

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ALTERACIÓN DEL GEN SUPRESOR *p16* EN EL
CARCINOMA RENAL**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Victoria del Barco Barriuso**

Bajo la dirección de los Doctores:
María Teresa Sanz Casla
Jesús Moreno Sierra

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1814-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ALTERACIÓN DEL GEN SUPRESOR *p16*
EN EL CARCINOMA RENAL**

TESIS DOCTORAL

VICTORIA DEL BARCO BARRIUSO

Director: Dra. M.T. Sanz Casla

Codirector: Dr. J. Moreno

Madrid, 2002

A mis padres

Agradecimientos

Han sido muchas las personas, relacionadas con el mundo científico como ajenas a él, las que han hecho posible que yo pudiera defender un día esta tesis. Aunque no pueda nombrarlas expresamente, todas y cada una de ellas han participado en esta faceta de mi vida apoyándome bien profesionalmente o de forma personal con su cariño y su apoyo constante.

Quiero agradecer de una forma especial el apoyo prestado por la Dra. Marisa Maestro, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, sin su ayuda y sus constantes ánimos, siempre prestados con mucho cariño, no hubiera podido realizar este trabajo. También quiero expresar mi agradecimiento de forma muy especial a la Dra. M^a Teresa Sanz Casla no sólo por haber dirigido mi tesis, sino también por su constante apoyo y estímulo, por su paciencia, por no perder la calma y sobre todo por su gran amistad. Muchas gracias por las innumerables charlas y discusiones científicas y sobre todo por vuestra amistad y por vuestros consejos.

Quiero agradecer al Dr. Jesús Moreno haber sido mi codirector en esta tesis y su trato siempre amable y estimulante.

Al Prof. Resel por su colaboración con el Servicio de Análisis Clínicos.

Al Dr. Valor por prestar el apoyo técnico para la realización de este trabajo en el Servicio de Análisis Clínicos.

Al Prof. Balibrea por su constante interés y apoyo en la realización de esta tesis y su cariñosa acogida en el Departamento de Cirugía.

A la Dra. Cristina Fernández por su inestimable ayuda en la comprensión de las técnicas estadísticas, por su paciencia y amabilidad.

A la Dra. Carmen Maestro por su ayuda y apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A la Dra. Dolores Aragonés por su dedicación como tutora de esta tesis.

A Ines Zanna por su amable dedicación, por su colaboración y disposición para ayudarme en la realización de este trabajo y por la gran amistad que nos une.

A Enrique Redondo por su inestimable ayuda y su disposición en cualquier momento, por su ánimo durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Servicio de Análisis Clínicos, con los que he disfrutado y he aprendido durante mis años de residencia.

A Paula y Pilar por ayudarme y por recibirme siempre con amabilidad y con una sonrisa.

A Celina Benavente por sus consejos, por estar siempre a mi lado compartiendo momentos fáciles y difíciles durante la residencia y después de ésta y, sobre todo por la gran amistad que nos une. A M^a Ángeles Castilla por ser una amiga incondicional y compartir muchos momentos a lo largo de estos años. A Nuria García por ser mi amiga y comprenderme en todo momento.

Quiero agradecer a mis padres que sin su cariño, su amor, su apoyo incondicional y su constante sacrificio nunca hubiera podido llegar a defender esta tesis. Agradezco su inquietud por aprender todo lo relacionado con mi profesión.

A mi familia por estar conmigo siempre que los necesito y apoyarme, por ser una parte muy importante en mi vida. A Alvaro por su sonrisa y su inocencia.

A todas las personas que me quieren, por el apoyo que he tenido desde siempre de todas y cada una de ellas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
EPIDEMIOLOGÍA	1
ETIOPATOGENIA	5
1. Factores ambientales	7
2. Factores de predisposición genética	12
ANATOMÍA PATOLÓGICA	13
FACTORES PRONÓSTICO	17
1. Factores pronóstico clásicos	19
2. Nuevos factores pronóstico	29
BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CARCINOMA RENAL	36
1. Descripción del gen <i>p16</i>	40
2. Proteína p16 y regulación del ciclo celular	44
3. Mecanismos de inactivación del gen <i>p16</i>	50
OBJETIVOS	56
PACIENTES Y MÉTODOS	57
PACIENTES	57
1. Periodo de estudio	57
2. Población de estudio	57
MÉTODOS	58
1. Metodología clínica	58
2. Metodología analítica	61
2.1 Estudio histopatológico	61

2.2 Procesamiento de las muestras	63
2.2.1 Extracción y cuantificación del DNA	63
2.2.2 Determinación de las alteraciones genéticas	66
A. Estudio de la pérdida de heterocigosidad del <i>locus</i> 9p21	66
B. Estudio de la metilación de la región promotora del gen <i>p16</i>	72
C. Estudio de la expresión de la proteína p16	81
3. Análisis estadístico	88
RESULTADOS	92
DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	92
ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS DEL GEN <i>p16</i> Y SU PROTEÍNA	98
1. Estudio de las alteraciones genéticas en el <i>locus</i> 9p21	98
1.1 Estudio de la pérdida de heterocigosidad (LOH)	100
1.2 Estudio de la inestabilidad cromosómica	107
1.3 Estudio de la LOH e inestabilidad cromosómica	108
2. Estudio de la metilación del promotor del gen <i>p16</i>	115
3. Estudio de la presencia de al menos una de las alteraciones genéticas en el gen <i>p16</i>	124
4. Estudio de la expresión de la proteína p16	132
EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA RENAL. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA	142
1. Supervivencia Global	142
EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA RENAL. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	145

1. Supervivencia Libre de Enfermedad	145
2. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de recidiva de los pacientes con cáncer renal en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos	147
3. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de recidiva de los pacientes con cáncer renal en relación con los nuevos factores pronóstico ..	154
4. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad	162
5. Análisis multivariante de la supervivencia libre de enfermedad	164
DISCUSIÓN	165
ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN <i>p16</i> . RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS	169
ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN <i>p16</i> . RELACIÓN CON EL PRONÓSTICO	185
CONCLUSIONES	189
BIBLIOGRAFÍA	191
ABREVIATURAS	216

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimación de la incidencia de cáncer en hombres y en mujeres en E.E.U.U., 1999 según la ACS.	4
Figura 2. Diferentes marcadores de microsatélites del brazo corto del cromosoma 9 donde está incluido el <i>D9S1747</i> (gen <i>p16</i>).	42
Figura 3. Organización genómica de <i>p16</i> y <i>p16β</i> .	43
Figura 4. Mecanismo de acción de la proteína <i>p16^{INK4a}</i> en el ciclo celular.	49
Figura 5. Gel de la LOH en 9p21 en 3 muestras. La muestra nº 5 presenta LOH.	72
Figura 6. Secuencias del tratamiento con bisulfito.	74
Figura 7. Esquema de la reacción del bisulfito.	75
Figura 8. Gel de la metilación del gen <i>p16</i> en tres muestras tumorales. En las muestras 2 y 40 sólo amplifica el DNA no metilado mientras que en la muestra 16 se observa también la amplificación del DNA metilado.	80
Figura 9. Expresión de la proteína <i>p16</i> mediante inmunohistoquímica en la muestra tumoral nº 34. La expresión de la proteína <i>p16</i> es positiva.	87
Figura 10. Expresión de la proteína <i>p16</i> mediante inmunohistoquímica en la muestra tumoral nº 38. La expresión de la proteína <i>p16</i> es negativa.	87
Figura 11. Distribución de los tumores según el tipo histológico. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	95
Figura 12. Distribución de los tumores según el estadio tumoral. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	95
Figura 13. Distribución de los tumores según el tamaño tumoral. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	96

Figura 14. Distribución de los tumores según la afectación ganglionar. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	96
Figura 15. Distribución de los tumores según el grado de diferenciación. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	97
Figura 16. Estudio de las alteraciones genéticas en el <i>locus</i> 9p21. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	99
Figura 17. Distribución del porcentaje de LOH en el <i>locus</i> 9p21 según el tipo histológico. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	102
Figura 18. Distribución del porcentaje de LOH en el <i>locus</i> 9p21 según el grado de diferenciación. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	103
Figura 19. Distribución del porcentaje de la LOH en el <i>locus</i> 9p21 según el estadio tumoral. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	103
Figura 20. Distribución del porcentaje de la LOH y/o inestabilidad en el <i>locus</i> 9p21 según el tipo histológico. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	110
Figura 21. Distribución del porcentaje de la LOH y/o inestabilidad en el <i>locus</i> 9p21 según el grado de diferenciación. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	111
Figura 22. Distribución del porcentaje de la LOH y/o inestabilidad en el <i>locus</i> 9p21 según el estadio tumoral. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	111

