



SEAP

Calle Ancora, 3, 2º B  
28045 MADRID  
Tfno. y Fax 91 539 86 28  
MAIL: SEAP@SEAP.ES



Programa de Garantía de  
Calidad en Patología

## Módulo de PATOLOGÍA LINFOIDE

### Ronda nº 7

**Antígeno probado:** bcl-2

**Tejido probado:** Amígdala

**Instrucciones:** Los participantes fueron invitados a teñir con anticuerpo anti-bcl 2 la preparación remitida por el programa (amígdala fijada en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

### Bcl-2

La proteína Bcl-2 ("B-cell lymphoma/leukaemia-2") forma parte de una familia de proteínas anti-apoptosis que se localizan en las membranas mitocondriales, de retículo endoplásmico y nucleares. Las más conocidas de esta familia son Bcl2, Bax y Bcl-X. Bcl-2, una proteína de 25 KDa, tiene como función principal inhibir la apoptosis, aunque también se ha demostrado su papel en el mantenimiento de la memoria de las células B, regulación de la señalización por calcio y promoción de la proliferación celular. Su expresión está inducida por IL2. Bcl-2 fue inicialmente descubierto como un proto-oncogen en los linfomas B de bajo grado. Hoy se sabe que también ejerce un efecto proto-oncogénico mediante la activación de la angiogénesis.

Expresión en tejidos normales: En los tejidos adultos, normalmente se expresa en células en rápida división y diferenciación. En los tejidos linfoides, Bcl-2 se expresa fuertemente en células T, células pro-B y en células B maduras (en las cuales la vida se expande), mientras que no se expresa en los centros germinales B (donde la apoptosis forma parte de la vía de desarrollo para seleccionar solo células productoras de anticuerpos).

Expresión en Neoplasias: En tumores, la sobreexpresión de Bcl-2 participa en la carcinogénesis mediante la supresión de la muerte celular programada y la extensión de la vida media de las células neoplásicas. Su sobreexpresión contribuye, por esta misma razón, a la resistencia a la quimioterapia. Sin embargo, el valor pronóstico de la sobreexpresión de Bcl-2 depende del tipo de neoplasia, ya que se ha observado que en algunas, el incremento de Bcl-2 puede asociarse a buen pronóstico, como en el cáncer de mama y en el de colon, e incluso tener un efecto supresor de tumores.

Su sobreexpresión es muy frecuente en muchos tipos de neoplasias, que incluyen linfomas no Hodgkin, leucemias, adenocarcinomas, (próstata, colorectal, estómago, pulmón, etc.), carcinoma escamocelular, carcinoma de células pequeñas, neuroblastoma y diferentes tipos de sarcomas, sobre todo GIST, tumor fibroso solitario y sarcoma sinovial.

En los linfomas, la sobreexpresión de Bcl-2 se suele deber a la traslocación del gen que lo codifica junto al de las cadenas pesadas de Igs t(14;18) bcl2/JH con reordenamiento del gen. Esta alteración es especialmente importante en el linfoma folicular lo que induce sobreexpresión de Bcl-2 en el 100% de los de grado I, en más del 80% de los de grado II y en el 75% de los de grado III. Sin embargo, el linfoma folicular de la piel suele ser Bcl-2 negativo.

Utilidad: Es un marcador muy útil en la distinción entre hiperplasia folicular reactiva y linfoma folicular, pero carece de utilidad para diferenciar entre linfoma folicular y otros tipos de linfomas de bajo grado, ya que la mayoría expresan Bcl-2.

Puede ser útil también en el diagnóstico diferencial de tumores de partes blandas, ya que las fibromatosis y el "histocitoma fibroso maligno" (si aún se contempla) son negativos.

Control: en una amígdala reactiva, todas las células de periferia del folículo, es decir, los linfocitos B del manto y los linfocitos T interfoliculares son positivas, con una intensa y definida tinción citoplasmática. Todos los centrocitos y centroblastos deben ser negativos y sólo se teñirán en el centro folicular algunos linfocitos T.

**Número de laboratorios participantes:**

- Remitidos: 87

- **Contestados:** 77, (88.5%) para el GCP y 75 (86.2%) para el Control Local.

