

Expresión de antígeno HMB-45 y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) como posibles factores pronóstico en los nevus displásicos. Estudio inmunohistoquímico en dos hermanas gemelas.

S. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ*, A. RAVENTÓS*, R. PEDRAGOSA** y P. HUGUET*.

Departamento de Anatomía Patológica*. Servicio de Dermatología**. Ciutat Sanitària i Universitaria Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.

SUMMARY

HMB-45 and PCNA expression as pronostic factors in dysplastic nevus. Immunohistochemical analysis in two sibilings.

Dysplastic nevus is a variety of common nevocellular nevus or is a marker of malignant melanoma. The cellular expression of HMB-45 and PCNA could be significative. We study with antimelanoma antigen (Dako-HMB-45) and proliferative cell nuclear antigen (Dako-PCNA, PC10) 14 cutaneous lesions in two female sibilings with dermatological criteria of dysplastic nevus. Results are compared with 5 cases of typical cellular nevus. 10 cases with histological criteria of dysplastic nevus and 4 cases with architectural atypia but no criteria of dysplastic nevus were positives for both HMB-45 and PCNA. No positivity was destacable in cases control.

HMB-45 and PCNA expression are more evident in both dysplastic nevus and cellular nevus associated to dysplastic nevus than in typical nevocellular nevus.

Key words: Dysplastic Nevus. Antibody HMB-45. PCNA.

INTRODUCCION

Existe en la actualidad una cierta controversia sobre el concepto de nevus displásico (ND), tanto en lo que se refiere a los criterios utilizados para su diagnóstico como en su relación con el melanoma maligno (MM) y su posible valor como marcador fenotípico de este tumor, ya que en un porcentaje variable de casos se han asociado ambas neoplasias (1,2).

Los ND suelen ser múltiples en un mismo paciente, constituyendo el denominado síndrome del nevus displásico (SND), que puede presentarse de forma aislada en un individuo síndrome de nevus displásico esporádico (SNDE) o bien en distintos miembros de una

misma familia, en cuyo caso dan lugar al llamado síndrome del ND familiar (SNDF), a veces asociado con antecedentes de melanoma maligno (3,4). Ello, sin embargo, no significa que todas las lesiones névicas que tengan estos pacientes vayan a mostrar caracteres displásicos, pero sí obliga a una revisión y seguimiento de las mismas para despistar la posible aparición de lesiones malignas.

En recientes estudios se ha intentado establecer el potencial de malignidad de las células neoplásicas con técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas mediante diversos marcadores: antígeno anti-melanoma, anti PCNA, anti p53, recuento numérico de AgNORs, etc (5-7). En nuestro caso hemos utilizado los anticuerpos HMB-45 y anti-PCNA para determinar la expresión de los correspondientes antígenos en las células névicas de 14 lesiones con características clínicas de ND, extirpadas en dos hermanas gemelas bivitelinas, lo que nos permite situarlas dentro del contexto del SNDF y obser-

Correspondencia: Dr. Pere Huguet. Departament d'Anatomia Patològica. Ciutat Sanitària i Universitaria Vall d'Hebron. Passeig de la Vall d'Hebron 119-129. 0835 Barcelona.

Tabla I. Relación de casos y características de cada uno de ellos.

Caso	Dx (*D)	HMB45*	*nivel	*%(+)	PCNA**	**%(+)	**dist
1A	NCCD m	++	2a	50-75	+	50-75	D
2A	NCCD m	++	2a	25-50	+	50-75	D
3A	NCCD s	+	2a	10-25	++	> 75	D
4A	NCCD m	++	2a	10-25	+	50-75	D
5A	NCCD l	++	2a	50-75	+	25-50	D
6A	NCCD l	++	2a	50-75	+	> 75	D
7A	NCC/DA	++	2a	50-75	+	50-75	D
8A	NCC/DA	+	2a	10-25	+	50-75	D
1B	NCCD l	+	2a	50-75	++	> 75	D
2B	NCCD m	++	2a	10-25	++	> 75	D
3B	NCCD s	++	2a	50-75	+	> 75	D
4B	NCCD m	++	2a	25-50	+	> 75	D
5B	NCC/DA	+	2a	25-50	+	25-50	D
6B	NCC/DA	+	2a	25-50	+	25-50	D
1C	NCC	+	2a	< 10	+	< 10	D
2C	NCC	+	2a	< 10	+	< 10	D
3C	NCC	+	1	< 10	+	< 10	D
4C	NCC	+	1	< 10	+	< 10	D
5C	NCC	+	2a	< 10	+	10-25	D

Dx: Diagnóstico histológico.; *D: Grado de displasia; l: leve, m: moderado, s: severo; NCC: Nevus celular compuesto; D: displásico; DA: Displasia arquitectural; HMB45*: Intensidad de expresión predominante para HMB45: (-)negativa, (+) positiva, (++) muy positiva.