Figura 23. Porcentaje de metilación del promotor del gen <i>p16</i> . <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	115
Figura 24. Distribución del porcentaje de metilación del promotor del gen <i>p16</i> según el tipo histológico. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000)</i>	119
Figura 25. Distribución del porcentaje de metilación del promotor del gen <i>p16</i> según el grado de diferenciación. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	119
Figura 26. Distribución del porcentaje de metilación del promotor del gen <i>p16</i> según el estadio tumoral. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	120
Figura 27. Porcentaje de presencia de al menos una alteración genética en el gen <i>p16</i> . <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	124
Figura 28. Distribución del porcentaje de presencia de al menos una alteración genética en el gen <i>p16</i> según el tipo histológico. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid(1993-2000).</i>	127
Figura 29. Distribución del porcentaje de la presencia de al menos una alteración genética en el gen <i>p16</i> según el grado de diferenciación. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	129
Figura 30. Distribución del porcentaje de la presencia de al menos una alteración genética en el gen <i>p16</i> según el estadio tumoral. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	129
Figura 31. Porcentaje de expresión de la proteína <i>p16</i> . <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	132

Figura 32. Distribución del porcentaje de expresión de la proteína p16 según el tipo histológico. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	135
Figura 33. Distribución del porcentaje de la expresión de la proteína p16 según el grado de diferenciación. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	135
Figura 34. Distribución del porcentaje de la expresión de la proteína p16 según el estadio tumoral. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	136
Figura 35. Relación de la expresión de la proteína p16 y el mecanismo de la metilación. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	139
Figura 36. Relación de la expresión de la proteína p16 y la presencia de alguna alteración genética del gen <i>p16</i> . <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	140
Figura 37. Curva de S.G. acumulada de los pacientes con carcinoma renal. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	144
Figura 38. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	146
Figura 39. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según el grado de diferenciación nuclear. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	151
Figura 40. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según el estadio tumoral. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	152
Figura 41. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según el tamaño tumoral (T). <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	153

Figura 42. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de LOH en el <i>locus</i> 9p21. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	157
Figura 43. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de LOH y/o Inestabilidad en el <i>locus</i> 9p21. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	158
Figura 44. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de metilación en el gen <i>p16</i> . <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	159
Figura 45. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de al menos una alteración genética. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	160
Figura 46. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de expresión de la proteína <i>p16</i> . <i>Serie de 34 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Factores de riesgo en el cáncer de riñón.	6
Tabla II. Clasificación del carcinoma renal de 1997.	14
Tabla III. Factores pronóstico en el cáncer renal.	18
Tabla IV. Clasificación de Robson del carcinoma renal.	20
Tabla V. Clasificación TNM del carcinoma renal de la UICC (1997).	21
Tabla VI. Relación entre los sistemas de clasificación de la extensión tumoral en el carcinoma renal.	22
Tabla VII. Secuencias de los primers utilizados en la amplificación del <i>locus</i> 9p21 mediante PCR.	58
Tabla VIII. Secuencias de los cebadores utilizados en las amplificaciones mediante PCR.	79
Tabla IX. Descripción de las variables clínico-patológicas. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	92
Tabla X. Descripción de las variables macroscópicas tumorales. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	97
Tabla XI. Prevalencia de la LOH en el locus 9p21 en relación con las variables clínico-patológicas. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	101
Tabla XII. Prevalencia de la LOH en el locus 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	104
Tabla XIII. Prevalencia de la LOH en el <i>locus</i> 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	106

Tabla XIV. Prevalencia de la LOH y/o inestabilidad en 9p21 en relación con las variables clínico-patológicas. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	109
Tabla XV. Prevalencia de la LOH y/o inestabilidad en 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	112
Tabla XVI. Prevalencia de la LOH y/o inestabilidad en el <i>locus</i> 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	114
Tabla XVII. Prevalencia de la metilación del promotor del gen <i>p16</i> en relación con las variables clínico-patológicas. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	117
Tabla XVIII. Prevalencia de la metilación del promotor del gen <i>p16</i> en relación con los factores pronóstico clásicos. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	121
Tabla XIX. Prevalencia de la metilación del promotor del gen <i>p16</i> en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	123
Tabla XX. Prevalencia de la presencia de al menos una alteración genética en el gen <i>p16</i> en relación con las variables clínico-patológicas. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	126
Tabla XXI. Prevalencia de la presencia de al menos una alteración genética en el gen <i>p16</i> en relación con los factores pronóstico clásicos. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	129
Tabla XXII. Prevalencia de la presencia de al menos una alteración genética en el gen <i>p16</i> en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. <i>Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	131

Tabla XXIII. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína p16 en relación con las variables clínico-patológicas. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	133
Tabla XXIV. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína p16 en relación con los factores pronóstico clásicos. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	137
Tabla XXV. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína p16 en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	138
Tabla XXVI. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína p16 en relación con los mecanismos de inactivación del gen. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	141
Tabla XXVII. Prevalencia de la expresión de la proteína p16 en relación con los mecanismos de inactivación del gen. <i>Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).</i>	141
Tabla XXVIII. Análisis univariante de la S.L.E. en relación con las variables clínico-patológicas. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	148
Tabla XXIX. Análisis univariante de la S.L.E. en relación con los factores pronóstico clásicos. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	149
Tabla XXX. Análisis univariante de la S.L.E. en relación con los nuevos factores pronóstico. <i>Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).</i>	156
Tabla XXXI. Nivel de significación en el estudio de la LOH, LOH y/o inestabilidad, <i>p16</i> metilada y presencia de al menos una alteración según los factores pronóstico considerados.	163

INTRODUCCIÓN

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es, por detrás de las enfermedades cardiovasculares, la segunda causa de muerte en los países desarrollados. En España el 28% de los hombres y el 20% de las mujeres fallecen como consecuencia de esta enfermedad (1).

El tumor maligno del parénquima renal es la duodécima patología tumoral más frecuente en Estados Unidos. En este país, su incidencia se ha incrementado en un 43% desde 1973, y su mortalidad en un 16% (2). Según el último informe de la Sociedad Americana del Cáncer (ACS) (3) se estima que se diagnosticarán 1.228.600 nuevos casos de cáncer invasivo en Estados Unidos durante 1999, de los cuales 29.900 serán carcinomas renales (riñón y pelvis renal). En el hombre la incidencia del cáncer renal representará el 3% y en la mujer el 2% (Figura1). Según este informe se estima que en 1998 fallecerán en Estados Unidos como consecuencia del cáncer 564.800 personas, más de 1.500 personas al día, y 11.600 de estos fallecimientos serán debidos al cáncer renal (riñón y pelvis renal). En Estados Unidos, el carcinoma renal supone el 3% de los tumores en el adulto y es el responsable del 2% de las muertes por cáncer (4).

En el estudio realizado por Black et al sobre la incidencia y mortalidad del cáncer en los países de la Unión Europea en 1990, la incidencia del carcinoma renal representa el 3,4% de los tumores en el hombre y el 2,1% de los tumores de la mujer.

Austria, Alemania y Finlandia son los países con mayor tasa de incidencia frente a los países del sur (España, Grecia y Portugal) donde la tasa de incidencia es tres veces menor. La tasa de mortalidad varía entre el 2,4% para los hombres y el 2,0% para las mujeres (5).

En España en 1990, el carcinoma renal representa el 2,9% de los tumores en el varón y el 1,7% de los tumores en la mujer y es el responsable del 1,6% y el 1,3 % de las muertes en el varón y en la mujer, respectivamente (5). Entre 1978 y 1992 fallecieron en España como consecuencia del cáncer de riñón 9.024 hombres y 5.008 mujeres con una edad media de 66 y 67 años respectivamente (6).

