

466 **M. Moreno-Cid<sup>a</sup>**  
**E. Bernet<sup>b</sup>**  
**R. Cano<sup>b</sup>**

## Expresión de la catepsina D en epitelio escamoso cervical y neoplasia cervical intraepitelial

<sup>a</sup>Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital General de Especialidades Ciudad de Jaén. Jaén. <sup>b</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital General de Especialidades Ciudad de Jaén. Jaén. España.

### Correspondencia:

Dra. M. Moreno-Cid García-Suelto.  
 Avda. de los Institutos, 6, 3.º-3.ª B.  
 13600. Alcázar de San Juan. Ciudad Real.  
 Correo electrónico: mamocigas@terra.es

Fecha de recepción: 2/4/04

Aceptado para su publicación: 18/6/04

### *Cathepsin D expression in cervical squamous epithelia and cervical intraepithelial neoplasia*

### RESUMEN

**Objetivo:** Determinar las positividades mediante técnicas inmunohistoquímicas de la catepsina D (CD) en nuestras muestras así como la intensidad y localización en el espesor del epitelio de los casos positivos para este marcador.

**Material y métodos:** Nuestro estudio está formado por 113 muestras de tejido cervical divididas en 4 grupos: 30 casos de epitelio escamoso cervical normal (CC), 31 de neoplasia cervical intraepitelial grado 1 (CIN1), 27 de neoplasia cervical intraepitelial grado 2 (CIN2) y 25 de neoplasia cervical intraepitelial grado 3 (CIN3). Se obtienen cortes de tejido, tras su fijación e inclusión en parafina, en los que se aplica una técnica inmunohistoquímica específica para la detección de la CD.

**Resultados:** La distribución de las positividades de este marcador fueron 0% para el CC, 48% para el CIN1, 33% para el CIN2 y 44% para el CIN3, con  $p = 0,00001$  en la relación CC-CIN1,  $p = 0,0005$  en la relación CC-CIN2 y  $p = 0,00005$  en la relación CC-CIN3 (el nivel de significación estadística aplicado

ha sido del 5%). La diferencia en la distribución de las intensidades fue significativa en el grupo de tinción intensa: 6,6% para CIN1, 0% para CIN2 y 45% para CIN3 ( $p = 0,0476$ ).

**Conclusión:** La expresión de la CD en un alto porcentaje de CIN1 puede atribuirse a su función estimuladora de la mitosis, así como el aumento de intensidad en los CIN3 podría indicar la adquisición temprana de alteraciones propias del fenotipo metastásico. Son necesarios estudios posteriores para sentar como base de la oncogénesis cervical nuestras conclusiones.

### PALABRAS CLAVE

Neoplasia cervical intraepitelial. Catepsina D. Inmunohistoquímica.

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to determine cathepsin D (CD) detection using immunohistochemical techniques in several

samples. The intensity and position of stains in epithelial tissue positive for this marker were also analyzed.

**Material and methods:** This study was carried out in 113 cervical tissue samples, classified in four groups: 30 samples of normal cervical squamous epithelia (CSE), 31 samples of cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1), 27 samples of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 (CIN2) and 25 samples of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3). The samples were fixed and embedded in paraffin and tissue sections were obtained from each. Subsequently an immunohistochemical technique specifically designed for CD detection was applied.

**Results:** The distribution of positive CD expression was 0% in the CSE group, 48% in CIN1, 33% in CIN2 and 44% in CIN3, with  $p = 0.00001$  for the relation between CC and CIN1,  $p = 0.0005$  for that between CC and CIN2 and  $p = 0.00005$  for that between CC and CIN3 (a significance level of 0.05 was used). Differences in the distribution of intensities was significant for the group showing strong staining: 6.6% for CIN1, 0% for CIN2 and 45% for CIN3 ( $p = 0.0476$ ).

**Conclusion:** Positive CD detection in a high fraction of CIN1 could be related to its function of mitogenic activity stimulation. Similarly, the higher intensity values in CIN3 could well indicate early detection of changes due to metastatic capacity. Further studies are required to confirm that this mechanism underlies malignant transformation of the ectocervical squamous epithelium.