* nivel: Nivel de expresión de HMB45: (1) unión dermo-epidérmica. (2a) dermis papilar alta, (2b) dermis papilar-reticular alta.

*%(+): porcentaje células marcadas/mm² con HMB45.; PCNA**: Intensidad de tinción predominante para PCNA: (-)negativa, (+) positiva, (++) muy positiva.; **%(+): Porcentaje de núcleos marcados/mm² por PCNA; ** dist: Distribución de núcleos marcados con PCNA; F: focal; D: difusa.

var la relación entre los diversos patrones histológicos y la expresión inmunohistoquímica de las distintas lesiones a pesar de su similitud clínica, en un intento de establecer parámetros morfológicos que permitan conocer cambios en dicha expresión en relación a un posible pronóstico de las mismas.

MATERIAL Y METODO

Las lesiones cutáneas correspondían a dos hermanas gemelas fraternas de 14 años de edad, sin antecedentes de MM ni casos conocidos de ND entre sus familiares más directos. Ambas mostraban, desde pequeñas, lesiones névicas pigmentadas diversas en tórax, abdomen y brazos fundamentalmente, de tamaño y forma variables y asintomáticas, hasta la actualidad. No existía, aparentemente, una relación evidente con la exposición solar en todas ellas, aunque sí podía considerarse en las situadas en cuello y brazos. Las niñas acudieron a consulta al apreciar crecimiento subjetivo de algunas de las lesiones. Por sus características dermatológicas consistentes con ND se extirparon 8 en una hermana y 6 en la otra, con diámetros entre 0,8 y 1,5 cm, siendo remitidas a nuestro Departamento para su estudio anatomopatológico. Se denominaron como casos A y B.

Las muestras habían sido fijadas en formaldehído

al 10% durante 24 horas e incluidas en parafina de manera rutinaria. Las secciones se cortaron a 4-6 micras de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina para hacer el diagnóstico y seleccionar las muestras apropiadas para la tinción inmunohistoquímica. Los resultados se compararon con los observados en cinco lesiones torácicas de tres pacientes distintos con aspecto clínico de nevus nevocelulares típicos, también fijadas e incluidas previamente de la misma manera, y con diagnóstico histológico de nevus nevocelulares compuestos (NCC), sin signos de displasia.

Para el estudio inmunohistoquímico en todos los casos, se empleó la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa, utilizando el anticuerpo hormonal HMB-45 (Dako-HMB-45) y el antígeno nuclear de proliferación celular (Dako-PCNA, PC10), ambos a concentración 1/50 y sin digestión enzimática previa. Como cromógeno se utilizó aminoetilcarbazol (AEC).

El marcaje con HMB-45 se valoró como negativo (-), positivo (+) o muy positivo (++) según la intensidad de la tinción dominante en la muestra. Se consideró el máximo nivel de profundidad de células névicas marcado, independientemente de la intensidad de la tinción: (1) epidérmicas y (2) dérmicas: altas (2a) situadas en dermis papilar alta, o profundas (2b) situadas en dermis papilar profunda o focalmente en reticular alta. Y se calculó el porcentaje de células marcado por mm², en

