

APOPTOSIS EN EL ADENOCARCINOMA RENAL. EXPRESIÓN DE BCL-2 EN TUMORES LOCALMENTE CONFINADOS

A. TEJIDO SÁNCHEZ, M. SÁNCHEZ CHAPADO*, J.M. DUARTE OJEDA,
J.C. TAMAYO RUIZ*, P. RUIZ RAMOS**, A. RUIZ VILLAESPEA**,
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:

Bcl-2. Adenocarcinoma renal. Apoptosis.

KEY WORDS:

Bcl-2. Renal cell carcinoma. Apoptosis.

Actas Urol Esp. 26 (1): 41-45, 2002

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO: La expresión del oncogén *bcl-2* se relaciona con una resistencia aumentada de las células tumorales a la apoptosis, lo que prolonga su supervivencia y contribuye a su transformación neoplásica. En el adenocarcinoma renal todavía no se ha podido establecer su importancia en cuanto a la evolución de estas neoplasias. Nuestra intención es determinar la expresión de la proteína *bcl-2* y su relación con diferentes variables clínicas y anatomopatológicas, estableciendo su valor pronóstico.

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 anatomopatológicas, así como la expresión de *bcl-2* en tejido parafinado, mediante técnicas de inmunohistoquímica, obteniendo una tinción citoplasmática que se valoró de forma cualitativa.

RESULTADOS: La tinción para *bcl-2* fue positiva en 44 de los 58 tumores analizados (62,1%), en distintos grados de intensidad. En cuanto a la relación de la expresión de *bcl-2* con otras variables histopatológicas, no encontramos asociación estadísticamente significativa con el grado nuclear, tamaño, estadio o posibilidad de recidiva tumoral. Agrupando los tumores según la intensidad de la tinción en dos grupos, tinción negativa y débil positiva, frente a tinción de intensidad moderada e intensa, tampoco obtuvimos relación entre *bcl-2* y la supervivencia.

CONCLUSIONES: La expresión de *bcl-2* no se relacionó 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

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: *Bcl-2* is a proto-oncogene known to be a negative regulator of apoptosis, whose expression conferring prolonged cell survival and contributing to tumorigenesis. Inconsistent results concerning *bcl-2* expression and the frequency of apoptosis were noted in renal cell carcinoma. To investigate a possible role of *bcl-2* protein in renal cell carcinomas, we analyzed its expression and relationship with clinical and pathological parameters, including prognostic impact.

METHODS: 58 patients diagnosed of renal cell carcinoma stage pT1, pT2 and pT3a N0 M0 (TNM 1997) were treated by radical or partial nephrectomy. We analyzed clinical and pathological parameters including *bcl-2* expression in paraffin-embedded tumor samples using immunohistochemical technique.

RESULTS: *Bcl-2* immunopositivity was detected in 44/58 of the samples in different grades of intensity. There was no correlation of nuclear grade, tumoral size, stage or recurrency with *bcl-2* immunopositivity. *Bcl-2* expression was not related to prognosis if we divided all cases into subgroups according of stain intensity.

CONCLUSIONS: *Bcl-2* expression was not related with any pathological parameters; size, nuclear grade and stage or prognostic.

Los tumores malignos del parénquima renal suponen aproximadamente, entre el 2 y el 3% de los tumores malignos en el adulto, lo que les convierte en la duodécima patología tumoral más frecuente. Dentro de estos, el adenocarcinoma renal es con diferencia el más frecuente, ya que supone el 90% de estos tumores^{1,2}. En España se calcula una incidencia del 4,1 al 4,5 por 100.000 habitantes (1,9 en mujeres y 5,3 en hombres), siendo el tercer tumor en cuanto a su prevalencia dentro de los tumores urológicos, el décimo dentro de los tumores malignos masculinos (2,9%) y el decimocuarto en los femeninos (1,7%). Presenta una mortalidad de 1 y 2,7 por 100.000 habitantes para mujeres y hombres, respectivamente³.

