

ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA) COMO FACTOR PRONÓSTICO EN TUMOR DE WILMS.

Cristóbal Davanzo C. (1), Emilia Crovo V. (2), Fernando Tirapegui S. (3), Dr. José Schalper P. (4)

INTRODUCCIÓN

El tumor de Wilms corresponde a la neoplasia maligna primitiva del riñón más frecuente en la infancia. Su incidencia ha sido estimada en 7,9 casos por 1 millón en los Estados Unidos y se han descrito diferencias en relación al origen étnico (1). La realidad en Latinoamérica no se conoce ni se han publicado grandes series al respecto. Esta neoplasia presenta un comportamiento biológico maligno y se asocia a algunos síndromes genéticos como el de Beckwith-Wiedemann y Denys-Drash (2, 3, 4). Desde un punto de vista clínico, la gran mayoría de los menores, consultan por dolor abdominal asociado a una masa palpable. Además pueden asociarse hematuria macroscópica y fiebre. La edad típica de presentación es en los primeros meses de vida con una media de 2 meses de edad al momento del diagnóstico (5). Característicamente presenta una gran diversidad histológica y en la forma clásica se describen 3 componentes: blastema, estroma y un tercer componente epitelial, aunque no siempre están todos presentes (6, 7) foto 1. Dentro de los factores asociados al pronóstico encontramos el tamaño tumoral, edad del

del paciente, etapa clínica, grado de invasión tumoral y presencia de infiltración linfovascular, sin embargo el factor más importante lo constituye la caracterización histológica (8, 9) **foto 2**. El desarrollo, en los últimos años, de técnicas de inmunohistoquímica que utilizan anticuerpos monoclonales específicos ha permitido investigar fenómenos moleculares que, hasta hace poco tiempo, resultaban por completo inaccesibles (10, 11). Uno de ellos es el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), que tiene un rol importante en la síntesis y reparación del ADN así como en la progresión del ciclo celular actuando como un coordinador en procesos de replicación lo que lo vincula con la actividad proliferativa del tejido neoplásico y por lo tanto con el comportamiento biológico del mismo (12). De esta forma resulta lógico pensar que niveles elevados de marcación de este anticuerpo en las piezas histológicas de tumores de Wilms podrían encontrarse en relación con otros parámetros histológicos de diferenciación del mismo y de esta forma contribuir al establecimiento definitivo del grado histológico, lo que se vincularía al pronóstico (13, 14, 15). El objetivo de este trabajo es el de realizar un caracterización de la marcación de PCNA en los distintos componentes histológicos de la neoplasia y relacionarlo con otras características morfológicas presentes que tengan valor

(1) Alumno 5º año U.S.S.

(2) Alumna 4º año U.S.S.

(3) Interno 6to Año U.S.S.

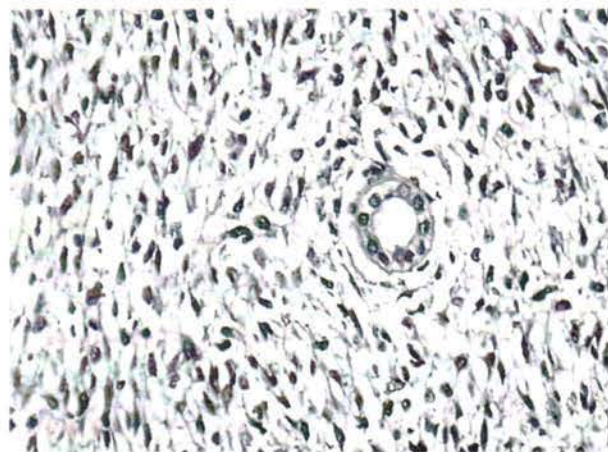
(4) Profesor Titular Universidad San Sebastián.

pronóstico.

Foto1. Corte Macroscópico Tumor de Wilms



Foto2. Microscopía Tumor de Wilms



MATERIALES Y MÉTODO

Diseño del Estudio

El modelo de estudio utilizado corresponde a estudio descriptivo experimental de corte transversal.

Recolección y selección de sujetos.

