

Cáncer de mama. Estudio inmunohistoquímico de receptores de progesterona en tejido congelado e incluido en parafina

J. J. Sirvent Calvera*,
M.^a T. Salvado Usach**,
A. Vidal Bel*,
L. Santacatalina Ubiedo*

SUMMARY

Progesterone receptors (PR) from 22 patients with breast cancer have been studied, applying a immunohistochemical study in frozen and formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Despite the good correlation between both methods, the study, when possible, must be done in sections of frozen tissue since the number of positive cases PgR-ICA/Paraffin is lower because of a probable alteration of PR protein due to the fixation and/or enzymatic treatment.

* Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Verge de la Cinta. Tortosa.
** Unidad de Anatomía Patológica.
Departamento de Ciencias
Médicas Básicas. Facultad de
Medicina. Reus.

Palabras clave

Receptores de progesterona, Receptores hormonales, Cáncer de mama, Inmunocitoquímica.

Correspondencia:
J. J. Sirvent Calvera.
Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Verge de la Cinta.
43500 Tortosa.

Key words

Progesterone receptors, Hormonal receptors, Breast cancer, Immunocytochemistry.

INTRODUCCION

Horwitz et al.¹ sugirieron en 1975 que ciertos tumores con receptores de estrógeno (RE) no responden al tratamiento endocrino debido a algún defecto en el mecanismo de respuesta de la célula al estrógeno, diferente y distante al paso de unión de la hormona a su receptor, conduciendo al tumor a un crecimiento autónomo. Se ha hipotetizado que los receptores de progesterona (RP) pueden ser mejores marcadores que los RE para evaluar la actividad funcional del sistema de los receptores hormonales esteroideos en el cáncer de mama, debido a la observación de que la expresión del RP es un fenómeno estrógeno-dependiente.²

Varios estudios han demostrado que el porcentaje

de respuesta de los pacientes RE positivos a la terapia endocrina varía entre el 55 y el 60%.^{3,4} La aportación del análisis de los RP mejora la predicción de la respuesta en un 20%, a menudo tan alta como 75-80% en pacientes RE +/RP +.^{5,6} En mujeres con cáncer de mama operable la expresión de los receptores hormonales esteroideos tienen también un valor pronóstico importante. El tumor en estadio I, la falta de RE parece ser uno de los factores principales para predecir la recurrencia temprana y supervivencia más pobre.⁷⁻⁹ En estadio II el contenido de RP parece ser mejor que el contenido de RE para predecir la recurrencia y la supervivencia.^{10,11}

Por todo ello es necesario para el clínico conocer el contenido de los receptores hormonales esteroideos en los tumores de mama. Los métodos utilizados pa-

ra el análisis de los receptores son bioquímicos, como el método del carbón recubierto con dextrano (DCC) e inmunohistoquímicos, con anticuerpos monoclonales (AcM) contra la proteína RE y RP; tanto en uno como en el otro método se necesita de tejido fresco congelado; sin embargo, en algunos casos no se dispone de él. En estos casos sería interesante el poder practicar este tipo de estudios en cortes de tejido incluido en parafina, lo que nos permitiría realizar estudios retrospectivos de material archivado o en mamas biopsiadas por alteraciones mamográficas en que se diagnostican pequeños carcinomas al hacer el examen microscópico.

En este estudio evaluamos la aplicabilidad de la detección inmunohistoquímica de los RP en tejidos de cáncer de mama fijados en formol e incluidos en parafina. La inmunotinción en las secciones de parafina se compara con la de las secciones congeladas, previo tratamiento enzimático con tripsina¹²⁻¹⁴ para desenmascarar los determinantes antigénicos de unión del anticuerpo con el receptor, producido por la fijación en formol y posterior proceso de inclusión en parafina.

MATERIAL Y METODOS

Material. Se estudiaron 22 mujeres con cáncer de mama, de 30 a 79 años de edad ($X = 61$ años, $DS = 13,8$), 16 postmenopáusicas y 6 premenopáusicas, del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta.

Método. En el laboratorio la tumoración se secciona inmediatamente y un fragmento de aproximadamente $0,5 \times 0,5 \times 0,3$ cm se congela con nitrógeno líquido y se guarda en un congelador a -70° C hasta su procesamiento para la determinación inmunohistoquímica de los RP en material congelado. El resto de la tumoración se fija en formol durante 24 horas, tras lo cual se procesa y se incluye en parafina; se realizan los bloques de parafina, se cortan secciones de 5 micras que se tiñen en hematoxilina-eosina y de todos los bloques del tumor se selecciona el más representativo, que es el que utilizaremos para la determinación de los RP en tejido incluido en parafina.