### **Anticuerpos y Métodos evaluados:**

Los anticuerpos más utilizados en inmunohistoquímica diagnóstica son los monoclonales 124 y 100/D5

### **Anticuerpos Primarios, proveedores y diluciones:**

<b>Proveedor</b>	<b>Nº</b>	<b>Código</b>	<b>Clon</b>	<b>Dilución</b>
Dako	26	N1587	124	Prediluido
Dako	22	M0887	124	1:20, 1:50, 1:80, 1:100, 1:120, 1:350
Master Diagnóstica	15	004002	100/D5	Prediluido
Novocastra/Vision Biosystems	5	NCL-bcl-2/ BCL-2-L-CE	Bcl2/100/D5	1:20, 1:50, 1:80, 1:120
Novocastra/Vision Biosystems	1	RTU bcl-2/ BCL-2-R-7- CE	Bcl2/100/D5	
Zymed-Invitrogen	2	08-1193	Bcl2/100	Prediluido
Diagnostic Biosystems	1	Mob 130	100/D5	1:25
Lab Vision- Neomarkers	1	MS-597	8C8	1:200
Biogenex	1	MU287-UC	Bcl2/100	1:800
Ventana	1	760-2693	Bcl2/100/D5	prediluido
No especificado	3			

### **Recuperación antigénica:**

- Microondas
- Olla a presión
- Baño María
- Autoclave
- PT Module Lab Vision
- Benchmark Ventana
- BondMax Vision Biosystems

### **Detección:**

- Kit Dako Envision

Kit Dako LSAB+/2  
 Kit Ventana Iview  
 Kit Bond Polymer Define Detection Vision Biosystems  
 Biogenex  
 Masvision polivalente Master Diagnóstica

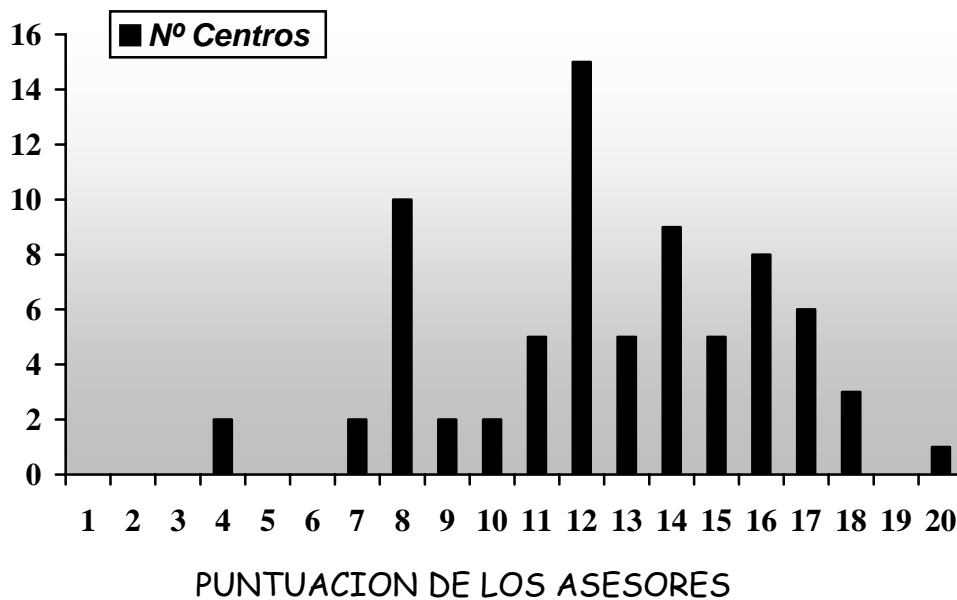
**Automatización:**

Dako Techmate 500  
 Lab Vision Autostainer  
 Biogenex 6000  
 Ventana Benchmark XT  
 Bond Max Vision Biosystems

**Estudio de los controles locales:**

Los controles locales correspondían en su mayoría a amígdalas no neoplásicas, aunque también se recibieron multibloques (2) y linfoma no Hodgkin de bajo grado (1)

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:



