 1089-1095.
78. GERDES J., SCHOWAB U., LEMKE H., *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
79. GERDES J., LEMKE H., BAISCH H., *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. *J Immunology* 1984; 133 (4): 1710-1715.
80. GERDES J., STEIN H., PILERI S., *et al.* Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* 1987; ii: 448.
81. GERDES J., LI L., SCHUETER C., *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138 (4): 867-873.
82. GERWIRTZ DA. DNA damage, gene expression, growth arrest and cell death. *Oncol Res* 1993; 397-408.
83. GOMPEL A., SABOURIN JC., MARTIN A., *et al.* Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1994; 144: 1195-1202.
84. GONZALEZ-MERLO J. Ginecología. Quinta edición. Masson-Salvat Barcelona 1988.
85. GRAMLICH TL., COHEN C., FRITSCH C., *et al.* Evaluation of c-erbB-2 amplification in breast carcinoma by differential polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1990; 101: 493-509.
86. GREASMAN WT. Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer. *Cancer Supplement* 1993; 71 (4): 1467-1470.

87. GREEN MR. When the products of oncogenes and antioncogenes meet. *Cell* 1989; 56: 1-3.
88. GREENE GL., FITCH FW., JENSEN EW. Monoclonal antibodies to estrophilin probes of the study of estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5115-5119.
89. GUILLARD P., DÚ MANOIR S., SEIGNEURIN D. Quantification and topographical description of ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mamary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol* 1989; 1: 25-39.
90. HALDANE JS., HIRD V., HUGHES CM., *et al.* C-erbB-2 oncogen expression in ovarian cancer. *J Pathol* 1990; 162: 231-237.
91. HALDAR., BEATY., TSUJIMOTO Y. The bcl-2 encodes a novel G protien. *Nature* 1989; 342: 195-198.
92. HALL PA., MCKEE PH., MENAGE HP., *et al.* High levels of p53 protein in UV irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8: 203-207.
93. HAMEL NW., SEBO TJ., WILSON TO., *et al.* Prognostic value of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 192-198.
94. HARRIS CC. P 53 : at the crossroad of molecular carcinogenesis and rick assessment. *Science* 1993; 262: 49-53.
95. HARRIS N., BRILL E., SHOHAT O., *et al.* Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 4650-4656.
96. HARVEY M., MCARTHUR MI., MONTGOMERY CA., *et al.* Spontaneous and carcinogen-induced tumorogenesis in p53 deficient mice. *Nature Genet* 1993; 5: 225-229.

97. HEINTZ NH., LESLIE KO., ROGERS LA., *et al.* Amplification of the c-erbB-2 oncogene and prognosis in breast adenocarcinoma. Arch Pathol Lab Med 1990; 114: 160-163.
98. HENRIK CJ., NYHOLM., NIELSEN AL., *et al.* Biochemical and immunohistochemical estrogen and progesterone receptors in adenomatous hyperplasia and endometrial carcinoma: Correlations with stage and other clinicopathologic features. Am J Obstet Gynecol 1992; 167 (5): 1334-1342.
99. HERNÁNDEZ-VERDÚN D., GAUTIER T. The chromosome periphery during mitosis. Bio Essays; 16: 179-185.
100. HERRERA E. Bioquímica. Primera edición. Interamericana Madrid 1986.
101. HETZEL DJ., WILSON TO., KEENEY GL., *et al.* Her-2/neu expression: A major prognostic factor in endometrial cancer. Gynecol Oncol 1992; 47: 179-185.
102. HIRATA S., YAMADA-MOURI N., NARA M., *et al.* Presence of alternatively spliced-estrogen receptor mRNA variants in normal human uterine endometrium and endometrial cancer. Endocr J 1995; 42: 289-293.
103. HOCKENBERY DM., NUÑEZ G., MILLIMAN., *et al.* Bcl-2 in an inner mitochondrial membrane protein that blockes programmed cell death. Nature 1990; 348: 334-336.
104. HOCKENBERY DM., OLTVAI ZN., YIN XM., *et al.* Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 1993; 75: 241-251.
105. HOFFMAN B., LIEBERMAN DA. Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor supressor genes as positive and negative modulators. Oncogene 1994; 9: 1807-1812.