La incidencia del carcinoma renal es aproximadamente el doble en hombres que en mujeres. El carcinoma renal es raro en las dos primeras décadas de la vida. Sólo el 2% de los tumores renales son pediátricos (7). La incidencia se incrementa progresivamente desde los 40 años para alcanzar el pico máximo en la séptima y octava década de la vida. A la edad de 40 años el riesgo de padecer un cáncer de riñón es del 1,27%, y de fallecer por esta causa del 0,51% (8).

El 80-85% de todos los tumores de riñón son carcinomas de células renales. Otros tipos histológicos incluyen el carcinoma de células transicionales de pelvis renal, que constituye el 15-20% de los cánceres de riñón en adultos, y el tumor de Wilms o

nefroblastoma en niños (8).

El cáncer renal es una enfermedad de pronóstico incierto porque el único tratamiento curativo es la cirugía, un porcentaje alto de los pacientes desarrollan metástasis y es muy resistente al tratamiento con quimioterapia y radioterapia (9). En la actualidad se están ensayando protocolos de inmunoterapia con resultados dispares según las series analizadas.

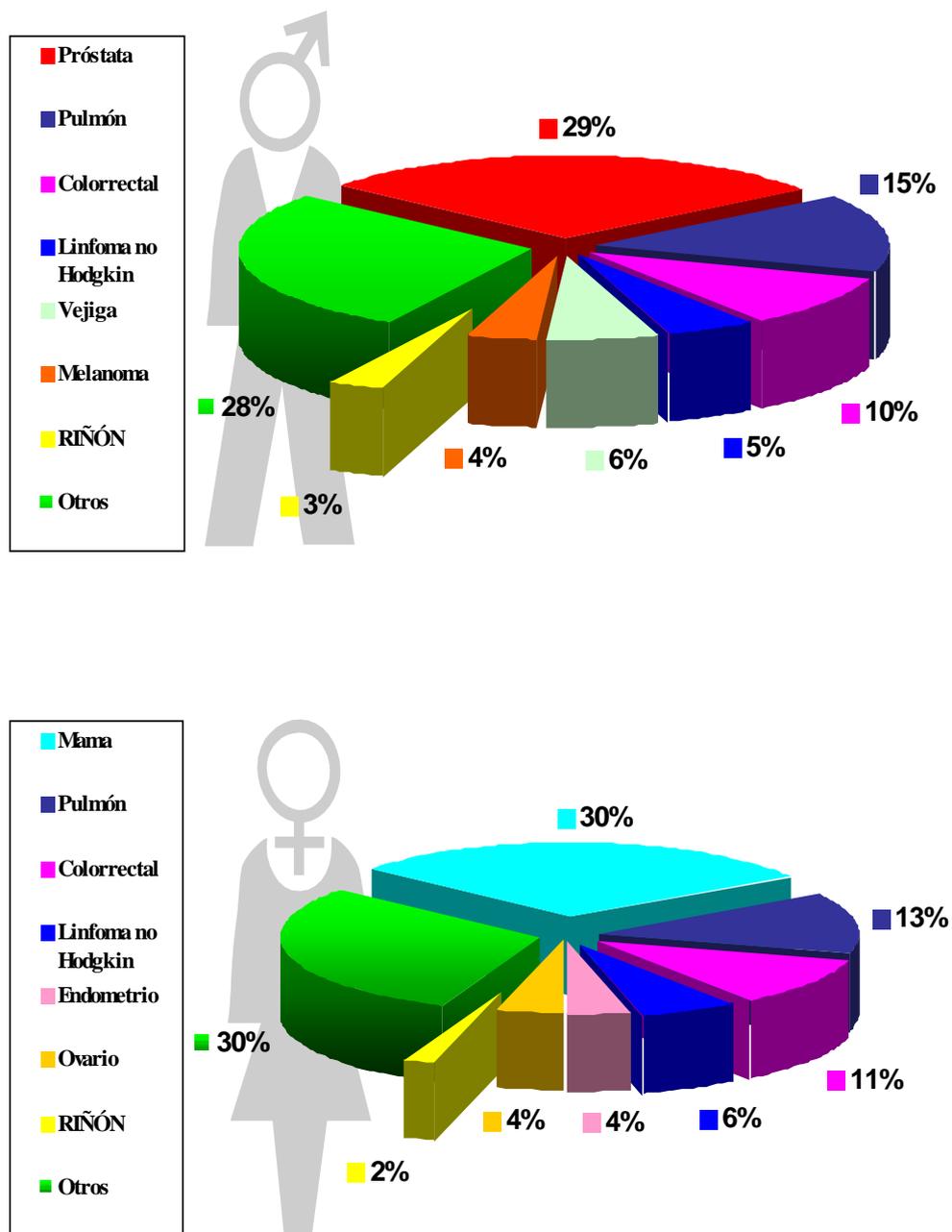


Figura 1. Estimación de la incidencia de cáncer en hombres y en mujeres en E.E.U.U., 1999 según la ACS (3).

ETIOPATOGENIA

En la actualidad se considera al cáncer como el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas que afectan a diversos genes con distintas funciones celulares, dependiendo estas alteraciones del tipo de tumor.

La carcinogénesis es un proceso complejo en la que están implicados al menos dos tipos de sustancias o agentes, unas que inducen alteraciones genéticas o iniciadoras (en la mayoría de los casos mutágenos como las radiaciones y agentes químicos) y otras consideradas como promotores tumorales, cuyo papel parece consistir en aumentar la proliferación celular (factores de crecimiento). A pesar de haberse identificado varios de ellos, se conoce poco sobre los mecanismos por los cuales estos factores contribuyen al desarrollo del cáncer renal.

El desarrollo del cáncer de riñón se entiende hoy en día como una secuencia de múltiples factores, teniendo como base una predisposición genética sobre la que actúan distintos factores ambientales, entre los cuales existen carcinógenos conocidos como el tabaco, asbesto, etc. Resulta interesante, desde el punto de vista de su prevención, el estudio de los factores de riesgo que aumentan la posibilidad de padecer esta enfermedad (Tabla I).

Tabla I. Factores de riesgo en el cáncer de riñón.

<i>Factores de riesgo</i>	<i>Riesgo relativo de cáncer renal (I.C.)</i>	<i>Nº de estudios</i>
Enfermedad de Von Hippel-Lindau	100	>5
Diálisis crónica	32	>5
Obesidad	3.6 (2.3 –5.7)	>5
Tabaco	2.3 (1.1 – 5.1)	>5
Familiar de primer grado con cáncer renal	1.6 (1.1 – 2.4)	>5
Hipertensión	1.4 (1.2 –1.7)	>5
Trabajadores de tintorerías	1.4 (1.1 –1.7)	>5
Diuréticos	1.3 (1.07 –1.52)	>5
Exposición a tricloroetileno	1.0 (0.7 –9.66)	>5
Radiación terapéutica	0.87, 3.2, 8.1	3
Uso de fenacetina	1.1, 2.6, 6.0	3
Riñón poliquístico	0.8, 2.0	2
Exposición al cadmio	1.0, 2.0, 3.9	3
Exposición al arsénico	1.6	1
Exposición a asbestos	1.1, 1.4, 1,8	3

Vogelzang et al (10).

1. FACTORES AMBIENTALES

- **Tabaco**

Algunos autores relacionan el consumo de cigarrillos con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de riñón (11-14).

En un estudio realizado por McLaughlin et al, uno de cada cuatro casos de carcinoma renal en los hombres y uno de cada diez en las mujeres se relaciona con el consumo de cigarrillos. En los fumadores habituales existe un incremento del riesgo de cáncer renal del 40% (riesgo relativo 1,4). Este riesgo se incrementa con la cantidad (número de cigarrillos) y con la duración (años de hábito). Dentro del grupo de los fumadores habituales, el riesgo relativo se incrementa desde un 1,1 para los que fuman menos de 16 paquetes al año hasta 2,0 para los que fuman más de 40 paquetes al año. Los ex-fumadores de más de 15 años experimentan una reducción del riesgo en un 15-25% frente a los fumadores habituales. La edad en la que se inicia el hábito de fumar también influye; las personas que empezaron a fumar tarde (con más de 24 años) disminuyen el riesgo en dos tercios frente a los que comenzaron a fumar más jóvenes (menores de 12 años) (15).

Un estudio realizado en Dinamarca con 368 casos de carcinoma renal y 396 controles indica que el riesgo relativo es de 2,3 para hombres fumadores que consumen más de 40 paquetes al año (12). En otro estudio posterior realizado por el grupo de

Coughlin (14) el riesgo relativo varía entre 1,3 y 2,3 para los fumadores ocasionales y entre 2 y 3 para los grandes fumadores.