El comportamiento biológico del adenocarcinoma renal es impredecible, ya que incluye desde tumores de lenta evolución, hasta tumores extremadamente agresivos, mediante invasión local o producción de metástasis a distancia. A pesar de que los factores pronósticos convencionales, grado histológico⁴ y estadio tumoral⁵, son de gran utilidad para predecir su evolución, todavía no se ha encontrado ningún marcador que permita conocer la evolución de un determinado tumor con una razonable certeza. En los últimos años, el mejor conocimiento de la biología molecular de estos tumores, ha permitido una mayor comprensión de los procesos que inducen la transformación neoplásica de las células, y su posterior evolución. Dentro de estos se incluye la alteración de la apoptosis o "muerte celular programada", lo que supone la prolongación del periodo durante el cual la célula sigue dividiéndose de forma activa, contribuyendo a la transformación neoplásica.

Entre los marcadores de apoptosis analizados en el adenocarcinoma renal se ha demostrado una alta expresión de la proteína bcl-2, tanto con métodos inmunohistoquímicos, como a través de la determinación de ARN mensajero, relacionándose su expresión con un grado nuclear elevado y un pronóstico desfavorable⁶, resultados no reproducidos en todos los estudios⁷⁻⁹.

Nuestra intención es determinar la expresión de la proteína bcl-2 (proteína producto del oncogen *bcl-2*) en el adenocarcinoma renal en estadios localmente confinados, analizando sus relaciones con diferentes parámetros histopatológicos, así como sus implicaciones pronósticas.

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), en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (Madrid). Incluimos en el estudio pacientes con tumores renales en estadios histopatológicos pT1, pT2 y pT3a (TNM 1997), y que no presentaban márgenes quirúrgicos positivo. 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, el grado nuclear (utilizando los criterios de Fuhrman), márgenes quirúrgicos, multifocalidad, afectación ganglionar y estadio.

La determinación de la expresión de la proteína bcl-2 se realizó en muestras de tejido tumoral incluidas en parafina, que fueron cortadas con un microtomo en secciones de 5 a 7 μ m, y colocadas sobre los cristales. Los cristales fueron calentados hasta 58° C entre 16 y 24 horas y desparafinados 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 anticuerpo monoclonal Dako® Bcl-2 124 a una concentración de 1:90, incubándose las muestras durante 10 minutos. 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 peroxidasa-estreptavidina e incubadas durante 10 minutos, para aplicar después la solución de sustrato cromógeno (sustrato 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 para valorar de forma cualitativa la intensidad de la tinción en el citoplasma de las células neoplásicas (Fig. 1), estratificando las muestras en cuatro grupos; negativa (-), débilmente positiva (+), moderadamente positiva (++) y muy positiva (+++), utilizando como control positivo tejido de amígdala.

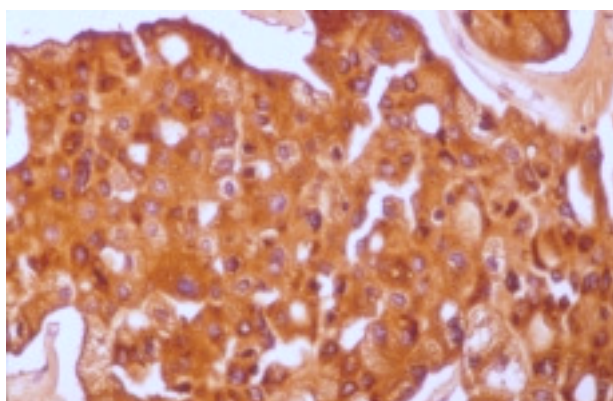


FIGURA 1. Preparación histológica en la que se aprecian los citoplasmas de las células tumorales con tinción positiva para bcl-2.

Estudio estadístico

Para determinar la asociación entre variables se empleó el test de la Chi cuadrado, siendo ésta sustituida por la prueba exacta 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, utilizando el test de Log-Rank para determinar su significación estadística. 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.

En el estudio histopatológico encontramos 58 adenocarcinomas renales, en su mayoría de estirpe celular clara (44 de los 58 tumores), correspondiéndose el resto a otros tipos celulares. El tamaño medio de los tumores fue de 6,4 cm, con un intervalo comprendido entre 2 y 18 cm. En cuanto al estadio histopatológico, 23 de los 58 pacientes (39,7%) se trataban de estadios pT1, 12 de los 58 (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%).

