



**HOSPITAL CENTRAL**  
**DR. IGNACIO MORONES PRIETO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Trabajo de investigación para obtener el diploma en la especialidad de Anatomía Patológica

**Inmunoexpresión de los anticuerpos Bcl-2 y Cyclina D1 en biopsia endometrial para diagnóstico diferencial entre Neoplasia Intraepitelial Endometrial y Carcinoma Endometrial de tipo endometriode Grado uno en pacientes del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.**

**Dr. Juan Antonio Pérez Méndez**

DIRECTOR CLÍNICO  
Dr. David Martínez Galla

CO-DIRECTOR  
Dra. Mary Carmen Gutiérrez Gil

DIRECTOR METODOLÓGICO  
Dr. Héctor Gerardo Hernández Rodríguez

Febrero de 2022.



HOSPITAL CENTRAL  
DR. IGNACIO MORONES PRIETO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE MEDICINA

Trabajo de investigación para obtener el diploma en la especialidad de  
Anatomía Patológica

**Inmunoexpresión de los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1 en biopsia  
endometrial para diagnóstico diferencial entre Neoplasia Intraepitelial  
Endometrial y Carcinoma Endometrial de tipo endometriode Grado  
uno en pacientes del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.**

**Dr. Juan Antonio Pérez Méndez**

DIRECTOR CLÍNICO

Dr. David Martínez Galla

CO-DIRECTOR CLÍNICO

Dra. Mary Carmen Gutiérrez Gil

DIRECTOR METODOLÓGICO

Dr. Héctor Gerardo Hernández Rodríguez

SINODALES

Dra. Nadia Judith Gómez Hernández  
Sinodal

---

Dra. Olga Johnson Ponce  
Sinodal

---

Dra. Claudia Peña Zepeda  
Sinodal

---

Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle  
Sinodal suplente

---

Febrero de 2022



Inmunoexpresión de los anticuerpos Bcl-2 y Cyclina D1 en biopsia endometrial para diagnóstico diferencial entre Neoplasia Intraepitelial Endometrial y Carcinoma Endometrial de tipo endometriode Grado uno en pacientes del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. by Juan Antonio Pérez Méndez is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## RESUMEN.

**INTRODUCCIÓN:** El diagnóstico histopatológico de lesiones endometriales en productos de biopsia o legrado en ocasiones llega a ser impreciso, debido a la similitud morfológica entre una Neoplasia Intraepitelial Endometrial (NIE) y un Adenocarcinoma Endometrial de tipo Endometriode Grado I (CE), añadiéndose frecuentemente como factor adverso el muestreo insuficiente de tejido, a diferencia de los especímenes de histerectomía, donde se cuenta con la posibilidad de muestreo de diferentes áreas del útero. La sobreexpresión y alteración en la regulación de Ciclina D1 y Bcl-2, han sido sugeridos como factores relacionados a la carcinogénesis de las lesiones endometriales pre invasoras e invasoras, hipotéticamente aumentando su inmunexpresión, conforme se desarrolla el proceso de carcinogénesis. **OBJETIVO:** determinar el rol de los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1 como herramienta de diagnóstico diferencial entre neoplasias intraepiteliales endometriales y carcinomas endometriales endometrioides grado I, evaluando su inmunexpresión en ambas lesiones. **SUJETO Y MÉTODOS:** se utilizaron un total de 79 biopsias de endometrio embebidas en bloques de parafina en un periodo de diez años (Neoplasia Intraepitelial Endometrial 41, Carcinoma Endometrial Endometriode Grado I 38), las cuales fueron evaluadas en términos de expresión inmunohistoquímica para los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1. **RESULTADOS** Los datos de la inmunexpresión de los 79 casos fueron analizados estadísticamente, registrando para el anticuerpo Bcl-2 en 41 casos de NIE, 30 positivos y 11 negativos, en tanto que en los 38 casos de CE, 30 resultaron positivos y 8 fueron negativos ( $P=0.917$ ), Por otro lado, la inmunexpresión del anticuerpo Ciclina D1 en NIE, resultó positiva en 37 casos, contra 4 negativos, en tanto que en CE, 30 casos resultaron positivos, contra 8 negativos. ( $P=0.591$ ), dando como resultado el predominio de la inmunexpresión positiva de ambos anticuerpos tanto en la lesión precursora de carcinoma endometrial endometriode, como en la lesión invasora; **CONCLUSIONES:** Los resultados obtenidos hasta el momento, no logaron comprobar significancia estadística que asocie la inmunexpresión positiva de los anticuerpos comprendidos en el estudio con alguna de las lesiones en particular, y por lo tanto, no

representan utilidad para el diagnóstico diferencial entre las lesiones comprendidas en éste protocolo.

**PALABRAS CLAVE:**

*Bcl-2, Ciclina D1  
Inmunohistoquímica,  
Neoplasia, Intraepitelial, Endometrial.  
Adenocarcinoma, Endometrioides, bien, diferenciado.*

## ÍNDICE

	Página
Resumen .....	5
Índice.....	7
Lista de cuadros .....	9
Lista de figuras .....	10
Lista de abreviaturas .....	11
Lista de definiciones .....	12
Dedicatorias .....	13
Agradecimientos .....	14
Antecedentes .....	15
Justificación .....	25
Hipótesis .....	27
Objetivos .....	28
Sujetos y métodos .....	29
Análisis estadístico .....	31
Ética .....	36
Resultados .....	37
Discusión .....	43
Nuevas perspectivas de investigación .....	46
Conclusiones .....	47
Bibliografía .....	48
Anexo 1. Carta de aprobación por el comité de investigación .....	51

Anexo 2. Carta de confidencialidad de datos.....	53
Anexo 3. Carta de aprobación por comité de Ética en Investigación.....	54
Anexo 4. Carta de aprobación y número de registro.....	55
Anexo 5. Fichas técnicas de los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1.....	56

## LISTA DE CUADROS

Página

<b>Tabla 1.</b> Comparación entre las clasificaciones OMS 1994 y 2014 de las lesiones endometriales precancerosas. ....	17
<b>Tabla 2.</b> Criterios diagnósticos de Neoplasia Intraepitelial Endometrial.....	18
<b>Tabla 3.</b> Cuadro de variables.....	32
<b>Tabla 4.</b> Número de casos por tipo de lesión evaluados en el estudio.....	37
<b>Tabla 5.</b> Edades de los casos de Neoplasia Intraepitelial Endometrial.....	37
<b>Tabla 6.</b> Edad de los casos de Adenocarcinoma Endometrial Endometriode Grado I.....	37
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la inmunexpresión del anticuerpo BCL-2 en Neoplasias Intraepiteliales Endometriales y en Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I.....	39
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la inmunexpresión del anticuerpo Ciclina D1 en Neoplasias Intraepiteliales Endometriales y en Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I.....	40
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la metodología y estadística aplicados según el test de Wilcoxon - Mann/Whitney.....	41
<b>Tabla 10.</b> Frecuencia e intensidad de la inmunexpresión de los anticuerpos Ciclina D1 y Bcl2 en NIE y CE.....	41

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la vía apoptótica intrínseca que demuestra un proceso escalonado desde la detección de señales de estrés hasta la disfunción organelar.....	22
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la función de la familia de las ciclinas en las fases del ciclo celular.....	23
<b>Figura 3.</b> Fórmula del método de Schlesselman para el cálculo del tamaño de la muestra del estudio.....	31
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografías demostrando la Inmunoexpresión de los anticuerpos BCL-2 y Ciclina-D1 en Neoplasia Intraepitelial Endometrial. Fotomicrografías demostrando la Inmunoexpresión de los anticuerpos BCL-2 y Ciclina-D1 en Adenocarcinoma Endometrial Endometriode Grado 1.....	38
<b>Figura 5.</b> Gráfica que presenta la distribución ordenada de valores de H-Score según el resultado de la inmunoexpresión del anticuerpo BCL-2 en Neoplasias Endometriales Intraepiteliales y Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado 1.....	39
<b>Figura 6.</b> Gráfica que demuestra la distribución ordenada de valores de H-Score según el resultado de la inmunoexpresión del anticuerpo Ciclina D1 en Neoplasias Endometriales Intraepiteliales y Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado 1.....	40
<b>Figura 7.</b> Gráfica demostrando la frecuencia ordenada en porcentajes de la inmunoexpresión e intensidad de la misma, de los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **NIE:** Neoplasia Intraepitelial Endometrial.
- **CE:** Carcinoma Endometrial.
- **HA:** Hiperplasia con Atipia.
- **IC:** Intervalo de confianza.
- **RE:** Receptor de estrógenos.
- **Ca<sup>2+</sup>:** Calcio.
- **HPF:** “*High Power Field*” (Campo de alto poder)

## LISTA DE DEFINICIONES

- **Carcinogénesis:** Proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas. También se llama carcinogénesis.
- **Hiperestrogenismo:** Aumento de la acción tisular estrogénica, derivada, en la mayoría de casos, de un incremento de la síntesis y secreción de estrógenos. Desde el punto de vista clínico se caracteriza por hiperplasia endometrial y menorragias.
- **Pleomorfismo:** variación en el tamaño y la forma de las células o sus núcleos.
- **Atipia:** alteración que afecta la forma de las células, su tamaño y el proceso de división de las mismas. Sencillamente es un cambio en la morfología celular normal.
- **Villoglandular:** proliferación celular exofítica, arquitecturalmente caracterizada por estructuras papilares largas y delgadas.
- **Cribiforme:** perforado con orificios pequeños como en un colador. Se refiere a la apariencia de un tumor cuando se observa bajo un microscopio.
- **Desmoplasia:** fenómeno de producción excesiva de tejido conectivo, pobre en células y rico en fibras de colágeno, que suele acompañar a algunos tumores malignos.

## **DEDICATORIAS:**

A mi Padre; lo logramos.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Laura, que siempre ha estado a mi lado presencialmente o a la distancia durante todos estos años de esfuerzo y dedicación. A mis padres, hermana y sobrinos.

A todo el personal del departamento de anatomía patológica del hospital central "Dr. Ignacio Morones Prieto". En especial a la Dra. Mary Carmen Gutiérrez Gil, Dra. Olga Johnson Ponce y Dr. David Martínez Galla, por su paciencia, entrega y servicio durante su tutoría y acompañamiento en mi formación.