Un estudio epidemiológico de casos-control realizado en Alemania por Schlehofer et al, con 277 casos de carcinoma renal y 286 controles, relaciona el consumo elevado de cigarrillos con el incremento en el riesgo de carcinoma renal; sin embargo, no encuentra diferencias significativas entre ex-fumadores y fumadores habituales (13).

- **Obesidad**

La obesidad puede ser otro factor de riesgo en el cáncer renal (16). Existen estudios en los que se ha observado que, sobre todo en las mujeres, existe una relación lineal entre el aumento de peso y el aumento de riesgo de carcinoma renal (17-18). Un estudio epidemiológico reciente de casos-control, realizado por Shapiro et al, ha asociado el aumento del índice de la masa corporal con el incremento de riesgo del carcinoma renal, tanto en hombres (riesgo relativo de 2,3) como en mujeres (riesgo relativo de 3,3) (19).

- **Diuréticos y fármacos**

El tratamiento con diuréticos se ha asociado durante los últimos 10 años con un incremento en el riesgo de carcinoma renal. En una revisión reciente, Grossman et al

encontraron 9 estudios de casos-control y 3 estudios de cohortes publicados entre 1996 y 1998, en los que se estudiaba la relación entre el tratamiento con diuréticos y el carcinoma renal. En el caso de los estudios casos-control, el riesgo relativo medio de carcinoma renal en pacientes tratados con diuréticos frente a los no tratados fue 1,55. También en los tres estudios de cohortes con un total de 1.226.229 pacientes, se asoció el tratamiento con diuréticos con el riesgo de carcinoma renal, duplicándose el riesgo en los pacientes tratados con diuréticos. En 1 estudio de cohortes y en 7 estudios casos-control, las mujeres presentaban mayor riesgo de carcinoma renal (riesgo relativo 2,01) que los hombres (riesgo relativo 1,69) (20).

Algunos estudios han descrito una asociación entre el carcinoma renal y el consumo habitual de analgésicos como fenacetina, paracetamol y salicilatos (21-22). Esta relación es controvertida en otros estudios en los que, además, no encuentran relación ni con la dosis de fármacos consumida, ni con la edad de este consumo (23).

Estudios experimentales han demostrado una asociación entre la furosemida y la hidroclorotiazida con adenomas tubulares y adenocarcinomas en ratas. Estos fármacos actúan directamente sobre el túbulo renal, lugar de origen del carcinoma (24).

- **Dieta**

Existen estudios que establecen una asociación significativa entre el riesgo de desarrollar carcinoma renal y la cantidad total de energía ingerida en la dieta (25-26).

En un estudio de casos-control con 351 casos y 340 controles, realizado en Dinamarca por Mellemgard et al, se ha asociado el consumo de productos lácteos con un incremento en el riesgo de carcinoma renal (26). Aunque algunos autores han sugerido una asociación positiva entre el consumo de proteínas y grasas, así como de sus fuentes de alimento principales (carne, leche, grasas) y el riesgo de carcinoma renal, no hay suficientes estudios epidemiológicos para establecer dicha asociación (18, 25).

El efecto protector de las frutas y verduras es casi unánime (16, 18, 25, 27-28). El grupo de Wolk et al ha asociado un descenso de riesgo de cáncer renal con el consumo de frutas y verduras. En este estudio también se ha asociado el bajo consumo de vitamina E y magnesio con un incremento del riesgo de cáncer renal (25).

- **Café y alcohol.**

Existe una gran controversia en relación con el consumo de café como factor de riesgo (27). La mayoría de los estudios no muestran asociación entre el consumo de alcohol, café o té con el riesgo de carcinoma renal (18, 24-25).

Un estudio reciente ha mostrado una relación inversa significativa entre el consumo de alcohol y el riesgo de padecer cáncer renal; los pacientes que consumían alcohol tenían menos riesgo (25).

- **Hipertensión arterial**

Diferentes estudios han relacionado el carcinoma renal con la hipertensión arterial (16, 29-30). McLaughlin et al observaron una asociación positiva entre el riesgo de cáncer renal y factores como la hipertensión y el consumo de diuréticos u otros antihipertensivos; sin embargo, la contribución relativa de cada uno de estos factores (hipertensión, diuréticos, antihipertensivos) no fue determinada (29).

- **Exposición ocupacional**

Existe mayor riesgo de carcinoma renal entre los trabajadores expuestos al asbesto (industrias de aislamiento, astilleros...), al cadmio, al hierro (industrias de acero), a la gasolina, al tetracloretileno y a productos derivados del petróleo (31). También existe un mayor riesgo en los trabajadores expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos (32).

La exposición a las radiaciones ionizantes no parece ser un factor de riesgo en el cáncer renal (33).

2. FACTORES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA

Aunque la mayoría de los cánceres renales se presentan de forma esporádica, existen tres tipos hereditarios bien definidos de carcinoma renal: el carcinoma de células claras renales familiar (CCRF), el carcinoma de células renales (CCR) asociado a la enfermedad de Von Hippel-Lindau (V.H.L.) y el carcinoma papilar de células renales hereditario en los que el modo de herencia es autosómico dominante. A diferencia de los casos esporádicos, la presentación de la enfermedad hereditaria es más temprana y los tumores suelen ser multifocales y bilaterales. Estos pacientes presentan un alto riesgo de padecer cáncer renal (34). En el CCRF y CCR se ha demostrado su asociación con anomalías en el brazo corto del cromosoma 3. La anomalía genética típica en el CCRF es una translocación en el *locus* 3p13-3p14 mientras que en el CCR hereditario, se producen mutaciones en 3p25. El carcinoma papilar de células renales hereditario no está asociado al cromosoma 3 y actualmente se investigan las alteraciones genéticas asociadas a su origen. Los pacientes que presentan enfermedad poliquística renal autosómica dominante también presentan un alto riesgo de desarrollar carcinoma renal (34).

Según algunos estudios, enfermedades renales asociadas con insuficiencia renal crónica como la enfermedad quística renal adquirida que aparece en pacientes sometidos a diálisis y la esclerosis tuberosa pueden incrementar el riesgo de carcinoma renal (35-36).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Dentro de los tumores renales hay que distinguir dos grandes grupos de neoplasias: *el carcinoma renal* en el adulto, y *el tumor de Wilms (nefroblastoma)* en el niño.

Históricamente, el carcinoma renal se ha clasificado de acuerdo con el tipo celular (células claras y granulares) y con el patrón de crecimiento (acinar, papilar o sarcomatoide). En 1986, se propuso una nueva clasificación histológica que se aproximaba más al comportamiento clínico del carcinoma, basada en la morfología, histoquímica y en estudios moleculares y citogenéticos (37).

En 1997, el grupo de Störkel (38) de acuerdo con la Union Internationale Contre le Cancer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC) propusieron una nueva clasificación del carcinoma renal según su morfología celular (Tabla II).

Tabla II. Clasificación del carcinoma renal de 1997.

NEOPLASIAS BENIGNAS	ADENOMA PAPILAR
	ONCOCITOMA
	ADENOMA METANÉFRICO
	ADENOFIBROMA METANÉFRICO
NEOPLASIAS MALIGNAS	CARCINOMA CONVENCIONAL (CÉLULAS CLARAS)
	CARCINOMA PAPILAR
	CARCINOMA CROMÓFOBO
	CARCINOMA DE TÚBULOS COLECTORES
	CARCINOMA INCLASIFICABLE

Störkel et al (38).

A continuación, haremos una breve descripción de las neoplasias malignas:

- **Carcinoma renal convencional (células claras)**

Es el carcinoma del epitelio tubular renal más frecuente y representa aproximadamente el 70% de los casos en las series quirúrgicas. Se le ha denominado “no papilar” en las clasificaciones genéticas. Genéticamente, este tumor se caracteriza por la pérdida de material genético en el brazo corto del cromosoma 3 (3p); el 50% presenta mutaciones en el gen de VHL (*locus* 3p25) y entre un 10 y un 20% muestra

una inactivación del gen VHL por hipermetilación. Los cambios sarcomatoides se producen en aproximadamente el 5% de estos carcinomas (38).

