

# **Análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica**

\*Carbajo Pérez, E.; #Carbajo Pérez, S.; §Triviño, A.;  
\*Hernández González, L.C.; \*López Muñiz, A.

\*Dept. Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo.  
#Dept. Anatomía e Histología Humanas, Universidad de Salamanca.  
§Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Carmen y Severo Ochoa. Asturias.

## **1.- Introducción**

La información acerca de la cinética celular supone una valiosa aportación a las distintas clasificaciones tumorales, basadas fundamentalmente en la apariencia microscópica (Almendral y col., 1992; García y col., 1989). Los distintos métodos de estudio para la evaluación de la proliferación celular permiten determinar con mejor exactitud la tasa de recambio celular en tejidos normales o conocer el porvenir biológico de los tumores (Carey y col. 1992).

Los estudios de proliferación celular estuvieron durante mucho tiempo restringidos al estudio de la división celular. Este era en un principio el único dato objetivable de la actividad proliferativa en los estudios de microscopía óptica. Se podía observar que una célula se dividía en dos células hijas repartiendo entre ellas el material nuclear y el contenido citoplásmico. Los fenómenos previos a la división celular, necesarios para que la célula duplique su dotación genética, no se acompañan de modificaciones de la morfología celular, y por ello, estos fenómenos excedían los límites de las técnicas de microscopía convencional.

El desarrollo de las técnicas de autorradiografía (ver Howard y Pelc, 1951; Steel, 1977) hizo posible la identificación de las células en fase de síntesis de ADN. Si la timidina, precursor que es utilizado de forma exclusiva para la síntesis de ADN, se marca con un radioisótopo (generalmente tritio) y éste se administra bien in vivo o in vitro, las secuencias de ADN neoformado lo incorporarán, que-

dando marcadas con el radioisótopo. La energía emitida por estos radioisótopos marcará su impronta en una película de emulsión fotográfica, permitiendo la identificación de las células que están en fase S.

En la práctica, las técnicas de autorradiografía para el cálculo de la fracción de fase S son laboriosas, y se han visto en gran medida sustituidas por técnicas inmunocitoquímicas. El desarrollo por Gratzner (1982) de anticuerpos monoclonales frente a la bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, ofrecía la posibilidad de identificar las células en fase S sin la necesidad de radioisótopos. De esta forma se obvia el principal inconveniente de las técnicas de autorradiografía, cual es la complejidad y lentitud en el procesado de las muestras.

En los últimos años se han utilizado técnicas inmunocitoquímicas, no ya para detectar precursores de la síntesis de ADN incorporados por las células en fase S, sino para detectar antígenos nucleares que se engloban bajo el término genérico de antígenos nucleares de proliferación celular (PCNAs) dado que son estructuras antigénicas que no son observables en células en reposo. El estudio de estos antígenos se ha desarrollado fundamentalmente en el campo de la oncología, dado que su expresión es diferente, tanto cuantitativa como cualitativamente, en células normales y malignas (Busch y Busch, 1977; Davis y col. 1978; Smetana y col. 1983). En el curso de los últimos años se han utilizado anticuerpos monoclonales frente a numerosas PCNAs. La rápida implantación de las técnicas para detectar PCNAs, tanto en los campos de la investigación clínica como básica ha venido de la mano de la gran simplicidad de las mismas. Aunque ha habido y hay serias discusiones acerca de la utilidad y fiabilidad de las mismas, sobre todo en el campo de la patología clínica, parecen ser técnicas con una gran proyección de futuro, que podrían simplificar en gran medida los estudios de cinética celular.

## **2.-Cuantificación de la fase S mediante marcaje con BrdU**

La técnica de marcaje con BrdU está experimentando una rápida expansión tanto en los laboratorios de investigación básica como en los de patología clínica y está sustituyendo en gran medida a las técnicas clásicas de autorradiografía en el estudio del ciclo celular. La gran difusión de esta técnica se ha debido a que auna, por una parte, una gran simplicidad y relativa rapidez, con la fidelidad en la identificación de las células que están duplicando su material genético. El desarrollo por Gratzner (1982) de anticuerpos monoclonales frente a la bromodesoxiuridina ofrecía la posibilidad de identificar las células en fase S sin la necesidad del uso de radioisótopos. Tras su descripción por Gratzner (1982) la técnica del marcaje con BrDU ha evolucionado rápidamente probando su eficacia para la valoración de la proliferación celular tanto *in vivo* (De Fazio y col., 1986; McNicol y Duffy, 1987, Nemoto et al., 1988; Carbajo-Pérez y col., 1989) como *in vitro* (Morstyn y col., 1986; Watanabe y Carbajo Pérez, 1990), demostrándose una magnífica correspondencia entre la fracción de fase S del ciclo celular obte-

nida tras el marcaje con timidina tritiada y tras el marcaje con BrdU (Silvestrini y col., 1988).

Una de las grandes ventajas que ofrece la técnica de marcaje con BrdU y su identificación inmunocitoquímica sobre secciones de tejido es que el resultado final de la reacción sobre los núcleos marcados es claro y bien definida. Esto permite que la identificación al microscopio de los núcleos marcados pueda hacerse con objetivos de pequeños aumentos (10X) lo que facilita en gran medida su cuantificación. Con una magnificación final de 100X (objetivo 10X; ocular 10X) se pueden reconocer áreas muy amplias de una muestra de tejido, permitiendo un cálculo rápido del número de núcleos por unidad de superficie. Para el cálculo directo del índice de marcaje (número de elementos marcados por cien células) es preferible utilizar mayores aumentos (Vg, 40X objetivo; 10X ocular). En este caso el proceso de contaje es más laborioso pero es susceptible de ser automatizado mediante procedimientos de análisis de imagen.

Si una de las características fundamentales del marcaje con BrdU es que esta técnica facilita la localización en el seno del tejido de las células marcadas, cabría pensar que el marcaje con BrdU es una técnica apropiada para el estudio de fenómenos de migración celular. En este sentido, la técnica de la BrdU ha sido utilizada con éxito para demostrar la existencia de fenómenos de migración celular en la glándula suprarrenal y en la mucosa intestinal por McNicol y Duffy (1987), y De Fazio y col., (1987) respectivamente.

En relación con los estudios de migración celular utilizando BrdU, es preciso señalar que para la detección inmunocitoquímica de la BrdU se utilizan generalmente dosis de marcaje que exceden considerablemente de la dosis de trazado de este precursor. Este hecho podría suponer una dificultad en el tránsito de las células que han incorporado este análogo de la timidina para progresar a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (Böswald y col. 1990), con lo que su utilización para el estudio de fenómenos de migración o en estudios cinéticos de larga duración (cálculo de la fracción de mitosis marcadas-FMM-) podría verse comprometido. Sin embargo, nuestra experiencia indica que utilizando dosis de BrdU 50mg/kg de peso corporal, el paso de las células a través de las distintas fases del ciclo celular no se ve alterado.

La fácil identificación de los núcleos marcados y el permitir el análisis topográfico de los mismos en el seno del tejido no son las únicas virtudes que adornan a la técnica de la BrdU. Esta técnica, combinada con el análisis inmunocitoquímico de antígenos citoplásmicos, por ejemplo, permite la identificación del inmunofenotipo de las células con actividad proliferativa (Schutte y col., 1987a; Carbajo -Pérez y col., 1989; French y col., 1990). Sin lugar a dudas, utilizando técnicas de doble marcaje (BrdU/marcadores citoplásmicos o de membrana) la información acerca de la actividad proliferativa de una muestra se enriquece considerablemente, dado que podemos no sólo establecer un índice de proliferación global sino el que corresponde a las distintas subpoblaciones que coexisten en un tejido.