## 1. ANTECEDENTES

### EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma de endometrio es la neoplasia maligna del aparato genital femenino que se presenta con mayor frecuencia estadística en naciones desarrolladas, al unísono, en las naciones en proceso de desarrollo, el cáncer cervicouterino se posiciona en el lugar número uno.<sup>1</sup>

En los Estados Unidos de América se registraron 50,000 nuevos casos y alrededor de 8,000 muertes en 2013. El porcentaje de posibilidades de una mujer de ser diagnosticada con carcinoma de endometrio durante su vida, es de 2.6%. La frecuencia de la edad de presentación es entre los 50 y 70 años con una media de 61 años cumplidos .<sup>2</sup>

De acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, en México el cáncer de endometrio se posiciona el tercer lugar de las neoplasias malignas ginecológicas, después del cáncer del cuerpo uterino y del ovárico. Durante el año 2003, registró 2.16% del total de las neoplasias malignas femeninas.<sup>3</sup> La alta incidencia, se encuentra relacionada al aumento en la esperanza de vida en las mujeres, a los tratamientos a base de tamoxifeno y al incremento de la obesidad como factor de riesgo en la población.<sup>4</sup>

### FISIOPATOLOGÍA

- **Carcinogénesis del adenocarcinoma endometrial endometrioide.**

---

*La hiperplasia endometrial es una causa importante de sangrado uterino anormal, y el precursor más frecuente de carcinoma endometrial. Se define como una proliferación aumentada de las glándulas endometriales con respecto al estroma, que resulta en una mayor relación glándulas/estroma, comparado con el endometrio proliferativo normal. Los estudios clínico-patológicos y epidemiológicos, han respaldado el potencial maligno de la*

*hiperplasia endometrial y el concepto de que las lesiones glandulares proliferativas se disponen a lo largo de un espectro que, en algunos casos, culmina en carcinoma. El riesgo estimado de progresión de hiperplasia con atipia a carcinoma endometrial tipo I es de 8 a 29%. Los estudios moleculares han confirmado esta relación, porque la hiperplasia endometrial y el carcinoma tipo I, comparten alteraciones genéticas específicas adquiridas en genes relacionados con la oncogénesis. (Kumar V., Abbas A. Robbins y Cotran 2015, pp 1012-1013).<sup>5</sup>*

---

- **Factores de riesgo**

*La hiperplasia endometrial se asocia a una estimulación estrogénica prolongada del endometrio, que puede deberse a anovulación, aumento de la producción de estrógenos en fuentes endógenas o administración de estrógenos exógenos. Las situaciones asociadas son: obesidad, menopausia, síndrome de ovario poliquístico, tumor de células de la granulosa funcional de ovario, función cortical ovárica excesiva, tratamiento sustitutivo con estrógenos. (Kumar V., Abbas A. Robbins y Cotran 2015, pp 1012-1013)<sup>5</sup>*

---

## **CAMBIOS EN LA CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA**

La clasificación de la hiperplasia endometrial ha gozado de numerosa terminología a través de los años. De acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud “OMS 1994”, basada en complejidad glandular y atipia nuclear, la hiperplasia endometrial se divide en cuatro grupos: hiperplasia endometrial sin atipia (simple, compleja), e hiperplasia endometrial con atipia (simple y compleja). El Colegio Americano de Ginecoobstetras y la Sociedad de Oncoginecólogos, declaran que la clasificación Neoplasia Intraepitelial Endometrial (NIE), es superior a la de la Organización Mundial de la Salud (OMS 1994) para el reporte histopatológico de la hiperplasia endometrial. Sin embargo, el sistema de clasificación de la OMS, permanece como el más común en uso y reporte en la literatura existente.

La nueva clasificación OMS 2014, aceptada por la Sociedad Internacional de Ginecopatólogos, divide hiperplasia en dos grupos: Hiperplasia endometrial simple e

Hiperplasia endometrial con atipia (HA)/Neoplasia Intraepitelial endometrial (NIE) (Tabla 1). El esquema de clasificación OMS 2014 es más susceptible a identificar exitosamente lesiones pre malignas que la clasificación OMS 1994, por lo cual será la clasificación empleada en este protocolo.<sup>6</sup>

Tabla 1. Comparación entre las clasificaciones OMS 1994 y 2014 de las lesiones endometriales precancerosas.

CLASIFICACIÓN OMS 1994/2003	CLASIFICACIÓN OMS 2014
Hiperplasia endometrial simple	<b>Hiperplasia endometrial sin atipia</b>
Hiperplasia endometrial compleja	
Hiperplasia endometrial simple con atipia	<b>Hiperplasia endometrial con atipia (HA)/Neoplasia Intraepitelial Endometriode (NIE)</b>
Hiperplasia endometrial compleja con atipia	

Tomado de: Yee Khong, MD, FRCPath, FRCPA “Diagnostic Endometrial Pathology”, Segunda edición 2019 por Taylor & Francis Group, LLC

- **Hiperplasia Endometrial sin atipia “OMS 2014”**

Es una proliferación exagerada de glándulas de tamaño y forma irregulares, con un incremento asociado en la proporción glándula/estroma, en comparación con el endometrio proliferativo, pero sin atipia citológica significativa.

Histopatológicamente las glándulas presentan una variación en tamaño y forma y pueden encontrarse separadas por cantidades variables de estroma, incluyendo superposición “espalda con espalda”, con una pequeña porción de estroma interviniente. Las glándulas se encuentran irregularmente distribuidas, creando una densidad variable entre glándulas y estroma. Mientras algunas glándulas pueden presentar una arquitectura normal “en rosca”, otras presentan ramificaciones, o dilatación quística. El epitelio es de tipo columnar estratificado, con mitosis frecuentes.<sup>7</sup>

- **Hiperplasia endometrial con Atipia/Neoplasia Intraepitelial Endometrial (NIE) “OMS 2014”**

Es una proliferación monoclonal de glándulas endometriales pre malignas, las cuales se caracterizan por alteraciones arquitectónicas y citológicas, que son propensas a transformación maligna hacia adenocarcinoma endometrial endometriode (tipo I). Esta lesión se caracteriza por presentar atipia citológica superpuesta sobre una hiperplasia endometrial. El promedio de la edad de presentación es 53 años de edad, teniendo como riesgo principal el hiperestrogenismo exógeno o endógeno. El sangrado postmenopáusico o sangrado uterino anormal en mujeres peri menopáusicas, es el síntoma más común presentado.

En el desarrollo de ésta, se encuentra implicada la mutación con inactivación de PTEN, un gen supresor de tumores; así mismo se han encontrado mutaciones de genes reparadores “*mismatch*” de *KRAS* y de *beta-catenina*.

Histopatológicamente, se caracteriza por agregados superpuestos de glándulas tubulares o con ramificaciones citológicamente alteradas. La distinción entre hiperplasia endometrial con y sin atipia, está basada en la atipia nuclear, la cual puede incluir aumento de tamaño, pleomorfismo, redondeo, pérdida de la polaridad y presencia de nucléolos. La atipia nuclear es variable, tanto de manera cualitativa como cuantitativa. A menudo esta lesión, está acompañada de cambios metaplásicos, los cuales no tienen relevancia en el comportamiento clínico, pero por los cambios nucleares que presentan, agregan dificultad en el diagnóstico de atipia nuclear.<sup>7</sup>

El diagnóstico histopatológico para NIE presenta un cuadro morfológico amplio el cual se resume en la tabla siguiente (tabla 2):

CRITERIO HISTOPATOLÓGICO	DEFINICIÓN	PAUTAS PARA APLICACIÓN
<b>SUPERPOSICIÓN GLANDULAR</b>	La relación glándula-estroma debe exceder 1:1	En la práctica, 55% del tejido debe estar compuesto de glándulas/estroma. Esta característica es determinada mejor a bajo aumento.
<b>DEMARCACIÓN CITOLÓGICA</b>	Las glándulas superpuestas deben diferir citológicamente del endometrio circundante.	Una vez que sea notada un área de superposición glandular, deberá analizarse cuidadosamente la citología de ese foco, para observar si difiere con el resto del endometrio normal circundante. Se recomienda a 10-20x
<b>TAMAÑO</b>	El tamaño de la lesión debe ser mayor de 1mm.	El objetivo de 10x en la mayoría de los microscopios, abarca un área aproximada de 2mm; por lo tanto, si la

		lesión es mayor a medio campo de 10x, es seguramente mayor de 1mm.
<b>EXCLUSIÓN DE LESIONES IMITADORAS</b>	Lesiones imitadoras reactivas o neoplásicas deben ser excluidas.	Hay que confirmar que lesiones imitadoras como metaplasia, endometrio secretor, pólipos y endometrio basal, no se encuentren presentes.

**Tabla 2. Criterios diagnósticos de Neoplasia Intraepitelial Endometrial.** (Tomado de "Diagnostic Endometrial Pathology Second edition" T. Yee Annie N. 2019 pág. 95)

## **CARCINOMA ENDOMETRIAL TIPO I (ENDOMETRIOIDE)**

Es una neoplasia glandular que presenta una configuración acinar, papilar, o parcialmente sólida, pero que carece de las características nucleares del carcinoma seroso endometrial.

Bokhman propuso que los carcinomas endometriales son patogénicamente divisibles en tipo I y tipo II. Los factores de riesgo entre los carcinomas tipo I (Adenocarcinoma endometrioide de bajo grado y sus variantes) son similares. Mujeres postmenopáusicas con concentraciones totales altas de estrógenos, síndrome de ovario poliquístico, tumores ováricos productores de estrógenos, menarca temprana, menopausia tardía, nuliparidad u obesidad, se encuentran en riesgo de presentar esta condición.

Clínicamente, la edad diagnóstica es en promedio a los 63 años de edad y el 90% de las pacientes, cursa con algún tipo de descarga vaginal, por lo general sangrado anormal. Pacientes con estenosis cervical, pueden presentar dolor pélvico, así como células glandulares malignas, pueden ser encontradas en citología cervicovaginal. Las mujeres con enfermedad avanzada, pueden presentar distensión abdominal y sensación de opresión y dolor pélvico.

Histopatológicamente, el carcinoma endometrioide tipo I, presenta típicamente una arquitectura glandular o villoglandular revestida por epitelio columnar estratificado con arquitectura superpuesta, ramificante y compleja. La celularidad de revestimiento, es usualmente columnar y comparte un borde apical común con las células adyacentes, resultando en un lumen glandular suavemente contorneado. El citoplasma de las células neoplásicas, es eosinófilo y granular; la atipia nuclear usualmente es de leve a moderada con nucléolos discretos, excepto en los carcinomas poco diferenciados.