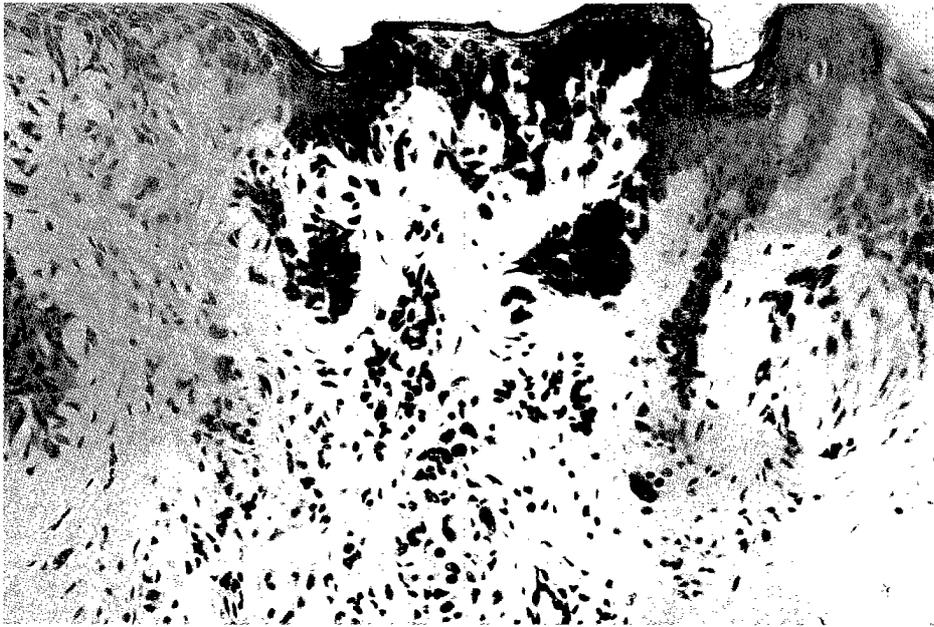


Figura 1.- Nevus celular compuesto displásico: se observa hiperplasia melanocítica atípica basal, tecas irregulares y confluentes, fibroplasia lamelar e infiltrado inflamatorio junto al componente névico intradérmico (H-E, 250 X).

cada uno de los niveles, distribuyéndolo en grupos por aproximación al 100%.

El marcaje con PCNA se valoró también como negativo (-), positivo (+) o muy positivo (++) en función de la intensidad de tinción nuclear predominante en la muestra, y se consideró también, independientemente de la intensidad de tinción, el porcentaje de núcleos marcados por mm^2 , así como su distribución focal (F) o difusa (D) en la totalidad de la muestra. La presencia de queratinocitos basales marcados se usó como control.

Los mismos parámetros se emplearon para valorar los 5 casos de nevus típicos (casos grupo C).

Los porcentajes de marcaje celular, para los dos marcadores, se distribuyeron de la siguiente forma: <10% (negativo), 10-25%, 25-50%, 50-75% y >75%.

RESULTADOS

Los resultados pueden observarse en la tabla I.

Diez de las lesiones (6 del caso A y 4 del caso B) se catalogaron histológicamente como ND siguiendo los requisitos propuestos por Clemente et al (8): presencia de dos criterios mayores (hiperplasia melanocítica basal y atipia celular) y al menos dos de los criterios menores (fibroplasia lamelar, infiltrado inflamatorio linfocitario, proliferación vascular, fusión de crestas epidérmicas por tecas névicas) (fig. 1).

La displasia se graduó como leve, moderada o severa, según el patrón establecido por Mihm et al (9). La atipia citológica (fig. 2) significaba la existencia de melanocitos aumentados de tamaño con hiper cromasia nuclear, contorno nuclear irregular con membrana replegada o engrosada, nucleolos evidentes e

hipercromáticos, citoplasma amplio de aspecto granular y con pigmento melánico groseramente distribuido y presencia de células fusiformes entremezcladas con otras epitelioides, algunas ocupando aisladamente niveles altos en la epidermis; todo ello configuraba tecas irregulares, confluentes y en general de disposición paralela a la unión dermoepidérmica (atipia arquitectural).

En el caso A, se observó un ND con displasia severa, tres con displasia moderada y dos con grado leve de displasia; en dos casos se cumplían los criterios menores pero no era evidente la atipia celular melanocítica ni existía hiperplasia lentiginosa, por lo que se consideraron, siguiendo las recomendaciones de Mihm et al (9), como NCC con displasia arquitectural (NCC/DA). En el caso B, un nevus mostraba displasia severa, dos displasia moderada, uno leve y dos, como en el caso anterior, se diagnosticaron de NCC/DA.

En el estudio con hematoxilina-eosina, se observó la presencia de células névicas de aspecto atípico semejantes a las de la zona de unión, situadas de forma irregular en las tecas más altas del componente intradérmico, en dermis papilar y focalmente en dermis reticular alta; esta presencia era más evidente cuanto mayor era el grado de displasia.