El marcaje con BrdU de células en cultivo monocapa no presenta problemas particulares desde un punto de vista técnico, permitiendo tanto la identificación de núcleos marcados con BrdU, como las técnicas de doble inmunotinción para evidenciar la presencia de BrdU y antígenos citoplásmicos (Watanabe y Carbajo-Pérez, 1990). Sin embargo, el problema fundamental que plantean los estudios de proliferación *in vitro* es que la actividad proliferativa de muestras en cultivo no reproduce de forma fiel la realidad de la dinámica celular de un tejido *in vivo* (Carbajo y col. 1992a).

Para obviar los problemas de la extrapolación de la actividad proliferativa de una muestra en cultivo a la cinética de una muestra del mismo tejido *in vivo*-obviando la exposición del sujeto objeto de estudio a la BrdU- se podría considerar el utilizar el marcaje con BrdU de pequeñas muestras de tejido de forma inmediata a su extracción. Este procedimiento, que ha sido utilizado para el estudio de suspensiones celulares frescas obtenidas por aspiración de la médula ósea (French y col. 1990) también es eficaz cuando se utiliza en dispersados celulares obtenidos mediante digestión enzimática de una muestra de tejido ya que la utilización de enzimas proteolíticas para la obtención de suspensiones celulares no afecta ni a la captación de BrdU ni a la posterior identificación inmunocitoquímica de la misma (Carbajo y col. 1992).

### **3.-Aspectos técnicos sobre la técnica de marcaje con BrdU y su detección inmunocitoquímica**

La incorporación de la BrdU a los núcleos en fase S y la detección y cuantificación de los núcleos marcados son los dos pasos fundamentales para la utilización de la BrdU como marcador para el estudio del ciclo celular. Una alteración en cualquiera de estas dos fases puede modificar y enmascarar el estado real de la actividad proliferativa de una muestra.

Para los estudios de ciclo celular en los que se utiliza el marcaje con BrdU *in vivo*, la selección de la dosis de BrdU y del tiempo de exposición a la misma es importante, y estará condicionada en gran medida por el tipo de técnica que se vaya a utilizar para la detección de la BrdU. Así, cuando la muestra va a ser analizada mediante técnicas de CF, con periodos de marcaje de 60 minutos, las dosis pueden variar entre 10 y 100mg/kg de peso sin que se produzcan modificaciones cuantitativas del índice de marcaje. Si, por el contrario, el estudio se va a realizar utilizando secciones de tejido incluido en parafina la dosis es más crítica, debiendo utilizarse dosis de 50 o 100mg/kg, dado que con dosis inferiores se produce una infravaloración del índice de marcaje (Alberca, 1993).

La elección de un fijador adecuado es uno de los problemas fundamentales con los que el patólogo o el investigador se enfrentan al aplicar técnicas inmunocitoquímicas. Desde el punto de vista inmunocitoquímico el fijador ideal es aquel que preservando de forma óptima la estructura histológica no modifica la capacidad antigénica de la sustancia/s objeto de estudio. Si la fijación es débil puede

resultar la destrucción o alteración de los determinantes antigénicos que se desean identificar. Por el contrario, éstos pueden quedar enmascarados por una fijación excesiva.

La detección inmunocitoquímica de la BrdU incorporada al núcleo por células en fase S ha sido satisfactoria en muestras tratadas con una gran variedad de soluciones fijadoras (Tabla 1). La elección del fijador, su concentración y tiempo de exposición, dependerá de la muestra objeto de estudio (bloques de tejido, dispersados celulares, células en cultivo) y de la técnica (MO, ME, CF) a emplear para demostrar la presencia de núcleos marcados.

*Tabla 1*

<b>FIJADOR</b>	<b>HIDROLISIS</b>	
Etanol 95%	HCl 0,1N; 15 min.	Morstyn y col.1986
Etanol 70%	HCl 2,5M; 30 min.; 23°C	Ramsdel 1990
	Formamida 95%	Carbajo y col.1992
	HCl 2N 60 min.	Nemoto y col. 1988
Metanol	Formamida 95%	French y col. 1990
Metanol/a. acético	HCl 1,5M; 20 min	De Fazio ycol.1987
Formol tamponado	HCl 1,5M; 60 min; 60°C	McNicol y Duffy 1987
PFA 4%-GA 0.1%	Trips. 0,1%; HCl 3,5N	Thiry 1988
Bouin	HCl 4M; 30 min (60°C)	Pan y col. 1990
Bouin	DNasa	Carbajo y col.1989
Carnoy	Tryps 0,1%; HCl 3,5N	Van de Kant 1990
	Formamida 95%	Carbajo y col. 1993

El proceso de fijación, por otra parte, condiciona un paso clave en la detección ICQ de la BrdU incorporada, cual es la hidrólisis del ADN. Los anticuerpos anti-BrdU desarrollados hasta el presente sólo son capaces de detectar la BrdU en DNA monocatenario, por tanto, para que la BrdU incorporada quede expuesta y pueda ser detectada por el anticuerpo anti-BrdU la doble cadena de ADN deberá ser reducida mediante hidrólisis a dos cadenas sencillas. La separación de las dos cadenas de ADN puede hacerse efectiva al tratar la muestra con calor (la formamida actuaría disminuyendo la temperatura y el tiempo necesarios para la hidrólisis), con ácido clorhídrico, o con la combinación de estos agentes y enzimas proteolíticos (Tabla 1). La BrdU incorporada a la doble cadena de ADN también puede ser desenmascarada mediante el tratamiento con nucleasas. Utilizando nucleasas se facilita en gran medida el proceso de detección dado que éstas pueden incorporarse al tampón de dilución del anticuerpo anti-BrdU.

En nuestra experiencia, cualquiera de los procedimientos de hidrólisis antes mencionados puede ser utilizado para cualquier tipo de muestras, si bien no es aconsejable el tratamiento con enzimas proteolíticas de placas de cultivo o de citodispersados, dado que este procedimiento haría que las células se separasen de su soporte de vidrio o plástico.

El proceso de fijación, como antes hemos mencionado, influye de forma determinante en el proceso de hidrólisis. Así, por ejemplo, en muestras fijadas con solución de Bouin, la detección inmunocitoquímica de la BrdU incorporada es factible cuando en el tampón de dilución del anticuerpo se incorporan nucleasas (preparado comercial) (Carbajo-Pérez et al. 1989). Sin embargo, este procedimiento se revela ineficaz para la identificación de la BrdU en muestras fijadas con formalina tamponada. La utilización de formol como solución fijadora lleva consigo la necesidad de emplear métodos más agresivos para conseguir una hidrólisis eficaz del ADN que permita la subsiguiente identificación de la BrdU incorporada. La dificultad de extraer el formaldehído del tejido fijado y las fuertes reacciones cruzadas de los grupos metileno que se forman en el proceso de fijación con el formaldehído (Puchtler y Meloan, 1985) pueden ser consideradas responsables de este fenómeno.

Como ya se ha señalado antes y se describe con detalle en la Tabla 1, pueden existir múltiples combinaciones de procesos de fijación y tratamientos proteolíticos. En manos del investigador o del técnico de laboratorio está el decidir la combinación ideal para el tratamiento de sus muestras.

