

EXPRESIÓN COORDINADA DE CITOQUERATINAS 7 Y 20 EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA: UTILIDAD DIAGNÓSTICA

P. CID MOUTEIRA, J.A. ORTÍZ REY, I. ANTÓN BADIOLA, P. SAN MIGUEL FRAILE,
C. ÁLVAREZ ÁLVAREZ, E. ZUNGRI TELO*, A. DE LA FUENTE BUCETA

Servicios de Anatomía Patológica y *Urología. Centro Médico POVISA. Vigo (Pontevedra).

PALABRAS CLAVE:

Carcinoma urotelial. Vejiga urinaria. Inmunohistoquímica. Citoqueratina 7. Citoqueratina 20.

KEY WORDS:

Urothelial carcinoma. Urinary bladder. Immunohistochemistry. Cytokeratin 7. Cytokeratin 20.

Actas Urol Esp. 26 (4): 279-284, 2002

RESUMEN

FUNDAMENTO: Las citoqueratinas son filamentos intermedios que forman parte del esqueleto de las células eucariotas. En cada tipo de epitelio se ha descrito un patrón característico de expresión de citoqueratinas, que se mantiene durante el proceso de malignización y metástasis. En concreto, la tipificación inmunohistoquímica de las citoqueratinas 7 y 20 (Ck 7 y Ck 20) se considera útil para determinar el origen de ciertos carcinomas.

MÉTODOS: Se analizaron 122 casos de carcinoma transicional de vejiga, mediante inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti Ck 7 y Ck 20. La técnica empleada fue la de estreptavidina-biotina marcada con peroxidasa. Se consideraron positivos aquellos casos en que se tiñó al menos un 1% de las células tumorales.

RESULTADOS: Todos los casos estudiados expresaron Ck 7 mientras que Ck 20 fue positiva en un 75% de ellos. La expresión de Ck 20 fue siempre focal. En ningún tumor Ck7 fue negativa.

CONCLUSIONES: El inmunofenotipo Ck 7+/Ck 20+ es el más característico del carcinoma transicional de vejiga, siendo menos frecuente Ck7+/Ck 20-. La determinación inmunohistoquímica de estas queratinas resulta útil para el diagnóstico ante tumores poco diferenciados y para identificar el origen de carcinomas metastásicos.

ABSTRACT

BACKGROUND: Cytokeratins are intermediate filament proteins which are part of the framework of eukaryotic cells. A characteristic pattern of expression of cytokeratins has been described for each type of epithelium. This pattern is maintained during the process of malignancy and metastasis. Immunohistochemical analysis of cytokeratins 7 and 20 (Ck 7 and Ck 20) has been considered particularly useful for identifying the origin of carcinomas.

METHODS: A total of 122 cases of transitional cell carcinoma of urinary bladder were studied immunohistochemically with monoclonal antibodies against Ck 7 and Ck 20. The peroxidase labelled-streptavidin biotin technique was performed. Cases were considered positive when at least 1% of tumoral cells were stained.

RESULTS: All cases investigated expressed Ck 7 whereas Ck 20 was positive in 75% of them. Reactivity for Ck 20 was always focal. No tumor was negative for Ck 7.

CONCLUSION: Ck 7+/Ck 20+ immunophenotype is highly characteristic of transitional cell carcinoma of urinary bladder, whereas Ck 7+/Ck 20- is less frequent. Immunohistochemical determination of these cytokeratins is useful for the diagnosis when tumors are poorly differentiated and for identifying the primary site of metastatic carcinomas.

El citoesqueleto de las células eucariotas se compone de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Uno de los grupos más complejos, dentro de los filamentos intermedios lo constituyen las citoqueratinas.

Las citoqueratinas componen una familia de hasta 20 polipéptidos, cuyos pesos moleculares se hallan comprendidos entre los 40 y los 68 KDa. Moll y col.¹, elaboraron una clasificación numérica de estos polipéptidos en función de su peso molecular y punto isoeléctrico. De esta manera, las citoqueratinas se dividen en dos grupos: aquellas cuyo punto isoeléctrico es ácido se denominan tipo I/A (citoqueratinas 9-20), y aquellas con un punto isoeléctrico neutro-básico, tipo II/B (citoqueratinas 1-8).