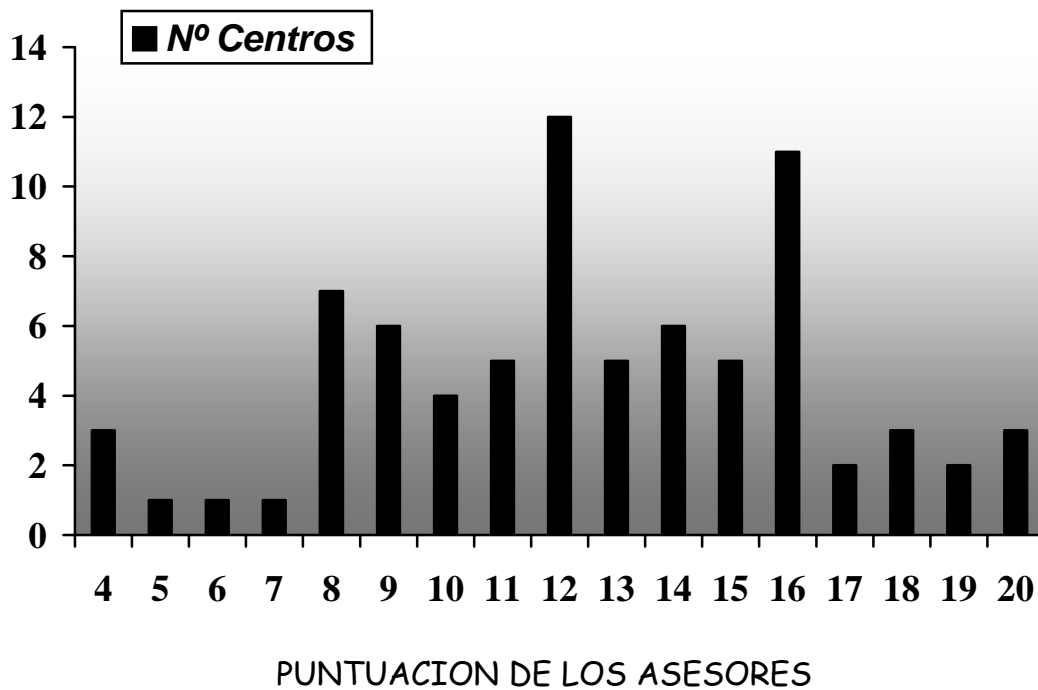
Ya que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 69,33% (52) de las 75 preparaciones remitidas se consideraron como aptas, con un 24% (18) con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como óptimas o cercanas y un único caso puntuado como 20/20.

Un 30'66% (23) de los centros participantes no alcanza el nivel mínimo para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

El principal problema detectado ha sido la escasa sensibilidad de la técnica, con una intensidad de la tinción o número de células inmunorreactivas inferior al esperable. Problemas menos frecuentes, han sido los artefactos técnicos generales y los debidos a un exceso de pretratamiento.

**Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:**

Se remitió un corte de amígdala fijada en formol e incluida en parafina para su inmunotinción para bcl-2. El resultado de la evaluación fue:



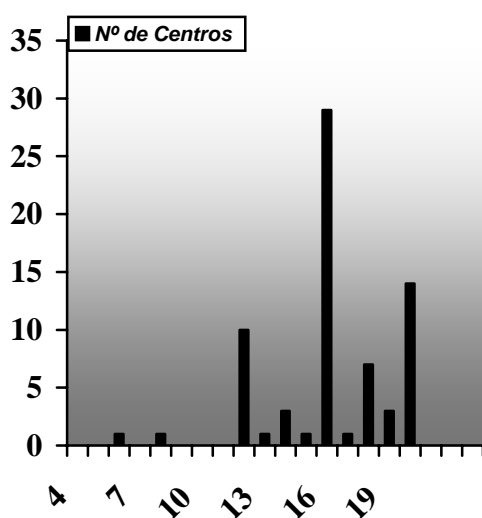
Si consideramos aceptable una puntuación igual o superior a 12, el 63'63% (49) de las 77 preparaciones remitidas alcanzaron este nivel. Un 27'27% (21) obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, considerada como óptima o cercana. Un 36'36% (28) de los centros no alcanzaron la calidad suficiente para considerar que la técnica puede aplicarse de manera rutinaria.

Al igual que en el control local, la técnica ha mostrado en un elevado porcentaje de centros escasa sensibilidad, con intensidades y detección de células inferiores a lo esperable.

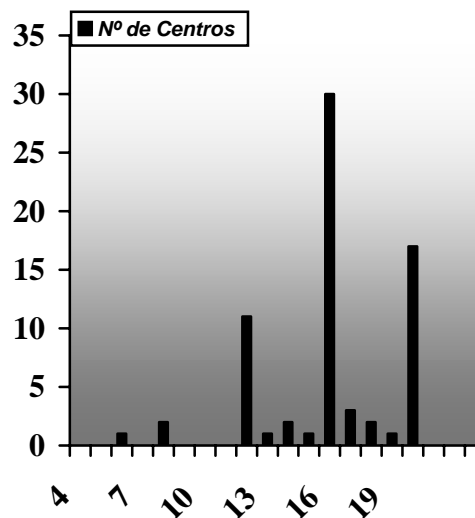
### Resultados de la autoevaluación:

El 94'6% de los técnicos y patólogos remitieron su valoración de los controles locales. Respecto a la evaluación de los controles GCP, el 97'3% de los participantes realizaron la evaluación. Los resultados obtenidos del análisis de tales datos son los siguientes:

#### Control Local



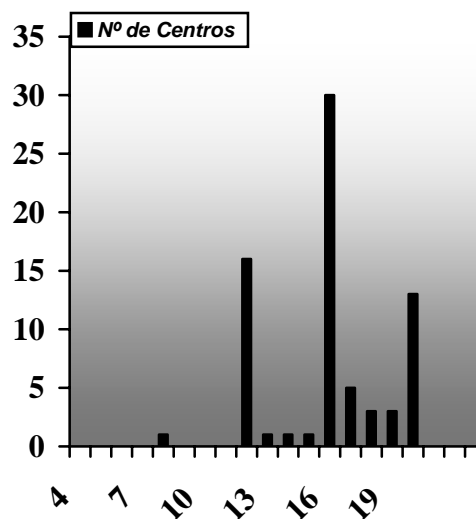
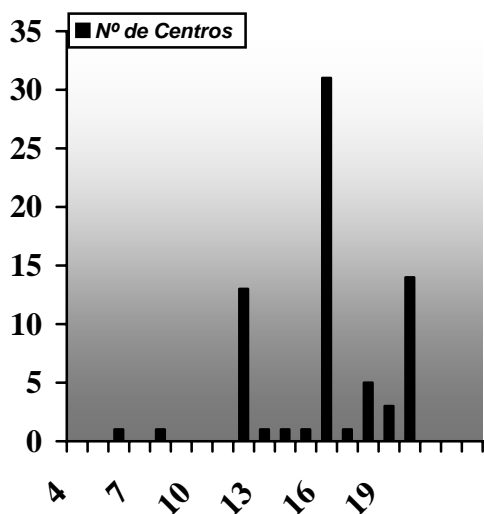
Puntuaciones del Patólogo



Puntuaciones del Técnico

Como se puede observar en los gráficos y seguimos reconociendo en la mayoría de las técnicas analizadas, la percepción local sobre los resultados es muy superior a la valoración de los observadores externos. De hecho, salvo en dos evaluaciones, el resto ha considerado su técnica válida para diagnóstico, reflejando que el nivel de sensibilidad exigido a la detección es muy inferior del que debiera. Para los patólogos y técnicos que han remitido su evaluación, el 97'2% de las preparaciones eran válidas para diagnóstico (mayores o iguales a 12/20) y el 76% de los casos obtenían una puntuación excelente, igual o superior a 16/20. Esas cifras eran muy superiores a las de los observadores externos (69'3% y 24%, respectivamente).

## Control del GCP



Puntuaciones del Patólogo

Puntuaciones del Técnico

Los resultados son similares al control local, con un 97,2% de preparaciones con una puntuación igual o superior a 12/20 para los patólogos, y un 98'6% para los técnicos, consideradas suficientes para uso diagnóstico, lo que contrasta con la evaluación externa (63'6%).

### Inmunotinción óptima:

Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba teñidos el número de células esperado con una adecuada relación en la intensidad de la tinción con respecto al contraste empleado y con mínimo o ausente artefacto tanto de técnica inmunohistoquímica (degradación del tejido por sobrecalentamiento, tinción de fondo, p. ej.) como de técnica histológica (contraste adecuado, ausencia de hidratación, etc).

En el caso de los tejidos linfoides se consideró una inmunotinción óptima la que mostraba una tinción citoplásmica intensa en las células de los mantos foliculares y las células linfoides interfoliculares, con negatividad de los centros foliculares, exceptuando salpicados linfocitos T pequeños.

En todos los tejidos se puntuó la ausencia de fondo moderado-intenso o tinción inespecífica y de artefactos técnicos, en especial la no degradación del tejido por sobrecalentamiento.

### Guía utilizada para la evaluación:

Los criterios para considerar óptima una tinción para bcl-2 en una amígdala fueron:

- Tinción fuerte y definida del 100% de las células B normales del manto.

- Fuerte tinción citoplasmática en las células linfoides interfoliculares

- Tinción de aislados linfocitos pequeños en el centro folicular

- Ausencia de fondo.

Cada uno de los cuatro asesores concedió una puntuación entre 0 y 5, lo que daba una puntuación total entre 0 y 20 puntos. La puntuación fue como sigue:

Puntuación	Patrón de tinción
0/No remitido	No remisión de preparación
1	Ausencia de tinción significativa
2	Tinción insuficiente de células diana
3	Tinción citoplasmática de células diana suficiente para diagnóstico, aunque mejorable en intensidad o artefactos
4	Tinción de células diana adecuada
5	Tinción óptima con clara detección de linfocitos T centrofoliculares y ausencia de fondo

### Mejores métodos:

Obtuvieron una puntuación de 20/20 en la preparación del GCP:

Método 1:

Automatización: Autostainer Plus

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión con tampón Citrato pH 6.5 durante 2 minutos.