106. HOLLSTEIN M., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., *et al.* P53 mutation in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
107. HORIGUCHI J., LINO Y., TAKEN T., *et al.* Immunohistochemical study on the expression of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. *Oncology* 1994; 51: 47-51.
108. HOROWITZ JM., YAWDELL DW., PARK SH., *et al.* Point mutational inactivation of retinoblastoma antioncogen. *Science* 1989; 243:937-940.
109. HUANG H-JS., YEE JK., SHEW JY., *et al.* Supression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 1988; 242: 1563-1566.
110. INTERNACIONAL FEDERATION OF GYNECOLOGIST AND OBSTETRICIANS. Annual report on the result of treatment in gynecologic cancer. *Int J Gynecol Obstet* 1989; 28: 189.
111. IOFFE OB., PAPADIMITRIOU JC., SIMONS J., *et al.* Bcl-2, p53 and c-erbB-2 expression in benign, hyperplastic, and malignant endometrium: Correlation with cell turnover indices. *Am J Clin Pathol* 1996; 106 (3): 414-415.
112. ISMAIL SM. Endometrial pathology associated with tamoxifen therapy. *Patologia* 1992; 25 (3) Suplemento. 137-138.
113. ISMAIL SM. Pathology of endometrium treated with tamoxifen. *J Clin Pathol* 1994; 47: 827-833.
114. ITO K., WATANABE K., NASIM S., *et al.* Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4667-4670.
115. IWAI M., KANZAKI H., FUJIMOTO M., *et al.* Regulation of sex steroid receptor gene expression by progesterone and testosterone in cultured human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 450-454.

116. JAROS E., PERRY RM., ADAM L., *et al.* Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor and ki 67 labelling in brain tumors. *Br J Cancer* 1992; 66: 373-385.
117. JASANI B., SCHMID KW. Immunocytochemistry in diagnostic histopatology. De. Longman Group UK limited 1993.
118. JAY G., DELEO AB., APPELLA E., *et al.* Acommon transformation related protein in murine sarcomas and leukemias. *Cold Sring Harbour Symp Quant Biol* 1980; 44: 659-664.
119. JENKINS JR., RUDGE K., CURRIE GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 1984; 312: 651-654.
120. JENSEN EV., JACOBSON HI. Basic guides to the mechanism of the estrogen action. *Rec Prog Horm Res* 1962; 18: 1-23.
121. JIWA NW., KANAVAROS P., VAN DER VALK P., *et al.* Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol* 1993; 46: 211-217.
122. KACINSKY BM., MAYER AG., KING BL., *et al.* Neu protein overexpression in benign borderline and malignant ovarian neoplasms. *Gynecol Oncol* 1992; 44: 245-253.
123. KAKU T., TSUKAMOTO N., HACHISUGA T., *et al.* Endometrial carcinoma associated with hyperplasia. *Gynecol Oncol* 1996; 60 (1): 22-25.
124. KEITH WN., DOUGLAS F., WISHART., *et al.* Co-amplification of erbB-2, topoisomerase II alfa and retinoic acid receptor alfa genes in breast cancer and allelic loss at topoisomerase I on chromosome 20. *Eur J Cancer* 1993; 29^a: 1469-1475.
125. KERN JA., FILDERMAN AE. Oncogenes and growth factors in human lung cancer. *Clin Chest med* 1993; 14: 31-41.

126. KERR JF., WYLLIE AH., CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
127. KEY G., BECKER MHG., BARON B., *et al.* New ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (Mib 1-3) generated against bacterially expressed parts of the ki-67. C-DNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the ki-67 epitope. *Lab-Invest* 1993; 68: 629-636.
128. KIHANA T., HAMADA K., INOUE Y., *et al.* Mutation and allelic loss of the p53 gene in endometrial carcinoma. *Cancer* 1995; 76 (1): 72-78.
129. KIYOSHI ITO., WATANABE K., NASIM S., *et al.* Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4667-4670.
130. KLEIHUES P., SCHÄUBLE B., HAUSEN A., *et al.* Tumors associated with p53 germline mutations. *Am J Pathol* 1997; 150 (1): 1-11.
131. KNUDSON AG. Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
132. KNUDSON AG., MEADOWS AG., NICHOLS WW., *et al.* Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N England J Med* 1976: 1120-1123.
133. KOHLER MF., BERCHUCK A., DAVIDOFF AM., *et al.* Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 1622-1627.
134. KOSHLAND DE. Molecule of the year. (editorial). *Science* 1993; 264: 1953.
135. KRAISS S., QUASSER A., OREN M., *et al.* Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol* 1988; 62: 4737-4744.