En muchos casos, las citoqueratinas se expresan como parejas de tipo I + tipo II, características de cada tejido. Puesto que las células epiteliales tienen la característica de mantener su patrón de citoqueratinas durante la malignización y metástasis²⁻⁶, éstas últimas resultan marcadores más o menos específicos de tejidos epiteliales.

Es por esto que la determinación inmunohistoquímica de los tipos de citoqueratinas, ayuda a identificar el origen primario de tumores epiteliales en los que aquél se desconoce o plantea dudas.

El presente estudio se ha basado en la determinación de las citoqueratinas 7 y 20 (Ck 7 y Ck 20), ya que éstas son las que se expresan en el urotelio.

La Ck 7 es una proteína básica (tipo II) de 54 KDa, presente en una amplia variedad de epitelios, además del tracto urinario, como pulmón, ovario, endometrio y mama⁷⁻¹⁰.

La Ck 20 es una proteína ácida (tipo I) de 46 KDa, cuya distribución tisular es mucho más restringida que la Ck 7, siendo en particular identificada en las células "en paraguas" del urotelio. También ha sido identificada en el tracto gastrointestinal y células de Merkel de la epidermis^{4,11}. A pesar de esta aparente especificidad, se han encontrado casos aislados de positividad a Ck 20 en tejidos que normalmente no la expresan, como mama, pulmón y endometrio⁴.

La determinación inmunohistoquímica del patrón de expresión de Ck 7 y Ck 20 se ha revelado útil para tipificar el origen de carcinomas en múltiples localizaciones^{12,13,18}. A pesar de esto, los estudios realizados en carcinomas de vejiga, se basan en series pequeñas¹²⁻¹³.

En el presente trabajo se ha analizado mediante inmunohistoquímica, una serie amplia de carcinomas transicionales de vejiga utilizando anticuerpos monoclonales anti Ck 7 y Ck 20, con el fin de investigar la utilidad del patrón de coexpresión de las mismas como herramienta diagnóstica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron un total de 122 casos de carcinoma transicional de vejiga del Departamento de Anatomía Patológica de POVISA.

Todos los casos (62 RTU, 16 biopsias y 44 casos de cistectomía) fueron fijados en formol neutro al 10% e incluidos en parafina.

Para la inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos monoclonales anti Ck 7 y anti Ck 20 cuyo fabricante, dilución de trabajo y designación del clon, vienen especificados en la Tabla I.

Secciones de 3 micras de cada bloque, fueron desparafinadas e hidratadas en alcoholos decrecientes hasta agua destilada.

El desenmascaramiento antigénico se llevó a cabo en olla a presión durante 5 minutos, en tampon citrato a pH 6.

Se realizó una inhibición de la peroxidasa endógena en peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos.

La incubación de los anticuerpos primarios (anti Ck 7 y anti Ck 20) se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El método utilizado para la detección fue el de estreptavidina-biotina marcada con peroxidasa y el cromógeno del revelado fue diaminobencidina (DAB).

Se incluyeron controles positivos, así como negativos en los cuales se omitió el anticuerpo primario.

La inmunorreactividad tisular fue testada considerándose positivo todo caso con un porcentaje de células con positividad citoplasmática superior al 1%.

TABLA I

CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS

Anticuerpo	Clon	Dilución	Procedencia
Ck 7	OV-TL 12/30	1:25	Dako ^R
Ck 20	Ks 20.8	1:25	Dako ^R

RESULTADOS

En 92 casos (75%) se detectó la expresión de ambas citoqueratinas (Figs. 1 y 2). Los 30 casos restantes (25%), presentaron expresión de Ck 7, pero no de Ck 20. En ninguno de los casos estudiados se dio la ausencia de la Ck 7 (Tabla II).