En los cinco casos de NCC se comprobó la existencia de un componente de unión formado por tecas regulares, sin hiperplasia ni atipia melanocítica basal, y un componente dérmico papilar madurativo, igualmente sin atipias. Había más o menos infiltrado inflamatorio, pero no se observó fibroplasia lamelar.

HMB-45 fue positivo en los 14 casos de los grupos A y B, tanto en los ND como en los 4 casos de NCC/DA, generalmente de forma intensa y, en general,

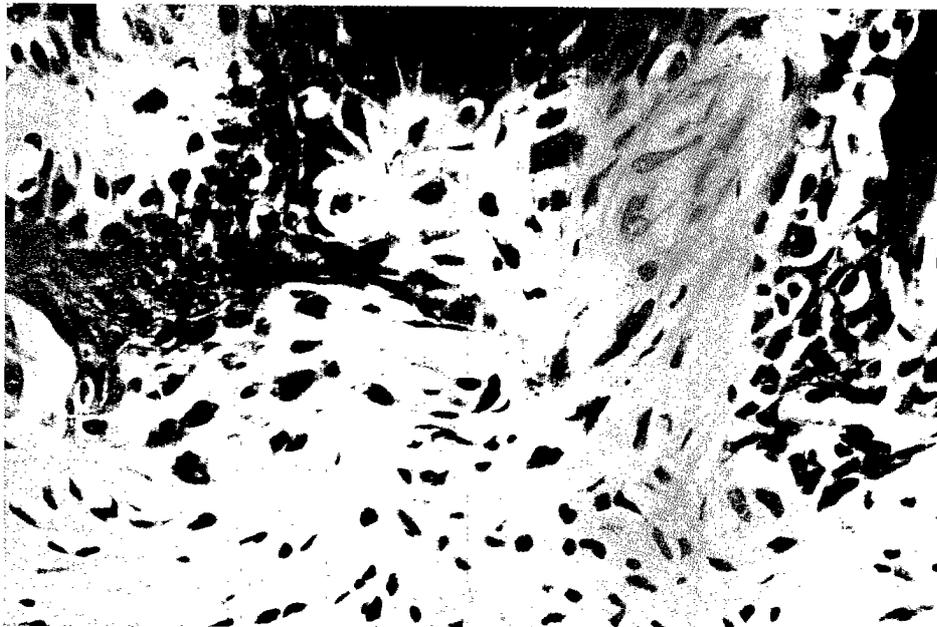


Figura 2.- Nevus celular compuesto displásico: detalle de la atipia melanocítica. (H-E, 400 X).

marcó las células de las teclas de unión y de forma irregular las células altas del componente intradérmico (niveles 1 y 2a) (fig. 3). El porcentaje de células marcadas/mm² fue variable, representando en 6 casos más del 50% de las células, en 4 casos entre el 25-50%, y en 4 casos menos del 25%. En el nivel dérmico más profundo (2b), el porcentaje de células marcadas fue siempre inferior al 10%, mostrándose solamente en células aisladas y considerado, por tanto, negativo. En ningún caso pudo establecerse una correlación directa entre los porcentajes de células marcadas y el grado de displasia observado, incluso sin diferencias evidentes entre los 10

ND y los 4 NCC/DA.

En los cinco casos de NCC típicos, el marcaje, aunque positivo focalmente en la zona de unión, se consideró negativo al mostrar un porcentaje inferior al 10% de las células.

El anticuerpo anti-PCNA mostró positividad nuclear granular en todos los casos (fig. 4), si bien el porcentaje de células positivas, como ocurrió con HMB-45 fue variable: en 6 casos fue superior al 75%, en 5 se situó entre el 50-75% y en 3 entre el 25 y 50%, existiendo concordancia con el grado de displasia: los casos de displasia severa-moderada mostraban un porcentaje de