136. KRAJEWSKI S., BODRUG S., KRAJEWSKA M., *et al.* Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. *Am J Pathol* 1995; 146 (6): 1309-1319.
137. KRAJEWSKI S., TANAKA S., TANAKA S., *et al.* Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; 53: 4701-4714.
138. KROEMER G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine* 1997; 3 (6): 614-620.
139. KUBO Y., URANO Y., YOSHIMOTO K., *et al.* P53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 440-444.
140. KURMAN RJ., NORRIS HJ. Endometrial neoplasia. *Curso de patologia ginecologica y obstetricia con correlación clínica* 1984; 107-148.
141. KURZROCK R., GUTTERMAN JV., TALPAZ M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl J. Med* 1988; 990-998.
142. KURZROCK R., TALPAZ M. *Molecular biology in cancer medicine.* Dunitz 1995. Primera edición. Great Britain.
143. LAM M. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca⁺² fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 85: 6569-6573.
144. LAMB P., CRAWFORD L. Characterization of the human p53 gene. *Mol cell Biol* 1986; 6: 1379-1385.
145. LANDERS JP., SPELSBERG TC. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1992; 2: 19-63.

146. LANE DP., CRAWFORD LV. T antigen is bound to a host protein in SV-40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.
147. LANE DP. The regulation of p53 function. *Int J Cancer* 1994; 57: 623-627. (a).
148. LANE DP. On the expression of the p53 protein in human cancer. *Moll Biol Rep* 1994; 19:23-29. (b).
149. LANE DP. P53 and human cancer. *Br Med Bull* 1994; 50: 528-599.
150. LANZON R., RUIZ MA. Adenocarcinoma de endometrio. *Medicine* 1995; 97: 4324-4331.
151. LAW ML., KAO FT., WEI Q. The progesterone receptor gene maps to human chromosome band 11q 13, the site of mammary oncogene int-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2877-2881.
152. LEEK R., KAKLAMANIS L., PEZZELLA F., *et al.* Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-139.
153. LEONG AS-Y., LEE AKC. Biological indices in assement of breast cancer. *Leader* 1995.
154. LESSEY BA., KILLAM AP., METZEGER DA., *et al.* Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 334-340.
155. LEVI F., LA VECCHIA C., GULIE C., *et al.* Oestrogen replacement treatment and the risk of endometrial cancer: an assessment of the role of covariates. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1445-1449.
156. LEVINE AJ. The p53 tumour supressor gene (editorial). *N Eng J Med* 1992; 326: 1350-1352.
157. LEVINE AJ., PERRYME.,CHANG A. The role of the tumour-supressor gene in tumorogenesis. *Br J Cancer* 1994; 69: 409-416.

158. LEVINE AJ. DNA damage limitation. The p53 “ tumour supressor gene. *Helix* 1995; IV issue 2: 18-25.
159. LEZANA G., LE CERF P., DUARTE I., *et al.* Análisis estadístico de variables morfológicas pronosticas en 231 pacientes con carcinoma de endometrio. *Patología* 1995; 28: 13-20.
160. LI BD., HARLOW SP., BUDBICK RM., *et al.* Detection of HER-2/neu oncogene amplification in flow cytometry sorted breast ductal cells by competitive polimerasa chain reaction. *Cancer* 1994; 73: 2771-2778.
161. LIEBERMANN DA. Molecular biology of normal development, malignancy and its supression. *Oncogen* 1996; 12: 2247-2250.
162. LINZER DIH., LEVINE AJ. Characteritacion of a 54 kdaltons cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52.
163. LODA M. Polymerase chain reaction-based methods for the detection of mutations in oncogenes and tumor supressor genes. *Hum Pathol* 1994; 25: 564-571.
164. LUKA J., JORNVALL H., KLEIN G. Purification and biochemical characterization of the Epstein Barr virus determined nuclear antigen and an association protein with a 53,000dalton subunit. *J Virol* 1980; 35: 592-602.
165. MARX J. How p53 supressess cell growth. *Science* 1993; 262: 1644-1645.
166. MATLASNEWSKI G., LAMB P., PEACOCK J., *et al.* Isolation and characterization of a human. *EMBO J* 1984; 3: 3257-3262.
167. MATLASHEWSKI G., TUCK S., PIM D., *et al.* Primary structure polymorphism at aminoacid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987: 961-963.
168. MC MANUS JFA., MOWRY RW. Técnicas histológicas. 3ª edición. Atika, Madrid. 1968.