Inmunotinción

Material congelado. Se obtuvieron secciones de 4-6 micras con un criostato, montadas en portaobjetos

tratados con adhesivo tisular. Rápidamente fueron fijadas en formol-PBS al 3,7% durante 10-15 minutos, lavadas en tampón fosfato (PBS), fijadas de nuevo en metanol frío de 3 a 5 minutos y acetona fría durante 1 a 3 minutos, tras lo cual se lavan en PBS a temperatura ambiente y se inicia la técnica inmunohistoquímica con el kit monoclonal PgR-ICA de Abbott Laboratories (FRG), siguiendo las instrucciones del fabricante, en las que brevemente las secciones se incuban sucesivamente con suero normal de cabra, anti-RP monoclonal de rata, anticuerpo antirrata de cabra y complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Revelado con diaminobencidina y contratinción con hematoxilina.

Material incluido en parafina. Del bloque de parafina seleccionado se obtuvieron cortes de 4-5 micras, montadas en portaobjetos tratados con adhesivo tisular. Se secan a la estufa a 60° C, para favorecer la extracción de parafina, durante una hora, tras lo cual se procede a la desparafinización con varios baños de xilol e hidratación con alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. Una vez tenemos los cortes hidratados se sumergen en TRIS 0,05M ($pH = 7,8$) y se incuban con tripsina (Merck, 40 U/mg, ref. 8350) al 0,1% en ClCa al 0,1% en TRIS 0,05M ($pH = 7,8$) durante 5 minutos y a 37° C, se lavan con TRIS para parar la reacción proteolítica y tras un baño con PBS se incuba con suero normal de cabra, continuando de la misma manera que en el material congelado.

Valoración. Tanto para el material congelado como el incluido en parafina se valora la intensidad de la tinción (I) de 0 a 3 y el porcentaje de células positivas (P), obteniéndose el Histoscore = $(I + 1) \times P$, con el que se pueden dar valores de 0 a 400. Un tumor se considera positivo para los RP cuando su histoscore es igual o superior a 100.

Estudio estadístico. Se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman y chi-cuadrado para el análisis de las relaciones entre los 2 métodos, con un nivel de confianza del 95% y un grado de significación menor o igual de 0,05.

RESULTADOS

Tanto en el material incluido en parafina como en el de congelación la positividad se observa en el núcleo de la célula. Dos hechos destacables son que, por una parte, en bastantes casos se observan células de los conductos normales positivas a los RP, mien-

TABLA I
RELACION ENTRE LOS METODOS INMUNOHISTOQUIMICOS PARA LA DETECCION DE RP EN MATERIAL CONGELADO E INCLUIDO EN PARAFINA

		Parafina			%
		+	-	Total	
Congelación	+	5	5	10	Concordancia 72,7
	-	1	11	12	Sensibilidad 50,0
Total		6	16	22	Especificidad 91,6
					Valor predictivo + 83,3
					Valor predictivo - 68,7
					Chi-cuadrado: p = 0,05.
					r(s) = 0,5226, p = 0,0166.

tras que las células tumorales son negativas y, por otra, la presencia de heterogeneidad de la inmunotinción, es decir, zonas de células malignas positivas junto a zonas negativas, lo que da un aspecto de «mosaico» al tejido.

En el material congelado, un total de 10 (45,4%) tumores fueron positivos a los RP, ya que su histoscore era igual o superior a 100 ($X = 292,7$, $DS = 111,3$), mientras que en el material incluido en parafina, 6 (27,2%) fueron los tumores RP positivos ($X = 298,6$, $DS = 49,6$). Al comparar los 2 métodos (tabla I), tomando como válido el del material congelado, si bien se observa una concordancia en 16 (72,7%) de los 22 tumores, la sensibilidad del método en el material incluido en parafina es baja, ya que sólo detecta la mitad de lo que lo hace el método con el material congelado. A destacar la alta especificidad (91,6%), por lo que detecta bien los negativos, aunque varios de ellos son «falsos negativos» (valor predictivo negativo: 68,7%) y el valor predictivo positivo (83,3%), por lo que cuando un tumor es positivo en parafina casi seguro que también lo es en congelación.

Al estudiar la relación entre los 2 métodos se obtiene significación estadística [$r(s) = 0,5226$, $p = 0,0166$].

