

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p21ras EN EL ADENOCARCINOMA RENAL LOCALMENTE CONFINADO Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS

A. TEJIDO SÁNCHEZ, J. PASSAS MARTÍNEZ, M. SÁNCHEZ CHAPADO*,
J.D. PIEDRA LARA, C. CAPITÁN MANJÓN, P. RAMOS GUILLÉN**,
O. LEIVA GALVIS

Servicio de Urología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. *Servicio de Urología. **Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares. Madrid.

PALABRAS CLAVE:

p21. Adenocarcinoma renal. Inmunohistoquímica.

KEY WORDS:

p21. Renal cell carcinoma. Immunohistochemistry.

Actas Urol Esp. 26 (6): 408-412, 2002

RESUMEN

OBJETIVO: La proteína p21^{ras} es codificada por los tres genes de la familia ras (H-, K- y N-ras), participando en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular. El objetivo de este estudio es determinar la expresión de esta proteína en el adenocarcinoma renal localmente confinado, así como sus relaciones con diferentes variables histopatológicas y sus implicaciones pronósticas.

MÉTODO: 58 adenocarcinomas renales, estadios pT1-T3a N0 M0 (TNM 1997), tratados mediante nefrectomía radical o parcial con intención curativa. Analizamos diferentes variables clínicas y anatómopatológicas, así como la expresión de p21^{ras} en tejido parafinado, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

RESULTADOS: El porcentaje medio de núcleos teñidos fue de 6,1%, con un rango comprendido entre 0 y 45%. No obtuvimos asociación estadísticamente significativa de la expresión de p21^{ras} y el tamaño tumoral ($p=0,698$), el grado nuclear ($p=0,676$) o el estadio histopatológico ($p=0,095$). El análisis de supervivencia tampoco demostró diferencias significativas cuando estratificamos a los pacientes utilizando como punto de referencia el valor medio de la muestra ($p=0,134$).

CONCLUSIONES: La expresión de p21^{ras} no ha demostrado relacionarse con ninguna de las variables histopatológicas analizadas; tamaño, grado y estadio, ni con la supervivencia, por lo que esta proteína no parece relacionarse con la evolución del adenocarcinoma renal.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The p21^{ras} protein is encoded by the three ras genes (H-, K- and N-ras) and participate in the regulation of normal cell growth and cell differentiation. The objective of this study is to determine the expression of this protein in locally confined renal cell carcinoma, as well as its relations with different histopathological variables and their prognostic implications.

METHOD: 58 renal cell carcinomas, in pT1-T3a N0 M0 (TNM 1997) stages, treated by radical or partial nephrectomy with curative intention. We analysed different clinical and anatomopathological variables, as well as expression of p21^{ras} in paraffinized tissue, using immunohistochemical techniques.

RESULTS: The mean percentage of stained nuclei was 6.1%, with a range lying between 0 and 45%. We did not obtain statistically significant association between expression of p21^{ras} and the tumour size ($p=0.698$), the nuclear grade ($p=0.676$) or the histopathological stage ($p=0.095$). The survival analysis also did not show significant differences when we stratified the patients using the mean value of the sample as reference point ($p=0.134$).

CONCLUSIONS: Expression of p21^{ras} was not demonstrated to be related to any of the histopathological variables analysed: size, grade and stage, or with survival. Therefore, this protein does not appear to be related to the evolution of renal cell carcinoma.

La proteína p21^{ras} es codificada por los oncogenes de la familia *ras*. Dicha familia está formada por tres protooncogenes (H-ras, K-ras y N-ras), un gen similar a estos denominado TC21, y otros 50 genes relacionados que codifican proteínas análogas con actividad GTPasa que regulan diversos procesos celulares. Tienen gran importancia en los procesos de carcinogénesis, gracias a la producción de diferentes proteínas G monoméricas de pequeño tamaño que participan en la transducción de la señal proliferativa inducida por factores de crecimiento y hormonas, cuando estos se unen a sus receptores localizados en la membrana celular. Además, han sido implicados en la inhibición de la apoptosis inducida por agentes quimioterápicos y en la estimulación de la angiogénesis tumoral¹.