169. MERCER WE., BASERGA R. Expression of the p53 protein during the cell cycle of human peripheral blood lymphocytes. *Ex Cell Res* 1985; 160: 31-46.
170. MESTER J., BAULIEU EE. Nuclear receptor superfamily. *Endocrinology*, L De Groot (De), Saunders Philadelphia. pp 6-36. (1995).
171. MINDS P., FINLAY C., LEVINE AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 1989; 63: 739-746.
172. MONK BJ., CHAPMAN JA., JOHNSON GA., *et al.* Correlation of c-myc and Her-2/neu amplification and expression with histopathologic variables in uterine corpus cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1193-1197.
173. MORA PT., CHANDRASEKARAN K., MCFARLAND VW. An embryo protein induced by SV40 virus transformation of mouse cells. *Nature* 1980; 288: 722-724.
174. MOSNIER JF., PERRET AG., VINDIMIAN M., *et al.* An immunohistochemical study of the simultaneous expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumors of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 655-659.
175. MUTOH H., KUME K., SATO S. Positive and negative regulations of human platelet –activating factor receptor transcript 2 (tissue-type) by estrogen and TGF-beta 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1130-1136.
176. NABER SP., TSUTSUMI Y., YIM S., *et al.* Strategies for the analysis of oncogene overexpression: studie of the neu oncogene in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 125-136.
177. NANBU K., KONISHI I., KOMATSU T., *et al.* Expression of heat shock proteins HSP 70 and HSP 90 in endometrial carcinomas. *Cancer* 1996; 77 (2): 330-338.

178. NARDONE FC., BENEDETTO MT., ROSSIELLO F., *et al.* Hormone receptor status in human endometrial adenocarcinoma. *Cancer* 1989; 64 (12): 2572-2578.
179. NICHOLSON RI., MC CLELLAND RA., GREE JMW. Steroid hormone receptors and their clinical significance in cancer. *J Clin Pathol* 1995; 48: 890-895.
180. NIELSEN AL., THOMSEN HK., NYHOLM HCJ. Evaluation of the reproductibility of the revised 1988 International Federation of Gynecology and Obstetrics grading system of endometrial cancers with special emphasis on nuclear grading. *Cancer* 1991; 15: 2303-2309.
181. NIGRO JM., BAKER SJ., PREISINGER AC., *et al.* Mutation in the p53 occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342: 705-708.
182. NISOLLE M., CASANAS-ROUX F., WYNS C., *et al.* Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: a new quantitative method. *Fertil Steril* 1994; 62: 751-759.
183. NOGALES FF. Prognostic factors in endometrial neoplasia: old and new. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1996; 8 (1): 74-78.
184. O'MALLEY BW., TSAY MJ. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol Reprod* 1992; 46: 163-167.
185. OREN M., MALTZAMAN W., LEVINE AJ. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1981; 1: 101-110.
186. OREN M., LEVINE AJ. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor Proc *natt. Acad Sci USA* 1983; 80: 56-59.
187. OSMER. Vaginosography for Carly detection of endometrial carcinoma. *Lancet* 1990; 335: 1569-1571.