La distinción entre carcinoma endometriode bien diferenciado y neoplasia intraepitelial endometrial está basada en la presencia de invasión estromal, definida por la pérdida de estroma interpuesto (un patrón glandular confluyente o cribiforme), estroma endometrial alterado (reacción desmoplásica) o arquitectura papilar (patrón villoglandular).<sup>7</sup>

- **Clasificación clínico-patológica.**

---

*Carcinoma endometrial Tipo I: tumores de histología endometriode grado 1 o 2; estos comprenden aproximadamente 80% de los carcinomas de endometrio. Tienen un mejor pronóstico y son sensibles a estrógenos. Pueden ser precedidos de hiperplasia endometrial compleja o atípica.*

*Carcinoma endometrial Tipo II: representan entre 10 y 20% de los carcinomas de endometrio. Incluyen los tumores endometrioides grado III, así como los tumores de histología no endometriode: seroso, mucinoso, de células claras, escamoso, de células transicionales, mesonéfrico e indiferenciado. Estos tumores tienen peor pronóstico, son de alto grado y no están asociados con estimulación estrogénica. Raramente presentan una lesión precursora.<sup>8</sup>*

*(Leslie KK, Thiel KW, Goodheart MJ, De Geest K, Jia Y, Yang S. Endometrial Cancer. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 2012;39(2): 255-68)*

---

- **Diagnóstico clínico.**

---

*El diagnóstico se realiza mediante la evaluación de la biopsia de endometrio, legrado uterino, o histerectomía.<sup>9</sup> La biopsia de endometrio puede realizarse en el consultorio empleando una cánula de Novak o Pipelle, ya sea bajo visión directa mediante: histeroscopia, dilatación-curetaje o haciendo un legrado fraccionado, cuya sensibilidad para establecer el diagnóstico es de 78% (intervalo de confianza [IC] al 95%: 76.3-79.6%) y su especificidad de 95.8% (IC al 95%: 95-96.1%).<sup>10</sup>*

*(Werner HM, Trovik J, Marcickiewickz J, Tingulstad S, Staff AC, Engh ME, et al. A discordant histological risk classification in preoperative and operative*

---

- **Histopatología del carcinoma endometrial de tipo endometriode.**

Los carcinomas endometrioides generalmente consisten en glándulas de tipo endometrial ramificadas, complejas y consecutivas, de diferenciación variable con estroma intermedio nulo o mínimo. Las estructuras cribiformes se forman cuando las células tumorales crecen más dentro de las luces glandulares. Ocasionalmente, se puede ver el patrón villoglandular (arquitectura papilar). Las glándulas tumorales están típicamente revestidas por epitelio columnar estratificado. El citoplasma de las células neoplásicas suele ser eosinófilo y granular, y las células del revestimiento comparten un borde apical común que da como resultado una luz glandular con contorno suave. La atipia nuclear suele ser de leve a moderada, con nucléolos discretos. Sin embargo, el carcinoma pobremente diferenciado con núcleos de grado III no es infrecuente.<sup>11</sup>

## **EL ROL DE CICLINA-D1 y BCL-2 EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS LESIONES ENDOMETRIALES PRECURSORAS DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL.**

### **BCL-2**

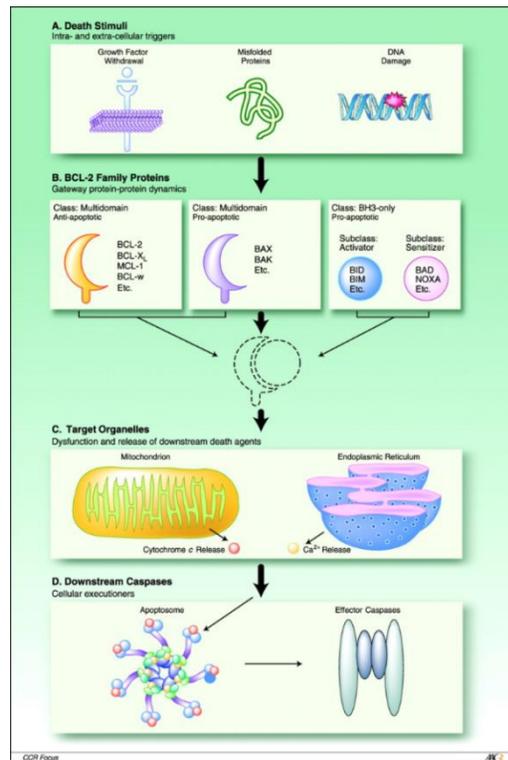
Apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso complejo en el cual Bcl-2 tiene un papel importante. Bcl-2 es un protooncogén que actúa previniendo la apoptosis y, por lo tanto, prolonga la supervivencia celular. Se ha encontrado que la expresión de Bcl-2 es hormonalmente regulada en el endometrio, porque sigue de cerca los niveles de receptor de estrógeno (RE), con pico de actividad en fase proliferativa cuando ocurre la máxima expresión de RE. Por lo tanto, se ha sugerido que los desequilibrios entre proliferación y apoptosis estén involucrados directamente en el desarrollo de lesiones endometriales como hiperplasia, pólipos y carcinoma.<sup>12,13</sup>

Laban Et al., Simin Et al. y Cai Et Al.<sup>14,15,16</sup>, reportaron como resultado de sus publicaciones, una inmunexpresión positiva del anticuerpo Bcl-2 predominante en tejido endometrial con diagnóstico de adenocarcinoma endometriode Grado I, en comparación con el tejido endometrial con diagnóstico de hiperplasia con atipia. Por el contrario, las publicaciones de Risberg Et al., Hassan Et al. y Trabzonlu Et al.<sup>17,18,19</sup>, realizadas con las mismas lesiones de tejido endometrial, reportaron una

inmunoexpresión positiva del anticuerpo Bcl-2 predominante en las muestras con diagnóstico histopatológico de hiperplasia con atipia. (ver Figura 1)

Representación esquemática de la vía apoptótica intrínseca que demuestra un proceso escalonado desde la detección de señales de estrés hasta la disfunción organelar.

**Figura 1.** Las señales de estrés de una variedad de agresiones, son detectadas por las proteínas proapoptóticas sólo BH3 y comunicadas a las proteínas Bcl-2 proapoptóticas y antiapoptóticas multidominio. La interacción funcional de las proteínas finalmente resulta en la activación de BAX y BAK en los organelos objetivo, como las mitocondrias y retículo endoplásmico, que participan en la apoptosis al liberar factores apoptogénicos y Ca<sup>2+</sup>, respectivamente.<sup>20</sup>

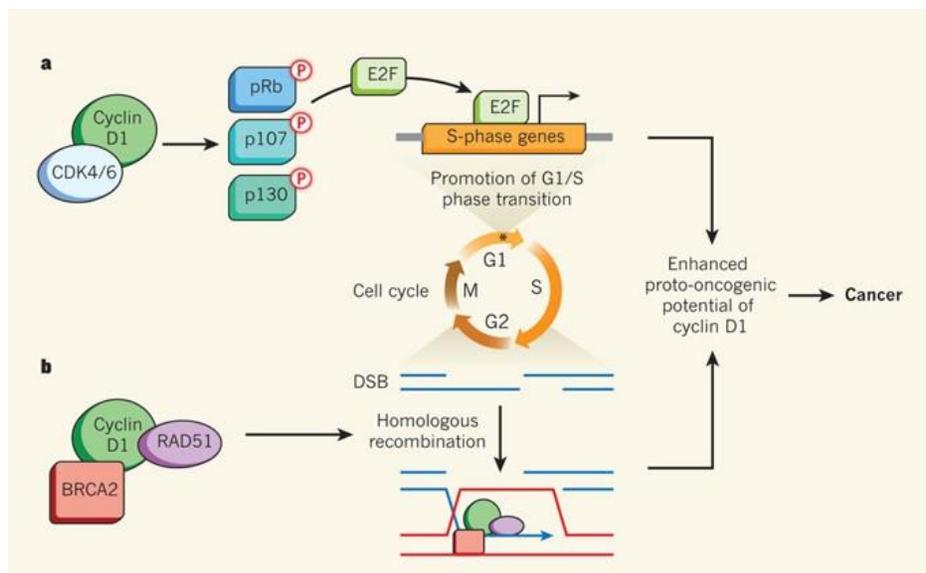


## Ciclina D1.

Las ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas y productos de genes supresores tumorales, interactúan y regulan el ciclo celular normal. Se requieren Ciclina D1 y quinasas dependientes de ciclina para completar la transición G1 / S en células normales de mamíferos. Ciclina D1 (PRAD-1, CCND-1) se encuentra en el cromosoma 11q13 y exhibe muchas características de oncogenes celulares. La sobreexpresión de Ciclina D1 se asocia con linfoma de células del manto, carcinoma epidermoide de células del cuello uterino, carcinoma de ovario, cáncer de mama, carcinoma de células de transicionales de la vejiga urinaria, y carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.<sup>21,22</sup> (ver figura 2)

Los mecanismos de la desregulación de la Ciclina D1 en las neoplasias endometriales, no están bien definidos, pero es muy probable que la desregulación contribuya a un aumento en la proporción de células en transición de G1 a fase S. La sobreexpresión de Ciclina D1, puede ser uno de los varios mecanismos involucrados en la neoplasia endometrioide, glándulas endometriales y estroma proliferativo, incluso cuando su actividad mitótica no sobreexpresa Ciclina D1. <sup>21,22</sup>

Previamente, Nikaido *et al*; detectaron sobreexpresión de Ciclina D1 en el 40% (30/74) de los casos con adenocarcinoma endometrial, comparado con 68% reportado por Quddus *et al*. Demostrando el último estudio, tendencia a la expresión preferentemente en adenocarcinoma endometrial versus neoplasia intraepitelial endometrial. <sup>21,22</sup>



**Figura 2.** Como parte de su función en el ciclo celular, la Ciclina D1 interactúa con las enzimas CDK4 o CDK6, iniciando la fosforilación (P) de la familia de retinoblastoma de represores transcripcionales (pRb, p107, p130). Como resultado, los factores de transcripción E2F se liberan, lo que permite la síntesis de genes de fase S5. Esta actividad de ciclina D1-CDK4 / 6 alcanza su punto máximo en la fase G1 tardía (asterisco) y se encuentra entre los principales determinantes del inicio de la replicación del ADN y la finalización autónoma del ciclo celular. <sup>23</sup>

## IMPORTANCIA CLÍNICO-PATOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN DE BCL-2 Y CICLINA D1 EN LAS LESIONES ENDOMETRIALES.

Distinguir entre lesiones in situ, e invasoras, tiene implicaciones clínicas significativas porque distintas condiciones pre malignas endometriales requieren una intervención

adecuada. Las alteraciones de los genes involucrados en el desarrollo de las lesiones precursoras y del carcinoma endometrial, tienen posibilidad de debutar de formas variadas, y dado que las alteraciones oncogénicas tienden a involucrar genes que son reguladores del ciclo celular y con funciones apoptóticas, la mayoría de los tipos de alteraciones, resultan de un sistema compuesto de activación de oncogenes y de inactivación de genes supresores de tumorales. La evaluación simultánea de la inmunoexpresión de Bcl-2 y Ciclina D1, que intervienen tanto en la apoptosis, como en la progresión del ciclo celular, en la carcinogénesis representarán una herramienta tanto diagnóstica diferencial entre las lesiones comprendidas en las variables de este protocolo, al esperar una sobreexpresión mayor de uno o de ambos anticuerpos conforme se lleva a cabo el proceso de transformación de neoplasia intraepitelial endometrial a carcinoma endometrial y la proliferación de sus células neoplásicas.