La identificación inmunocitoquímica de diferentes antígenos citoplásmicos (vg.: contenido hormonal) y de núcleos que han incorporado BrdU en la misma muestra (doble marcaje) ofrece problemas particulares. Al decidir el protocolo a seguir para la preparación de la muestra para su estudio histológico hay que conjugar los factores anteriormente descritos, fijación e hidrólisis, con la resistencia o labilidad del nuevo antígeno a este proceso. El proceso de hidrólisis es un proceso agresivo, que pudiera destruir o alterar los determinantes antigénicos de la sustancia que se pretende analizar. No es por tanto sorprendente que, como se describe en los trabajos de Schutte y col. (1987a), French y col. (1990) o Carbajo y col. (1992a), en el proceso de doble tinción la primera reacción corresponda al antígeno problema (serotonina, cadenas ligeras de inmunoglobulinas humanas u hormonas hipofisarias, respectivamente) y, una vez revelada esta primera reacción, se proceda a la hidrólisis del ADN y a la identificación inmunocitoquímica de la BrdU.

Es obvio que el cromógeno utilizado al final de cada una de las reacciones ha de ser diferente. En los tres trabajos anteriormente citados, la primera reacción fue revelada con diaminobenzidina (DAB), que presta un color marrón a los núcleos reactivos. En la segunda fase, utilizando también la técnica de la peroxidasa/anti-peroxidasa (PAP) el cromógeno utilizado fue DAB intensificada con cobalto (Schutte y col., 1987a) o con níquel (Carbajo y col., 1992a), cromógenos que ofrecen un depósito negro fácilmente distinguible del depósito marrón de la DAB.

En el trabajo de French y col. (1990) se utilizó la técnica de la fosfatasa alcalina/anti-fosfatasa alcalina (FAAFA) en la segunda reacción, reacción para revelar la BrdU, utilizando como cromógeno fast red. Puede decirse que cuando la reacción sigue este orden, es aconsejable utilizar para la primera reacción la técnica de la PAP siendo la DAB el cromógeno más apropiado. Otros cromógenos como la DAB intensificada con níquel, el 4-cloro-naftol, o la mayoría de los sustratos para las reacciones de la FAAFA (fast red, azul de tetrazolio), pueden desaparecer durante el proceso de hidrólisis.

Tras el proceso de hidrólisis, y para revelar la BrdU incorporada al material nuclear, se pueden utilizar con buenos resultados tanto la técnica de la PAP como la de la FAAFA. La FAAFA ofrece por lo general ventajas dado que las interferencias con la primera reacción son mínimas. De entre los distintos cromógenos que se pueden utilizar con esta segunda reacción, los rojos dan menor contraste con el marrón de la DAB de la primera reacción, pero tienen la ventaja de que son fácilmente distinguibles del azul de la hematoxilina, que es la tinción nuclear más habitual como tinción de contraste. La tinción de contraste con hematoxilina es importante dado que es necesario conocer el número total de células de una muestra para calcular tanto la proporción de células que expresan el antígeno problema, como para el cálculo del índice de marcaje con BrdU ( $IM-BrdU = \text{número de células marcadas con BrdU una hora después de la administración de ésta, expresando este valor como porcentaje en relación con el número total de células de la muestra}$ ).

Otra alternativa es el uso de colorantes azules como paso final de la reacción de la FAAFA. Estos se distinguen con gran facilidad del color marrón de la DAB, por tanto, resultan muy apropiados para estudios mediante técnicas de análisis de imagen porque los colores azul y rojo se segmentan muy bien. Sin embargo, la coloración azul de la segunda reacción obliga a utilizar una tinción nuclear verde, que no es habitual en muchos laboratorios.

En lo que se refiere a la utilización de la técnica de la PAP en la segunda reacción inmunocitoquímica, la DAB intensificada con cobalto o con níquel ofrecen un color negro que se distingue muy bien de la coloración marrón de la primera reacción. Cuando se utilizan estos cromógenos ha de procurarse, primero, que la coloración de la primera reacción sea de un color marrón suave y, segundo, que la reacción del segundo cromógeno sea rápida, todo ello al objeto de prevenir que el marrón original se oscurezca, dificultando la identificación de los núcleos marcados con BrdU en células doblemente teñidas. Utilizando benzidina como cromógeno en estas reacciones se obtiene un color azul brillante que ofrece gran contraste con el marrón de la primera reacción, pero tiene el inconveniente de producir un granulado grosero con abundantes espiculaciones que, cuando se estudian células de contornos irregulares y escaso citoplasma, por ejemplo células hipofisarias productoras de prolactina, dificultan la identificación de células doblemente marcadas. Otra posibilidad es la utilización del 4-cloro-naftol, cromógeno azul, en reacciones con el método de la PAP. Este cromógeno tiene el incon-

veniente de desvanecerse en un tiempo relativamente breve, lo que impide que las preparaciones puedan ser archivadas y, ante la posibilidad de que la intensidad de coloración decrezca, obliga al estudio de las preparaciones en un breve plazo.

Es necesario hacer también mención al uso de nucleasas para la tinción inmunocitoquímica de la BrdU. Una de las grandes ventajas de este método es que preserva de forma óptima la estructura del tejido. El inconveniente fundamental es que sólo puede ser utilizada con ciertos fijadores. Nosotros hemos comprobado su efectividad tras la fijación con Bouin, etanol, metanol y fijador de Carnoy. Sin embargo, en muestras fijadas con formol tamponado o Bouin-Hollander, es necesario tratar las muestras con proteasas antes de la incubación con el anticuerpo anti-BrdU con la DNasa.

#### **4.-Antígenos de proliferación celular**

Las técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas, pueden utilizarse, no ya para revelar marcadores incorporados por las células en fase S, tal y como se ha visto hasta ahora en este capítulo, sino también para revelar la presencia de distintos antígenos cuya expresión se relaciona con la proliferación celular.

Se han elaborado, y se siguen elaborando, numerosos anticuerpos frente a los antígenos de proliferación celular. Algunos de estos anticuerpos, como los que a continuación se mencionan están actualmente en desuso.

- Anticuerpo anti-PAA reconoce un lípido neutro asociado a la proliferación celular (Dubey y col., 1987).
- Anticuerpo anti-K-112 que reconoce un antígeno nuclear de 43 kD. (Quak y col. 1990).
- Anticuerpo monoclonal frente al antígeno regulador del ciclo celular denominado C5F10 (Lloyd y col. 1985).
- Anticuerpo monoclonal frente al antígeno regulador del ciclo celular conocido como antiribonucleótido reductasa (Engstrom y col. 1982).
- Anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno regulador del ciclo celular: DNA metiltransferasa. (Papadopoulos T y col. 1989).

Algunos autores han propuesto que la demostración inmunohistoquímica del receptor de la transferrina (CD71) podría ser usado como índice de proliferación celular. Sin embargo, este receptor es expresado ampliamente, no sólo sobre tejidos proliferantes, sino también sobre aquellos no proliferantes, pero metabólicamente activos, indicando así un pobre índice de proliferación celular. (Gatter y col. 1983).