- **Carcinoma renal papilar**

Es el carcinoma del epitelio tubular renal más frecuente después del carcinoma convencional y representa entre el 10 y el 15% de los casos en las series quirúrgicas. También se le ha denominado “carcinoma de células cromófilas” en la clasificación de Mainz. La arquitectura papilar predomina en la gran mayoría de estos tumores ó al menos, está presente en la totalidad de ellos. Genéticamente, este tipo de tumores se caracteriza por la presencia de trisomías (3q, 7, 12, 16, 17 y 20) y la pérdida del cromosoma Y. Estas características genéticas apoyan el diagnóstico del carcinoma papilar, incluso cuando las estructuras papilares no son predominantes. Por el contrario, neoplasias que no presentan estas características (por ejemplo, el tumor de Wilms) no deben ser designadas como carcinomas papilares a pesar de que la arquitectura papilar sea la que predomine (38).

- **Carcinoma renal cromóforo**

Es la tercera neoplasia del epitelio tubular renal más común y representa el 5% de los casos. La arquitectura sólida es la más común. Genéticamente, este tumor se caracteriza por la monosomía de cromosomas múltiples (1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21) y por hipodiploidía (38).

- **Carcinoma de túbulos colectores**

Representa menos del 1% de los carcinomas y presenta una morfología muy heterogénea. Debido al poco número de casos y su diversidad, todavía no se ha establecido un patrón de anomalías genéticas (38).

- **Carcinoma renal inclasificable**

Representa aproximadamente del 4 al 5% de los casos (38).

La arquitectura sarcomatoide representa un patrón de crecimiento celular que puede originarse a partir de cualquier tipo histológico de carcinoma renal. Por lo tanto, los cambios sarcomatoides se pueden encontrar en todos estos tipos histológicos, así por ejemplo, en el carcinoma convencional se producen cambios sarcomatoides en aproximadamente el 5% (38).

FACTORES PRONÓSTICO

El estudio correcto de los pacientes diagnosticados de cáncer renal exige una evaluación completa de los factores pronóstico conocidos de esta enfermedad. Esta información es esencial para conocer el curso clínico probable del tumor en cada caso concreto y realizar el tratamiento más adecuado. En 1997, la UICC y el AJCC, basándose en la clasificación recomendada por el Colegio de Patólogos Americanos, evaluaron los factores pronóstico en el cáncer renal, tanto los que se emplean en el momento actual (factores pronóstico clásicos) como los que probablemente se utilizarán en el futuro (nuevos factores pronóstico) ya que aún no están consolidados, con la finalidad de poder identificar aquellas características tumorales con repercusión clínica (Tabla III) (39).

Tabla III. Factores pronóstico en el cáncer renal.

FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS	NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO
<ul style="list-style-type: none">• Estadio tumoral TNM• Grado de diferenciación• Tipo histológico• Arquitectura sarcomatoide	<ul style="list-style-type: none">• Morfometría del núcleo Factores biomoleculares: <ul style="list-style-type: none">• Contenido de DNA (ploidía)• Marcadores de proliferación celular• Marcadores de apoptosis• Angiogénesis del tumor• Anomalías citogenéticas y pérdida de heterocigosidad• Genes supresores de tumores y oncogenes• Factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adhesión celular

Gelb et al (39).

1. FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

- **Estadio Tumoral**

El factor pronóstico más importante en la supervivencia de los pacientes con carcinoma renal es la extensión anatómica del tumor, es decir, el estadio tumoral (10, 38-41). Los pacientes con tumores localizados en el riñón, y que generalmente son resecaados completamente, tienen mayor supervivencia que los pacientes con afectación ganglionar o con metástasis a distancia.

Las dos clasificaciones más utilizadas para estratificar los niveles de extensión de una neoplasia de riñón, con el fin de identificar grupos de distinto pronóstico, son la clasificación de Robson et al (Tabla IV) (42) y la clasificación TNM propuesta por la UICC y el AJCC en 1997 (Tabla V) (43-45).

Tabla IV. Clasificación de Robson del carcinoma renal.

<i>ESTADIO I</i>	Tumor limitado al riñón
<i>ESTADIO II</i>	Tumor que invade la grasa perirrenal, pero no se extiende más allá de la cápsula de Gerota.
<i>ESTADIO III</i>	Se subdivide en tres grupos:
<i>A</i>	Tumor con invasión macroscópica de la vena renal o vena cava inferior.
<i>B</i>	Tumor con metástasis ganglionar regional.
<i>C</i>	Tumor con invasión vascular y metástasis ganglionar regional.
<i>ESTADIO IV</i>	Se subdivide en dos grupos:
<i>A</i>	Tumor con invasión de órganos adyacentes (excepto suprarrenal).
<i>B</i>	Tumor metastásico.

Robson et al (42)

Tabla V. Clasificación TNM del carcinoma renal de la UICC (1997).

<i>Tumor primario T</i>			
Tx	No se puede evaluar el tumor primario		
T0	No hay evidencia de tumor primario		
T1	Tumor ≤ 7 cm, limitado al riñón		
T2	Tumor > 7 cm, limitado al riñón		
T3	Tumor que se extiende a las venas principales o invade la glándula suprarrenal o los tejidos perirrenales, pero sin atravesar la cápsula de Gerota:		
T3a	Tumor que invade la glándula suprarrenal o los tejidos perirrenales, pero sin atravesar la cápsula de Gerota.		
T3b	Tumor que se extiende de forma importante en la vena cava por debajo del diafragma.		
T3c	Tumor que se extiende de forma importante en la vena cava por encima del diafragma.		
T4	Tumor que atraviesa la cápsula de Gerota.		
<i>Ganglios linfáticos regionales N</i>			
Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.		
N0	No existen metástasis ganglionares regionales.		
N1	Metástasis en un solo ganglio linfático.		
N2	Metástasis en más de un ganglio linfático.		
<i>Metástasis a distancia M</i>			
Mx	No se puede evaluar la metástasis a distancia.		
M0	No existe metástasis a distancia.		
M1	Metástasis a distancia.		
<i>Agrupación por Estadios</i>			
ESTADIO I	T1	N0	M0
ESTADIO II	T2	N0	M0
ESTADIO III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
ESTADIO IV	T4	N0, N1	M0
	Cualquier T	N2	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

Guinan P. et al (45)

En la tabla VI se establece la relación entre el sistema de clasificación de Robson y la clasificación TNM.

TablaVI. Relación entre los sistemas de clasificación de la extensión tumoral en el carcinoma renal.

ROBSON	TNM
I	T1, T2
II	T3a
III A	T3b, T3c
III B	N1, N2
IV A	T4
IV B	M1

En 1969, Robson introdujo una clasificación que todavía se emplea en los Estados Unidos debido a su sencillez y claridad (Tabla IV). Sin embargo, esta clasificación no tiene en cuenta de forma explícita el tamaño tumoral y combina estadios que pueden tener supervivencia pronóstica muy diferente; por ejemplo, la afectación de la vena cava inferior o de la vena renal (Estadio IIIA) se considera en el mismo estadio que la infiltración tumoral de los ganglios linfáticos (Estadio IIIB), siendo el pronóstico peor en esta última situación. Algunos autores justifican la aplicación del sistema de Robson al considerar que la invasión local del tumor, la formación de trombos venosos y las metástasis a distancia son los factores pronóstico más determinantes (46). A diferencia de la clasificación de Robson, la clasificación TNM del carcinoma renal proporciona una visión más precisa de la extensión tumoral, tiene en cuenta el tamaño del tumor, es menos ambigua y presenta una información más útil para el tratamiento y para establecer el pronóstico de la enfermedad (Tabla V). La clasificación TNM de 1997 propuesta por la UICC y AJCC es muy reciente y la mayoría de los estudios están referidos a la clasificación anterior de 1992. La clasificación de 1992 considera el límite del tamaño del tumor (T) para diferenciar T1 de T2 en 2,5 cm y la clasificación de la afectación ganglionar (N) se realiza en función del número de ganglios afectados y de sus dimensiones. Los pacientes con tumores resecables de tamaño inferior a 7 cm presentan una supervivencia semejante a la de la población general (48); sin embargo, los pacientes con tumores mayores de 15 cm se encuentran en estadios más avanzados y con una peor supervivencia menor a los 10 años (49).