El riesgo de cáncer coexistente en mujeres con diagnóstico de hiperplasia endometrial en la evaluación de muestras de biopsia / curetaje endometrial se debe a limitaciones tanto en el muestreo endometrial como en las diferencias de clasificación diagnóstica entre los patólogos. Existen factores que limitan el diagnóstico histopatológico de las biopsias de legrado endometrial, como lo son datos clínicos insuficientes, muestreo inadecuado, además de dificultades técnicas, como una fijación inadecuada y una calidad de tinción deficiente, la falta de experiencia del patólogo en la evaluación del tejido del endometrio, por lo cual es imperativo optimizar el material recibido por el departamento de patología para ofrecer una certeza diagnóstica en los casos mencionados. Allison KÍ, Reed SD, Voigt LF, et al. han informado que la insuficiencia de material es la principal causa de diagnóstico erróneo.<sup>24</sup>

Histopatológicamente, muchas de las características de diagnóstico de atipia (irregularidad nuclear, pérdida de polaridad, nucléolo prominente, engrosamiento de cromatina) también se pueden observar en irregularidades hormonales, regeneración y cambios metaplásicos. La hiperplasia endometrial es una de las lesiones más comúnmente diagnosticadas erróneamente (sobre diagnosticadas)<sup>25</sup>. Los pólipos endometriales a menudo se diagnostican como hiperplasia debido a problemas de fijación, mala conducción de secciones y legrado por sangrado excesivo<sup>26</sup>.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La neoplasia endometrial Intraepitelial, y el adenocarcinoma de endometrio de tipo de endometriode grado I, son lesiones que presentan problema diagnóstico y de clasificación imprecisa, debido a similitud morfológica y la insuficiente cantidad de tejido muestreado en una biopsia o legrado endometrial. A diferencia de los especímenes de histerectomía, donde se cuenta con la posibilidad de muestreo de diferentes áreas del útero. En la literatura existen estudios de la inmunoexpresión de Bcl-2 y Ciclina D1 en tejido endometrial, tomando en cuenta ambos anticuerpos por separado, los cuales han mostrado resultados contradictorios, pero aún no existe ningún estudio comparativo entre los marcadores mencionados que incluya hiperplasias con atipia/neoplasias Intraepiteliales y adenocarcinomas endometriales Endometrioides Grado I con el objetivo principal de ser un referente para apoyo de un diagnóstico diferencial entre las lesiones comprendidas en este protocolo.

Es importante la correcta clasificación de estas lesiones debido al manejo interdisciplinario clínico según el reporte histopatológico; por lo cual se pretende evaluar la sobreexpresión por inmunohistoquímica en biopsias de endometrio como método auxiliar en el diagnóstico diferencial entre neoplasias intraepiteliales endometriales y adenocarcinomas endometrioides de endometrio Grado I.

Actualmente en la literatura encontrada, no existe registro de que se hayan realizado estudios de este tipo en población mexicana.

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe diferencia significativa en la inmunoexpresión de Ciclina D1 y Bcl-2 en el adenocarcinoma endometrioide Grado I y la Neoplasia Intraepitelial Endometrial?

#### **4. HIPÓTESIS**

Se encontrará mayor inmunexpresión de Ciclina D1 y Bcl-2 en el adenocarcinoma endometrial endometriode (Grado I) en comparación con la Neoplasia Intraepitelial Endometrial.

## 5. OBJETIVOS

### **General:**

- Evaluar si existe diferencia significativa en la inmunoexpresión de Ciclina D1 y Bcl-2 para el diagnóstico diferencial entre Neoplasia endometrial intraepitelial y adenocarcinoma de endometrio en biopsias de pacientes del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

### **Específico:**

- Determinar la capacidad de los anticuerpos Ciclina D1 y Bcl-2 como prueba auxiliar para el diagnóstico diferencial entre las neoplasias endometriales intraepiteliales y carcinomas endometrioides de endometrio Grado I.

### **Secundario:**

- Reclasificar las lesiones endometriales precursoras del carcinoma endometrial tipo I comprendidas en éste estudio, de acuerdo a la nomenclatura OMS 2014, la cual ha demostrado ser la óptima para reducir la variabilidad inter observador considerando únicamente las previamente diagnosticadas como “Hiperplasia Endometrial simple y compleja con atipia”, las cuales se traducirán a “Neoplasia Intraepitelial Endometrial”.

## 6. SUJETOS Y MÉTODOS

Bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de Neoplasia Intraepitelial Endometrial y adenocarcinoma endometrial endometriode Grado I, obtenidas por biopsias endometriales y legrados uterinos registrados en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” durante el periodo comprendido del primero de enero de 2009, al 31 de noviembre de 2019.

### **Criterios de selección.**

Inclusión:

- Biopsias de endometrio embebidas en bloque de parafina con diagnóstico histopatológico de neoplasia Intraepitelial endometrial y adenocarcinoma de endometrio tipo endometriode Grado I.
- Disponibilidad de bloques de parafina en el archivo.

Exclusión:

- Especímenes de estudio Transoperatorio.

Eliminación:

- Bloques de parafina mal preservados o dañados.

### **Variables en el estudio.**

Variables Dependientes:

- Inmunoexpresión de Bcl-2 y Ciclina D1

Variable Independiente:

- Biopsias de endometrio admitidas en el servicio de anatomía patológica por motivo de sangrado uterino anormal o disfuncional.

Variables de control:

- Edad
- Sexo
- Tipo histológico

### **Diseño de estudio:**

- Retrospectivo y comparativo.

**Factibilidad:**

- Es un estudio factible, ya que se cuenta con el equipo y la infraestructura para su realización, así como también la disponibilidad del anticuerpo, y los bloques de parafina a los cuales se les realizará el estudio de inmunohistoquímica.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico utilizado para comprobar significancia en las diferencias en los porcentajes de células con inmunexpresión positiva en cada una de las lesiones endometriales abarcadas dentro del protocolo es Análisis de Varianza paramétrico al ajustarse el modelo a la normalidad (ANOVA).

### Tipo de muestreo

- Consecutivo por conveniencia

### Cálculo del tamaño de la muestra

- Se utilizarán los bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial endometrial y carcinoma endometrial endometriode Grado I del archivo del departamento de patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” durante el periodo comprendido del 1 de enero de 2009 al 31 de noviembre de 2019.
- Se calculó el tamaño de la muestra de acuerdo a la fórmula establecida para estudio de casos y controles con el método de Schlesselman:

$n =$	$\left\{ \frac{Z_{\alpha} \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right\}^2$
	<b>Confianza %</b> <b>Potencia %</b> <b>Z =</b>
$\alpha =$	0.05 95 80 <b>1.96</b>
$\beta =$	0.20 <b>0.84</b>
$P_1 =$	0.27 Probabilidad de efecto en un grupo
$P_2 =$	0.07 Probabilidad de efecto en el otro grupo
<b>n =</b>	<b>54.2</b>
Redondeo =	<b>55.0</b>
$P =$	0.17 Promedio de las 2 probabilidades

#### Referencias:

Schlesselman J.J., Sample Size Requirements in Cohort and Case – Control Studies of Disease. Am J Epid. 99:381-384,1974.

Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies. A practical manual. Geneva: World Health Organisation, 1991.

**Figura 3.** Fórmula de Schlesselman para el cálculo del tamaño de la muestra del estudio de casos y controles.

### Prueba piloto

Se realizará prueba piloto al no contar con el suficiente número de casos requeridos según el cálculo del tamaño de muestra empleando el método de Schlesselman. Dicha prueba piloto consta de un censo de casos de neoplasias Intraepiteliales endometriales y adenocarcinomas Endometrioides grado I comprendidos en un periodo de diez años (2009-2019).

### Cuadro de Variables.

Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
<b>Independiente</b>				
<b>Biopsia o legrado endometrial con diagnóstico de Hiperplasia con atipia (NIE) / Adenocarcinoma</b>	Lesión precursora o lesión neoplásica maligna del tejido endometrial.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Neoplasia Intraepitelial endometrial</li> <li>2. Adenocarcinoma de endometrio bien diferenciado (G1)</li> </ol>	Biopsia	Categórica
<b>Dependientes</b>				
<b>Inmunoexpresión de Bcl-2</b>	La presencia de inmunoreacción membranal/citoplásmica de la células pre neoplásicas y neoplásicas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo: (&lt; 10 % de células positivas) = Score 0</li> <li>• Positivo débil: (10-30% de células positivas) = Score 1</li> <li>• Positivo moderado: (31-60% de células</li> </ul>	<b>H Score</b> [1 x (% células 1+) + 2 x (% células 2+) + 3 x (% células 3+)]	continua

		positivas) = Score 2 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo intenso: (&gt; 60% de células positivas) = Score 3</li> </ul>	Umbral de corte. 0-300	
<b>Inmunoexpresión de Ciclina-D1</b>	Presencia de inmunoreacción nuclear en las células pre neoplásicas y neoplásicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo: (&lt; 10 % de células positivas) = Score 0</li> <li>• Positivo débil: (10-30% de células positivas) = Score 1</li> <li>• Positivo moderado: (31-60% de células positivas) = Score 2</li> <li>• Positivo intenso: (&gt; 60% de células positivas) = Score 3</li> </ul>	<b>H Score</b> [1 x (% células 1+) + 2 x (% células 2+) + 3 x (% células 3+)]  Umbral de corte. 0-300	continua
<b>Edad</b>	Tiempo vivido de una persona	Años cumplidos por la paciente	Años	Continua

Tabla 3. Cuadro de Variables.

## H-SCORE

El H-score es una medida para convertir marcadores de inmunohistoquímica a un rango más cuantitativo, se utiliza para estandarizar la medición de la inmunoexpresión de los anticuerpos en las células estudiadas. Este sistema de puntuación se utiliza habitualmente para la evaluación de inmunohistoquímica; inicialmente en cáncer de mama en receptores de estrógenos, progesterona y Her2neu, siendo considerado como el “estándar de oro” en la evaluación y presentación de datos de inmunohistoquímica, por su factibilidad para realizar las mediciones se ha adaptado su utilidad en otros marcadores de inmunohistoquímica, neoplasias y tejidos como pulmón, médula ósea, colon, entre otros. <sup>27</sup> El H-Score se basa en la evaluación de intensidad de la inmunoexpresión del anticuerpo en las células estudiadas y el porcentaje de inmunoexpresión positiva de dichas células: evaluándose de la siguiente manera: negativo (0), débil (1), moderado (2) e intenso (3). Cuyo valor va de 0-300 con la siguiente fórmula:

$$[1 \times (\% \text{ células } 1+) + 2 \times (\% \text{ células } 2+) + 3 \times (\% \text{ células } 3+)]$$

En términos para la correcta aplicación del método en nuestro estudio, se sustituirán los valores de acuerdo con los indicadores de medición la fórmula de la siguiente manera:

$$(1 \times \% \text{ de células con tinción débil}) + (2 \times \% \text{ células con tinción moderada}) + (3 \times \% \text{ de células con tinción intensa}). \text{ }^{28}$$

En su estudio, Hassan y Sangwan <sup>29,30</sup> utilizaron el método de H-Score, como sistema de cuantificación para la Inmunoexpresión de Bcl-2 y Ciclina-D1 en neoplasias Intraepiteliales endometriales y adenocarcinomas endometriales tipo I bien diferenciados, de la siguiente manera:

- Intensidad de inmunoreacción: 0=negativo; 1=positivo débil; 2=positivo moderado; 3=positivo intenso

- Porcentaje de Inmunoexpresión positiva en las células estudiadas como: a= porcentaje de células positivas con tinción débil, b=porcentaje de células positivas con tinción moderada y c=porcentaje de células con tinción intensa.
- Se representa la fórmula de la siguiente manera:
  - $[(1 \times a) + (2 \times b) + (3 \times c)]$

Con fundamento en los resultados de los estudios obtenidos por Hassan y Sangwan empleando el método del H-Score en un área de cuatro campos de alto poder (4 HPF) contando por lo menos 50 células. Cuando menos del 10% de las células fueron positivas, se les asignó un score de “0”, cuando fueron positivas del 10 al 30% se les asignó un score de “1”, del 31 al 60% se les asignó un score de “2”, y más del 60% de células positivas se les asignó un score de “3”.