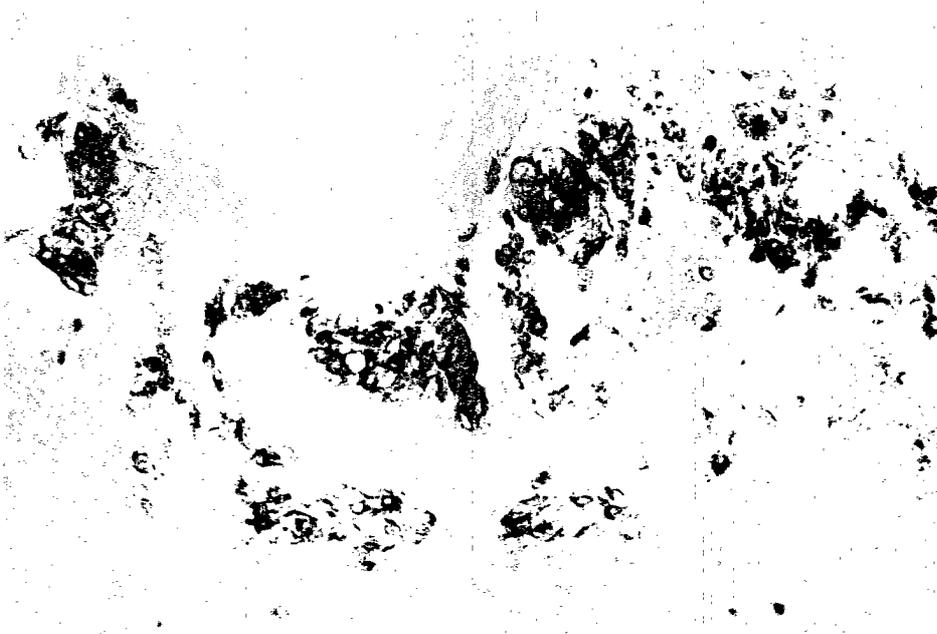


Figura 3.- Positividad del antígeno HMB-45 en las células del componente juntural y en las más altas del componente intradérmico (nivel 2a). (HMB-45. 250 X).

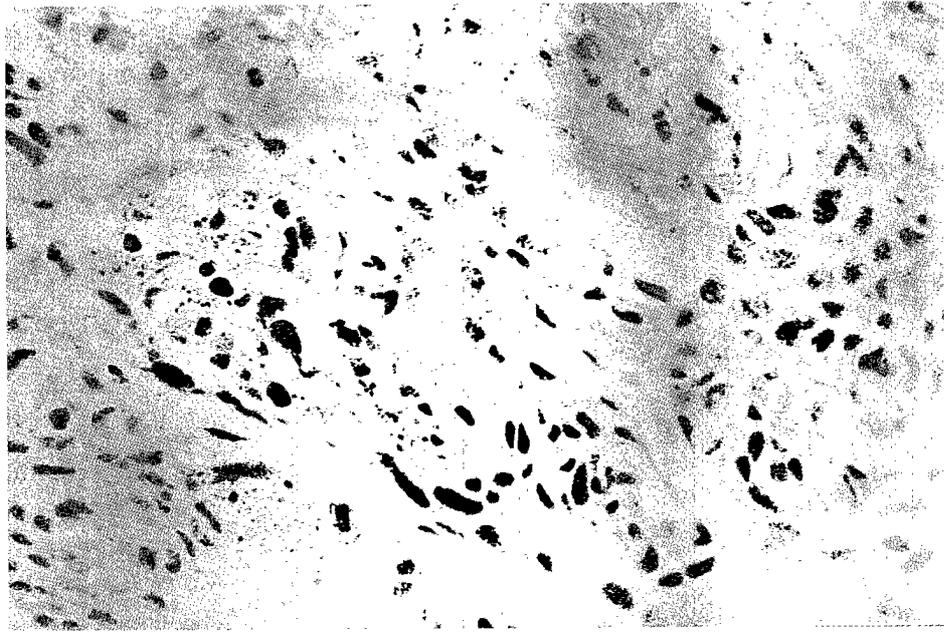


Figura 4.- Positividad granular nuclear en numerosas células de la zona dérmica papilar en un ND (caso 3A). (PC-10. 400 X).

células marcadas superior al 50%, mientras los tres casos con porcentaje inferior correspondían a un ND con displasia leve y a los dos casos de NCC/DA. La intensidad de tinción nuclear fue en todos los casos moderada (+), generalmente en forma de gránulos nucleares evidentes, aunque en 3 casos fue muy intensa (++).. La distribución de los núcleos marcados en el conjunto de la lesión fue en todos los casos difusa, sin apreciarse agregados focales significativos de células con mayor intensidad de marcaje o grupos de células negativas.