En algunos estudios, la invasión local es un factor pronóstico independiente en la supervivencia de los pacientes. En el estudio realizado en 1990 por Hermanek et al (50), dentro del grupo de pacientes que no presentaban afectación ganglionar ni metástasis a distancia, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los pacientes con tumores T1 y T2 (95% frente al 92,5%, respectivamente, a los 5 años) pero si las hubo al comparar T1 y T2 frente a T3 (91% frente al 64%, respectivamente, a los 5 años). De hecho, la afectación de la vena renal o de la cava inferior (T3b) es uno de los factores de mal pronóstico en algunas series publicadas (51,52).

La afectación ganglionar es un factor pronóstico independiente (10, 50, 52-54); ya en 1971 se describieron supervivencias a los 5 años entre el 11% y el 21% en pacientes con metástasis linfáticas regionales no sometidos a linfadenectomía (53). Entre un 10% y un 20% de los tumores mayores o iguales a 7 cm tienen afectación ganglionar, estos pacientes presentan peor pronóstico que los que no tienen afectación ganglionar (10). En algunas series de pacientes (50), la supervivencia a los 5 años en los pacientes sin afectación se situó entre el 52% y el 92%, y en los pacientes que presentaban invasión tumoral ganglionar, la supervivencia fue del 15%. En el estudio retrospectivo con 320 pacientes realizado en 1997 por Masuda et al (54), en el que se realizó un análisis multivariante de diferentes factores pronóstico en el carcinoma renal, la afectación ganglionar (clasificación N) fue uno de los factores pronóstico de

supervivencia más importantes.

La presencia de metástasis es un factor pronóstico independiente en la supervivencia de los pacientes con cáncer renal (51, 54). En el estudio realizado por Gilberti et al en 1997 (52) se determinó, mediante análisis multivariante, que la presencia de metástasis era el factor pronóstico más importante en la supervivencia de los pacientes (8% de supervivencia a los 5 años y 0% a los 7 años después de la cirugía). Entre el 25% y el 30% de los pacientes presentan metástasis a distancia en el diagnóstico. Las metástasis más frecuentes son las pulmonares (50 - 60%), óseas (30 - 40%), hepáticas (30 - 40%) y cerebrales (5%). Otras metástasis menos frecuentes en el cáncer renal son las de tiroides, páncreas, músculo esquelético y piel (55). Entre el 20% y el 30% de los pacientes con tumores renales localizados presentan recidivas después de la nefrectomía radical. La metástasis de pulmón es el lugar más común de las metástasis a distancia, diagnosticándose entre el 50% y el 60% de los pacientes que recidivan mientras que, menos del 5% presentan recidiva local. El tiempo medio de recidivar después de la nefrectomía se sitúa entre 15 y 18 meses, el 85% de las recidivas aparecen antes de los tres años (56, 57).

- **Grado de Diferenciación**

Casi todos los autores consideran que el grado de diferenciación nuclear es un factor pronóstico (48, 58, 59). El grado de diferenciación nuclear comenzó a utilizarse en E.E.U.U. en 1932, cuando Hand and Broders (60) establecieron una relación entre el grado de diferenciación nuclear del carcinoma renal y la evolución del paciente; los pacientes con tumores más indiferenciados presentaban una supervivencia menor que aquellos que tenían más diferenciación celular. Desde entonces se han utilizado distintas clasificaciones del grado de diferenciación nuclear, siendo la clasificación de Fuhrman et al (61) la más utilizada en la actualidad, sobre todo por los patólogos norteamericanos. Esta clasificación distingue cuatro grados de diferenciación nuclear, según el tamaño, la forma y el contenido nuclear.

En el estudio realizado en 1982 por el grupo de Fuhrman se asoció el grado nuclear 1 (células más diferenciadas) con un menor índice de metástasis y una mayor supervivencia a los 5 años. No hubo diferencias significativas entre el grado 2 y el grado 3 en la supervivencia global de los pacientes. Al agrupar estos dos grados hallaron diferencias entre el grado 1, los grados 2 y 3 agrupados y el grado 4 (61).

Medeiros et al (62) aplicaron la clasificación de Fuhrman a 121 casos de tumores renales y no encontraron diferencias entre el grado 1 y el grado 2. La supervivencia de los pacientes con tumores de grado 1 y 2 fue mayor que la de los

pacientes con tumores de grado 3 o 4. Este grupo considera factor pronóstico al grado de diferenciación de la clasificación de Fuhrman, sobre todo al agrupar los grados 1 y 2 (63).

- **Tipo Histológico**

El carcinoma renal de células claras es la neoplasia renal más frecuente y es un factor de mal pronóstico en estos enfermos (64).

La evolución clínica del carcinoma papilar es controvertida, algunos autores consideran que su curso clínico es más favorable que el que presenta el carcinoma de células claras (65) pero para otros, la morfología papilar supone un peor pronóstico (61, 62).

Los pacientes con carcinoma de células cromóforas presentan mejor pronóstico que el resto de los tipos histológicos (66).

El carcinoma de los tubos colectores se comporta como una neoplasia de curso clínico agresivo con tendencia al desarrollo temprano de metástasis (67). Durante el primer año de seguimiento fallecen dos tercios de los pacientes (68).

- **Arquitectura Sarcomatoide**

La arquitectura sarcomatoide representa un patrón de crecimiento celular que puede originarse a partir de cualquier tipo histológico de carcinoma renal. Su presencia comporta un indudable peor pronóstico en todas las series (62, 64, 69, 70).

- **Patrón de crecimiento**

El patrón de crecimiento del carcinoma renal puede ser sólido, quístico o mixto. Aunque ciertos autores atribuyen peor pronóstico al patrón sólido (9), el pronóstico se relaciona más con el estadio que con el patrón de crecimiento.

2. NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO

A lo largo de los años se ha demostrado que los factores pronóstico clásicos no son suficientes para predecir la evolución del tumor. Tumores con el mismo tipo histológico e idéntico estadio TNM pueden presentar evoluciones diferentes. Esto se debe a que las características biológicas de las células tumorales son distintas. Se ha intentado concretar en parámetros objetivos las características biológicas de las células tumorales para obtener información sobre las modificaciones genotípicas y fenotípicas de estas células cancerosas. La identificación temprana de los tumores con evolución más agresiva puede mejorar el pronóstico de los pacientes con carcinoma renal.

En los últimos años se han estudiado nuevos factores pronóstico que han proporcionado información adicional sobre el grado de proliferación de las células tumorales y sobre el pronóstico de la enfermedad.

- **Morfometría del Núcleo**

Existen estudios que sugieren que la morfometría nuclear puede aportar información pronóstica independiente y puede ser una herramienta muy útil para la estadificación de los pacientes con carcinoma renal. Los parámetros de morfometría nuclear que reflejan un área nuclear aumentada y variaciones en la forma del núcleo están asociados con un pronóstico más desfavorable (71).

En un estudio reciente realizado por Monge et al se determinó el valor pronóstico de la morfometría nuclear en 140 tumores de pacientes diagnosticados de carcinoma renal, en los cuales se realizó un seguimiento de 5 años. El grupo de pacientes con tumores que presentaban medidas más pequeñas de los parámetros morfométricos estudiados (área, forma, perímetro, diámetro mayor y menor...) presentaba una supervivencia mayor ($p < 0,05$). También observaron relación entre los parámetros de morfometría nuclear y el grado y estadio del tumor. El diámetro del núcleo era el parámetro con mayor valor pronóstico de todos los parámetros morfométricos estudiados (72).

- **Contenido de DNA (ploidía)**

Aunque algunos estudios realizados en el carcinoma de mama y en el carcinoma colorrectal consideran el contenido de DNA como un marcador tumoral (73), la mayoría de los trabajos son contradictorios respecto a este parámetro en cuanto a su valor pronóstico y sobre todo en el caso del carcinoma renal.

En un estudio retrospectivo realizado por Lanigan et al (74), el contenido de DNA determinado mediante citometría de flujo en 90 pacientes con carcinoma renal primario y 10 pacientes con carcinoma renal metastásico, se asoció con el riesgo de fallecer, pero no resultó ser un factor pronóstico independiente. En varios estudios realizados en tumores limitados al riñón, tampoco el contenido de DNA es un factor

pronóstico de supervivencia (75, 76).