188. OTSUKI Y., MISAKI O., SUGIMOTO O., *et al.* Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 1994; 344: 28-29.
189. PALACIOS S. Receptores esteroideos y mecanismo de acción hormonal. Mirpal. Madrid 1996.
190. PALMER DC., MUIR MI., ALEXANDER AI., *et al.* The prognostic importance of steroid receptors in endometrial carcinoma. *Ostetric and Gynecol* 1988; 72 (3): 388-393.
191. PARADA LF., LAND H., WEINBERG RA., *et al.* Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984; 312: 649-651.
192. PARDO MINDÁN J. Anatomía Patológica Especial. Volumen II. Doyma Barcelona 1992.
193. PASCAL RR., SANTOUSANIO G., SANELL D., *et al.* Immunohistologic detection of estrogen receptors in paraffin embedded breast cancers: correlation with cytosol measurements. *Hum Pathol* 1986; 17: 370-375.
194. PAVLETICH NP., CHAMBERS KA., PABO CO. The DNA-bonding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Develop* 1993; 7: 2556-2564.
195. PEZZELLA F., TURLEY H., KUZU I., *et al.* bcl-2 protein in non small-cell lung carcinoma. *N England J Med* 1993; 329: 690-694.
196. PONGLIKITMONGKOL M., GREEN S., CHAMBON P. Genomic organisation of the human estrogen receptor gene. *EMBO J* 1988; 7: 3385-3388.
197. PORSCHE R., LOHE B., HENGELS KJ., *et al.* Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki 67. Correlation with pathohistologic criteria and influence of irradiation. *Cancer* 1989; 64 (12): 2501.

198. PRESS MF., HUNG G., GODOLPHIN W., *et al.* Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54: 2771-2777.
199. PRESS MF. Oncogen amplification and expression. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 240-241.
200. PUIG L. Antioncogenes, proteínas supresoras y ciclo celular: implicaciones en dermatología oncológica. *Piel* 1995; 10: 8-10.
201. PURDIE CA., O'GRADY J., PIRIS J., *et al.* P53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991; 138 (4): 807-813.
202. RAZKIN-MURILLO J. Oncogen c-erbB-2 en el carcinoma de mama. *Patología* 1994; 27: 37-44.
203. RAYTER Z. Steroid receptors in breast cancer. *Br J Surg* 1991; 38: 528-535.
204. REED JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
205. REED JC., MIYASHITA T., TAKAYAMA S., *et al.* Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involvel in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996; 60: 23-32.
206. REICH N., LEVINE AJ. Growth regulation of a cellular tumour antigen p53 in non transformed cells. *Nature* 1994; 308: 199-201.
207. REINARTZ JJ., GEORGE E., LINDGREN BR., *et al.* Expression of P53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor and c-erb B-2 in endometrial carcinoma and correlation with survival and known predictors of survival. *Hum Pathol* 1994; 25 (10): 1075-1083.

208. RIETHDORF L., BEGEMANN C., RIETHDORF S., *et al.* Comparison of benign and malignant endometrial lesions for their p53 state, using immunochemistry and temperature gradient gel electrophoresis. *Virchows Arch* 1996; 428: 47-51.
209. ROBBINS CJ. *Patología estructural y funcional*. Cuarta edición. Volumen II. Interamericana-McGraw-Hill Madrid 1990.
210. ROSAI J. *Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby 1995. Octava edición. Vol II: 1408-1447.
211. ROSE PG. Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335 (9): 640-649.
212. ROSS JC., EIFEL PJ., COX RS., *et al.* Primary mucinous adenocarcinoma of the endometrium. A clinicopathologic and histochemical study. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 715-729.
213. ROWLEY JD. Identification of the chromosomal region involved in human haemathologys malignances. *Science* 1982; 216: 749.
214. RUBIN SC., FINSTAD CL., WONG GY., *et al.* Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 162-169.
215. SARNOW P., HO YS., WILLIAMS J., *et al.* Adenovirus E1b-58 kd tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28: 387-394.
216. SCHARL A., VIERBUCHEN M., GAUPNER J., *et al.* Immunohistochemical study of distribution of estrogen receptors in corpus and cervix uteri. *Arch Gynecol Obstet* 1988; 24: 221-226.
217. SCHÜLTER C., DUCHROW M., WOHLLENBERG C., *et al.* The cell proliferation-associated antigen of antibody ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, represnting a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123: 513-522.