De los 58 tumores estudiados, 22 de ellos (38%) no mostraron positividad para la inmunotinción de bcl-2, mientras que en los 36 restantes (62%) se tiñeron los citoplasmas de las células neoplásicas en mayor o menor medida. Dentro de estos 36 tumores que presentaron positividad, en 16 (27,6%) la tinción fue débilmente positiva (+), en 11 (19%) se tiñó de forma moderada (++) y en 9 (15,5%) la tinción fue intensa (+++) (Tabla I y Fig. 2).

No se objetivaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de bcl-2 y los

TABLA I

DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS SEGÚN LA INTENSIDAD DE LA TINCIÓN PARA bcl-2

	Frecuencia	%	% acumulado
Negativo	22	37,9	37,9
+	16	27,6	65,5
++	11	19,0	84,5
+++	9	15,5	100
	58	100	

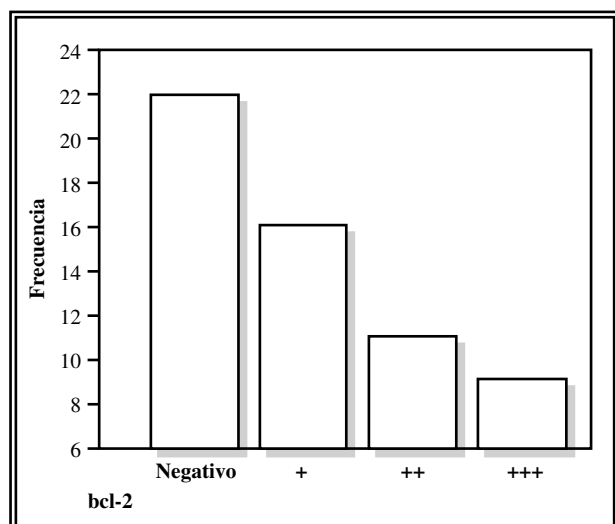


FIGURA 2. Diagrama de barras que muestra la distribución de los casos según la tinción para bcl-2.

distintos parámetros clínicos e histopatológicos analizados. No se relacionó con el tamaño tumoral ($p = 0,89$ IC 95%:-2,417; 1,162), con el grado nuclear ($p = 0,355$) o con el estadio tumoral ($p = 0,473$). Tampoco encontramos asociación con la recidiva tumoral ($p = 0,602$). Para llevar a cabo el estudio de supervivencia mediante curvas de Kaplan Meier dividimos la muestra en dos grupos, incluyendo en el primero aquellos tumores que no se tiñeron o lo hicieron de forma débil (38/58), mientras que en el segundo se trataba de tumores que presentaban una tinción de intensidad moderada o fuerte (20/58), y no demostramos diferencias significativas entre ambos grupos, obteniendo en el estudio estadístico una $p = 0,531$ (Fig. 3).

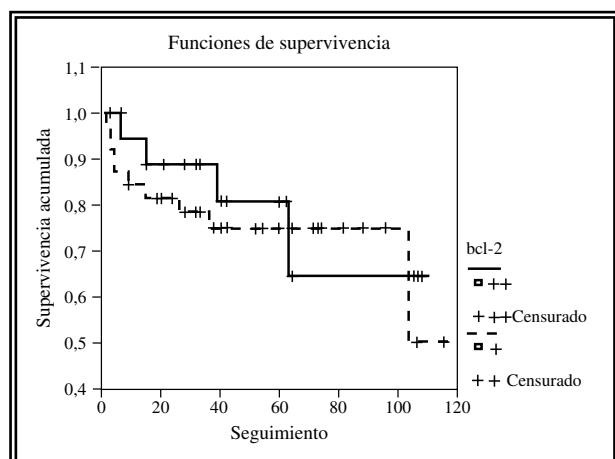


FIGURA 3. Curvas de Kaplan Meier según la intensidad de la tinción para bcl-2.