La presencia de mutaciones en los genes de la familia *ras* se ha demostrado en el 30% de las neoplasias en humanos. Este porcentaje varía dependiendo del tipo de tumor; así pues, estas mutaciones aparecen en un porcentaje comprendido entre el 50 y el 90% en el cáncer de páncreas, en un 50% en el cáncer de colon y en el 40% de los seminomas. Sin embargo, está presente en menos del 5% de los carcinomas de mama, ovario y estómago².

El objetivo de este estudio es determinar la expresión de la proteína p21^{ras} en pacientes con adenocarcinoma renal en estadios localmente confinados (pT1-3a, N0, M0), analizando su relación con diferentes variables histopatológicas; estadio, tamaño y grado nuclear, así como su importancia pronóstica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de pacientes: Se han estudiado los especímenes correspondientes a 58 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma renal, tratados mediante cirugía con intención curativa (radical o parcial). Incluimos en el estudio pacientes con tumores renales en estadios histopatológicos pT1, pT2 y pT3a (TNM 1997), y que no presentaban márgenes quirúrgicos positivos. El seguimiento mínimo fue de 24 meses en el caso de que no se objetivase recidiva tumoral, mientras que los pacientes que presentaron recidiva fueron seguidos hasta su fallecimiento.

Estudio histopatológico e inmunohistoquímico: En el estudio histopatológico se consideraron los

siguientes parámetros para su análisis: tamaño tumoral, grado nuclear (utilizando los criterios de Fuhrman), márgenes quirúrgicos, multifocalidad, afectación ganglionar y estadio.

La determinación de la expresión de la proteína p21^{ras} se realizó en muestras de tejido tumoral incluidas en parafina, que fueron cortadas con un microtomo en secciones de 5 a 7 µm, y colocadas sobre los cristales. Los cristales fueron calentados hasta 58º C entre 16 y 24 horas y deparafinados con xilol, para ser posteriormente rehidratados con etanol, en concentraciones decrecientes. Se añadió peróxido de hidrógeno al 3%, siendo incubadas las muestras durante 5 minutos. A continuación aplicamos el anticuerpo primario, utilizando los anticuerpos monoclonales anti-p21RAS, NCC-RAS-001 a una concentración de 1:60. Posteriormente se añadieron unas gotas del anticuerpo secundario de la preparación (LSAB/HRP. Dako Diagnósticos S.A.) y se incubaron de nuevo durante 10 minutos. Las muestras fueron entonces cubiertas por fosfata-sa alcalina e incubadas durante 10 minutos, para aplicar después la solución de substrato cromógeno (substrato DAB. Dako Diagnósticos S.A.) incubándose durante 5 minutos. Por último se realizó la contratinción cubriendo las muestras con heatoxilina y montando éstas en medio acuoso.

Valoración de la expresión inmunohistoquímica: Todas las muestras fueron evaluadas por dos observadores independientes, sin saber en ningún momento de que pacientes procedían, desconociendo por tanto su evolución clínica. Se utilizó microscopía óptica, con un objetivo de x40 para contabilizar el porcentaje de núcleos teñidos en un total de 600 células, distribuidas en 6 campos elegidos al azar. La cuantificación se realizó de forma visual por los dos observadores de forma independiente (300 células cada uno), calculándose el porcentaje de tinción dividiendo el número de núcleos positivos por el número total de células contadas. (Fig. 1)

A efectos de estudio estadístico, establecimos como punto de corte para p21^{ras} el valor medio de los porcentajes obtenidos en el total de la muestra.

Estudio estadístico: Para determinar la asociación entre variables se empleó el test de la Chi cuadrado, siendo ésta sustituida por la prueba exac-

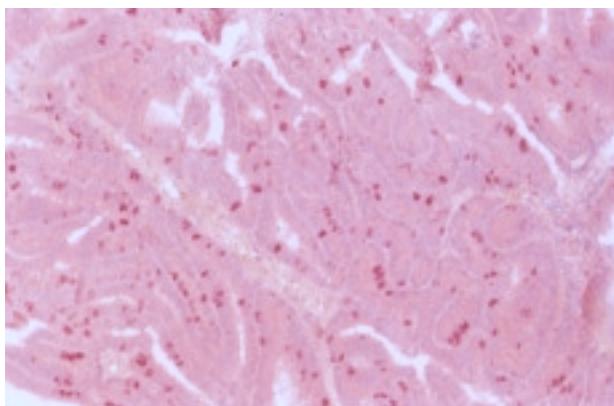


FIGURA 1: Preparación histológica en la que se aprecian los núcleos de las células tumorales con tinción positiva para p21 en color rojo.

ta de Fisher en el caso de muestras pequeñas, así como comparación de medias (T-test). Para analizar la supervivencia se empleó el método de Kaplan-Meier para construir las curvas de supervivencia y el test de Log-Rank. Como nivel de significación estadístico se consideró un valor de $p<0,05$.