En la actualidad, son numerosos los anticuerpos que se utilizan, o se pretenden utilizar, para el estudio de la cinética celular. Entre los anticuerpos empleados más frecuentemente para determinar la cinética celular existe un anticuerpo



monoclonal que reconoce una de las hasta ahora 4 polimerasas conocidas: la DNA polimerasa  $\alpha$ . Esta enzima está implicada en la inicialización de la replicación del DNA durante el proceso de la proliferación celular. Su detección inmunohistoquímica se puede evidenciar en tejidos fijados en formaldehído y embebidos en parafina (Bensch y col., 1982; Tanaka y col., 1982; Seki y col., 1993).

Recientemente se sintetizó un nuevo anticuerpo monoclonal que reconoce, incluso en tejidos embebidos en parafina, una proteína no histona de alto peso molecular (160 Kd), denominada Ki-S1 y de vida media larga. Este antígeno puede detectarse en células aún cuando éstas hayan abandonado el ciclo celular varios días antes (Mc Cormick y col. 1993).

Merecen una especial atención dos anticuerpos monoclonales ampliamente difundidos en la literatura científica: el anticuerpo monoclonal frente antígeno de proliferación celular conocido también como ciclina, PCNA, o, PCNA/ciclina, y el anticuerpo frente a la proteína Ki-67, tanto el empleado sólo sobre tejidos congelados, como su equivalente que reconoce un epítoto antigénico similar al anterior en material fijado con formaldehído y embebido en parafina (anticuerpo monoclonal MIB1).

El antígeno de proliferación celular (PCNA) es una proteína acídica nuclear no histona de 36 kd y de 261 aminoácidos con alto contenido en ácido glutámico y aspartato (Almendral y col. 1987), que funciona como proteína adyuvante de la síntesis de DNA (Bravo y col. 1987). Fue descubierta en 1978 mediante el estudio de autoanticuerpos en pacientes con lupus eritematoso (Miyachi y col. 1978).

El gen que codifica PCNA ha sido clonado en diversas especies, existiendo sólo 4 aminoácidos diferentes entre el PCNA humano y el de rata. La conservación y evolución del PCNA en el reino animal y vegetal, sugieren que este antígeno desempeña un papel fundamental en la replicación de DNA en eucariotas, siendo su presencia necesaria aunque no suficiente para el proceso de proliferación celular (MacCormick y col. 1992). El PCNA también está implicado en la escisión-reparación de nucleótidos al comprobarse la asociación de éste con cromatina en todas las fases del ciclo celular tras irradiación con luz ultravioleta en experimentos "in vitro" (Toschi y col. 1988).

Está actualmente demostrado que el PCNA es una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta, y es imprescindible para la iniciación de la proliferación celular. La síntesis de PCNA es muy baja al principio de la fase G1, aumenta durante el período tardío de la fase G1 y alcanza su máximo en el período inicial de la fase S, descendiendo a niveles basales durante el período de transición que comprende desde el final de la fase S a la fase G2, alcanzando los niveles más bajos, virtualmente indetectables por métodos inmunocitoquímicos, durante la fase M (Takasaki y col., 1981; Tsuji y col., 1992). Sin embargo, su expresión puede solaparse con la fase temprana G2 e incluso extenderse hasta la fase M (Kurki y col., 1987). Precisamente, algunos autores encuentran inmunorreactividad citoplasmática para el PC10 en las células de Reed-Sternberg, como ocurre en nuestros casos de archivo (datos no publicados) o durante la fase de mitosis celular (Montironi y col., 1993).

Estudios con inmunofluorescencia, han mostrado la existencia de dos patrones de expresión del PCNA durante la fase S del ciclo celular. Por una parte hay una reacción nucleoplásmica que es fácilmente extraíble por la acción detergente de solventes orgánicos como el metarcan. Por otra, existe una inmunorreactividad asociada a estructuras específicas nucleares (Bravo y col. 1987b). Esta última es resistente a la acción detergente, y está imbricada con los sitios de replicación de DNA. Cuando se utilizan anticuerpos frente al PCNA aparece como una inmunorreactividad nuclear de tipo granular (Hall y col., 1990), estando localizada en complejos replicativos equivalentes a los que ocupa la bromodeoxiuridina (BrDU).

Parece que sólo pequeñas variaciones en el nivel total de PCNA en el ciclo celular (quizá dos o tres veces más que en situaciones basales), provocan una dramática alteración de la porción proteica asociada a los lugares replicativos, particularmente durante la fase S (Hall y col., 1990).

Se han elaborado distintos anticuerpos monoclonales frente a la ciclina, disponibles comercialmente: 19A2, 19F4, TOB7 y PC10 (Ogata y col., 1987; Waseem y col., 1990; Kanitakis y col., 1993). Concretamente uno de los más empleados: el anticuerpo PC10, fue generado por ratones inmunizados con PCNA recombinante humano y expresado en *E. Coli* (Waseem y col. 1987). Los epítopes que reconocen estos anticuerpos son aparentemente distintos, y muestran diferencia en su inmunoexpresión, dependiendo de la fijación y el procesamiento de los tejidos. Así, una prolongada fijación, puede reducir drásticamente la inmunorreactividad a la PCNA (Hall y col., 1990). Probablemente también hay diferencias en cuanto a la composición bioquímica de estos anticuerpos "sintéticos" y los autoanticuerpos humanos (Huff y col. 1990).

El patrón de tinción nuclear puede ser de dos tipos: uno granular, ya mencionado, que reconoce la fase S, y otro difuso, no específico de la fase S (Van Diernonck y col., 1991; Bravo y col., 1987b). También puede haber patrones mixtos. Montironi y col. (1993), demostraron que los núcleos teñidos con patrón difuso, homogéneo, aparecían más oscuros y más a menudo en lesiones prostáticas agresivas, que los de patrón granular o mixto. Si bien el significado del patrón de tinción difuso no está claro, debemos de considerar que puede haber una retención celular de PCNA durante la fase G2 y durante un período, en general limitado, de la fase G0, debido a la larga vida media de la ciclina: unas 20 horas (Celis y col., 1985). Este hecho, explicaría la presencia de discreta inmunorreactividad en las células proliferantes epiteliales que revisten las criptas gastrointestinales y las porciones más apicales de las vellosidades intestinales, al igual que la inmunotinción nuclear que aparece en muchos otros tejidos no tumorales cuyas células estén en la fase S, o hayan abandonado ésta recientemente, por ejemplo, en las células basales de piel y anejos pilosos.

Además del tejido en proliferación, niveles altos de PCNA, aparecen como expresamos anteriormente en respuesta a daño del DNA y por estimulación a factores de crecimiento (Jaskulski y col., 1987).

En células que durante largo tiempo han estado en reposo (desde el punto de vista de la proliferación), el PCNA está presente en aquellas con potencial de división. Para algunos autores, la ausencia de niveles estables de RNAm de PCNA en las células en reposo, se asociaría a la presencia de intron 4 en el gen que codifica la ciclina (Hall y col., 1990); su anulación produce una acumulación de niveles altos de RNAm de PCNA con la consiguiente síntesis de su proteína (Ottavio y col., 1990). Además, esta acumulación de RNAm de PCNA, es igualmente favorecida por factores de crecimiento (como los factores de crecimiento tumoral). Pero este acontecimiento importante no necesariamente va ligado a la síntesis de DNA (Hall y col. 1990); de hecho, la ciclina se acumula incluso en presencia de hidroxiaurea, una sustancia que inhibe la síntesis de DNA (Bravo y col. 1985). Todo ello explicaría que las células en fase no proliferativa que asientan en tejidos normales adyacentes a tumores, resulten inmunoreactivas para anticuerpos frente al PCNA (Hall y col., 1990).