En la Tabla III, se resume la clasificación de los dos inmunofenotipos que presentan los 122 casos de carcinoma transicional de vejiga analizados, en función del grado tumoral. Se aprecia que independientemente del grado tumoral, en la mayoría de los casos, se da coexpresión de ambas citoqueratinas. Los carcinomas de grado 1 son los que mayor porcentaje de Ck 7+/Ck 20+ presentan (92%). En los carcinomas de grado 2 y 3, el porcentaje del inmunofenotipo Ck 7+/Ck 20+ es de 67% y 78% respectivamente.

DISCUSIÓN

Las citoqueratinas son proteínas componentes de los filamentos intermedios, que a su vez son parte del citoesqueleto celular. Generalmente las citoqueratinas se expresan en pares de citoqua-

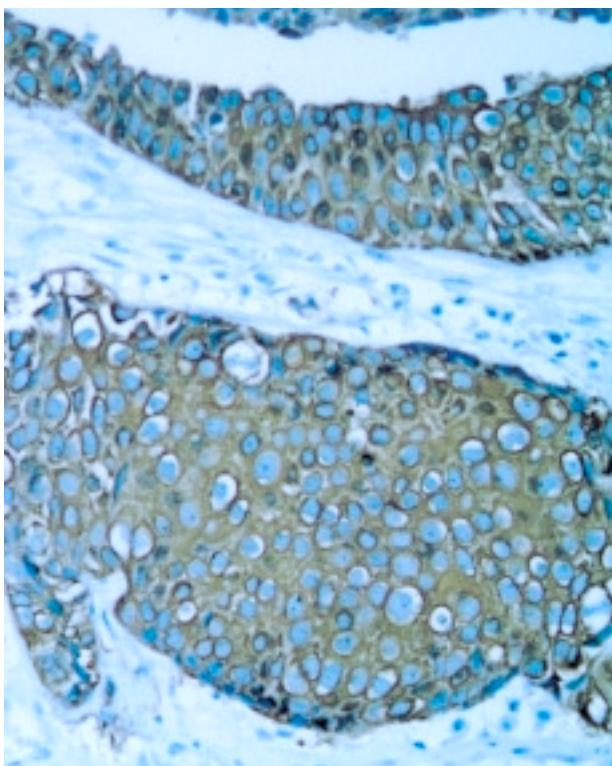


Figura 1. Ck7: Positividad intensa y generalizada en el tumor infiltrante y en el urotelio de superficie (parte superior). (Inmunoperoxidasa, 200x).

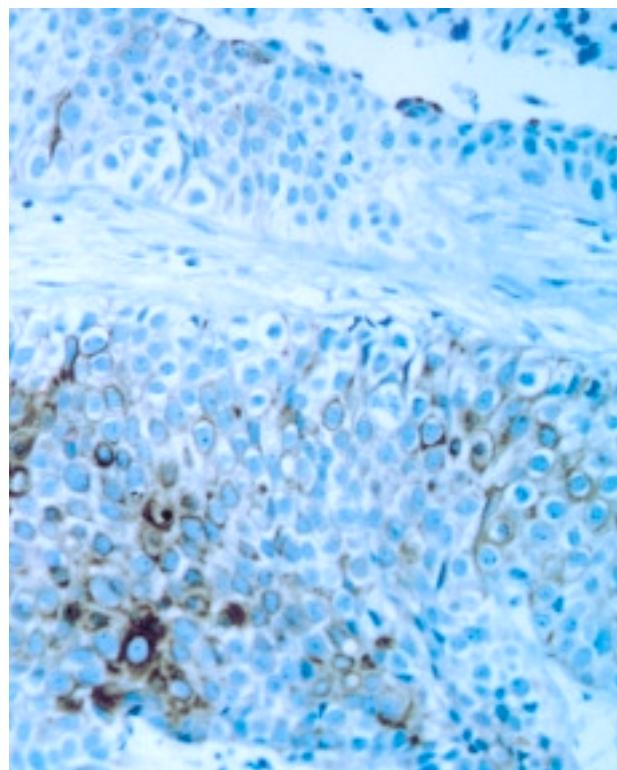


Figura 2. Ck20: Expresión focal en el mismo tumor que la Fig. 1. En el urotelio hay también aisladas células positivas. (Inmunoperoxidasa, 200x).