DISCUSIÓN

La proteína bcl-2 deriva del proto-oncogén *bcl-2*, que se localiza en la región 18q21, cuya función es la de evitar la apoptosis en las células programadas para ello, lo que supone un proceso natural de resistencia al tratamiento antitumoral. Se ha demostrado la presencia de altos niveles de la proteína bcl-2 en diferentes neoplasias, lo que sugiere que la alteración en su producción se relaciona con la prolongación de la supervivencia celular y la transformación neoplásica de los tejidos¹⁰, asociándose su sobre-expresión con un peor pronóstico en diversos tumores como el carcinoma de mama¹¹, de pulmón¹², ovario¹³, vejiga¹⁴, o próstata¹⁵.

Mediante la utilización de técnicas de inmunohistoquímica, se ha demostrado la expresión de bcl-2 en una gran variedad de tejidos humanos: células precursoras hematopoyéticas, epitelio glandular de la mama, tiroides, próstata, piel y tejido nervioso¹⁶. En el riñón fetal la proteína bcl-2 se expresa durante el desarrollo de las nefronas yuxtamedulares, glomérulos y el epitelio de los túbulos. La mayor intensidad en la tinción para bcl-2 se objetiva en las células mesenquimales, a partir de las cuales se desarrollan las nefronas subcapsulares, disminuyendo su expresión a medida que maduran éstas. En el riñón adulto, la proteína bcl-2 se produce, de forma predominante, en la vertiente parietal de la cápsula de Bowman y en las células epiteliales del tubo contorneado distal del asa de Henle. Sin embargo, las células de los túbulos proximales, donde se originan en su mayoría los tumores renales, rara vez se tiñen para bcl-2¹⁰.

Se ha demostrado la expresión de bcl-2 en un alto porcentaje de adenocarcinomas renales, tanto mediante la determinación de ARN mensajero, como con la utilización de métodos inmunohistoquímicos¹⁷. El porcentaje de tumores con tinciones positivas varía entre el 60 y el 80%, dependiendo de las series^{6,7,10}, cifras que se corresponden a las que encontramos en nuestra serie, ya que la positividad fue del 62,1%, aunque hay que tener en cuenta que la intensidad de la tinción variaba según los casos. Otros autores sin embargo, han comunicado resultados muy diferentes, encontrando una baja positividad para bcl-2, lo que podría explicarse por problemas técnicos, ya que el citoplasma celular puede perderse durante la inclusión en parafina^{18,19}.

No está clara la asociación de la expresión de la proteína bcl-2 con diferentes parámetros histopatológicos. En este aspecto, Vasavada y cols.⁶ en 39 tumores renales en estadio localizado, encontraron una alta expresión de esta proteína en tumores de células claras y en tumores papilares. Asimismo, demostraron una asociación significativa con el grado tumoral, sugiriendo que la proteína bcl-2 podría intervenir en la regulación de la proteína p53. Pepe y cols.²⁰ en una serie de 33 tumores renales encontraron que tanto la expresión de bcl-2 como la de p53, presentaban una correlación inversa estadísticamente significativa, al tiempo que la bcl-2 se relacionó con la presencia de células diploides y con una menor fracción de células en fase S. Esta asociación sugiere que la proteína bcl-2 podría disminuir según progresa el tumor renal hacia un fenotipo más agresivo, caracterizado por una sobre-expresión de p53, aneuploidía y una alta fracción de células en fase S. Otros autores como Sejima⁷ o Zhang⁸, no encontraron relación entre la expresión de bcl-2 y diferentes parámetros histopatológicos, como son el estadio tumoral, el grado nuclear, tipo celular o patrón de crecimiento; resultados que coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, en el que no objetivamos asociación de la proteína bcl-2 con el tamaño tumoral, grado nuclear o estadio tumoral.

Al igual que en nuestra serie, el valor pronóstico de la expresión de la proteína bcl-2 en el adenocarcinoma renal no ha podido ser demostrado, al no relacionarse con la recidiva tumoral, ni comportarse como factor relacionado con la supervivencia^{6,7,8,20}.

CONCLUSIONES

La expresión de la proteína bcl-2, al igual que en la mayoría de las series publicadas, no ha demostrado relacionarse en el adenocarcinoma renal localmente confinado, con ninguna de las variables histopatológicas analizadas en nuestro estudio: tamaño tumoral, grado nuclear y estadio tumoral. Tampoco se comporta como factor pronóstico, ya que no se relaciona con la recidiva, ni con la supervivencia de los pacientes.