RESULTADOS

Estudiamos 58 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma renal, tratados mediante nefrectomía radical o parcial con intención curativa. De los pacientes analizados, 15 fallecieron (25,8%), de los cuales 14 (24,1%) lo hicieron por causa relacionada con su neoplasia, y 1 (1,7%), lo hizo por causa ajena al tumor. Los 14 pacientes fallecidos por causa tumoral presentaron recidiva en forma de metástasis, principalmente pulmonares (13 de los 14 casos). El tiempo medio de seguimiento para toda la muestra fue de $45,4 \pm 31,7$ meses, con un rango de 2 a 115 meses. El tiempo medio de supervivencia de los pacientes fallecidos a causa de su tumor fue de $23,5 \pm 29,0$ meses, con un rango de 2-103 meses. El tiempo medio de seguimiento de los pacientes vivos fue de $54,7 \pm 26,4$ meses, con un rango de 24-108 meses.

Estudio histopatológico: Estudiamos 58 adenocarcinomas renales, siendo el tamaño medio de los tumores de 6,4 cm, con un intervalo comprendido entre 2 y 18 cm. De los 58 tumores, 23 (39,7%) se trataban de estadios pT1, 12 (20,7%) fueron estadios pT2, mientras que en otros 23 casos

(39,7%) el estadio patológico fue pT3a. Según el grado nuclear, 13 de los tumores correspondieron al grado 1 (22,4%), 26 al grado 2 (44,8%), 16 al grado 3 (27,6%) y 3 al grado 4 (5,2%).

Expresión de p21^{ras}: Obtuvimos un porcentaje medio de núcleos teñidos del 6,10%, con una desviación típica de 7,74 y un intervalo comprendido entre 0,0% y 45%. La mediana fue de 4,0%, mientras que la moda fue de 0,0%. En 13 casos la tinción fue negativa (22,4%) siendo en 43 el porcentaje de núcleos teñidos inferior a la media (74,13%), frente al 25,86% (15/58), que presentaron porcentajes de tinción por encima de ésta. (Fig. 2).

Asociaciones estadísticas: Analizamos la relación de la expresión de p21^{ras} con distintos parámetros clínicos e histopatológicos, sin obtener asociaciones estadísticamente significativas. Así pues, no obtuvimos relación con el tamaño tumoral ($p=0,698$ IC95%:-2,504; 1,687), el grado nuclear ($p=0,6$) o el estadio tumoral ($p=0,676$). Para llevar a cabo el estudio de supervivencia mediante curvas de Kaplan Meier dividimos la muestra en dos grupos, según el porcentaje de núcleos estuviese por encima o por debajo del 6%. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, con una $p=0,134$ (Fig. 3). Sin embargo sí demostraron significación estadística el tamaño tumoral ($p=0,03$), el grado nuclear ($p<0,001$) y la afectación de la grasa perirenal ($p=0,002$).

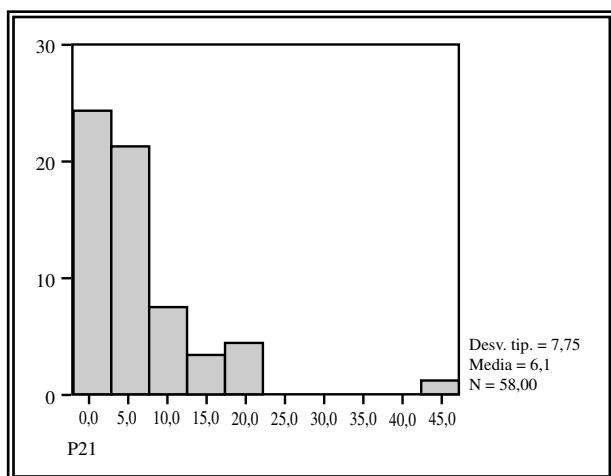


FIGURA 2: Diagrama de barras que muestra la distribución de los casos según el porcentaje de núcleos positivos para p21.