TABLA II

INMUNOFENOTIPO CK 7/CK 20 EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA

Inmunofenotipo Ck 7/Ck 20	Porcentaje de casos (%)
Ck 7 + /Ck 20 +	75 (92/122)
Ck 7 + /Ck 20 -	25 (30/122)
Ck 7 - /Ck 20 +	0
Ck 7 - /Ck 20 -	0

tina ácida y básica, ya que esta asociación se presenta como indispensable para la formación de filamentos⁶.

Se ha demostrado que el perfil de citoqueratinas de una célula normal se conserva en gran medida en su proceso de malignización²⁻⁶. De esta manera, la tipificación del perfil de citoqueratinas de un tumor de origen primario desconocido, se presenta en algunos casos como una importante herramienta diagnóstica¹² y en concreto la determinación de Ck 7 y Ck 20 se ha revelado útil para ese fin^{12,15-18}.

TABLA III

PORCENTAJE DEL INMUNOFENOTIPO CK7/ CK 20 EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA,
EN FUNCIÓN DEL GRADO TUMORAL

Grado tumoral	% Grado respecto el total	Inmunofenotipo Ck 7/ Ck 20	Porcentaje
1	9,8% (12/122)	+ / +	92
		+ / -	8
2	32% (39/122)	+ / +	67
		+ / -	33
3	58,2% (71/122)	+ / +	78
		+ / -	22

Recientemente, estudios realizados por Wang y col.¹² y Chu y col.¹³, han tratado de determinar la existencia de un inmunofenotipo Ck 7/Ck 20 característico para cada tipo de carcinoma. En general, se encuentra un patrón de expresión coordinada Ck 7/Ck 20 en diferente proporción dependiendo del origen del carcinoma.

Los resultados presentan cierta variabilidad en las distintas series y también se encuentran ciertas discrepancias en lo que se refiere al carcinoma transicional de vejiga.

Hay que señalar que las anteriores series que estudiaron el carcinoma transicional incluían un número reducido de casos (19 en la serie de Wang y col.¹² y 24 en la de Chu y col.¹³). En el presente trabajo se han estudiado 122 casos de carcinoma transicional de vejiga y hemos comprobado que el inmunofenotipo más característico es Ck 7+/Ck 20+ (75% de los casos). El 25% fue Ck 7+/Ck 20- (Tabla IV). Se podría con esto concluir que la Ck 7 se expresa en todos los casos de car-

cinoma transicional de vejiga, mientras que en un 25% de ellos, no hay expresión conjunta con la Ck 20.

Los resultados obtenidos por Wang y col.¹², coinciden en gran medida con nuestras observaciones. En su estudio de 19 casos, un 89% muestran expresión de ambas citoqueratinas y sólo un 11% tiene un inmunofenotipo Ck 7+/Ck 20- (Tabla IV).

Sin embargo, Chu y col.¹³, consideran como mayoritario el inmunofenotipo Ck 7+/Ck 20- (63% de 24 casos), siendo el segundo en porcentaje el Ck 7+/Ck 20+ (25%). La mayor discrepancia radica en la aparición de un 12% de casos en los que la Ck 7 no se expresa (Tabla IV). Chu y col.¹³, proponen tres posibles causas para explicar la diferencia con los resultados de Wang y col.¹². La primera es el tipo de anticuerpo utilizado (marca comercial y clon). La segunda es el grado de diferenciación tumoral; Chu y col.¹³, afirman que los tumores de vejiga bien diferenciados tienen más

TABLA IV

COMPARACIÓN DE LOS POCENTAJES DEL INMUNOFENOTIPO CK7/ CK 20 EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA POR DISTINTOS AUTORES