DISCUSION

El contenido de RP no sólo tiene implicaciones endocrinas en la regulación hormonal de los tejidos, sino que sirve también como marcador proteico de la dependencia hormonal en cáncer de mama humano.¹ Mujeres con carcinoma de mama ricos en RP

tienen mayores probabilidades de responder a la terapia endocrina, tener mayor intervalo libre de enfermedad y mejor pronóstico que las mujeres con pocos RP.¹⁵

La importancia del conocimiento de la existencia o ausencia de los RP, en los tumores malignos de mama, junto con la falta, en ocasiones, de material en fresco para su determinación, es lo que nos animó a emprender este estudio de análisis de los RP inmunohistoquímicamente en material incluido en parafina previo tratamiento enzimático con tripsina para destruir las uniones y precipitaciones de las proteínas celulares por coagulación que producen la fijación en formol y el proceso de inclusión en parafina sobre las moléculas de los RP que puedan existir en el tejido y que evitan la unión del AcM con el RP, favoreciendo de esta manera la reacción inmunohistoquímica.³

En los escasos trabajos que existen en la literatura que emplean el mismo método,^{13, 14} las relaciones son buenas y significativas entre los métodos inmunohistoquímicos aplicados en material congelado y en material incluido en parafina tras tratamiento enzimático, pero no informan sobre la concordancia entre ambos métodos e incluso en uno de ellos¹⁴ no utilizan el mismo AcM, por lo que no podemos comparar nuestros resultados. A nuestro entender, los resultados han sido pobres, por ello, a pesar de que existe buena relación entre ambos métodos inmunohistoquímicos, siempre que sea posible el estudio de los RP debe hacerse en secciones de tejido congelado, ya que el número de casos positivos en tejido incluido en parafina es inferior, por probable alteración de la proteína RP, debido a la fijación y/o tratamiento enzi-

mático, existen muchos «falsos negativos», aunque, por contra, cuando es positivo en material incluido en parafina casi podemos asegurar que realmente es positivo.

RESUMEN

Se han estudiado los receptores de progesterona (RP) en un total de 22 pacientes con cáncer de mama, aplicando un método inmunohistoquímico, en tejido congelado e incluido en parafina. A pesar de la buena correlación entre ambos métodos, siempre que sea posible, el estudio debe hacerse en secciones de tejido congelado, ya que el número de casos positivos por PgR-ICA/Parafina es inferior por probable alteración de la proteína RP, debido a la fijación y/o tratamiento enzimático.

REFERENCIAS

1. Horwitz KB, McGuire WL, Pearson OH, Segaloff A. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* 1975; 189: 726-727.
2. Rao BR, Wiest WG, Allen WH. Progesterone receptor in rabbit uterus. Characterization and 17-beta-estradiol augmentation. *Endocrinology* 1973; 92: 1229-1240.
3. Kiang DT, Frenning DH, Goldman AI, Ascensao VF, Kennedy BJ. Estrogen receptors and responses to chemotherapy and hormonal therapy in advanced breast cancer. *N Engl J Med* 1978; 299: 1330-1334.
4. Gapinski PV, Donegan WL. Estrogen receptors and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Surgery* 1980; 88: 386-393.
5. McGuire WL, Clark GM. Role of progesterone receptors in breast cancer. *Semin Oncol* 1985; 12: 12-16 (suppl 1).
6. Horwitz KB. The central role of progesterone receptors and progestational agents in the management and treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 1988; 15: 14-19 (suppl 2).
7. Knight WA III, Livingston RB, Gregory EJ, et al. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977; 37: 4669-4671.
8. Godolphin W, Elwood JM, Spinelli JJ. Estrogen receptor quantification and staging as complementary prognostic indicators in breast cancer: a study of 583 patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1981; 28: 677-683.
9. Crowe JP, Hubay CA, Pearson OH, et al. Estrogen receptor status as a prognostic indicator for stage I breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2: 171-176.
10. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS. Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1983; 309: 1343-1347.
11. Pichon MF, Pallud C, Brunet M, Milgrom E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res* 1980; 40: 3357-3360.
12. Bur M, Greene GL, Press MF. Estrogen receptor localization in paraffin embedded endometrium and endometriotic tissue. *Int J Gynecol Pathol* 1987; 6: 140.
13. Press MF, Greene GL. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterin receptor. *Endocrinology* 1988; 122: 1165-1175.
14. Scharl A, Vierbuchen M, Conradt B, Moll W, Würz H, Bolte A. Immunohistochemical detection of progesterone receptor in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissue using a monoclonal antibody. *Arch Gynecol Obstet* 1990; 247: 63-71.
15. Gelbfish GA, Davidson AL, Kopel S, et al. Relationship of estrogen and progesterone receptors to prognosis in breast cancer. *Ann Surg* 1988; 207: 75-79.