REFERENCIAS

1. RUIZ CERDÁ JL, JIMÉNEZ CRUZ JF.: Tumores del parénquima renal en: Tratado de Urología. Jiménez Cruz JF y Rioja Sanz LA. *JR Prous Editores*. Barcelona 1993; **63**: 1.093-1.128.
2. BELLDEGRUN A, DEKERNION JB.: Renal tumors en: Campbell's Urology. Walsh, Retik, Vaughan y Wein. 7th edition. *Ed. Saunders*. Philadelphia 1997; **76**: 2.283-2.326.

3. ROBLES GARCÍA JE, ROSELL COSTA D, ZUDAIRE BERGE-RA JJ, BERIÁN POLO JM.: Epidemiología de los tumores del parénquima renal en: Epidemiología Descriptiva y Analítica en Oncología Urológica. Tema Monográfico LXIII Congreso Nacional de Urología. *ENE Ediciones*. Madrid 1998; **4**: 69-79.
4. WEISS LM, GELB AB, MADEIROS LJ.: Adult renal epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1995; **103**: 624-635.
5. GELB AB.: Renal cell carcinoma. Current prognostic factors. *Cancer* 1997; **80**: 981-986.
6. VASAVADA SP, NOVICK AC, WILLIAMS BR.: p53, bcl-2 and bax expression in renal cell carcinoma. *Urology* 1998; **51**: 1.057-1.061.
7. SEJIMA T, MIYAGAWA I.: Expression of bcl-2, p53 oncoprotein, and proliferating cell nuclear antigen in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1999; **35**: 242-248.
8. ZHANG X, TAKEMAKA I.: Cell proliferation and apoptosis with bcl-2 expression in renal cell carcinoma. *Urology* 2000; **56**: 510-515.
9. KANAMARU H, LI B, MIWA Y et al.: Immunohistochemical expression of p53 and bcl-2 proteins is not associated with sarcomatoid change in renal cell carcinoma. *Urol Res* 1999; **27**: 169-173.
10. HUNG A, FONE PD, GANDOUR-EDWARDS R et al.: Immunohistochemical analysis of bcl-2 protein expression in renal cell carcinoma. *J Urol* 1999; **162**: 610-613.
11. VAN SLOOTEN HJ, CLAHSSEN PC, VAN DIERENDONCK JH et al.: Expression of bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br J Cancer* 1996; **74**: 78-85.
12. KITAGAWA Y, WONG F, LO P et al.: Overexpression of bcl-2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1996; **15**: 45-54.
13. HEROD JJ, ELIOPOULOS AG, WARWICK J et al.: The prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996; **56**: 2.178-2.184.
14. GLICK SH, HOWELL LP, WHITE RW.: Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1996; **155**: 1.754-1.757.
15. BAUER JJ, SESTERHENN IA, MOSTOFI FK et al.: Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer patients. *J Urol* 1996; **156**: 1.511-1.516.
16. HOCKENBERY D, ZUTTER M, HICKEY W et al.: Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 6.951.
17. TOMITA Y, BILIM V, KAWASAKI T et al.: Frequent expression of bcl-2 in renal cell carcinoma carrying wild type p53. *Int J Cancer* 1996; **66**: 322-325.
18. PARAF F, GOGUSEV J, CHRETIEN Y, DROZ D.: Expression of bcl-2 oncoprotein in renal cell tumours. *J Pathol* 1995; **177**: 247-252.
19. HOFMOCKEL G, WITTMANN A, DAMMRICH J, BASSUKAS ID.: Expression of p53 and bcl-2 in primary locally confined renal cell carcinomas: No evidence for prognostic significance. *Anticancer Res* 1996; **16**: 3.807-3.811.
20. PEPE S, RUGGIERO A, D'ACQUISTO M et al.: Nuclear DNA content-derived parameters correlated with heterogeneous expression of p53 and bcl-2 proteins in clear cell renal carcinomas. *Cancer* 2000; **89**: 1.065-1.075.

Dr. A. Tejido Sánchez

Servicio de Urología. Hospital Univ. 12 de Octubre
Ctra. de Andalucía km 5,400 - 28041 Madrid

(Trabajo recibido el 9 mayo de 2001)