En los NCC típicos del grupo C, cuatro casos fueron considerados negativos dado que el marcaje no superó el 10% de las células, y sólo en un caso estuvo entre el 10 y el 25% y se pudo contar como positivo.

DISCUSION

HMB-45 es un anticuerpo que reacciona con el antígeno citoplasmático en los melanocitos inmaduros y estimulados, habiéndose referido su positividad en melanomas malignos, nevus de unión, nevus displásicos, nevus residuales junto a MM, nevus azules, nevus de Spitz y en melanocitos fetales y neonatales; pero es negativo en nevus intradérmicos y melanocitos maduros en general (10-14).

El antígeno de proliferación nuclear (PCNA) es una proteína ácida nuclear adyuvante de la síntesis de ADN, y está relacionado con la duplicación del material genético que sustenta los fenómenos de proliferación celular; su síntesis es máxima en la fase inicial de la fase S del ciclo celular. Existe una fracción de PCNA asociada a estructuras específicas nucleares que muestra una inmunorreactividad nuclear de tipo granular cuando se utilizan anticuerpos frente al PCNA. Al parecer, sólo

pequeñas variaciones en el nivel total de PCNA en el ciclo celular provocan un gran trastorno en la porción proteica asociada a la replicación, especialmente en la fase S. Se han elaborado diversos anticuerpos monoclonales anti PCNA, entre ellos PC10 (Dako) utilizado por nosotros en este trabajo. El patrón de tinción nuclear puede ser granular, que reconoce la fase S, o difuso, no específico de la fase S, considerado tal vez como remanente del PCNA propio de la fase G2. La presencia de células marcadas positivamente, ya sea con tinción nuclear granular o con tinción difusa intensa, permite establecer el grado de actividad proliferativa de las células de un tumor y evaluar un pronóstico sobre la posible agresividad del mismo (5).

Los resultados obtenidos en este trabajo están en la línea de los obtenidos por otros autores (6,15,16) y muestran prácticamente una superposición de patrones inmunohistoquímicos en los nevus displásicos y los que tienen sólo displasia arquitectural en el SNDF, tanto en lo que se refiere al porcentaje de células marcadas con HMB-45 como en el de células proliferativas marcadas con PC10, aún teniendo en cuenta las diferencias morfológicas que caracterizan el diagnóstico de unos y otros, y el distinto grado de displasia existente en las diversas lesiones, y considerando el hecho de que valorar solamente 10 casos de ND y 4 casos de NCC/DA resta significación estadística a los resultados. Por otro lado, estos patrones son totalmente distintos a los observados en nevus celulares típicos, especialmente en cuanto al porcentaje de células positivas. Es decir, existe gran similitud inmunohistoquímica entre las diversas lesiones névicas del SND, a pesar de que algunas de ellas carezcan de la atipia melanocítica necesaria para establecer el diagnóstico de ND, mientras las diferencias son

claras con los nevus típicos. Y esta similitud inmunohistoquímica podría relacionarse con dos hechos: en primer lugar, si el anticuerpo monoclonal HMB-45 reconoce solamente melanocitos inmaduros o estimulados, los resultados obtenidos indicarían que el mayor porcentaje de células marcadas en el SNDF, independientemente de cumplir los criterios de ND o no, serían células activas a diferencia de las observadas en los NCC comunes y, en segundo lugar, serían además células con alto índice proliferativo (alto porcentaje de células en fase S), y más en relación con el grado de displasia histológica observada.

Así pues, podríamos considerar que el estudio de la expresión del antígeno HMB-45 y de la actividad proliferativa nuclear podría ser útil en casos de duda ante un posible ND que no cumpla todos los criterios, y podríamos igualmente considerar que la semejanza inmunohistoquímica observada entre las distintas lesiones del SNDF, junto a las diferencias existentes entre el grupo control y los casos de este síndrome, apoyan la existencia del ND como entidad clínicopatológica propia, al menos en los casos de SNDF, y por ende, refuerzan la trascendencia de su diagnóstico para controlar aquellas lesiones pigmentadas que puedan aparecer en estos pacientes; incluso aquellas que, con características clínicas de ND, puedan mostrar características morfológicas dudosas o insuficientes para establecer el diagnóstico de ND.