Sin embargo, Eskelinen et al asociaron el contenido de DNA aneuploide con un pronóstico más favorable (77); estos autores tratan de explicar este fenómeno diciendo que la inestabilidad genómica de las células aneuploides provoca un incremento de la sensibilidad de las células tumorales aneuploides a la terapia o reduce la capacidad de resistencia de estas células a la respuesta inmunológica.

- **Marcadores de Proliferación Celular**

Otra forma de evaluar la agresividad celular y, por lo tanto el pronóstico, es cuantificando la capacidad proliferativa de las células tumorales a través de marcadores de proliferación celular entre los que se incluyen la fracción de células en fase S y proteínas del ciclo celular como Ki-67 (MIB-1), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el antígeno de proliferación nuclear p105 (76, 78, 79, 81-84). Estos marcadores de proliferación celular son los más estudiados pero su información pronóstica no está todavía determinada.

En el análisis multivariante de 69 pacientes con carcinoma renal realizado por Larsson et al (78), la fracción de células en fase S tiene valor pronóstico independiente. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, este parámetro no es un factor pronóstico en la supervivencia de los pacientes con carcinoma renal (76, 79).

Riese et al consideran la proteína Ki-67 como un marcador de agresividad tumoral en el carcinoma renal sin invasión ganglionar (80). En la mayoría de los estudios, Ki-67 (MIB-1) es considerado como un factor pronóstico independiente (79, 81-83). Sin embargo, en el estudio realizado por Gelb et al (76), MIB-1 no es un factor que informe sobre el pronóstico de los pacientes con carcinoma renal.

En varios trabajos realizados por el grupo de Tannapfel, el marcador de proliferación celular PCNA no ha resultado ser un factor pronóstico (79, 82).

El aumento de la expresión del antígeno de proliferación nuclear p105 se ha asociado con un pronóstico desfavorable; se trata, según Yokogi et al, de un factor pronóstico independiente en la supervivencia (84).

- **Marcadores implicados en la Apoptosis**

Existen pocos trabajos en los que se haya estudiado los marcadores implicados en la función apoptótica y su valor pronóstico en el cáncer renal. Los genes *p53*, *bcl-2* y *p21* y la expresión de sus proteínas son los más estudiados, sin embargo, no hay resultados concluyentes para establecer su valor pronóstico en el carcinoma renal.

En un estudio realizado por Bot et al (85) no se asoció la sobreexpresión de la proteína p53 con la supervivencia en el cáncer renal. Sin embargo, en trabajos

realizados en series pequeñas de tumores, las mutaciones del gen *p53* si se han relacionado con un peor pronóstico (86).

Shalitin et al determinaron la proteína p21 (WAF) circulante mediante un método de enzimoimmunoensayo y relacionaron los cambios en los niveles séricos de esta proteína con el curso clínico de la enfermedad (87).

- **Angiogénesis del Tumor**

La angiogénesis tumoral, o formación de nuevos vasos inducida por las células tumorales es esencial en el crecimiento del tumor y en la diseminación de las células tumorales. La intensidad de la angiogénesis intratumoral es considerada como un factor pronóstico en el cáncer de mama y en otras neoplasias; sin embargo, en el cáncer renal los resultados son contradictorios.

Para algunos autores, la densidad microvascular intratumoral, que es una medida de la angiogénesis, es un factor pronóstico de supervivencia en tumores renales limitados al riñón (88, 89); por el contrario, la mayoría de los estudios no demuestran que la angiogénesis sea un factor pronóstico independiente (38, 90).

Es necesario investigar más en la detección de marcadores tumorales relacionados con la progresión del cáncer renal. Esto incluye el estudio de cadherinas

(responsables de las uniones intercelulares y de las células tumorales a la membrana basal sobre la que asientan), integrinas, CD44 y factores de crecimiento entre los que destacan: el FGF o factor de crecimiento fibroblástico, el VEGF o factor de crecimiento vascular–endotelial (necesarios para la formación de nuevos vasos en el tumor primitivo) (64).

- **Anomalías Citogenéticas y Genes implicados**

El cáncer es una enfermedad causada por múltiples alteraciones genéticas, que dan lugar a la pérdida de control en la diferenciación y proliferación celular. El comportamiento de un tumor es el reflejo de las anomalías genéticas presentes en él, que determinará la evolución y el pronóstico del paciente. Una peculiaridad de los carcinomas renales es que, examinando los estudios que se han realizado al respecto, la implicación de los mecanismos muy conocidos de oncogenes y genes supresores no parece particularmente manifiesta.

El estudio citogenético clásico mediante cariotipos, junto con la hibridación genómica ha permitido el estudio del genoma de las células cancerígenas. El siguiente paso es realizar estudios genéticos más avanzados mediante técnicas de detección de microsatélites (específicas del *locus* genético correspondiente) e hibridación *in situ*, seguido del estudio de las mutaciones de los genes y sus efectos en la tumorigénesis (91).

Las alteraciones genéticas específicas implicadas en el pronóstico del cáncer renal deben ser investigadas más. Actualmente, se conocen genes que juegan un papel importante en el carcinoma renal como el gen de Von Hippel-Lindau (VHL), el protooncogen MET y los genes del factor de transcripción TFE3 y PRCC. Sin embargo, anomalías cromosómicas importantes sugieren la presencia de genes adicionales que también pueden ser relevantes y que deben ser identificados en los tejidos tumorales. El conocimiento de estas anomalías genéticas puede contribuir a determinar el pronóstico de la enfermedad junto con los factores pronóstico clásicos (91).

Un grupo de genes entre los que se incluyen aquellos que están implicados en la regulación del ciclo celular y en la reparación del DNA parecen ser importantes en el desarrollo del cáncer renal (91). Las pérdidas genéticas detectadas en el brazo corto del cromosoma 9 (9p) y en el brazo largo del cromosoma 14(14q) han sido relacionadas con la progresión del tumor (91, 92). Las pérdidas en 14q se han relacionado con el estadio del tumor y con la evolución del paciente (93). La mayoría de los estudios han confirmado que la pérdida de material genético en distintas zonas del brazo corto del cromosoma 3 (3p) es muy frecuente en el carcinoma renal (94, 95). Sin embargo, 3p parece estar implicado en la iniciación del tumor y no se asocia con la progresión del tumor (92).

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CARCINOMA RENAL

La biología molecular del carcinoma renal es un área de intensas investigaciones. Las características genéticas permiten diferenciar y separar entidades biológicas definidas, con una patología molecular y un resultado clínico definido. Al mismo tiempo permiten establecer una correlación entre el patrón citogenético y la evolución del paciente. Los diferentes tipos histológicos del carcinoma renal se caracterizan por presentar anomalías genéticas diferentes. Según la clasificación de Störkel et al (38), el carcinoma renal convencional (células claras) se caracteriza por la pérdida de material genético en el brazo corto del cromosoma 3; el 50% de estos tumores presenta mutaciones en el gen de VHL y entre un 10% y un 20% muestran una inactivación del gen VHL por hipermetilación; el carcinoma renal papilar se caracteriza por la presencia de trisomías en diferentes cromosomas (3q, 7, 12, 16, 17 y 20) y la pérdida del cromosoma Y; el carcinoma renal cromóforo se caracteriza por la monosomía de cromosomas múltiples (1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21) y por hipodiploidía; no existen estudios suficientes para establecer un patrón genético en el carcinoma de tubos colectores debido a su escasa incidencia.

Las alteraciones del brazo corto del cromosoma 3 (3p) son las más frecuentes en el carcinoma renal. Estudios genéticos moleculares de 3p en carcinomas renales

familiares y carcinomas renales esporádicos de células claras han revelado pérdidas genéticas a lo largo de todo el brazo corto del cromosoma 3, desde el *locus* 3p14 hasta 3p26 (96, 97).

En la región 3p25 se encuentra el gen de Von Hippel-Lindau, gen supresor de tumores que está implicado en el desarrollo del cáncer renal (98, 99). El análisis de este gen en carcinomas renales esporádicos de células claras ha revelado la frecuente pérdida de un alelo e inactivación del otro alelo por mutaciones puntuales o hipermetilación. Estos datos sugieren que este gen es un supresor de tumores cuya inactivación contribuye al desarrollo del tumor renal (100, 101). En el estudio de Druck et al, el 89% de los cánceres renales esporádicos estudiados presentaron pérdida de heterocigosidad (LOH) en el *locus* 3p14.2. Este estudio ha sugerido que probablemente existe un gen que se encuentra cerca de la zona 3p14.2, que está implicado en el carcinoma renal, tanto en el familiar como en el esporádico (94, 95). También se ha estudiado otro gen que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 3, en el *locus* 3p21.1, que parece estar implicado en el carcinoma renal (102).