Realizadas las aclaraciones pertinentes anteriores por Hassan y Sangwan, y en consenso con el comité del departamento de Anatomía Patológica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, se estableció que la medición de Bcl-2 y Ciclina-D1 con H-Score, es la forma más adecuada para su evaluación estandarizada.

## 8. ÉTICA

Posterior a revisar la declaración de Helsinki (1964 y su última revisión en el 2013), en su Artículo 8 en el que se habla sobre el derecho del paciente a tomar decisiones informadas y el derecho a su autodeterminación, aunado al Artículo 5 en el que se expresa que el bienestar del paciente debe ser siempre precedente sobre los intereses de la ciencia o de la sociedad, así mismo, posterior a revisar la Norma Oficial Mexicana-004-SSA3-2012, del expediente clínico en su apartado 4.2 sobre el consentimiento informado y Ley general de salud en el su Artículo 13 en el que se expresa que toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar sumado a su Artículo 16 en el que establece que en las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice; entendido esto, y así como lo marca esta última Ley se concluye que esta es una investigación sin riesgo ya que será un estudio que emplea técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, en este estudio no están considerados cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta. Para el presente estudio no se hará participe al paciente, sólo se utilizarán los informes histopatológicos y los bloques de parafina de los mismos. Los datos con los cuales se identificará el material serán con el número de quirúrgico asignado, los cuales serán manejados con estricta confidencialidad y será sujeto a los lineamientos de COFEPRIS Y CONBIOÉTICA.

Por último, se revisó la LEY GENERAL DE PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES EN POSESIÓN DE SUJETOS OBLIGADOS, la cual en su artículo veintidós, inciso IX, establece que el responsable del manejo de una base de datos, no estará obligado a recabar el consentimiento del titular para el tratamiento de sus datos personales en caso de ser sometidos a un procedimiento previo de disociación.

## 9. RESULTADOS

### Características de la población del estudio (Casos):

En el periodo comprendido entre el 01 de enero de 2009 al 31 de diciembre de 2019 en cuanto al sexo y edad, fueron 79 casos de mujeres; 41 con diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Endometrial, y 38 con diagnóstico de Adenocarcinoma Endometrial Endometriode Grado I. Las cuales presentaron una edad promedio de 49 años cumplidos, con una mínima de 29 y una máxima de 73 años cumplidos.

Total de casos de Neoplasia Intraepitelial Endometrial	Total de casos de Adenocarcinoma Endometrial Endometriode Grado I
41	38

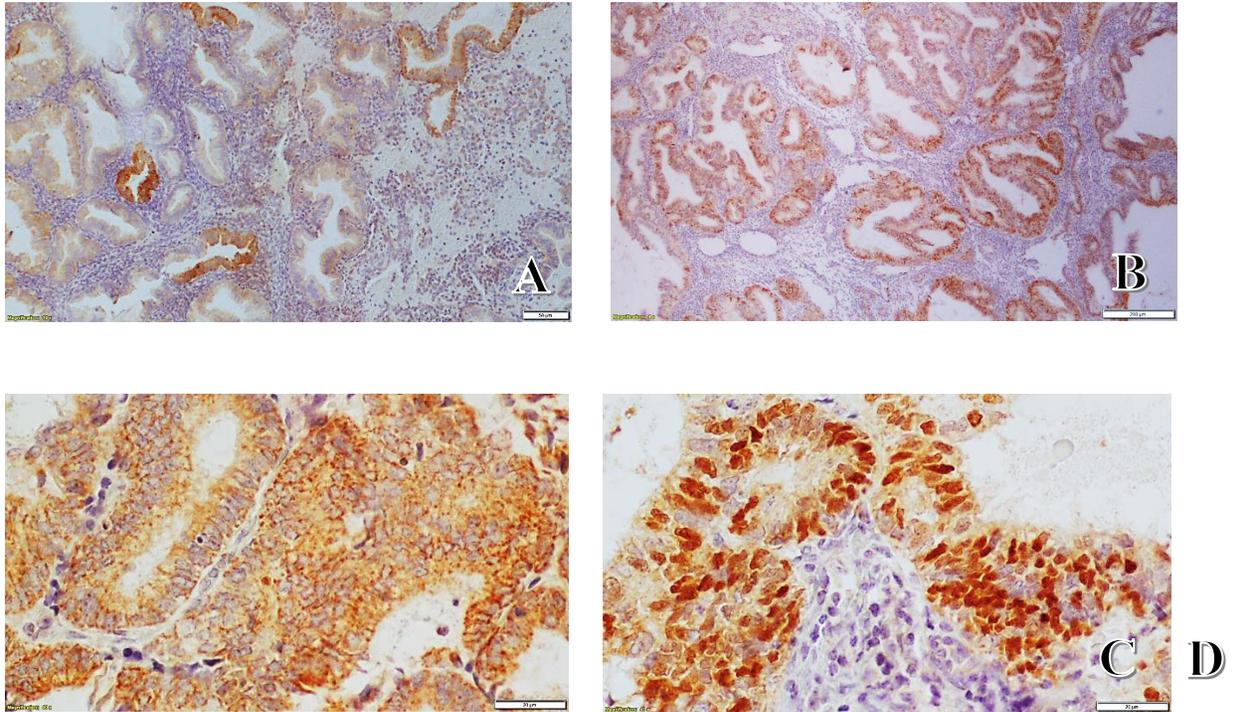
**Tabla 4.** Número de casos por tipo de lesión evaluados en el estudio.

Edad de los 41 casos de Neoplasia Intraepitelial endometrial (NIE)	
Edad promedio	46 años
Edad mínima	35 años
Edad máxima	67 años

**Tabla 5.** Edad de los casos de Neoplasia Intraepitelial Endometrial.

Edad de los 38 casos de Adenocarcinoma Endometrial Endometriode Grado I	
Edad promedio	53 años
Edad mínima	29 años
Edad máxima	73 años

**Tabla 6.** Edad de los casos de Adenocarcinoma Endometrial Endometriode Grado 1



**Figura 4.** Fotomicrografías demostrando la Inmunoexpresión de los anticuerpos BCL-2 (10x) (A) y Ciclina-D1 (10x) (B), en Neoplasia Intraepitelial Endometrial. Fotomicrografías demostrando la Inmunoexpresión de los anticuerpos BCL-2 (40x) (C) y Ciclina-D1 (40x) (D) en Adenocarcinoma Endometrial Endometriode Grado I.

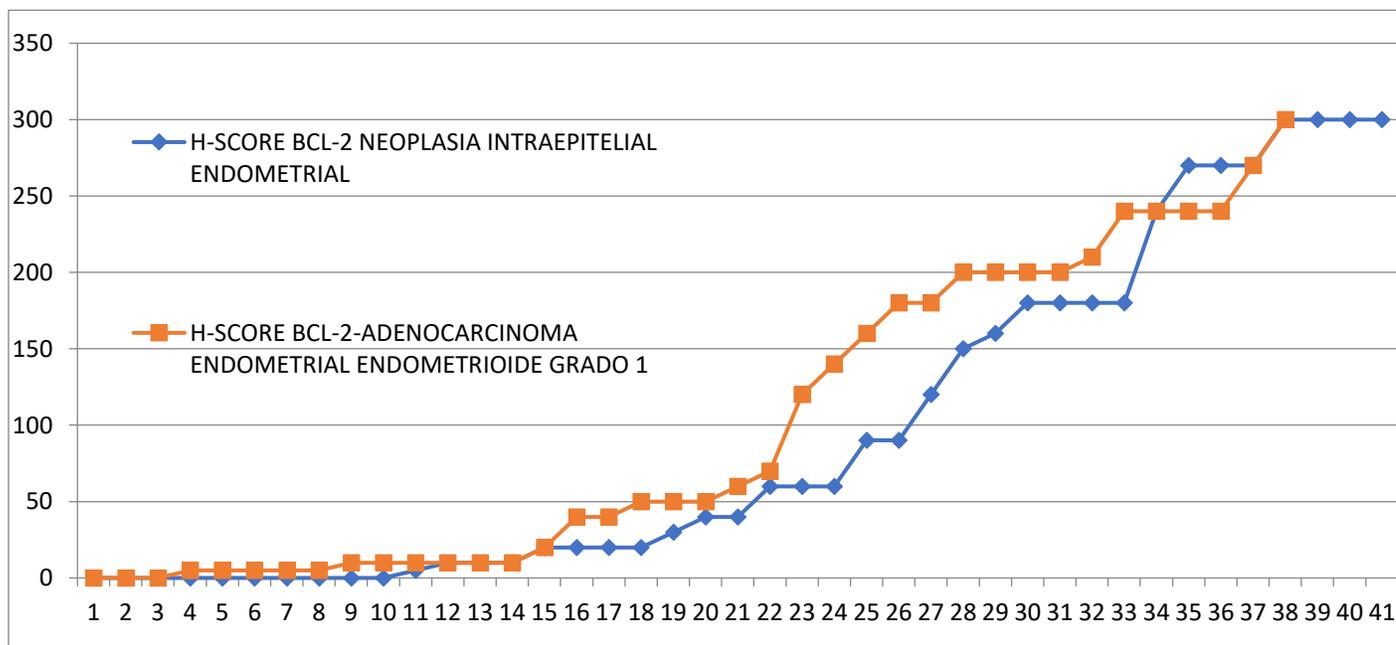
En relación con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, con el marcador **BCL2**, se obtuvieron los siguientes datos (Tabla 5 y Gráfica 1):

- Neoplasias Intraepiteliales Endometriales: Once casos resultaron negativos, y treinta positivos, con un rango de H-Score de 10 a 300.
- Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I: Ocho casos resultaron negativos, y treinta positivos, con un rango de H-Score de 10 a 300.
- Al realizarse la comparación de la inmunoeexpresión entre ambas lesiones, se obtuvo una desviación estándar de 107.5336 en neoplasias Intraepiteliales endometriales, y 98.02243 en adenocarcinomas endometriales Endometrioides grado uno, con una P de 0.917, y una Z 0.104, no demostrando significancia estadística.

RESULTADO DE LA INMUNOEXPRESIÓN	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL	ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL ENDOMETRIOIDE GRADO 1
NEGATIVO	11	8
POSITIVO DÉBIL	15	14
POSITIVO MODERADO	7	9
POSITIVO INTENSO	8	7
TOTAL	41	38

**Tabla 7.** Resultados de la inmunexpresión del anticuerpo BCL-2 en Neoplasias Intraepiteliales Endometriales y en Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I

### Distribución ordenada de la inmunexpresión del anticuerpo BCL-2 según su valor obtenido por H-Score



**Figura 5.** Gráfica que presenta la distribución ordenada de valores de H-Score según el resultado de la inmunexpresión del anticuerpo BCL-2 en Neoplasias Endometriales Intraepiteliales y Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I.