Anticuerpo primario: Dako M887 Clon 124 Dilución 1:350, durante 30 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: Envision Dual Dako K5007

Cromógeno: Dako



Método 2:

Automatización: Dako Techmate 500

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión 1 minuto con tampó

EDTA pH 9.

Anticuerpo primario: Dako M887 Clon 124

Método de detección: Dako K5007

Cromógeno: Dako DAB.

Obtuvo una puntuación de 20/20 en las preparaciones de controles locales:

Automatización: Techmate Horizon

Recuperación antigénica con calor: Olla a presión 2 minutos con tampón pH 6.

Anticuerpo primario: Dako M887 Clon 124 Dilución 1:50, durante 30 minutos a temperatura ambiente

Método de detección: No indicado

Cromógeno: Dako DAB 5 minutos a temperatura ambiente.

### **Comentarios:**

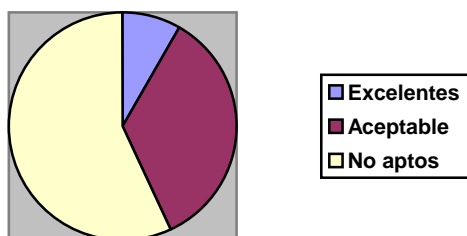
El análisis de los resultados de inmunotinción con diversos anticuerpos monoclonales y condiciones de tinción muestra resultados de mayor calidad que en la ronda anterior. Los monoclonales empleados -clones 124, bcl2/100/D5 y 100- son útiles para su uso en rutina, así como diferentes tampones para el desenmascaramiento antigénico.

El principal problema de los laboratorios considerados no aptos ha sido la escasa sensibilidad de la técnica con una intensidad de tinción o una proporción de células marcadas muy inferior a lo esperado.

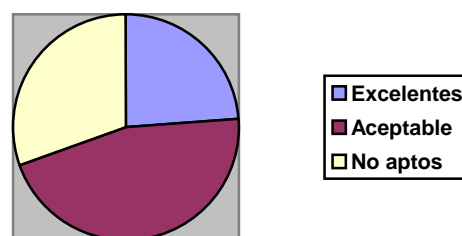
**Evolución de los resultados respecto al control de bcl-2 previo (en 2ª ronda linfoide):**

	<b>2ª Ronda</b>	<b>7ª Ronda</b>
% de Aptos Control Local ( $\geq 12$ )	43'06%	69,33%
% de Excelentes Control Local ( $\geq 16$ )	8'33%	24%
% de Aptos Control GCP ( $\geq 12$ )	58'33%	63'63%
% de Excelentes Control GCP ( $\geq 16$ )	11'11%	27'27%

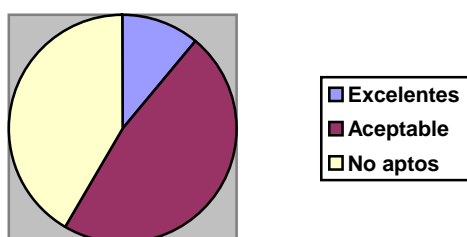
**Control Local 2ª Ronda**



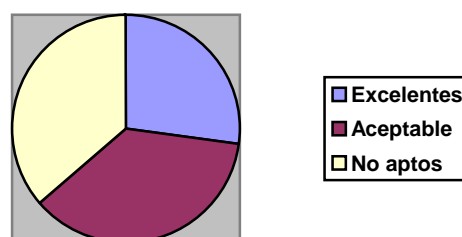
**Control Local 4ª Ronda**



**Control GCP 2ª Ronda**



**Control GCP 4ª Ronda**



Como se puede apreciar en los gráficos, ha existido una franca mejoría en los resultados obtenidos sobre el control local, siendo algo menos pronunciada, aunque importante en los del GCP. Los datos señalan una notable mejoría en la realización de la técnica en ambos tipos de control, que se aprecia mejor en unos controles locales mejor seleccionados que en la ronda previa.

Queda, sin embargo, un porcentaje aún importante de laboratorios (30'66% y 36'36%) en los que la técnica no puede considerarse de calidad suficiente para ser empleada en diagnóstico.

**Referencias:**

1. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8590-607. Review.
2. Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM: Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Modern Pathology* 1998; 11:864-869.
3. Karl et.al *Cancer Research* 2005, 65: 5063-5069
4. [www.nordiqc.org](http://www.nordiqc.org)