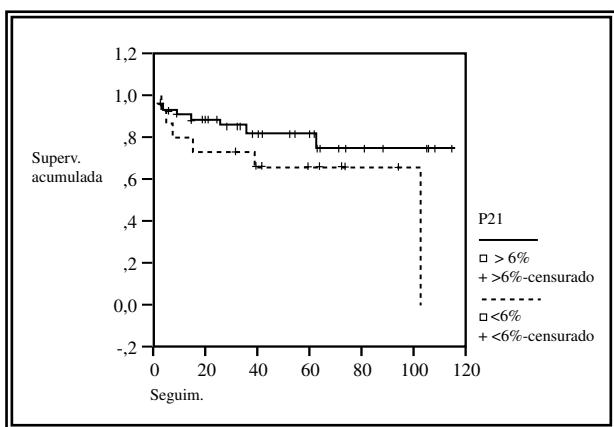


FIGURA 3: Curvas de supervivencia según el porcentaje de núcleos teñidos para p21, estableciendo el punto de corte en el 6%.

DISCUSIÓN

Los oncogenes de la familia *ras*, H-*ras*, K-*ras* y N-*ras* están localizados en los cromosomas 11, 12 y 1 respectivamente, y tienen un peso molecular de 21,000 daltons. Codifican la proteína p21^{ras}, compuesta por 188 aminoácidos, que participa en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, así como en otras funciones como son la regulación de la actividad de proteasas, glicosilación de las glicoproteínas de la superficie celular, la motilidad y la adhesión celular^{3,4}.

La proteína p21 se localiza en la membrana citoplasmática, actuando como transductor de señales externas gracias a diferentes receptores nucleares, y emitiendo señales intracelulares que provocan el crecimiento y proliferación incontrolados de la célula tumoral. Para ello la proteína p21 se une a GDP y GTP, con una actividad GTPasa intrínseca. En situaciones de reposo celular esta proteína se encuentra unida a GDP; cuando recibe una señal externa se libera de la GDP, incorporando una molécula de GTP, lo que produce un mensaje que activa la proliferación celular. En condiciones normales existe un equilibrio entre p21-GDP y p21-GTP, sin embargo, al producirse una mutación en esta proteína se frena su inactivación intrínseca, por su incapacidad de hidrolizar el GTP, con lo que se produce una situación de proliferación incontrolada. Dicha mutación suele ser puntual, generalmente de guanina a timidina en el codón 12, 13 ó 61, aunque también se han demostrado sobreexpresiones y amplificación de esta proteína⁵.

La vía Ras se ha relacionado con la transmisión de señal generada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Yabunaka y cols.⁶ utilizando células renales neoplásicas SMKT-R3 *in vitro*, introdujo en ellas un plásmido con el gen *v-H-ras* objetivando un aumento de la actividad glucolípido sulfotransferasa, frente a la demostrada en células de control, lo que confirma esta hipótesis.

La presencia de mutaciones en el oncogén *p21* ha sido demostrada en algunos tumores como el carcinoma de vejiga⁷ o el adenocarcinoma de colon⁸, lo que provocaría que la proteína p21 producida no fuese funcional y por tanto, no pudiera frenar el crecimiento celular incontrolado. En el adenocarcinoma renal se ha puesto de manifiesto la importancia de las mutaciones del oncogén *K-ras* en tumores inducidos en animales de experimentación^{9,10}, aunque dichas mutaciones no han sido demostradas en tumores humanos^{11,12,13}. Sin embargo, en una serie de 36 tumores humanos Kozma y cols.¹⁴ estudiaron la amplificación de *K-ras* demostrando la presencia de esta en 6 adenocarcinomas renales (16,6%). Cuando analizaron su relación con diferentes parámetros clínicos e histopatológicos, demostraron que se relacionaba con el grado histológico y el tamaño tumoral, lo que sugiere que la amplificación de *K-ras* se relaciona con una mayor posibilidad de progresión tumoral.