En relación con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, con el marcador **Ciclina D1**, se obtuvieron los siguientes datos (Tabla 5 y Gráfica 1):

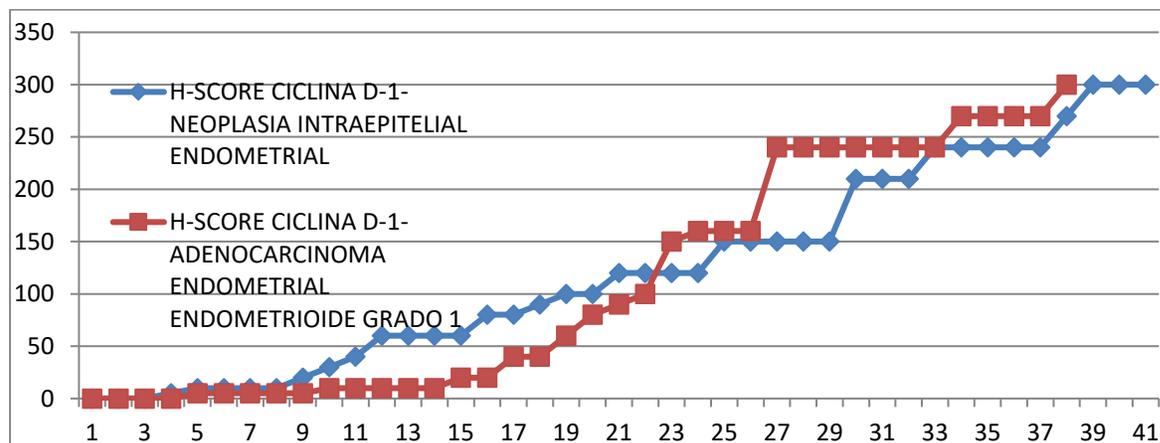
- Neoplasias Intraepiteliales Endometriales: cuatro casos resultaron negativos, y treinta y siete positivos, con un rango de H-Score de 10 a 300.
- Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I: Ocho casos resultaron negativos, y treinta positivos, con un rango de H-Score de 10 a 300.

Al realizarse la comparación entre ambas lesiones, se obtuvo una desviación estándar de 94.8272 para Neoplasias Intraepiteliales Endometriales y de 108.7358 para Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I; con una P de 0.591, y una Z de 0.537, no demostrando significancia estadística.

RESULTADO DE LA INMUNOEXPRESIÓN	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL	ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL ENDOMETRIOIDE GRADO 1
NEGATIVO	4	8
POSITIVO DÉBIL	17	14
POSITIVO MODERADO	8	4
POSITIVO INTENSO	12	12
TOTAL	41	38

**Tabla 8.** Resultados de la inmunexpresión del anticuerpo Ciclina D1 en Neoplasias Intraepiteliales Endometriales y en Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado 1

### Distribución ordenada de la inmunexpresión del anticuerpo Ciclina D1 según su valor obtenido por H-Score



**Figura 6.** Gráfica que demuestra la distribución ordenada de valores de H-Score según el resultado de la inmunexpresión del anticuerpo Ciclina D1 en Neoplasias Endometriales Intraepiteliales y Adenocarcinomas Endometriales Endometrioides Grado I.

	H-SCORE CICLINA D-1- NIE	H-SCORE CICLINA D-1- CE	H-SCORE Bcl-2 NIE	H-SCORE Bcl-2 CE
<b>Promedio</b>	123.29	110.92	97.20	99.61
<b>Desviación Estándar</b>	94.83	108.74	107.53	98.02
<b>Mínimo</b>	0	0	0	0
<b>Máximo</b>	300	300	300	300
<b>Número de casos</b>	41	38	41	38
<b>Wilcoxon - Mann/Whitney Test</b>				
<i>z "corrected for ties"</i>	0.763		0.458	
<i>p-value (two-tailed)</i>	0.445		0.647	
<b>Z =</b>	<b>0.537</b>		<b>0.104</b>	
<b>P =</b>	<b>0.591</b>		<b>0.917</b>	

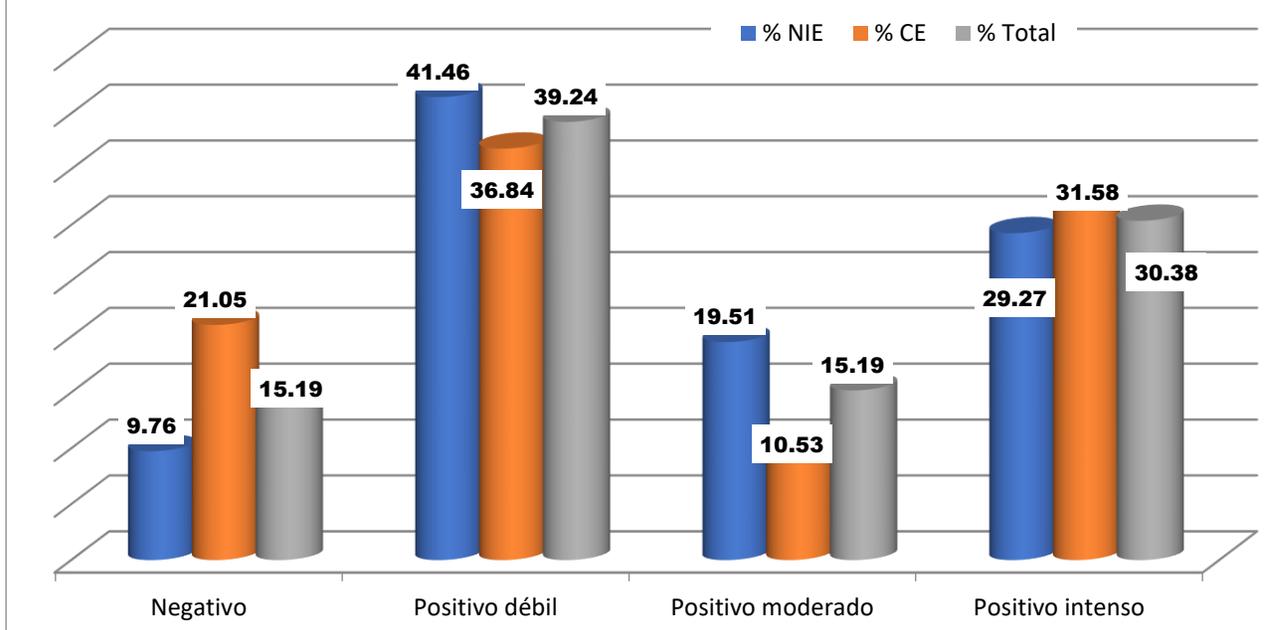
**Tabla 9.** Resultados de la metodología y estadística aplicados según el test de Wilcoxon - Mann/Whitney

<b>Frecuencia de la Inmunoexpresión en ambas lesiones</b>						
<b>Inmunoexpresión</b>	<b>NIE</b>	<b>CE</b>	<b>Total</b>	<b>% NIE</b>	<b>% CE</b>	<b>% Total</b>
<b>Negativo</b>	4	8	12	9.76	21.05	15.19
<b>Positivo débil</b>	17	14	31	41.46	36.84	39.24
<b>Positivo moderado</b>	8	4	12	19.51	10.53	15.19
<b>Positivo intenso</b>	12	12	24	29.27	31.58	30.38
<b>Total</b>	41	38	79	100.00	100.00	100.00

$$\chi^2_3 = 2.85 \quad P = 0.42 \text{ (NS)}$$

**Tabla 10.** Frecuencia e intensidad de la inmunoexpresión de los anticuerpos Ciclina D1 y Bcl2 en NIE y CE

## Frecuencia de la Inmunoexpresión de los anticuerpos en ambas lesiones:



**Figura 7.** Gráfica demostrando la frecuencia ordenada en porcentajes de la inmunoexpresión e intensidad de la misma, de los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1.

## 10. DISCUSIÓN

El carcinoma endometrial, es una de las neoplasias malignas más comunes que afectan el aparato genital femenino, abarcando el segundo lugar en frecuencia en mujeres mexicanas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, para México la frecuencia de esta enfermedad en 2018 fue de 7266 casos, cifra que la colocó por debajo de la del cáncer cervicouterino entre las neoplasias malignas del aparato genital femenino <sup>31</sup>, desplazando a las neoplasias malignas de Ovario, las cuales habían prevalecido en el segundo lugar, según la Dirección de Epidemiología de la Secretaría de Salud.<sup>32</sup>

El desarrollo del carcinoma endometrial endometriode, involucra una serie de pasos de adquisición de diversas alteraciones genéticas en genes supresores tumorales y oncogenes. Diversos estudios han demostrado previamente que la exposición prolongada a estrógenos por más de dos años, duplica y en algunos casos, triplica el riesgo de desarrollo de carcinoma endometrial de tipo endometriode <sup>33</sup>, el cual se posiciona como el tipo histopatológico más común de las neoplasias malignas de origen epitelial en el cuerpo uterino.

La familia de proteínas Bcl-2, es conocida por participar de manera contundente en la regulación de los cambios cíclicos a nivel endometrial, manteniendo el equilibrio en la proliferación de las células endometriales; Mientras que la familia de las ciclinas, son un componente clave en la regulación del ciclo celular, teniendo la capacidad de activar genes necesarios para la progresión de la fase S a la fase G1 del mismo; Hasta la fecha, el papel definitivo de éstas familias en la iniciación, diferenciación e infiltración o extensión del carcinoma endometrial no ha sido bien definido, ni investigado sistemáticamente, siendo propuestas ciertas asociaciones entre la amplificación génica o desregulación transcripcional de las proteínas previamente mencionadas, y evaluables mediante su sobreexpresión, traducida en la inmunoexpresión de los anticuerpos comprendidos en éste estudio.

Existen diferentes estudios que han investigado la inmunoexpresión de Bcl-2 y Ciclina D1 en endometrio sin alteraciones, endometrio hiperplásico, así como endometrio con

diagnóstico de adenocarcinoma, la mayoría de ellos, con resultados inconsistentes y datos no concluyentes; aunque ninguno de ellos realizado en población mexicana.

Algunos autores citados en el presente protocolo, como Laban y colaboradores, realizaron un estudio en 100 muestras de tejido endometrial en bloques de parafina, donde encontraron un aumento significativo en la inmunoexpresión de Bcl-2 en endometrio sin alteraciones histológicas, hiperplasia sin atipia, con atipia / Neoplasia Intraepitelial endometrial y adenocarcinoma Grado I ( $P = 0,002$ ,  $P = 0,0008$  y  $P = 0,0001$ , respectivamente). Hubo una diferencia significativa entre la inmunoexpresión de diferentes tipos de hiperplasia endometrial; a medida que variaba desde hiperplasia sin atipia y neoplasia Intraepitelial endometrial ( $P < 0,05$ ). La tinción con Bcl-2 no mostró una correlación significativa con los estadios moderadamente, poco diferenciados y diferentes del adenocarcinoma ( $P = 0,6$ ,  $P = 0,29$  y  $P = 0,1$  respectivamente), demostrando que los resultados obtenidos, podrían indicar un papel sustancial para Bcl-2 como uno de los impulsos de iniciación de la carcinogénesis endometrial, pero no en la progresión de la lesión.