#### KEY WORDS

Cervical intraepithelial neoplasia. Cathepsin D. Immunohistochemical.

#### INTRODUCCIÓN

La biología molecular ha abierto nuevas vías para la explicación del proceso de cancerogénesis. En estas técnicas está basada la mayoría de las investi-

gaciones que han dado lugar al modelo de Vogelstein<sup>1</sup>. Es la teoría más reciente y aceptada basada en estudios de tumores humanos, sobre todo en el colon. Las hipótesis que postula este modelo son que algunos carcinomas necesitan en su desarrollo múltiples cambios en el genoma de las células implicadas ya que el cáncer no se explica por un mecanismo de una sola causa-un efecto, sino como el resultado final de un proceso en múltiples pasos y que la acumulación de estos cambios sigue una secuencia determinada a lo largo del proceso de oncogénesis.

Dentro de los factores pronósticos clásicos relacionados con la neoplasia tenemos la extensión tumoral, el grado de diferenciación histológica, la actividad proliferativa, la capacidad de invasión tumoral y los marcadores genéticos y moleculares<sup>2</sup>.

El marcador utilizado en nuestro estudio es la catepsina D (CD), relacionado clásicamente con la capacidad de invasión tumoral. Pertenece al grupo de las cisteinproteasas con actividad endopeptidasa. Es una enzima proteolítica lisosomal incluida en el remodelado de proteínas intracelulares en todas las células y que actúa contra los componentes de la matriz extracelular. Se sintetiza a partir de un precursor de 54 kD y normalmente se secreta en su forma madura y activa de aproximadamente 46 kD<sup>3</sup>. El precursor presenta una actividad mitogénica, mientras que la forma activa se relaciona con proteólisis de proteoglicanos y colágenos del cartílago.

También se ha asociado esta proteína con la posible activación de varios factores de crecimiento<sup>4</sup>.

El anticuerpo contra la CD tiñe normalmente fibroblastos, macrófagos y células mioepiteliales de glándulas mamarias no lactantes. En la piel lo encontramos en los conductos glandulares, músculo liso y estrato granuloso de la epidermis. También se puede ver en algunas zonas de los acinos pancreáticos así como en hepatocitos, conductos biliares y focalmente en epitelio prostático<sup>3</sup>.

La CD se asocia con proliferación tumoral e invasión, pero no con las respuestas hormonales<sup>5</sup>, aunque en un estudio reciente se ha visto que su producción en determinadas líneas celulares del cáncer de mama (MCF-7) se incrementa específicamente por los estrógenos y se inhibe por los antiestrógenos. Su actividad, por tanto, favorece las metástasis en caso de carcinomas, incluso se considera como factor pronóstico en determinados casos<sup>6</sup>.

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

### MATERIAL Y MÉTODOS

La casuística está constituida por 113 muestras de tejido cervical.

Se recogieron todos los casos de neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN) diagnosticadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ciudad de Jaén entre los años 1992 y 1996, inclusive, y 30 de tejido cervical sin patología. Para completar el número de muestras, se recogieron 27 casos diagnosticados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Agustín de Linares entre los años 1982 y 1994. Se realizan 4 grupos según su diagnóstico anatomopatológico: epitelio escamoso cervical normal (CC), 30 casos; neoplasia cervical intraepitelial grado 1 (CIN1), 31; neoplasia cervical intraepitelial grado 2 (CIN2), 27, y neoplasia cervical intraepitelial grado 3 (CIN3), 25.

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

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

Se ha utilizado la prueba de la  $\chi^2$  para valorar la asociación de variables cualitativas de 2 o más categorías y el test exacto de Fisher cuando el número de casos fue menor de 5 en alguna tabla de contingencia. El error  $\alpha$  se ha fijado en el 5%. No se ha utilizado ningún método de ajuste de  $\alpha$  para comparaciones múltiples.