Posiblemente este efecto acumulativo de PCNA, provocado presumiblemente por factores de crecimiento, daría respuesta a lo observado en algunos tumores, en donde el número de células marcadas para el PCNA, no se correlaciona con otros índices de proliferación celular (Yu y col., 1991).

Aún admitiendo la discrepancia existente a la hora de valorar distintos marcadores de proliferación celular, basada en las diferentes partes de un tejido, tumoral o no, García y col. (1989) valoraron marcadores de proliferación distintos a la ciclina, como los organizadores nucleolares argirófilos (AgNORs) o el anticuerpo frente a la proteína Ki-67, observando que la mayoría de aquellos presentaban resultados equiparables a los hallados con los anticuerpos frente al PCNA. Si bien parece haber menos problemas a la hora de interpretar las imágenes que ofrece el inmunomarcaje para el PCNA que para los AgNORs (Korkolopoulou y col., 1993; Kanitakis y col., 1993; Tateyama y col., 1993), y cierta ventaja en la evaluación del inmunomarcaje con Ki-67 (incluso si se realiza sobre material embebido en parafina).

No existe uniformidad en el método de evaluación de los PCNA utilizado en distintos trabajos, variando considerablemente el recuento de núcleos marcados (bien el número total de células valoradas o el área de tejido objeto de estudio) (Pelosi y col., 1992; Theunissen y col., 1992). La intensidad de la inmunorreacción es otro punto de debate. La mayoría de los autores consideran positividad únicamente cuando se detecta inmunoreactividad sin atender a la intensidad de tinción (Filipe y col., 1993). Sin embargo hay comunicaciones científicas que valoran el grado de intensidad en los núcleos "positivos"; atribuyéndoles una cruz (+) a aquellos discretamente amarillos-marrónáceos, dos cruces (++) a los de coloración marrón, y tres cruces (+++) a los que presentan color marrón oscuro (claro está, cuando se utiliza DAB como cromógeno) (Roa y col., 1993).

Mercer y col. (1991), exponen que existe evidencia de una interrelación entre la ciclina y distintos oncogenes celulares. Concretamente, un oncogén recesivo: el p53, ejerce una inhibición de la progresión del ciclo celular a la fase S dependien-

te de una menor síntesis de ciclina, cuando se introduce su oncoproteína en ensayos con una línea celular derivada de glioblastoma multiforme humano.

El anticuerpo monoclonal contra el antígeno Ki-67, reconoce una proteína de Mr345 y de 395kD, estando codificada por un solo gen ubicado en el cromosoma 10, cuya expresión está íntimamente asociada al ciclo celular (Gerdes y col., 1983; Gerdes y col., 1984; Gerdes y col., 1991). En un principio se elaboró un anticuerpo monoclonal frente a un epítipo del antígeno Ki-67 que era destruído cuando los tejidos eran fijados y embebidos en parafina (McGurrrin y col., 1987). Recientemente, se ha sintetizado un nuevo anticuerpo monoclonal frente al antígeno Ki-67 que es efectivo en material fijado en formol y embebido en cera, el anticuerpo MIB1 (MacCormick y col., 1993b). Este anticuerpo reconoce presumiblemente epítopes distintos a su homólogo detectable sólo en tejidos congelados. La técnica inmunohistoquímica con el MIB1 necesita de la ayuda del microondas acompañado de una solución con buffer citrato. El mecanismo de colaboración del microondas no se conoce del todo, si bien parece que permite la exposición de epítopes ocultos.

Aunque no se conoce la totalidad de la estructura del antígeno Ki-67, éste se detecta a bajos niveles en la fase G1, aumenta a medida que el ciclo celular progresa, alcanzando su máxima expresión en la fase postsíntesis (G2), y desciende rápidamente después de la mitosis (Gerdes y col., 1984; Bruno y col., 1992). Sin embargo el Ki-67 no está presente durante la fase G0 del ciclo celular o en el período inicial de la fase G1 (Hitchcock, 1991). El sistema de valoración cuando existe inmunorreactividad para el Ki-67, varía, al igual que para el PCNA dependiendo de la literatura consultada, si bien suele haber acuerdo en considerar su presencia, cuando existe inmunomarcaje nuclear, independientemente de su intensidad. Wintzer y col. (1991), recomiendan un recuento de células inmunorreactivas para el Ki-67 en al menos 10 campos de gran aumento y el resultado puede ser expresado en número de células marcadas con relación al número de campos estudiados, al número de células totales, o por milímetro cuadrado. Sin embargo, si se utilizan técnicas de análisis de imagen para la valoración de la tinción con este marcador, se observa generalmente que el área total de tinción nuclear no se corresponde con el porcentaje de núcleos positivos (Shwartz y col., 1989).

Cuando se intenta correlacionar la inmunotinción con anticuerpo Ki67 con el índice mitótico se observa que existe una buena correlación cuando la tasa de mitosis en un tejido (tumoral o no) es baja (menos de 5 mitosis por 10 campos de gran aumento). Sin embargo, existen trabajos en los que no se encuentra una correspondencia adecuada entre el porcentaje de células que expresan Ki-67 y el recuento de mitosis cuando estas últimas son numerosas (Sahin y col. 1991). Por otra parte, parece haber buena correlación entre la expresión del Ki-67 y los resultados con citometría de flujo en estudios con un diseño cuidadoso (Isola y col. 1990) y dicha correlación es más importante en tumores con mayor porcentaje de células en fase S (Sahin y col. 1991).

El antígeno Ki-67 no se expresa cuando hay reparación del DNA, y sin embargo, como ya habíamos comentado, sí lo hacen el PCNA o la proteína Ki-S1.

Así, el Ki-67 estaría de nuevo en ventaja cuando se valora la proliferación celular. En cambio algunos autores no detectan diferencias significativas entre el inmunomarcaje para el PCNA en tejidos embebidos en parafina, y la valoración de proliferación celular empleando el Ki-67 en tejido congelado (Dervan y col., 1992). Además, el antígeno Ki-67, presenta numerosos restos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina, con lo que facilita su rápido catabolismo, justificando así su corta vida media (Schluter y col., submitted for publication). Por el contrario, la larga vida media de la ciclina o de la Ki-S1, es un inconveniente ya manifestado que se le achaca a estos marcadores cuando se aprecia marcaje celular inesperado (el PCNA o el Ki-S1 pueden expresarse en células que han dejado el ciclo celular) (McCormick y col., 1993). Además, por medio de estudios "in vitro", se ha demostrado que aún habiendo variaciones en la expresión de la PCNA a través del ciclo celular y en su estado físico (por ejemplo, asociación con la cromatina), los niveles de PCNA raramente están bajo el nivel de detección (Bravo, 1987b; Morris y col., 1989; Bravo y col., 1985).

El empleo del anticuerpo para el Ki-67, proporciona, en algunos trabajos, una medida más fiable de la fracción proliferativa tumoral que la incorporación de timidina tritiada en tumores sólidos, pues independientemente de la mayor sencillez metodológica que supone el manejo de la técnica inmunohistoquímica (Deshmukh P y col., 1990), la timidina tritiada o la bromodeoxiuridina, son únicamente marcadores de la fase S (Burger y col., 1986; McCormick y col., 1993; Kerr y col., 1983).