Inmunofenotipo Ck7/Ck20	Porcentaje de casos positivos		
	Estudio Presente	Estudio de Wang y col.	Estudio de Chu y col.
Ck 7+/ Ck 20+	75% (92/122)	89% (17/19)	25% (6/24)
Ck 7+/ Ck 20-	25% (30/122)	11% (2/19)	63% (15/24)
Ck 7-/ Ck 20+	0% (0/122)	0% (0/19)	4% (1/24)
Ck 7-/ Ck 20-	0% (0/122)	0% (0/19)	8% (2/24)

TABLA V

EXPRESIÓN DE LA CK 7 EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA Y ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

Autor	Porcentaje de casos positivos a Ck 7	
	Carcinoma transicional de vejiga	Adenocarcinoma prostático
Wang y col.	100% (19/19)	16% (2/13)
Chu y col.	88% (21/24)	0% (0/18)
Genega y col.	83% (38/46)	12% (4/34)

probabilidad de ser Ck 20+ que Ck 20-, y la causa del diferente porcentaje de expresión de la Ck 20 en ambos estudios podría residir en la elección de casos con distintos grados de diferenciación. Sin embargo en nuestro estudio no se han constatado diferencias notables en la expresión de estas citoqueratinas en función del grado tumoral.

La tercera causa de discrepancia reside en el porcentaje de expresión que ambos autores establecen para considerar un caso positivo o negativo, lo cual podría llevar a ciertas diferencias en los resultados. Así, mientras Chu y col.¹³ considera que es un 5% de expresión citoplasmática el porcentaje necesario para considerar positivo un caso, tanto Wang y col.¹² como en el presente estudio, consideramos un 1% como punto de corte.

Sí hay concordancia entre las distintas series, incluyendo la actual, en que la Ck 7 se expresa en el carcinoma urotelial en un altísimo porcentaje de casos (88% Chu y col.¹³, 100% Wang y col.¹², 100% estudio presente).

El hecho único de que el carcinoma de vejiga exprese en todos los casos Ck 7, no aportaría una clara información del origen tumoral, debido a que también existe positividad en un alto porcentaje de otros carcinomas como el de páncreas, pulmón, ovario y endometrio⁷⁻¹⁰. Sin embargo, su ausencia en un estudio inmunohistoquímico sí ayudaría a descartar con gran seguridad un posible origen urotelial.

La expresión conjunta de la Ck 7 y la Ck 20 proporciona mayor información, ya que ésta última tiene una distribución tisular mucho más limitada, apareciendo únicamente en el tracto gastrointestinal, urotelio y células de Merkel^{4,11}.

El perfil Ck 7/Ck 20 resulta útil también para diferenciar carcinomas prostáticos de los uroeliales.

Aunque generalmente el adenocarcinoma de próstata y el carcinoma transicional de vejiga, son fácilmente distinguibles por sus características clínicas y por el examen histológico, en ocasiones la escasa diferenciación tumoral puede dificultar la determinación del origen de la neoplasia en metástasis a distancia o ante tumores poco diferenciados que infiltran la próstata. En estos casos resulta de elección la determinación inmunohistoquímica de PSA y fosfatasa ácida prostática pero la detección de Ck 7 aporta también información relevante¹⁴.

Para Wang y col.¹² y Chu y col.¹³, el porcentaje de casos Ck 7+ en el adenocarcinoma prostático es claramente minoritario (0 y 16% de positividad), con respecto a los casos de expresión de la Ck 7 en los carcinomas transicionales de vejiga (entre un 88-100%).

En un trabajo más específico como es el de Genega y col.¹⁴, se confirman los resultados anteriores: un 83% de expresión de Ck 7 en el carcinoma transicional de vejiga y un 12% en el adenocarcinoma de próstata (Tabla V).