218. SCHWARTZ LB., KREY L., DEMOPOULUS R., *et al.* Alterations in steroid hormone receptors in the tamoxifen-treated endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176 (1): 129-137.
219. SELIVANOVA G., IOTSOVA V., OKAN I., *et al.* Retoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nature Medicine* 1997; 3 (6): 632-638.
220. SERVICE R. Slow DNA repair implicated in mutation found in tumors. *Science* 1994; 263: 1374.
221. SETO M., OSADA H. Bcl-2 gene in B cell lymphoma. *Rinsko ketsueki* 1991; 32 (5): 633-649.
222. SHAY JW., PEREIRA-SMITH OM., WRIGHT WE. A role for both Rb and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196: 33-39.
223. SHI SR., KEY KL., KALRA KL. Antigen retrieval in formalin fixed paraffin embedded tissues an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.
224. SHUAM-FANG LI., SHIOZAWA T., NAKAYAMA K., *et al.* Stepwise abnormality of sex steroid hormone receptors, tumor supressor gene product (p53 and Rb), and cyclin E in uterine endometrioid carcinoma. *Cancer* 1996; 77 (2): 321-329.
225. SILVERBERG SG., KURMAN RJ. Tumors of the uterine corpus and gestational trophoblastic disease. *Armed Forces Institute of Pathology* 1992; 3 ed.: 47-89.
226. SINGLETON TP., PERRONE T., OAKLEY G., *et al.* Activation of c-erbB-2 and prognosis in ovarian carcinoma: comparison with histologic type, grade, and stage. *Cancer* 1994; 73: 1460-1466.

227. SIRVENT-CALVERA JJ., SALVADÓ-USACH MT. Estudio inmunohistoquímico de los receptores de estrogénos en cáncer de mama y su relación con parámetros morfométricos. *Patología* 1991; 24 (3): 205-209.
228. SLAMON DJ., CLARK GM., WONG SG., *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
229. SLAMON DJ., GODOLPHIN W., JONES LA., *et al.* Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244; 707-712.
230. SMITH KL., ROBBINS PD., DAWKINS HJS., *et al.* C-erbB-2 amplification in breast cancer: detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue by in situ hybridization. *Hum Pathol* 1994; 25:413-418.
231. SOINI Y., PÄÄKKÖ P. Bcl-2 is preferentially expressed in tumours of muscle origin but is not related to p53 expression. *Histopathology* 1996; 28: 141-145.
232. SOYER HP. Ki-67 immunostaining in melanocytic skin tumors. Correlation with histologic parameters. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 264-272.
233. SPANDAU DF. Distinct conformations of p53 are observed at different stages of keratinocyte differentiation. *Oncogene* 1994; 9: 1861-1868.
234. SPENCER SJ., CATALDO NA., JAFFE RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey* 1996; 51 (5): 314-323.
235. STRANG P., NORDSTRÖM., NILSSON S., *et al.* Mutant p53 protein as a predictor of survival in endometrial carcinoma. *Eur J Cancer* 1996; 32 A (4); 598-602.

236. STÜRZBECHER HW., CHUMAKOV P., WELCH WJ., *et al.* Mutant p53 proteins bind hsp 72/73 cellular heat shock related proteins in SV 40-transformed monkey cells. *Oncogene* 1987; 1: 201-211.
237. STÜRZBECHER HW., DEPERT W. The tumor supressor protein p53: relationship of structure to function. *Oncol Rep* 1994; 1: 301-307.
238. SUNDBLAD A., AHN CH., CAPRARULO L., *et al.* Expresión de c-erbB-2 en cáncer temprano de mama. Valor pronóstico y relación con el grado nuclear. *Patología* 1994; 27: 313-318.
239. TASHIRO H., ISACSON C., LEVINE R., *et al.* p53 gene mutations are common in uterin serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150 (1): 177-183.
240. THOMAS R., KAPLAN L., REICH N., *et al.* Characterization of human p53 antigens employing primate specific monoclonal antibodies. *Virology* 1983; 131: 502-517.
241. THOMPSON AM., ANDERSON TJ., CONDIE A., *et al.* P53 allele losses, mutation and expression in breast cancer and their relationship to clinicopathological parameters. *Int J Cancer* 1992; 7: 743-748.
242. THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
243. THOMPSON JD., ROCK JA. *Ginecología quirúrgica*. Edi. Panamericana S.A. Buenos Aires 1995.
244. TORA L., WHITE J., BROU C., *et al.* The human estrogen receptor has two independent nonacidis transcriptional activation functions. *Cell* 1989; 59: 447-453.
245. TRIVIÑO-LÓPEZ A., CARBAJO-PEREZ E., LÓPEZ-MUÑIZ A., *et al.* El antígeno de proliferación celular. *Patología* 1994; 27: 343-347.
246. VAUX DI., CORY S., ADAMS JM. Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1998; 335: 440-442.