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

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

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

El anticuerpo utilizado para la CD fue el policlonal de ratón. Se incubó a 54 °C durante 30 min. La dilución fue 1:300. Se utilizaron como control cortes de carcinoma ductal infiltrante de mama. La tinción es citoplasmática.

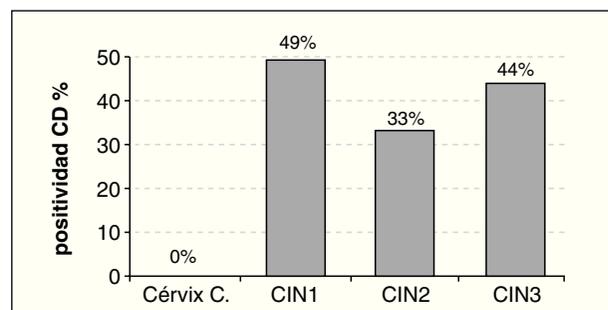
Todas las muestras fueron interpretadas por un mismo patólogo con experiencia en las técnicas inmunohistoquímicas realizadas, con desconocimiento de cualquier dato previo. La interpretación se realizó de la siguiente forma:

1. No hay expresión.
2. Hay expresión del anticuerpo utilizado. Se valora: *a*) intensidad: leve (+/+++); moderada (++/+++); intensa (+++ /+++), y *b*) localización: en el tercio inferior del epitelio (1/3); en los dos tercios inferiores del epitelio (2/3); en la totalidad del epitelio (3/3).

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

### RESULTADOS

La distribución de las positividades de la CD fue 0 (0%) para el CC, 15 (48%) para el CIN1, 9 (33%) para el CIN2 y 11 (44%) para el CIN3 (fig. 1), y presentó significación en la relación del CC-CIN1 (0 frente a 48%;  $p = 0,00001$ ), CC-CIN2 (0 frente a 33%;  $p = 0,0005$ ) y CC-CIN3 (0 frente a 44%;  $p = 0,00005$ ) (tabla 1).



**Figura 1.** Porcentaje de muestras positivas para la catepsina D (CD) según el diagnóstico histológico.

**Tabla 1** Expresión de la catepsina D (CD) según el diagnóstico histológico

Grupo histológico	CD positiva	%
Cérvix control	0/30	0
CIN1	15/31	48,38
CIN2	9/27	33,33
CIN3	11/25	44

$\chi^2 = 19,9$ ;  $p = 0,00017$ ; CC-CIN1:  $p = 0,00001$ ; CC-CIN2:  $p = 0,0005$ ; CC-CIN3:  $p = 0,00005$ .

La diferencia en la distribución de las intensidades en los casos CD positivos fue significativa en el grupo de tinción intensa, que fue 1 (6,6%) para CIN1, 0 (0%) para CIN2 y 5 (45%) para CIN3 ( $p = 0,0476$ ) (fig. 2).

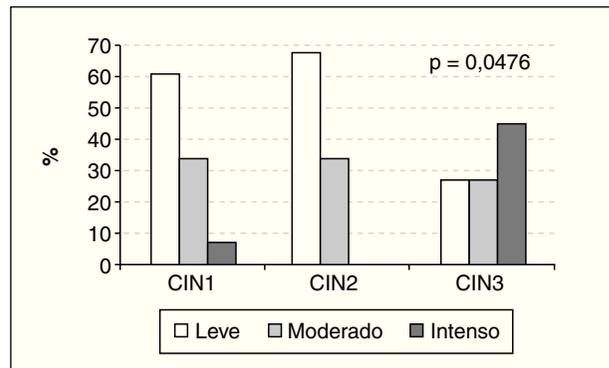
No encontramos significación en las diferencias entre los grupos histológicos estudiados en cuanto a la localización en el espesor del epitelio en los casos positivos para la CD.

**DISCUSIÓN**

Numerosos estudios han investigado la importancia de factores como las proteasas lisosomales en el proceso de carcinogénesis y su contribución al crecimiento e invasión tumoral. Dentro de este grupo presenta especial importancia la CD que actúa contra los componentes de la matriz extracelular.