Se seleccionaron en forma retrospectiva todos los casos con diagnóstico histológico de tumor de Wilms entre los años 1997 y 2001 del archivo de anatomía patológica del Hospital Las Higueras de Talcahuano, Chile. No se consideraron origen étnico, sexo ni edad al momento del diagnóstico. El total de casos incluidos en el estudio fue igual a 7.

Recolección y evaluación de la información.

Una vez seleccionados el total de casos se estudiaron las piezas completas y se realizó inclusiones en bloques de parafina de cada una de ellas. Posteriormente se procedió a realizar cortes microscópicos a dichos bloques con el propósito de obtener preparaciones para realizar la evaluación microscópica. La información fue obtenida mediante un protocolo de análisis que incluyó componente histológico, porcentaje de marcación para PCNA, grado de atipia celular, índice mitótico, presencia de infiltración vascular, compromiso ganglionar y tamaño tumoral. El componente histológico se clasificó en epitelial, blastema y componente estromal. El grado de marcación para PCNA fue expresado en forma de porcentaje de la muestra que resultó positiva. De tal suerte se clasificó como marcación baja a aquellas que mostraron un porcentaje de marcación entre 1 y 33%, como moderada entre 34 y 66% y como alta a las que presentaron sobre 66%. El grado de atipia celular se clasificó en tres categorías donde la primera fue considerada como leve, la segunda como moderada y la tercera como acentuada. El índice mitótico se clasificó de acuerdo al número de mitosis en 10 campos de aumento mayor (400X). Para evaluar el compromiso de estructuras vasculares se consideró como positivo o negativo para invasión capilar y compromiso tumoral de la vena renal. De la misma forma se evaluó el compromiso ganglionar. Para la evaluación del tamaño tumoral se consideró el diámetro mayor de la pieza macroscópica que fue expresada en centímetros.

Descripción de la técnica

Para la realización de los cortes se utilizó un cuchillo de micrótopo con el que se realizaron cortes de 5Um de espesor, los que fueron

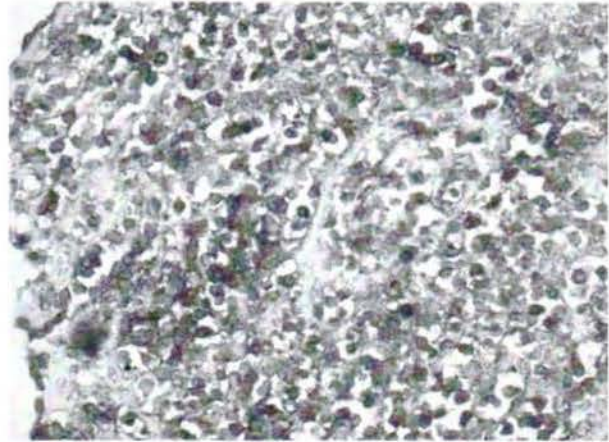
montados en portaobjetos silanizados y secados en estufa a 60 grados Celsius. Una vez desparafinados e hidratados se realizó tripsinización por 10 minutos a 37 grados Celsius. Posteriormente se bloqueó la actividad de la Pseudoperoxidasa con solución de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Luego se procedió a realizar la incubación con los anticuerpos primarios anti PCNA por 60 minutos en los preparados. Se utilizó anticuerpos monoclonales anti PCNA humano de ratón clon 320 A2 de la firma comercial Novocastra[®]3f. El revelado se realizó con un kit de revelado para Inmunoperoxidasa (LSAB-2, DAKO[®]3f[®]3f) con la respectiva incubación en solución sustrato. Finalmente las muestras fueron deshidratadas y montadas en resina sintética para quedar listas para una adecuada evaluación microscópica. Todas las muestras fueron evaluadas por un patólogo experto tanto al examen macro como microscópico.

RESULTADOS

Todos los casos y tipos histológicos presentaron positividad para la inmunomarcación anti PCNA foto 3. El porcentaje más bajo detectado se localizó en el componente estromal de uno de los casos y fue igual a 5%. El mayor porcentaje de marcación se detectó en un tipo epitelial y fue igual al 75%. En relación a los resultados globales el mayor grado de marcación se registró siempre en el componente epitelial y la media fue de 59%. Para el tipo blastema la media fue de 39% y para el componente estromal fue de 17%, que fue siempre la menor. En cada uno de los casos fue siempre mayor la positividad en el componente epitelial, seguido del componente

blastema. El componente estromal resultó con el menor porcentaje de positividad en todos los casos.