Simin y colaboradores, por otra parte, realizaron un estudio con 94 muestras de tejido endometrial, en las cuales la tasa de expresión de Bcl-2 fue 54,2% en el grupo de cáncer, 76,2% en el grupo con hiperplasia y 60% en el grupo que contenía tejido normal ( $p = 0,23$ ), demostrando ausencia de significancia estadística.

Risberg y colaboradores estudiaron la expresión de Bcl-2 en 194 muestras de tejido endometrial con diagnósticos de hiperplasia endometrial, pólipos, carcinomas y endometrio cíclico de un área geográfica definida. Los resultados se analizaron estadísticamente con respecto a la expresión del marcador, la localización del componente estromal o glandular y la topografía intraglandular, documentado que la expresión glandular de Bcl-2 fue mayor en el endometrio proliferativo y los pólipos. La expresión de Bcl-2 fue significativamente menor en los adenocarcinomas que en las lesiones hiperplásicas ( $p = 0,002$ ).

Analizando las diferencias entre los estudios previamente comentados y la presente tesis, es importante destacar que en nuestro estudio, no se trabajó con muestras de endometrio no neoplásico (proliferativo, secretor, asincrónico, etc.), así como también se excluyeron las lesiones como carcinomas moderadamente o poco diferenciados, (Grados II y III) con el propósito de optimizar el conjunto de variables y datos para únicamente considerar las variables más significativas encontradas en el conjunto de datos original.

La evaluación estadística de nuestro estudio, arrojó que la inmunexpresión de Bcl-2, fue predominantemente positiva tanto en neoplasias intraepiteliales endometriales (73.18%, 30 de 41 casos), así como en adenocarcinomas endometriales endometrioides Grado I (78.95%, 30 de 38 casos), ( $p=0.917$ ). En cuanto a la inmunexpresión de Ciclina D1, fue predominantemente positiva en neoplasias Intraepiteliales endometriales (90.25%, 37 de 41 casos), así como en adenocarcinomas endometriales endometrioides Grado I (78.95%, 30 de 38 casos) ( $p=0.591$ ). Éstos resultados demostraron que la inmunexpresión de ambos marcadores, es predominantemente positiva y elevada en ambos tipos de lesión endometrial, demostrando un ligero aumento en la inmunexpresión positiva de Bcl-2 en los adenocarcinomas grado uno comparado con los adenocarcinomas Grado I, así como un ligero decremento en la inmunexpresión positiva de Ciclina D1 en los adenocarcinomas grado uno, comparado con las neoplasias intraepiteliales endometriales, pero no lo suficiente para demostrar asociación significativa entre la inmunexpresión de los marcadores y alguna de las lesiones que represente significancia estadística, por lo que determinamos con este estudio que no se recomienda el uso de los anticuerpos evaluados como auxiliares en el diagnóstico diferencial entre neoplasias Intraepiteliales endometriales y adenocarcinomas endometriales Endometrioides Grado I.

## **11.NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN**

Se propone la realización de estudio prospectivo con seguimiento estrecho de la conducta terapéutica clínica empleada posterior al diagnóstico histopatológico de neoplasias intraepiteliales endometriales/carcinomas endometriales endometrioides Grado I y evaluar comparativamente las características morfológicas y progresión de la lesión reportada en el estudio histopatológico de la biopsia previa y/o posterior histerectomía con el propósito de evaluar la optimización de los criterios histopatológicos para el diagnóstico de estas lesiones y reducción de la variabilidad inter e intra observador .

## 12. CONCLUSIONES

El diagnóstico diferencial histopatológico entre neoplasia Intraepitelial endometrial y adenocarcinoma endometrial endometriode Grado I, conlleva un efecto clínico significativo, pues el reporte de cualquiera de las dos lesiones por parte del anatomopatólogo, debe combinarse con una intervención clínica adecuada para evitar el tratamiento insuficiente o excesivo. El propósito de ésta tesis se centró en buscar una herramienta auxiliar en el diagnóstico diferencial histopatológico entre dos lesiones endometriales que, en productos de biopsia o legrado endometrial, a menudo suelen presentar cierta dificultad diagnóstica y de clasificación debido a la similitud morfológica de ambas, y a la reducida cantidad de tejido sometido para evaluación. El resultado del estudio, al no arrojar significancia estadística para asociar la inmunoexpresión positiva de los anticuerpos con alguna de las lesiones comprendidas en el presente estudio; postulamos que los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1, no representan utilidad como herramienta auxiliar para el diagnóstico diferencial entre neoplasias endometriales intraepiteliales y adenocarcinomas endometriales endometrioides Grado I. Por lo anterior, y aunado a la publicación de resultados inconsistentes en otros estudios similares realizados con anterioridad; los nuestro estudio concluye que la realización de estos anticuerpos no representa utilidad con propósito de diagnóstico diferencial entre las lesiones pre invasoras e invasoras de tipo endometriode en productos de biopsias de endometrio.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. **Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths.** CA Cancer J Clin. 2011 Jul-Aug;61(4):212-36. doi: 10.3322/caac.20121.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. **Cancer statistics, 2013.** CA Cancer J Clin. 2013 Jan;63(1):11-30. doi: 10.3322/caac.21166.
3. Secretaría de Salud. **Compendio del Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas en México.** México: Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud; 2003.
4. Ruvalcaba-Limón E, Cantú-de León D, León-Rodríguez E, Cortés-Esteban P, Serrano-Olvera A, Morales-Vásquez F, et al. **Primer Consenso Mexicano de CE. Grupo de Investigación en Cáncer de ovario y tumores. ginecológicos de México (GICOM).** Rev Invest Clin. 2010; 62 (6): 585-605.
5. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins y Cotran. **Patología estructural y funcional. 9ª Edición** España: Elsevier Health Sciences: 2015.
6. Katarzyna Sobczuk<sup>1</sup>, Anna Sobczuk<sup>2</sup>. **New classification system of endometrial hyperplasia WHO 2014 and its clinical implications.** Menopause Rev 2017; 16(3): 107-111.
7. WHO Classification of tumours editorial board. **"Female Genital Tumours: WHO Classification of Tumours Fifth Edition, 2020"**.
8. Leslie KK, Thiel KW, Goodheart MJ, De Geest K, Jia Y, Yang S. **Endometrial Cancer. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.** 2012;39(2): 255-68.
9. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). **ACOG practice bulletin, clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists, number 65,** August 2005: management of endometrial cancer. Obstet Gynecol. 2005 Aug;106(2):413-25.
10. Werner HM, Trovik J, Marcickiewickz J, Tingulstad S, Staff AC, Engh ME, et al. **A discordant histological risk classification in preoperative and operative**
11. T. Yee Khong, MD, FRCPath, **FRCPA Diagnostic Endometrial Pathology, Sgunda edición 2019** by Taylor & Francis Group, LLC
12. Arends MJ. **Apoptosis in the endometrium. Histopathology 1999;** 35:174–8

13. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, et al. **Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle.** *Am J Pathol* 1994;144:1195–202.
14. Cai, L., Chen, J., Deng, F., Wang, L., & Chen, Y. (2020). **MiR-326 regulates the proliferation and apoptosis of endometrial cancer by targeting Bcl-2.** *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* doi:10.1111/jog.14572
15. Laban M, Ibrahim EA, Agur W, Bahaaa Elddin Ahmed AM. **Bcl-2 may play a role in the progression of endometrial hyperplasia and early carcinogenesis, but not linked to further tumorigenesis.** *J Microsc Ultrastruct* 2015;3:19-24
16. Simin Mirakhor Samani, Tahmineh Ezazi Bojnordi, Manijeh Zarghampour, Sobhan Merat & Daniel F. Fouladi (2018): **Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study,** *Journal of Obstetrics and Gynaecology,* DOI: 10.1080/01443615.2018.1437717
17. Risberg, Björn M.D., Ph.D.; Karlsson, Kerstin B.Sc.; Abeler, Vera M.D., Ph.D.; Lagrelus, Anders M.D., Ph.D.; Davidson, Ben M.D., Ph.D.; Karlsson, Mats G. M.D., Ph.D. **Dissociated Expression of Bcl-2 and Ki-67 in Endometrial Lesions: Diagnostic and Histogenetic Implications,** *International Journal of Gynecological Pathology:* April 2002 - Volume 21 - Issue 2 - p 155-160
18. Laban, Mohamed et al. **“Bcl-2 may play a role in the progression of endometrial hyperplasia and early carcinogenesis, but not linked to further tumorigenesis.”** *Journal of microscopy and ultrastructure* vol. 3,1 (2015): 19-24. doi:10.1016/j.jmau.2014.11.001
19. Trabzonlu L, Muezzinoglu B, Corakci A. **BCL-2 and PAX2 Expressions in EIN which had been previously diagnosed as non-atypical hyperplasia.** *Pathol Oncol Res.* 2017; doi:https://doi.org/10.1007/s12253-017-0378-0.
20. Nika N. Danial, **BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death** *Clin Cancer Res* December 15 2007 (13) (24) 7254-7263; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1598.
21. Mutter GL, Lin M-C, Fitzgerald JT, et al. **Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers.** *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:924–930
22. Nikaido T, Li S-F, Shiozawa T, Fujii S. **Coabnormal expression of cyclin D1 and p53 protein in human uterine endometrial carcinomas.** *Cancer.* 996;78: 1248–1253.
23. Bartek, J., Lukas, J. **Cyclin D1 multitasks.** *Nature* 474, 171–172 (2011). <https://doi.org/10.1038/474171a>

24. Allison KĪ, Reed SD, Voigt LF, et al. **Diagnosis endometrial hyperplasia: why is it so difficult to agreed** Am J Surg Pathol. 2008;32:691–698. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
25. Silverberg SG, Mutter GL, Kurman RJ, et al. **Tumours of the uterine corpus. Epithelial tumours and related lesions. In: World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics.** In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. Tumors of the breast and female genital organs. Tumors of the uterine corpus. Lyon: IARC Press; 2003. pp. 221–232
26. Owings RA, Quick CM. **Endometrial intraepithelial neoplasia.** Arch Pathol Lab Med. 2014;138:484–491.
27. Fedchenko, N., & Reifenrath, J. (2014). **Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review.** Diagnostic Pathology, 9(1). doi: 10.1186/s13000-014-0221-9
28. Aeffner, F., Wilson, K., Martin, N., Black, J., Hendriks, C., & Bolon, B. et al. (2017). **The gold standard paradox in digital image analysis: Manual versus automated scoring as ground truth.** Archives Of Pathology & Laboratory Medicine, 141(9), 1267-1275. doi: 10.5858/arpa.2016-0386-ra
29. Hassan, Walaa & Adly, Mohamed & Ahmed, Ahmed. (2019). **Expression of Bc-12 in precancerous endometrial lesion and endometrial carcinoma.** Sohag Medical Journal. 23. 49-54. 10.21608/smj.2019.40957.
30. Sangwan, K., Garg, M., Pathak, N., & Bharti, L. (2020). **Expression of Cyclin D1 in Hyperplasia and Carcinoma of Endometrium and Its Correlation with Histologic Grade, Tumor Type, and Clinicopathological Features.** Journal of laboratory physicians, 12(3), 165–170. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721150>
31. Rtveladze K, et al. **Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden.** Public Health Nutrition 2014; 17 (1): 233-39. <https://doi.org/10.1017/S1368980013000086>
32. Fernández CSB, et al. **Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México.** Dirección General de Epidemiología. (SINAIS/SINAVE/DGE/Salud). Ciudad de México: Secretaría de Salud, 2011; 46-122.
33. Ronnett BM, Zaino RJ, Ellenson LH, Kurman RJ. Endometrial carcinoma. In: Kurman RJ, editor. **Blaustein’s pathology of the female genital tract. 5th ed.** Baltimore: Springer; 2002:501-559.