La mayoría de los estudios realizados en CD se refieren al carcinoma de mama. El aumento de producción de esta enzima en determinadas líneas celulares de estos cánceres se incrementa específicamente por los estrógenos y se inhibe con los antiestrógenos<sup>7</sup>. Los hallazgos más importantes derivados de estos estudios explican que en los carcinomas de mama con afección ganglionar, los valores elevados de CD se asocian con mejor pronóstico, y cuando no existe dicha afección implican una reducción de la supervivencia libre de enfermedad<sup>7,8</sup>. Cuando se asocia la positividad para los receptores de estrógenos con la de la CD, existe un mejor pronóstico<sup>9</sup>.

También se ha demostrado un aumento de la expresión de este marcador en adenocarcinomas gástricos indiferenciados, carcinoma endometrial pobremente diferenciado y carcinoma de ovario. En este



**Figura 2.** Distribución de los porcentajes de muestras positivas para la catepsina D (CD) según su intensidad.

último existe una correlación significativa entre los valores de CD y el pronóstico<sup>3,10</sup>.

En los tumores endometriales, de forma similar a los de mama, se observa una asociación entre la positividad para la CD y la de los receptores de hormonas esteroideas, lo que sugiere una regulación hormonal de los valores de esta enzima en este tipo tumoral<sup>11</sup>.

Mucho más escasos son los estudios realizados de este marcador en los carcinomas de cérvix, y cuando el estudio incluye los diferentes tipos histológicos tampoco los resultados son unánimes. Así, mientras que para unos no existen diferencias en la distribución de la positividad para la CD<sup>4</sup>, para otros la expresión fue más alta en los adenocarcinomas que en los carcinomas escamosos y adenoescamosos<sup>12</sup>, y aunque encuentran positivities importantes (entre el 47 y el 54% de todas las muestras), no encuentran más que una cierta tendencia de estos casos a una supervivencia más corta aunque sin significación estadística, por lo que no lo consideran válido como factor pronóstico. El incremento de la expresión de este marcador se relaciona con el tamaño tumoral y con la mejor respuesta a la quimioterapia, pero no con la edad, estadio tumoral, grado de diferenciación y existencia de metástasis tumorales<sup>12,13</sup>. El factor más relacionado con la expresión de esta enzima en los estadios precoces de carcinoma cervical ha sido el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R). Los altos valores encontrados de este receptor sugieren que la CD en este tejido, a diferencia de la mama y el endometrio, puede ser modulada por este factor de crecimiento

470 y no por esteroides<sup>4</sup>. Esto apoya la hipótesis de que la regulación de la CD es específica del tejido<sup>14</sup>.

Si escasos son los estudios en carcinoma de cérvix, son inexistentes a la hora de valorar las CIN. Cuando se planteó nuestro trabajo de investigación, se eligió la aplicación de la técnica para la CD en tejido cervical normal y preneoplásico porque nos pareció interesante evaluar el comportamiento de esta proteína en el proceso de oncogénesis de este tejido, precisamente por la ausencia de estudios previos. No utilizamos el marcador (CD) para detectar la presencia o ausencia de lesión escamosa, ya que no es un método diagnóstico, simplemente se valora su comportamiento según aumenta el grado de CIN.

En nuestro estudio no hemos encontrado ningún caso positivo en las muestras de tejido cervical sano.

Sí hemos encontrado este marcador inmunohistoquímico en las CIN, con porcentajes que se distribuyen en el 48, el 33 y el 44% para CIN1, 2 y 3, respectivamente.

Existe significación estadística al comparar todos los grupos entre sí, con una  $p = 0,00017$ . Al analizar esta significación, encontramos que es a expensas de la comparación entre el cérvix control y el grupo de CIN con  $p = 0,00001$ ,  $p = 0,0005$  y  $p = 0,00005$  para CIN1, 2 y 3, respectivamente.

De estos resultados se desprende que la diferencia fundamental en la expresión de este marcador se produce entre el tejido cervical normal y la CIN1, aunque está por definir si el aumento de esta enzima lisosómica en ese momento cronológico de la enfermedad se relaciona con la desestructuración de

la matriz extracelular o, como es más probable, tenga una función como factor estimulante de la mitosis dado el carácter no infiltrante de las CIN. Ésta sólo se ha observado cuando se estudia el comportamiento de la CD *in vitro*<sup>15,16</sup>.