Foto3 Inmunohistoquímica Tumor de Wilms



En relación a los resultados obtenidos para el componente epitelial encontramos que hubo correlación absoluta entre el porcentaje de PCNA marcado y el grado de atipia visualizado en el mismo. En todos los casos en que la marcación fue baja, se encontró grado leve de atipia. Lo mismo ocurrió en los casos de marcación moderada y alta, donde los grados de atipia fueron moderados y acentuados respectivamente. El índice mitótico fue en todos los casos mayor a 15. Los datos se muestran en la **tabla 1**.

En relación a los resultados obtenidos en el componente blastema encontramos que también hubo correlación absoluta entre el porcentaje de PCNA marcado y el grado de atipia visualizado en el mismo. El índice mitótico fue siempre entre 5 y 10. Los resultados se muestran en la **tabla 2**.

El índice mitótico fue siempre independiente del porcentaje de marcación para PCNA. Si se encontró asociación directa entre este y el componente histológico correspondiente.

Epitelial	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Promedio
% PCNA	75 %	25 %	45 %	50 %	70 %	75 %	70 %	59 %
Grado Atipia	Acentuada	Leve	Moderada	Moderada	Acentuada	Acentuada	Acentuada	-
Indice Mitótico	> 15	> 15	> 15	> 15	> 15	> 15	> 15	-

TABLA 1. Distribución de marcación de PCNA, grado de atipia y número de mitosis componente epitelial

Blastema	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Promedio
% PCNA	45 %	15 %	35 %	35 %	55 %	50 %	40 %	39 %
Grado Atipia	Moderada	Leve	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	-
Indice Mitótico	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	5 a 10	-

TABLA 2. Distribución de marcación de PCNA, grado de atipia y número de mitosis componente blastema.

Estromal	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Promedio
% PCNA	15 %	5 %	20 %	10 %	30 %	25 %	15 %	17 %
Grado Atipia	Leve	Leve	Moderada	Leve	Leve	Leve	Leve	-
Indice Mitótico	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	-

TABLA 3. Distribución de marcación de PCNA, grado de atipia y número de mitosis componente estromal.

Característica	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7
Infiltración Capilar	-	-	+	+	+	-	-
Infiltración ramas de la vena renal	-	-	-	+	+	-	-
Compromiso ganglionar	-	-	+	-	+	-	-
Tamaño tumoral	6 cm	8 cm	9,5 cm	12 cm	10,6 cm	3,9 cm	5,4 cm
Promedio PCNA	45 %	15 %	33 %	32 %	52 %	50 %	38 %

TABLA 4. Relación entre infiltración vascular y ganglionar linfática, tamaño tumoral y promedio PCNA por caso.

Se debe considerar que no hubo relación entre el porcentaje de marcación de PCNA, el grado de atipia y la presencia de infiltración de elementos linfáticos y vasculares. El único elemento analizado que sí presentó relación estrecha con la infiltración tumoral vascular y ganglionar fue el tamaño tumoral al momento del diagnóstico, donde no se encontró infiltración en aquellos tumores menores de 9cm a diferencia de los mayores de dicho diámetro en que la infiltración capilar, venosa y el compromiso ganglionar fueron frecuentes. Los resultados se muestran en la **tabla 4**.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El anticuerpo monoclonal anti PCNA es un excelente marcador de grado de diferenciación en los tumores de Wilms, principalmente en sus componentes epitelial y blastema. De acuerdo a la consistente asociación encontrada se propone que PCNA podría ser usado como un nuevo factor pronóstico de tipo histopatológico en dichos tumores, ya que niveles altos de marcación se asociarían a un peor comportamiento biológico de la neoplasia. El componente epitelial es siempre el más agresivo en tumores de Wilms, lo cual se encuentra en relación con el conocimiento actual, ya que se sabe que frecuentemente las neoplasias malignas de origen epitelial presentan comportamientos biológicos más agresivos debido a su mayor capacidad intrínseca de proliferación.