## **14. ANEXOS**

**Anexo 1. Carta de aprobación por el comité de investigación.**

**Anexo 2. Carta de confidencialidad de datos.**

**Anexo 3. Carta de aprobación por comité de Ética en Investigación**

**Anexo 4. Carta de aprobación y número de registro**

**Anexo 5. Fichas técnicas de los anticuerpos Bcl-2 y Ciclina D1**



**FLEX**  
**Monoclonal Mouse**  
**Anti-Human**  
**BCL2 Oncoprotein**  
Clon 124  
**Ready-to-Use**  
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

**N.º de catálogo IS614**

<b>Uso previsto</b>	Para uso diagnóstico in vitro. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein, Clon 124, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus), está indicado para su uso en inmunohistoquímica junto con los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus. Este anticuerpo marca las células que expresan la oncoproteína BCL2. Los resultados positivos contribuyen a la clasificación de los linfomas foliculares y de varias enfermedades linfoproliferativas difusas (1). La clasificación diferencial se complementa con los resultados de un panel de anticuerpos. La interpretación clínica de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con estudios morfológicos mediante los controles adecuados y debe evaluarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está indicado para su uso después de realizar el diagnóstico primario mediante histopatología convencional con tinciones histoquímicas no inmunológicas.
<b>Resumen y explicación</b>	La oncoproteína BCL2 es un bloqueador de la muerte celular apoptótica. Los experimentos en transferencia de genes han mostrado que niveles elevados de esta proteína pueden proteger a una amplia variedad de células contra diversos estímulos de muerte celular, desde la supresión del factor de crecimiento y las linfocinas citotóxicas hasta la infección viral y el daño en el ADN, los fármacos anticancerosos y la radiación (2, 3). La oncoproteína BCL2 reside en el lado citoplasmático de la membrana externa mitocondrial, en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear (2, 4), y tiene una masa molecular de 26 kDa (3). El gen BCL2 participa en la translocación cromosómica t(14;18), que se encuentra en el 85% de los linfomas foliculares humanos y en el 20% de los linfomas de células B difusos (4). En esta translocación, el gen BCL2 en el segmento cromosómico 18q21 se yuxtapa con el locus de la cadena pesada de Ig en 14q32, lo que produce una expresión desregulada de la oncoproteína BCL2 (4). Consulte el documento de Dako <a href="#">Genex/ Instructions for Immunohistochemical Staining</a> (instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica) o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHC.
<b>Reactivo suministrado</b>	Anticuerpo monoclonal de ratón listo para su uso suministrado en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/l de ácido sódico. <u>Clon:</u> 124 (1). <u>Isotipo:</u> IgG1, kappa.
<b>Inmunógeno</b>	Péptido sintético que comprende los aminoácidos 41-54 de la oncoproteína BCL2 humana (1).
<b>Especificidad</b>	En las inmunotransferencias de extractos de bazo humano normal (1, 5), linfoma folicular t(14;18) positivo (1) y líneas celulares de leucemia mieloide (5), el anticuerpo marca únicamente una banda de 26 kDa que corresponde a la oncoproteína BCL2 en condiciones de reducción (1, 5) y sin reducción (1). El anticuerpo marca las líneas celulares de leucemia mieloide, HL-60 (promielocítica), KG1 (mieloblástica), GM-1 (monoblástica) y K562 (eritromieloide) (5).
<b>Precauciones</b>	1. Para usuarios profesionales. 2. Este producto contiene azida sódica (NaN <sub>3</sub> ), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. A las concentraciones en las que está presente en el producto, aunque no se clasifican como peligrosas, la azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, lo que formará acumulaciones de azidas metálicas muy explosivas. Tras desechar el producto, abra el grifo y deje que salga abundante agua para despejar las cañerías de cualquier acumulación de azidas. 3. Como con cualquier producto derivado de fuentes biológicas, deben utilizarse los procedimientos de manipulación apropiados. 4. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. 5. La solución no utilizada debe desecharse de acuerdo con las normativas locales, nacionales y de la UE.
<b>Almacenamiento</b>	Almacénelo a una temperatura de 2 a 8 °C. No debe utilizarse después de la fecha de caducidad que aparece impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario debe comprobarlas. No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad en este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. Si observa tinciones inesperadas que no puedan atribuirse a las variaciones en los procedimientos de laboratorio y se sospecha que existe un problema con el anticuerpo, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Dako.
<b>Preparación de las muestras Incluido material necesario pero no suministrado</b>	El anticuerpo puede utilizarse para marcar cortes de tejido fijados con formal e incluidos en parafina. Las muestras de tejido deben cortarse en secciones de aproximadamente 4 µm. Se requiere el pretratamiento con recuperación del epítipo inducida por calor (HIER) usando Dako PT Link (n.º de catálogo PT100/PT101). Para más detalles, consulte la Guía del usuario de PT Link. Se obtienen resultados óptimos al pretratar los tejidos con EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (n.º de catálogo K8010/K8004). <u>Cortes en parafina:</u> Se recomienda el pretratamiento de los cortes de tejido en parafina y fijados en formal siguiendo el procedimiento de preparación de la muestra 3 en 1 para Dako PT Link. Siga el procedimiento de pretratamiento explicado en el prospecto de EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (n.º de catálogo K8010/K8004). Nota: Después de la tinción, se deben deshidratar, enjuagar y montar los cortes usando un medio de

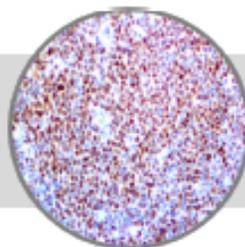
(116871-004)

IS614/ISSM/2014.09 p. 12

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

## Cyclin D1, RMAb

Clone: RBT14  
Rabbit Monoclonal



RUO

**Bio SB**  
BIO SCIENCE FOR THE WORLD

www.biosb.com

*Inset: IHC of Cyclin D1 on a FFPE Mantle Cell Lymphoma Tissue*

### Intended Use

For Research Use Only.

This antibody is intended for use in immunohistochemical applications on formalin-fixed paraffin-embedded tissues (FFPE), frozen tissue sections and cell preparations. Interpretation of results should be performed by a qualified medical professional.

### Immunogen

Synthetic peptide corresponding to residues of the C-terminus of the human cyclin D1 protein.

### Summary and Explanation

Cyclins are a family of proteins involved in the progression of cells through the cell cycle. Cyclins form a complex with their partner, cyclin-dependent kinase (Cdk), which activates the latter's protein kinase function. Cyclins are so named because they are produced or degraded as needed in order to drive the cell through the different stages of the cell cycle. When its concentrations in the cell are low, the cyclin detaches from the Cdk, inhibiting the enzyme's activity, probably by causing a protein chain to block the enzymatic site.

Cyclin D1 or PRAD-1 or bcl-1 is one of the key cell-cycle regulators, and functions in association with Cdk4 and/or Cdk6 by phosphorylating the Rb protein. It is a putative proto-oncogene overexpressed in a wide variety of human neoplasms including Mantle Cell Lymphomas (MCL).

Antibody Type	Rabbit Monoclonal	Clone	RBT-14
Isotype	IgG	Reactivity	Paraffin, Frozen
Localization	Nuclear	Control	Tonsil, Placenta, Brain, Pituitary, Adrenal, Cervix, Breast, Mantle Cell Lymphoma, Breast Carcinoma
Species Reactivity		Human, Mouse, Rat	

### Precautions

- For professional users only. Results should be interpreted by a qualified medical professional.
- This product contains <0.1% sodium azide (NaN<sub>3</sub>) as a preservative. Ensure proper handling procedures are used with this reagent.
- Always wear personal protective equipment such as laboratory coat, goggles and gloves when handling reagents.
- Dispose of unused solution with copious amount of water.
- Do not ingest reagent. If reagent is ingested, seek medical advice immediately.
- Avoid contact with eyes. If contact occurs, flush with large quantities of water.
- Follow safety precautions of the heating device used for epitope retrieval (TintoRetriever Pressure Cooker or similar).
- For additional safety information refer to Safety Data Sheet for this product.
- For complete recommendations for handling biological specimens, please refer to the CDC document, "Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories" (see References in this document).

### Presentation

Cyclin D1 is a rabbit monoclonal antibody derived from cell culture supernatant that is concentrated, dialyzed, filter sterilized and diluted in buffer pH 7.5, containing BSA and sodium azide as a preservative.

Catalog No.	Antibody Type	Dilution	Volume/Qty
BSB 5365	Tinto Prediluted	Ready-to-Use	3.0 mL
BSB 5366	Tinto Prediluted	Ready-to-Use	7.0 mL
BSB 5367	Tinto Prediluted	Ready-to-Use	15.0 mL
BSB 5368	Concentrated	1:100 - 1:500	0.1 mL
BSB 5369	Concentrated	1:100 - 1:500	0.5 mL
BSB 5370	Concentrated	1:100 - 1:500	1.0 mL

### Control Slides Available

Catalog No.	Quantity
BSB 5371	Slides

**Storage** Store at 2-8°C (Control Slides: Store at 20-25°C)

### Stability

This product is stable up to the expiration date on the product label. Do not use after expiration date listed on package label. Temperature fluctuations should be avoided. Store appropriately when not in use, and avoid prolonged exposure to room temperature conditions.

### Specimen Preparation

**Paraffin sections:** The antibody can be used on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections. Ensure tissue undergoes appropriate fixation for best results. Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval (HIER) is recommended using Bio SB ImmunoDNA Retriever with Citrate (BSB0020-BSB0023), ImmunoDNA Retriever with EDTA (BSB0030-BSB0033) or ImmunoDNA Digestor (BSB0108-0112). See reverse side for complete protocol. Tissue should remain hydrated via use of Bio SB ImmunoDNA Washer solutions (BSB0029 & BSB0042).

**Frozen sections and cell preparations:** The antibody can be used for labeling acetone-fixed frozen sections and acetone-fixed cell preparations.