En nuestro estudio determinamos la expresión de la proteína p21 en una muestra de adenocarcinomas renales en estadio localmente confinado. Para ello utilizamos el anticuerpo monoclonal anti-p21RAS, NCC-RAS-001, que reconoce un epitopo dentro de la región 126-140 de la porción carboxilo terminal de la proteína p21^{H-ras}, una región peor conservada en la proteína p21 codificada por *K- y N-ras*. Obtuvimos una gran variabilidad en la expresión de p21 entre las muestras analizadas, estando el intervalo comprendido entre el 0% y el 45%, con una media del 6%. Cuando intentamos demostrar la relación de esta proteína con las diferentes variables histopatológicas determinadas no demostramos que la p21 se asociase con el tamaño tumoral, el grado histológico o el estadio. Para el análisis de supervivencia dividimos la muestra utilizando como punto de corte la media de núcleos teñidos (6%), obteniendo una mejor supervivencia en aquellos pacientes que presentaban un menor porcentaje de núcleos positivos, aunque los resultados no alcanzaron significación estadística ($p=0,13$).

REFERENCIAS

1. LOWY DR., WILLUMSEN BM: Function and regulation of *ras*. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**: 851-891.
2. MUÑOZ A: Protooncogenes implicados en la transducción de la señal mitógena. En "Cáncer. Genes y Nuevas Terapias". Editorial Hélice. Madrid 1997. Pág. 138-169.
3. SIMON MI, STRATHMANN MP, GAUTMAN N: Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* 1991; **262**: 802-808.
4. HART IR, EASTY D: Tumor cell progression and differentiation in metastasis. *Semin Canc Biol* 1991; **2**: 87-95.
5. QUILIAM LA, KHOSRAVI-FAR R, HUFF Y, DER CJ: Guanine nucleotide exchange factors: activators of the ras superfamily of proteins. *Bio-Essays* 1995; **17**: 385-404.
6. YABUNAKA N, HONKE K, ISHII A, OGISO Y, KUZUMI N, AGISHI Y, MAKITA A.: Involvement of ras in the expression of glycolipid sulfotransferase in human renal cancer cells. *Int J Cancer* 1997; **71**: 620-623.
7. NAGATA Y, ABE M., KOBAYASHI K, SAIKI S, KOTAKE T, YOSHIKAWA K, UEDA R, NAKAYAMA E, SHIKU H: Point mutations of c-ras genes in human bladder cancer and kidney cancer. *Jpn J Cancer Res* 1990; **81**: 22-27.
8. WARD R, HAWKINS N, O'GRADY R, SHEEHAN C, O'CONNOR T, IMPEY C, ROBERTS N, FUERY C, TODD A: Restriction endonuclease-mediated selective polymerase chain reaction: a novel assay for the detection of K-ras mutations in clinical samples. *Am J Pathol* 1998; **153**: 373-379.
9. HIGINBOTHAN KG, RICE JM, DIWAN BA, KASPRZAK KS, REED CD: GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogen in renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA. *Cancer Res* 1992; **52**: 4.747-4.751.
10. OHGAKI H, KLEIHUES P, HARD GC: Ki-ras mutations in spontaneous and chemically induced renal tumors of the rat. *Mol Carcinog* 1991; **4**: 455-459.
11. SUZUKI Y, TAMURA G, MAESAWA C, FUJIOKA T, KUBO T, SATODATE R: Analysis of genetic alterations in renal cell carcinoma using the polymerase chain reaction. *Virchows Arch* 1994; **424**: 453-457.
12. NANUS DM, MENTLE IR, MOTZER RJ, BANDER NH, ALBINO AP: Infrequent rasoncogene point mutations in renal cell carcinoma. *J Urol* 1990; **143**: 175-178.
13. ROCHLITZ CF, PETER S, WILLROTH G, DE KANT E, LOBECK H, HUHN D, HERRMANN R: Mutations in the *ras* protooncogenes are rare events in renal cell cancer. *Eur J Cancer* 1992; **28**: 333-336.
14. KOZMA L, KISS I, NAGY A, SZAKALL S, EMBER I: Investigation of c-myc and K-ras amplification in renal clear cell adenocarcinoma. *Cancer Lett* 1997; **111**: 127-131.

Dr. A. Tejido Sánchez
Hospital Universitario 12 de Octubre
Servicio de Urología
Ctra. de Andalucía km. 5,400
28041-Madrid

(Trabajo recibido el 14 mayo 2002)