La presencia de infiltración capilar, de la vena renal así como el compromiso ganglionar linfático parecen estar relacionados estrechamente al tamaño tumoral, no así al grado de diferenciación del mismo. Esta aparente discordancia encontrada podría deberse al intervalo de tiempo presente entre el comienzo de la iniciación (producido por defecto del gen supresor WT1) y el de la promoción neoplásica

(producido por estímulo ambiental) que podría ser distinto para cada caso, lo que explicaría presencia de alto grado de malignidad con tumores de pequeño o menor diámetro y por lo tanto ausencia de infiltración de estructuras vasculares y linfáticas al momento del diagnóstico.

Se propone la necesidad de realizar estudios posteriores con series mayores y correlación clínica que confirmen los hallazgos preliminares encontrados en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, et al., eds. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. National Cancer Institute, SEER Program. NIH Publication No. 99-4649, Bethesda, MD, 1999
2. Bonaiti-Pellie C, Chompret A, Tournade MF, et al. Genetics and epidemiology of Wilms' tumor: the French Wilms' Tumor Study. *Med Pediatr Oncol* 1992;20:284.
3. Denys P, Malvaux P, Van Den Berghe H, Tanghe W, Proesmans W. Association d'un syndrome anatomo-pathologique de pseudohermaphroditisme masculin, d'une Tumeur de Wilms, d'une néphropathie parenchymateuse et d'un mosaicisme XX hXY. *Arch Fr Pédiatr* 1967;24:729.
4. Coppes MJ, Huff V, Pelletier J. Denys-Drash syndrome: relating a clinical disorder to genetic alterations in the tumor suppressor gene WT1. *J Pediatr* 1993;123:673.
5. Green DM. Diagnosis and management solid tumors in infants and children. Boston: Martinus Nijhoff, 1985.
6. Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. Atlas of tumor pathology. 3rd Series. fascicle 11. Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1994.

7. Breslow NE, Beckwith JB, Ciol M, Sharples K. Age distribution of Wilms tumor: report from the National Wilms Tumor Study. *Cancer Res* 1988;48:1653.
8. Breslow N, Churchill G, Beckwith JB, et al. Prognosis for Wilms' tumor patients with nonmetastatic disease at diagnosis--results of the Second National Wilms' Tumor Study. *J Clin Oncol* 1985;3:521.
9. Breslow N, Sharples K, Beckwith JB, et al. Prognosis in nonmetastatic, favorable histology Wilms' tumor: results of the Third National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 1991;68:2345.
10. Ambros R., Trost R.: Immunohistochemical localization of metallothionein in human breast cancer. *Anticancer Research*, May-june; 19(3^a):2133-9, 1999-09-21
11. Hans Huber. *Citología, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Aufl. Verlag, Bern, Stuttgart, Wien, 1997.
12. Khine MM, Aung W, Sibbons PD, Howard CV, Clapham E, McGill F, Van Velzen D. Analysis of relative proliferation rates of Wilms' tumor components using proliferating cell nuclear antigen and MIB-1 (Ki-67 equivalent antigen) immunostaining and assessment of mitotic index. Department of Fetal and Infant Pathology, University of Liverpool, United Kingdom. *Lab Invest* 1994 Jan;70(1):125-9
13. Nagoshi M, Tsuneyoshi M. Expression of proliferating cell nuclear antigen in Wilms' tumors and other pediatric renal tumors: the correlation between histologic classification and proliferative activity. Second Department of Pathology, Kyushu University, Fukuoka, Japan. *J Surg Oncol* 1994 Feb;55(2):114-21
14. Chen F, Liu G, Zhang Z, Li Z, Cai W. Expression of proliferating cell nuclear antigen in Wilms' tumor. Department of Pediatric Surgery, Xin Hua Hospital, Shanghai Second Medical University, China. 236: *Chin Med J (Engl)* 1997 May;110(5):352-3
15. Delahunt B, Farrant GJ, Bethwaite PB, Nacey JN, Lewis ME. Assessment of proliferative activity in Wilms' tumour. Department of Pathology, Wellington School of Medicine, New Zealand. *Anal Cell Pathol* 1994 Aug;7(2):127-38