En conclusión, la determinación inmunohistoquímica de Ck 7 y Ck 20 en nuestra serie de 122 casos de carcinoma transicional de vejiga muestra un patrón de reactividad característico. Mientras que Ck 7 se expresa en todos los casos, Ck 20 es positiva en un 75%. Este inmunofenotípico puede ayudar al diagnóstico de tumores metastásicos sin origen primario concluyente o ante la infiltración de la próstata por carcinomas poco diferenciados.

REFERENCIAS

- MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, GEIGER B, KREPLER R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; **31**: 11-24.

2. HYNES RO, DESTREE AT: 10 nm filaments in normal and transformed cells. *Cell* 1978; **13**: 151-163.
3. MOLL R: Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcellular Biochem* 1998; **31**: 205-261.
4. MOLL R, LOWE A, LAUFER J, FRANKE WW: Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histo-diagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992; **140**: 427-447.
5. WU YJ, RHEINWALD JC: A new small (40kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell* 1981; **25**: 627-635.
6. SUN TT, SKELTON HG, GREEN H: Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979; **76**: 2813-2817.
7. RAMAEKERS F, HUYSMANS A, SCHAArt G, MOESKER O, VOOIJS P: Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 1987; **170**: 235-249.
8. RAMAEKERS F, VAN-NIEKERK C, POELS L, SCHAArt G, HUIJSMANS A, ROBBEN H, SCHAArt G, VOOIJS P: Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1990; **136**: 641-655.
9. VAN NIEKERK CC, JAP PH, RAMAEKERS FC, VAN DE MOLENGRAFT FJ, POELS LG: Immunohistochemical demonstration of keratin 7 in routinely fixed paraffin embedded human tissues. *J Pathol* 1991; **165**: 145-152.
10. VOJTESEK B, STASKOVÁ Z, NENUTIL R, BARTKOVÁ J, KOVAR'IK J, REJTHAR A, BARTEK J: A panel of monoclonal antibodies to keratin no. 7: characterization and value in tumor diagnosis. *Neoplasma* 1990; **37**: 333-342.
11. MOLL R, ZIMBELMANN R, GOLDSCHMINDT MD, KEITH M, LAUFER J, KASPER M, KOCH PJ, FRANKE WW: The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 1993, **53**: 75-93.
12. WANG NP, ZEE S, ZARBO RJ, BACCHI CE, GOWN AM: Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. *Appl Immunohistochem* 1995; **3 (2)**: 99-107.
13. CHU P, WU E, WEISS LM: Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol* 2000; **13 (9)**: 962-972.
14. GENEGA EM, HUTCHINSON B, REUTER VE, GAUDIN PB: Immunophenotype of high-grade prostatic adenocarcinoma and urothelial carcinoma. *Mod Pathol* 2000; **13 (11)**: 1186-1191.
15. BLUMENFELD W, TURI GK, HARRISON G, LATUSZYNSKI D, ZHANG C: Utility of cytokeratin 7 and 20 subset analysis as an aid in the identification of primary site of origin of malignancy in cytologic specimens. *Diagn Cytopathol* 1999; **20**: 63-66.
16. CAMPBELL F, HERRINGTON CS: Application of cytokeratin 7 and 20 immunohistochemistry to diagnostic pathology. *Curr Diagn Pathol* 2001; **7**: 113-122.
17. PECCIARINI L, CANGI MG, DOGLIONI C: Identifying the primary sites of metastatic carcinoma: the increasing role of immunohistochemistry. *Curr Diagn Pathol* 2001; **7**: 168-175.
18. MOLL R: Value of cytokeratin immunohistochemistry in the differential diagnosis of carcinoma metastases. En: S. Hauptmann, M. Dietel, M. Sobrinho-Simões, eds. *Surgical Pathology Update 2001/18th European Congress of Pathology*. ABW Wissenschaftsverlag. Berlin, 2001; 229 - 231.

Dr. José A. Ortíz Rey.
Anatomía Patológica
POVISA.
Salamanca, 5
36211 Vigo (Pontevedra)

(Trabajo recibido el 20 febrero de 2002)