Aunque el grueso de este capítulo se ha dedicado al análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunocitoquímicas, no debe olvidarse que existen otras técnicas para la valoración de la proliferación celular. El recuento de mitosis, aunque evalúa solamente una pequeña porción de las células en ciclo, resulta barato y es de uso común entre los patólogos (Triviño, 1993; Triviño y col., 1993). De este método se ha dicho recientemente que proporciona un valor de la fracción de crecimiento tumoral equivalente al índice de incorporación de bromodeoxiuridina (Weinder y col., 1993).

Las ventajas del análisis del DNA celular (ploidía y proliferación) usando citometría de flujo, descansa en la capacidad para analizar gran número de células o núcleos en un corto período de tiempo, ventaja a la que se añade la posibilidad de complementar el análisis con otros parámetros para acotar las poblaciones celulares objeto de estudio (Zarbo y col., 1989). Sin embargo la citometría de flujo requiere un equipamiento caro y elimina el criterio morfológico del análisis (Sahin y col., 1991).

Nuestra intención al escribir este capítulo ha sido el procurar una idea global de la utilización del marcaje con BrdU y de la detección inmunocitoquímica de distintos antígenos de proliferación celular para el cálculo de la actividad proliferativa de una muestra de tejido. Tanto los conceptos generales, como las pinceladas técnicas en relación con la utilización de la BrdU pueden ser ampliadas en el capítulo de bibliografía, que si no muy amplio, recoge una selección de citas que

sin lugar a dudas podrán ser de utilidad para todos aquellos que deseen familiarizarse con estas técnicas. No debe olvidarse que es necesario conocer las ventajas, desventajas y peculiaridades de los distintos métodos para el estudio de la proliferación celular, para, en base a unas premisas teóricas bien fundadas, decidir con acierto cual debe ser la herramienta a utilizar en el momento de plantear un trabajo experimental o de investigación clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.-ALBERCA, V. (1993). Proliferación celular en la hipófisis de la rata. Estudio comparativo de distintos procedimientos de evaluación de la actividad proliferativa. Análisis de los fenómenos de transdiferenciación. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- 2.-ALMENDRAL, J.M., HUEBSCH, D., BLUNDELL, P.A., MACDONALD-BRAVO, H. y BRAVO, R. (1987). Cloning and sequence of human nuclear protein cyclin: homology with DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 1575-1579.
- 3.-BENSCH, K.G., TANAKA, S., HU, S.Z., WANG, T.S.F. y KORN, D. (1982). Intracellular localization of human DNA polimerase  $\alpha$  with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, 257: 8391-8396.
- 4.-BÖSWALD, M., HARASIM, S. y MAURER-SCHULTZE, B. (1990). Tracer dose and availability time of thymidine and bromodeoxyuridine; application of bromodeoxyuridine in cell kinetic studies. *Cell. Tissue Kinet.*, 23: 169-181.
- 5.-BRAVO, R. y MACDONALD BRAVO, H. (1985). Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its syntesis depend on DNA replication. *EMBO. J.*, 4: 655-661.
- 6.-BRAVO, R., FRANK, R., BLUNDELL, P.A. y MACDONALD-BRAVO, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerasa-delta. *Nature*, 326: 515-517.
- 7.-BRAVO, R. y MACDONALD-BRAVO, H. (1987b). Existence of two populations of Cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: associated with DNA replication sites. *J. Cell. Biol.*, 105: 1549-1554.
- 8.-BRUNO, S. y DARZYNKIEWICZ Z. (1992). Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by ki 67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.*, 25: 31-40.
- 9.-BURGER, P.C., SHIBATA, T. y KLEINHUES, P. (1986). The use of monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am. J. Surg. Pathol.*, 57: 269-276.
- 10.-BUSCH, R.K. y BUSCH, H. (1977). Antigenic proteins of nucleolar chromatin of Novikoff hepatoma ascites. *Tumori* 63: 347-357.
- 11.-CARBAJO, S., GONZÁLEZ DEL POZO, F. y CARBAJO-PÉREZ, E. (1992a). Quantitation of the cellular proliferation on freshly dispersed cells from rat anterior pituitaries after in vivo and in vitro labelling with bromodeoxyuridine. *Histochem. J.*, 24: 137.
- 12.-CARBAJO, S., HERNÁNDEZ, J.L. y CARBAJO-PÉREZ, S. (1992b). Proliferative activity of cells of the intermediate lobe of the rat pituitary during the postnatal period. *Tissue and Cell*. 24: 829-834.

- 13.-CARBAJO, S., ORFAO, A., VICENTE-VILLARDON, J.L. y CARBAJO-PÉREZ, E. (1993). Expression of silver-stained nucleolar organizer regions is coupled to cell cycle in rat thymic cells. *Cytometry* 14: 46-52.
- 14.-CARBAJO-PÉREZ, E. y WATANABE, Y.G. (1990). Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell. Tissue Res.*, 261: 333-338.
- 15.-CARBAJO-PÉREZ, E. y WATANABE, Y.G. (1991). Cell proliferation in the anterior pituitary of the adult male mice at different periods of the day as revealed by bromodeoxyuridine. *An. Anat.*, 37: 29-34.
- 16.-CARBAJO-PÉREZ, E., MONTEGI, M. y WATANABE, Y.G. (1989). Cell proliferation in the anterior pituitary of mice during growth. *Biomed. Res.*, 10: 275-281.
- 17.-CARBAJO-PÉREZ, E., CARBAJO, S., ORFAO, A., VICENTE-VILLARDON, J.L. y VÁZQUEZ, R. (1991). Circadian variation in the distribution of cells throughout the different phases of the cell cycle in the anterior pituitary gland of adult male rats as analysed by flow cytometry. *J. Endocrinol.*, 129: 329-333.
- 18.-CAREY, F.A., FABRONI, G. y LAMB, D. (1992). Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology*, 20: 499-503.
- 19.-CELIS, J.E. y CELIS, A. (1985). Cell cycle-dependent variation in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3262-3266.
- 20.-DAVIES, F.M., BUSCH, R.K., YEOMAN, L.C. y BUSCH, H. (1978). Differences of nucleolar antigens of rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells. *Cancer Res.* 38: 1906-1915
- 21.-DeFAZIO, A., LEARY, J.A., HEDLEY, D.W. y TATTERSALL, M.H.N. (1987). Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 571-577.
- 22.-DERVAN, P.A., MAGEE, H.M., BUCKLEY, M.C. y CARNEY D.N. (1992). Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with ki-67 in fresh tissue. *Am. J. Clin. Pathol.*, 97 (Suppl. 1): 21-28.
- 23.-DESHMUKH, P., RAMSEY, L. y GAREWAL H.S. (1990). Ki-67 labeling index is a more reliable measure of solid tumor proliferative activity than tritiated thymidine labeling. *Am. J. Clin. Pathol.*, 94: 192-195.
- 24.-DIERENDONCK, J.H., WYSMAN, J.H., KEYZER, R., VAN DE VELDE, C.J.H. y CORNELISSE C.J. (1991). Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdURd labelling and Ki-67 staining. *Am. J. Pathol.*, 138: 1165-1172.