247. VEGA D. Inmunología. Curso Intensivo MIR Asturias. Varona Salamanca 1996.
248. VERHEIJEN R., KUIJPERS H., SCHLINGEMAN RO., *et al.* Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci* 1989; 92: 123-130.
249. VERGARA A., LAZARO MA., GUIMBAO J., *et al.* Gobierno de Aragón. Departamento de sanidad, bienestar social y trabajo. Incidencia de cáncer en Zaragoza 1987-1990.
250. VERGARA A., MOREO P., GUIMBAO J., *et al.* Gobierno de Aragón. Departamento de sanidad y consumo. Incidencia de cáncer en Zaragoza 1983-1986.
251. WAGATA T., SHIBAGAKI I., IMAMURA M., *et al.* Loss of 17p mutation of the p53 gene and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 846-850.
252. WANG D., KONISHI I., KOSHIYAMA M., *et al.* Expression on c-erb B-2 protein and epidermal growth factor receptor in endometrial carcinomas. *Cancer* 1993; 72 (9): 2628-2637.
253. WARE JL., MAYGARDEN SJ., KOONTZ WW., *et al.* Immunohistochemical detection of c-erbB-2 protein in human benign and neoplastic prostata. *Hum Pathol* 1991; 22: 254-258.
254. WEIL M., JACOBSON M., COLES T., *et al.* Constitutive expresion on the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996; 128: 1173-1184.
255. WEINBERG RA. Tumor supressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-1145.
256. WEINSTEIN B. Abnormalities en cell cycle regulation. Divided against itself. *Helix* 1996; 2: 20-27.

-
257. WHITE E. P53, guardian of Rb. *Nature* 1994; 371: 21-22.
258. WHITE P., BUCHKOVICH KJ., HOROWITZ JM., *et al.* Association between an oncogene and an antioncogene: The adenovirus E y A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-129.
259. WINTZER HO., ZIPFEL I., SCHULTE-MÖNTING J., *et al.* Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991; 67: 421-428.
260. WISTUBA II., GAZDAR AF., ROA I., *et al.* P53 proteine overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. *Human Pathol* 1996; 24 (4): 360-365.
261. WRIGHT C., ANGUS B., NICHOLSON S., *et al.* Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 2087-2090.
262. YANG E., KORSMEYER SJ. Molecular thanatopsis a discourse on the Bcl-2 family and cell death *blood* 1996; 88: 386-401.
263. YOKOTA J., YAMAMOTO T., TOYOSHIMA K., *et al.* Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. *Lancet* 1986; 1: 765-767.
264. YONOMURA Y., NINOMIYA I., OHOYAMA S., *et al.* Expression of c-erbB-2 oncoproteina in gastric carcinoma. *Cancer* 1991; 67: 2914-2918.
265. YU W., WILKINSON N., BRITO MJ., *et al.* Patterns of immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen and p53 in benign and neoplastic human endometrium. *Histopathology* 1993; 23: 367-371.
266. ZAINO RJ., KURMAN RJ., DIANA KL., *et al.* The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. *Cancer* 1995; 75: 81-86.

267. ZAKUT-HOURI R., OREN M., BIENZ B., *et al.* A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature* 1983; 306: 594-597.
268. ZHENG W., CAO P., ZHENG M., *et al.* P53 Overexpression and bcl-2 persistence in endometrial carcinoma: Comparison of papillary serous and endometrial subtypes. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 167-174.