RESUMEN

Unos autores consideran el nevus displásico como una variedad de nevus celular con peculiaridades morfológicas, y otros lo consideran una entidad propia precursora del melanoma maligno. La expresión de HMB-45 y PCNA podría remarcar las similitudes o diferencias entre ambos grupos, ayudando a la identificación de estos tumores. Realizamos el estudio de 14 nevus en dos hermanas gemelas de 14 años, con características clínicas de nevus displásico. De las 14 lesiones, 10 mostraban criterios histopatológicos de nevus displásico, y 4 mostraban displasia arquitectural pero no citológica. HMB-45 fue positivo en los 14 casos, sin relación con el grado de displasia, y negativo en los 5 casos control. PCNA mostró positividad en los 14 casos, mayor cuanto mayor era el grado de displasia; de los casos control, sólo uno mostró positividad débil.

En conclusión, los antígenos HMB-45 y PCNA se expresan con mayor evidencia en nevus displásico y en nevus celulares compuestos asociados a nevus displásico que en casos de nevus celulares compuestos comunes, favoreciendo la consideración de nevus displásico como entidad propia.

Palabras clave: Nevus displásico. Anticuerpo HMB-45. PCNA.

BIBLIOGRAFIA

1. Contreras F, Ferreira JA, Ortega P, Higuera IG, Cuevas J. Nevus melanocítico displásico. Revisión de 199 casos. Comunicación presentada en el XVII Congreso Nacional de Anatomía Patológica de la SEAP. Barcelona, abril 1995; 27-30.
2. Rhodes AR, Harrist TJ, Day CL, McMihm Jr, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1983; 9: 563-574.
3. Elder DE, Greene MH, Bondi EE, Clark Jr WH. Acquired melanocytic nevi and melanoma: the dysplastic nevus syndrome. In Ackerman AB: *Pathology of malignant melanoma*. Masson Monographs in Dermatopathology 1981, vol I. New York.
4. Lever WF, Schaumburg-Lever G. *Histopathology of the skin*. 7th Edition. JB Lippincott Co. Philadelphia 1990.
5. Triviño-López A, Carbajo-Pérez E, López-Muñiz A, Claros-González I, Herrero-Zapatero A. El antígeno de proliferación nuclear. Respuestas complejas a un apelativo simple. *Patología* 1994; 27: 343-347.
6. Triviño A, López-Muñiz A, Carbajo-Pérez E, Claros I, Pérez A, Pérez P, Herrero-Zapatero A. Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), p53 y organizadores nucleolares argirófilos (NORs) en nevus melanocítico y melanomas malignos. Comunicación presentada en el XVII Congreso Nacional de Anatomía Patológica de la SEAP. Barcelona abril 1995; 27-30.
7. Fortea-Baixaui JM, Oliver-Martínez V. Nuevos parámetros de valor pronóstico en el melanoma maligno. *Piel* 1995; 10: 5-7.
8. Clemente C, Cochran AJ, Elder DE, Levene A, MacKie RM, McMihm Jr, Rilke F, Cascinelli N, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: concordance among pathologists convened by the World Health Organization Melanoma Programme. *Hum Pathol* 1991; 22: 313-319.
9. Mihm Jr MC, Googe PB. Dysplastic nevus. In *Problematic pigmented lesions. A case method approach*. Lea & Febiger 1990. Philadelphia.
10. Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Ann J Pathol* 1986; 123: 195-203.
11. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 recognizes stimulated melanocytes. *J Cutan Pathol* 1989; 16: 49-53.
12. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 staining of dysplastic nevi: support for a spectrum of progression toward melanoma. *Amer J Surg Pathol* 1989; 13: 680-684.
13. Sun J, Morton Jr TH, Gown AM. Antibody HMB-45 identifies the cells of blue nevi. An immunohistochemical study on paraffin sections. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 748-751.
14. McNutt NS, Urmacher C, Hoss DM, Lugo JR. La utilidad del anticuerpo monoclonal HMB-45 en el diagnóstico de las lesiones melanocíticas. *Patología*

- 1991; 24: 93-98.
15. Palazzo J, Duray PH. Typical, dysplastic, congenital and spitz nevi: a comparative immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1989; 20: 341-346.
 16. Kuwata T, Kitagawa M, Kasuga T. Proliferative activity of primary cutaneous melanocytic tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423: 359-364.