- 25.-DUBEY, D.B., STAUNTON, D.E. y PAREKH A.C. (1987). Unique proliferation associated marker expressed on activated and transformed human cells defined by monoclonal antibody. *J.N.C.I.*, 78: 203-212.
- 26.-ENGSTROM, Y. (1982). Monoclonal antibodies against mammalian ribonucleotide reductase. *Acta Chem. Scand.*, 36: 343-344.
- 27.-FILIFE, M.I., MENDES, R., LANE, D.P.y MORRRIS, R.W. (1993). Assessment of proliferating cell nuclear antigen expression in precursor stages of gastric carcinoma using the PC10 antibody to PCNA. *Histopathology*, 22. 349-354.
- 28.-FRENCH, M., MAGAUD, J.P., DUHAUT, P., BRYON, P.A. y VIALA, J.J. (1990). Determination of plasma cell labelling index with bromodeoxyuridine using a double immunoenzymatic technique. *Stain Tech.*, 65: 31-36.
- 29.-GALAND, P.y DEGRAEF, C. (1989). Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for making S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell tissue Kinet.*, 22: 383-392.
- 30.-GARCÍA, R.L., COLTRERA, M.D. y GOWN A.M. (1989). Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, 134: 733-739.
- 31.-GATTER, K.C., BROWN, G., TROWBRIDGE, I.S., WOOLSTON, R.E.y MASON, D.Y. (1983). Transferrin receptor in human tissues: their distribution and possible clinical significance. *J. Clin. Pathol.*, 36: 539-545.
- 32.-GERDES, J., LI, L.y SCHLUTER, C. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.*, 138: 867-873.
- 33.-GERDES, J., SCHWAB, U, LEMKE, H., STEIN, H. y col. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*, 31: 13-20.
- 34.-GERDES, J., LEMKE, H., BAISCH, H., y col. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, 133: 1710-1715.
- 35.-GRATZNER, H.G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218: 474-475.
- 36.-HOWARD, A. y PELC, S.R. (1951). Nuclear incorporation of <sup>32</sup>P as demonstrated by autoradiographs. *Ex. Cell. Res.* 2: 178-187.
- 37.-HALL, P.A., LEVISON, D.A., WOODS, A.L., YU, C.C.W., KELLOCK, D.B., WATKINS, J.A., BARNES, D.M., GILLET, C.E., CAMPLEJOHN, R.D., WASEEM, N.H. y LANE, D.P. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

- immunolocalización in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.*, 162: 285-294.
- 38.-HALL, P.A. y LEVISON, D.A. (1990b). Review. Assesment of proliferation in histological material. *J. Clin. Pathol.*, 43: 193-195.
  - 39.-HITCHCOCK, C.L. (1991). Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. *Am. J. Pathol.*, 94: 444-445.
  - 40.-HUFF, J.P., ROOS, G., PEEBELS, C.L., HOUGHTEN, R., SULLIVAN, K.E.y TAN, E.M.(1990). Insights into native epitopes of proliferating cell nuclear antigen using recombinant DNA protein products. *J. Exp. Med.*, 172: 419-429.
  - 41.-ISOLA, J.J., HELIN, H.J., HELLA, M.J. y KALLIONIEMI, O. (1990). Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer*, 65: 1180-1184.
  - 42.-JASKULSKI, D., GATTI, G., TRAVALI, S., CALABRETTA, B.y BASERGA, R. (1988). Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J. Biol. Chem.*, 263: 1075-1079.
  - 43.-KANITAKIS, J., HOYO, E., CHOUVET, B., THIVOLET, J., FAURE, M.y CLAUDY, A. (1993). Keratinocyte proliferation in epidermal keratinocyte disorders evaluated through PCNA/Cyclin immunolabelling and AgNOR counting. *Acta Derm.Venereol.*, 73: 370-375.
  - 44.-KERR, K.M., ROBERTSON, A.M.G. y LAMB, D. (1983). In vitro thymidine labelling of human pulmonary neoplasms. *Br. J. Cancer*, 47: 245-251.
  - 45.-KORKOLOPOULOU, P., CHRISTODOULOU, P., PAPANIKOLAOU, A. y THOMAS-TSAGLI, E. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organizer regions in CNS tumors: correlation with histological and tumor grade. *Am. J. Surg. Pathol.*, 17: 912-919.
  - 46.-KURKI, P., OGATA, K. y TAN, E.M. (1987). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/Cyclin in activated human T Lymphocytes. *J. Immunol.*, 138: 4114-4120.
  - 47.-LLOYD, R.V., WILSON, B.S., VARANI, J., GAUR, P.K., MOLINE, S.y MAKARI, J.G.(1985). Immunocytochemical characterization of a monoclonal antibody that recognizes mitosing cells. *Am. J. Pathol.*, 121: 275-283.
  - 48.-McCORMICK, D. y HALL, P.A. (1992). The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, 21: 591-594.
  - 49.-McCORMICK, D., YU C., HOBBS, C. y HALL, P.A. (1993a). The revelance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology*, 22: 543-547.
  - 50.-McCORMICK, D., CHONG, H., HOBBS, C., DATTA, C. y HALL, P.A. (1993b). Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology*, 22: 355-360.

- 51.-McGURRIN, J.F., DORIA M.I. y DAWSON, P.J. (1987). Assessment of tumor cell kinetics by immunohistochemistry in carcinomas of the breast. *Cancer*, 59: 1744-1750.
- 52.-McNICOL, A.M. y DUFFY, A.E. (1987). A study of cell migration in the adrenal cortex of the rat using bromodeoxyuridine. *Cell. Tissue Kinet.*, 20: 519-526.
- 53.-MERCER, W.E., SHIELDS M.T., LIN, D., ETTORE, A. y ULLRICH, S.J. (1991). Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 1958-1962.
- 54.-MIYACHI K., FRITZLER, M.J., TAN, E.M. (1978). Autoantibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, 121: 2228-2234.
- 55.-MONTIRONI, R., GALLUZI, C.M., DIAMANTI, L., GIANNULIS, I., PISANI, E. y SCARPELLI, M. (1993). Prostatic intra-epithelial neoplasm. Expression and location of proliferating cell nuclear antigen in epithelial, endothelial and stromal nuclei. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, 422: 185-192.
- 56.-MORRIS, G.M. y MATHEWS, M.B. (1989). Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 264: 13856-13864.
- 57.-MORSTYN, G., PYKE, K., GARDNER, G., ASHCROFT, R., de FAZIO, A., y BHATHAL, P. (1986). Immunohistochemical identification of proliferating cells in organ culture using Bromodeoxyuridine and a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 697-701.
- 58.-NEMOTO, R., UCHIDA, K., HATTORI, K., SHIMAZUI, T., NISHIJIMA, Y., SAITO, S., KOISO, K. y HARADA, M. (1988). S phase fraction of human bladder tumor measured in situ with bromodeoxyuridine labeling. *J. Urol.*, 139: 286-289.
- 59.-NEMOTO, R., HATTORI, K., UCHIDA, K., SHIMAZUI, T., KOISO, K. y HARADA, M. (1990). Estimation of the growth fraction in situ in human bladder cancer with bromodeoxyuridine labelling. *British. J. Urol.* 65: 27-31.
- 60.-OGATA, K., OGATA, Y., TAKASAKI, Y. y TAN, E.M. (1987). Epitopes on proliferating cell nuclear antigen recognised by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. *J. Immunol.*, 139: 2942-2946.
- 61.-OTTAVIO, L., CHANG, C.D., RIZZO, M.G., TRAVALLI, S., CASADEVALL, C. y BASERGA, R. (1990). Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 303-309.
- 62.-PAN, S., OKAZAKI, Y. y TAKEMOTO, T. (1990). In vivo cell kinetics of the duodenum during and after healing of cysteamine-induced duodenal ulcer in rats using bromodeoxyuridine incorporation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 5: 281-287.