En cuanto al estudio de la intensidad y localización de la tinción en los casos positivos para la CD, no existen datos en la bibliografía.

En nuestro trabajo, encontramos un incremento de la intensidad de la tinción que se hace patente sobre todo en el paso de CIN2 a CIN3, donde un 46% de las muestras positivas fueron intensas frente a un 0 y 6% de los CIN2 y 1, respectivamente. Esta diferencia presenta significación estadística con una  $p = 0,0476$ . Nuestro hallazgo podría reflejar una adquisición precoz del fenotipo metastásico en cérvix en los casos positivos para la CD.

Por tanto, podríamos concluir con que la expresión de la CD en un alto porcentaje de CIN1 puede atribuirse a su función estimuladora de la mitosis, así como el aumento de intensidad en las CIN3 sugiere la adquisición temprana de alteraciones propias del fenotipo metastásico en los casos donde la CD contribuye al proceso de transformación celular, ya que no todos los carcinomas de cérvix tienen por qué seguir la misma vía oncogénica. Nuestras conclusiones son especulativas pero apoyadas en los resultados obtenidos. La utilidad de esta técnica actualmente es muy escasa, pero conocer los pasos que siguen en ocasiones las células cervicales en su transformación maligna puede tener su aplicación clínica en un futuro.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
2. Hermanek P, Hutter R, Sobin L. Prognostic grouping: the new step in tumor classification. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:513-6.
3. Scambia G, Panici P, Ferrandina G, Salerno G. Clinical significance of cathepsin D in primary ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1994;30A:935-40.
4. Scambia G, Benedetti P, Ferrandina G, Distefano M, Romanini M. Significance of cathepsin D expresión in uterine tumours. *Eur J Cancer* 1995;31:1449-54.
5. García M. Immunohistochemical distribution of the 52 kDa protein in mammary tumors: a marker associated with cell proliferation rather than with hormone responsiveness. *J Steroid Biochem* 1987;27:439-43.
6. Henry J. Prognosis significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer: an immunohistochemical study. *Cancer* 1990;65:265-70.
7. Tandon A, Clark G, Chamness G, Chirgwin J, McGuire W. Cathepsin-D and prognosis in breast cancer. *N Engl Med* 1990;322:297-302.

8. Spyrtos F, Maudelonde T, Brouillet J, Brunet M. Cathepsin-D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989;II:1115-8.
9. Henry J, McCarthy A, Angus B, Westley B. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein cathepsin-D in breast cancer. *Cancer* 1990;65:265-71.
10. Nazeer T, Malfetano J, Rosano T, Ross J. Correlation of tumour cytosol cathepsin D with differentiation and invasiveness of endometrial adenocarcinoma. *Anat Pathol* 1992;97:764-9.
11. Elangovan S, Moulton B. Progesterone and estrogen control of rates of synthesis of uterine cathepsin D. *J Biol Chem* 1980;225:7474-9.
12. Mitchell K, Hale R, Buckley C, Fox H, Smith D. Cathepsin-D expression in cervical carcinoma and its prognostic significance. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993;442:357-60.
13. Kristensen G, Holm R, Abeler V, Trope C. Evaluation of the prognostic significance of cathepsin-D, epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1996;78:433-40.
14. Capony F, Morisset M, Barret A. Phosphorylation glycosylation and proteolytic activity of de 52-kD estrogen-induced protein secreted by MCF cells. *J Cell Biol* 1987;104:253-62.
15. Rochefort H, Capony F, García M. Cathepsin D in breast cancer: from molecular and cellular biology to clinical applications. *Cancer Cells* 1990;2:383-8.
16. Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, García M, Rochefort H. Autoendocrine growth stimulation of the MCF-7 breast cancer cells by the estrogen regulated 52 Kda protein. *Endocrinology* 1986;118:1437-45.