- 63.-PAPADOPOULOS, T., PFEIFER, G.P., HOPPE, F., DRAHOVSKY, D. y MÜLLER-HERMELINK, H.K. (1989). Proliferation-associated expression of DNA methyltransferase in human embryonic lung cells. *Virchows Arch. A. Anat. Pathol.*, 56: 371-375.
- 64.-PELOSI, G., ZAMBONI, G. y DOGLIONI, C. y cols. (1992). Immunodetection of proliferating cell nuclear antigen assesses the growth fraction and predicts malignancy in endocrine tumors of the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.*, 16: 1215-1225.
- 65.-PUCHTLER, H. y MELOAN, S.N., (1985). On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry*, 82: 201-204.
- 66.-QUAK, J.J., DONGEN, G.V., KOKEN, M.A.E. y col.. (1990). Identification of a 43 kDa nuclear antigen associated with proliferation by monoclonal antibody K 112. *Int. J. Cancer*, 46: 50-55.
- 67.-RAMSDELL, J.S. (1990). Thyrotropin-releasing hormone tuoliferation by blocking entry into S phase. *Endocrinology*, 126: 472-479.
- 68.-ROA, I., ARAYA, J., SHIRAIISHI ,T. y cols. (1993). Proliferating cell nuclear antigen in gallblader carcinoma. *Histopathology*, 23: 179-183.
- 69.-SAHIN, A.A., RO, J.I., EL-NAGGAR A.K., y col. (1991). Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms. A comparative study of Ki-67 immunostaining and flow cytometric determinations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 96: 512-519.
- 70.-SCHUTTE, B., REYNDERS, M.M.J., BOSMAN, E.T. y BLIJHAM, G.H. (1987a). Studies with anti-Bromodeoxyuridine antibodies: II. Simultaneous immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by in vivo labelling of mouse intestinal mucosa. *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 371-374.
- 71.-SCHUTTE, B., REYNDERS, M.M., BOSMAN, F.T. y BLIJHAM, G.H. (1987b). Effect of tissue fixation on antibromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 1343-5.
- 72.-SCHWARTZ, B.R., PINKUS, G., BACUS, S., TODER, M. y WEINBERG, D.S. (1989). Cell Proliferation in non Hodgkin´s lymphomas. Digital image analysis of Ki-67 antibody staining. *Am. J. Pathol.*, 134: 327-336.
- 73.-SEKI, S., SAKAGUCHI, H., KAWAKITA, N., YANAI, A., KUROKI, T., KOBAYASHI, K. (1993). Analysis of proliferating biliary epithelial cells in human liver disease using monoclonal antibody against DNA polymerase æ. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, 422: 133-143.
- 74.-SILVESTRINI, R., COSTA, A., VENERONI, S., DEL BINO, G. y PERSICI, P. (1988). Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell. Tissue Kinet.*, 21: 123-131.
- 75.-SMETANA, K., GYORKEY, F., CHAN, P.K. TAN, E. y BUUSCH, H. (1983). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and human malignant tumor

- nucleolar antigen (HMTNA) in nucleoli of human hematological malignancies. *Blood*. 46: 133-141.
- 76.-STEEL, G.C. (1977). Experimental techniques for cell kinetic studies. En: *Growth Kinetics of Tumors* (Ed. by Steel, G.G.) p. 86. Clarendon Press. Oxford.
- 77.-TAKASAKI, Y., DENG, J.S. y TAN, E.M. (1981). A nuclear antigen associated with proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cells. *J. Exp. Med.*, 154: 1899-1909.
- 78.-TANAKA, S., HU, S.Z., WANG, T.S.F. y KORN D. (1982). Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibody against DNA polymerase  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, 257: 8391-8396.
- 79.-TATEYAMA, H., MIZUNO, T., TOYOHITO, T., EIMOTO, T., HASHIMOTO, T. y MASAOKA, A. (1993). Thymic epithelial tumours. Evaluation of malignant grade by quantification of proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organizer regions. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.*, 422: 265-269.
- 80.-THEUNISSEN, P.H.M.H., LEERS, M.P.G. y BOLLEN, C.M. (1992). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology*, 20: 251-255.
- 81.-THIRY, M. (1988). Immunoelectron microscope localization of bromodeoxyuridine incorporated into DNA of Ehrlich tumor cell nucleoli. *Exp. Cell Res.* 179: 204-213.
- 82.-TOSCHI, L. y BRAVO, R. (1988). Changes in Cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J. Cell. Biol.*, 107: 1623-1628.
- 83.-TRIVIÑO, A. (1993) Leiomyosarcoma de extremidades. *Med Clin (Barc)*, 100: 279.
- 84.-TRIVIÑO, A., BABÍO, J., CLAROS, I. y HERRERO-ZAPATERO, A. (1993) Pedal Leiomyosarcoma. *J. Foot Surg.*, 32: 539-540.
- 85.-TSUJI, T., SHRESTHA, P., YAMADA K., TAKAGI, H., SHINOZAKI, F., SASAKI, K., MAEDA, K. y MORI, M. (1992). Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin. An immunohistochemical study. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, 420: 377-383.
- 86.-VAN DE KANT, H.J.G., VAN PELT, A.M.M. VERGOUWEN, R.P.F.A. y DE ROOIJ, D.G. (1990). A rapid immunogold-silver staining for detection of bromodeoxyuridine in large numbers of plastic sections, using microwave irradiation. *Histochemical Journal*. 22: 321-326.
- 87.-VAN DIERENDONCK, J.H., WIJSMAN, J.H., KEIJZER, R., VAN DE VELDE, C.J.H. y CORNELISSE, C.J. (1991). Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.*, 138: 1165-1172.

- 88.-WALDMAN, F.M., CHEW, K., LJUNG, B-M. (1993). A comparison between bromodeoxyuridine and 3H thymidine labeling in human breast tumors. *Mod. Pathol.*, 4: 718-722.
- 89.-WASEEM, N.H. y LANE, D.P. (1990). Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of nucleolar form. *J. Cell. Sci.*, 96: 121-129.
- 90.-WATANABE, Y.G. y CARBAJO-PÉREZ, E. (1990). Cell proliferation in pituitary monolayers as revealed by the BrDU labelling method. *Biomed. Res.*, 11: 373-377.
- 91.-WEINDER, N., MOORE, D.H., LJUNG, B.M. y col.. (1993). Correlation of bromodeoxyuridine (BRDU) labeling of breast carcinoma cells with mitotic figure content and tumor grade. *Am. J. Surg. Pathol.*, 10: 987-994.
- 92.-WINTZER, H.O., ZIPFEL, I., SCHULTE-MONTING, J., HELLERICH, U. y von KLEIST, S. (1991). Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*, 67: 421-429.
- 93.-YU, C.C-W., HALL, P.A., FLETCHER, C.D.M. y col. (1991). Haemangiopericytomas: the prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Histopathology*, 19: 29-34.
- 94.-ZARBO, R.J., VISSCHER, D.W. y CRISSMAN, J.D. (1989). Two-color multiparametric method for flow cytometric DNA analysis of carcinomas using staining for cytokeratin and leukocyte-common antigen. *Anal. Quant. Cyto. Histol.*, 11: 391-402.