Actualmente, se conocen genes que juegan un papel importante en el carcinoma renal como el gen de VHL, MET, TFE3 y PRCC (91). Otro grupo de genes entre los que se incluyen aquellos que están implicados en la regulación del ciclo celular y en la reparación del DNA parecen ser importantes en el desarrollo del cáncer renal. El estudio

de Thrash-Bingham et al sugiere que la pérdida de múltiples genes supresores de tumor es requerida para el desarrollo y progresión del cáncer renal (103). En este estudio, la LOH en los cromosomas 3p, 6q, 8p, 9pq y 14q es muy frecuente, no siendo un evento único ya que las LOH estaban asociadas entre sí, 3p con 8p, 3p con 14q, 8p con 9pq y 9pq con 14q.

Las pérdidas genéticas halladas en el brazo corto del cromosoma 9 (9p) han sido relacionadas con la progresión del tumor (91). En esta zona se encuentra localizado un gen supresor de tumores llamado *p16*, que es el objeto de estudio de este trabajo.

El gen *p16* está localizado en la región 21 del brazo corto del cromosoma (9p21), zona de frecuentes pérdidas alélicas (LOH) en la mayoría de los tumores en el hombre (104-106). En 1994, dos grupos de investigación independientes describieron por primera vez alteraciones de *p16* en varias líneas celulares humanas (104, 105). Las líneas celulares de melanoma, esófago, pulmón, páncreas, mesotelioma, vejiga, cabeza y cuello, mama, leucemia linfocítica aguda, cerebro, osteosarcoma, ovario y riñón presentaban deleciones de *p16*. Estos grupos encontraron una frecuencia muy elevada de deleciones homocigotas y mutaciones del gen *p16* en el proceso de tumorogénesis.

En 1994 se describió por primera vez la implicación del gen *p16* en familias con

melanoma maligno cutáneo y melanoma múltiple atípico familiar (FAMM) en Estados Unidos, Australia y Europa, encontrándose alteraciones de *p16* en aproximadamente el 50% de las familias estudiadas. *p16* está frecuentemente mutado en familias con FAMM apoyando la hipótesis de que *p16* es el gen del melanoma familiar (107, 108). Posteriores estudios han confirmado que se producen mutaciones de *p16* en otro tipo de tumores además del melanoma.

1. DESCRIPCIÓN DEL GEN *p16*

El gen *p16* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 9, concretamente en 9p21 (Figura 2), es un gen regulador del ciclo celular en la fase G1. Se denomina también MTS-1 (“major tumor suppressor”), *INK4a* (inhibidor de quinasas 4a dependientes de ciclinas), *CDKN2A* (inhibidor 2A de quinasas dependientes de ciclina) o *CDK4I*.

El gen *p16* está situado en el *locus* *INK4a* y está formado por tres exones: el exón 1 de 125 pares de bases (pb), el exón 2 de 307 pb y el exón 3 de 12 pb (109). Este gen transcribe dos mRNAs que difieren en el primer exón y comparten el segundo y el tercero, aunque con distintas fases de lectura. Cada transcrito tiene un exón 5' específico, exón 1 α o exón 1 β y, por lo tanto, codifica dos proteínas diferentes denominadas $p16^{\text{INK4a}}$ y $p16\beta$ ($p19^{\text{ARF}}$). El mRNA transcrito que contiene el exón 1 α , el exón 2 y el exón 3 codifica la proteína $p16$ ($p16^{\text{INK4a}}$), de 15,8 kd y formada por 156 aminoácidos (110). El mRNA transcrito que contiene el exón 1 β (situado a 15 kb del exón 1 α), el exón 2 y el exón 3 codifica la proteína $p16\beta$ ($p19^{\text{ARF}}$) y tiene un peso molecular de 13,8 kd (Figura 3) (111, 112). La proteína $p16^{\text{INK4a}}$ tiene la capacidad de parar el ciclo celular en la fase G1 mediante la inhibición de los complejos ciclinas-CDKs mientras que la proteína $p16\beta$ es capaz de detener el ciclo celular tanto en la fase G1 como en la fase G2 pero mediante mecanismos diferentes a $p16$ (113).

Próximo al *locus* INK4a, se encuentra el gen INK4b o MTS-2, situado en el *locus* INK4b. Este gen codifica una proteína llamada p15 ($p15^{\text{INK4b}}$) que se comporta también como un inhibidor de los complejos ciclina D-CDK4/6. El mecanismo de inhibición de la proteína p15 se cree que está inducido por el factor de crecimiento transformante (TGF- β), inhibidor de la proliferación de las células epiteliales. La proteína p15 frena la proliferación celular en la fase G1 inhibiendo la síntesis de CDK4a (114).

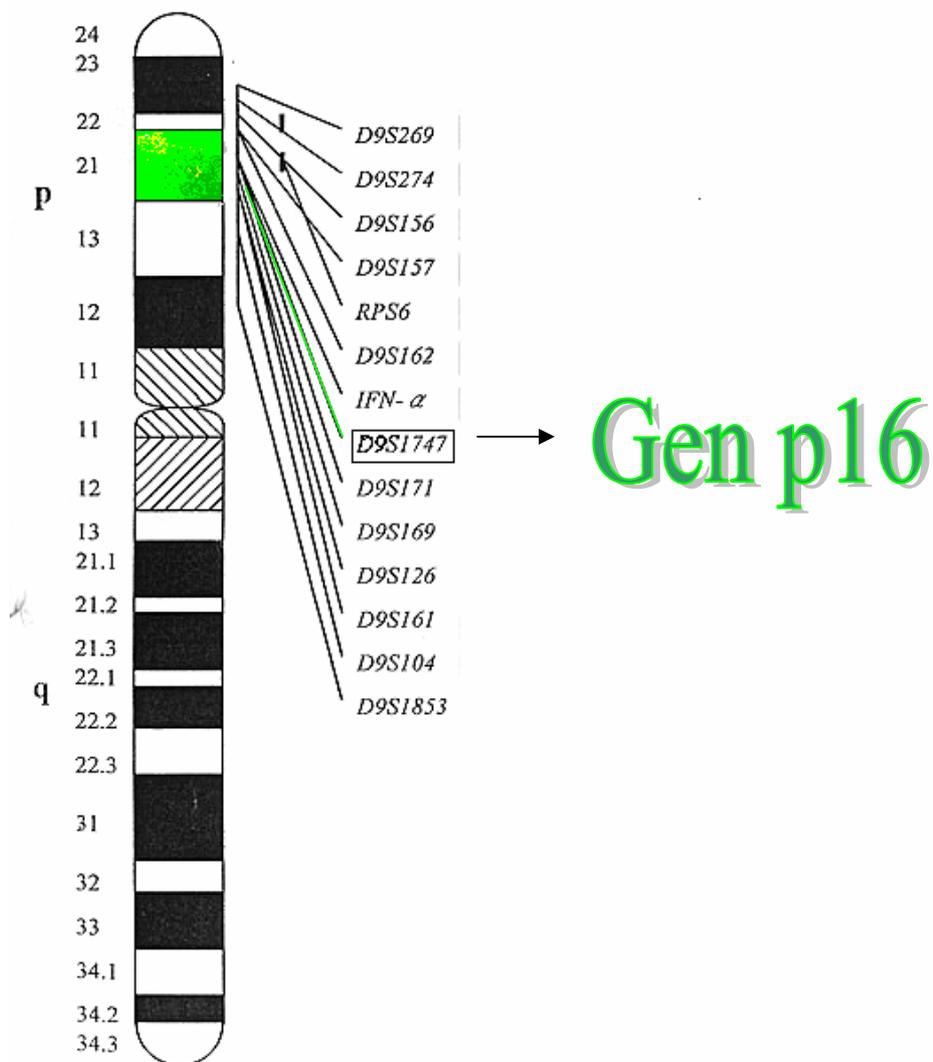


Figura 2. Diferentes marcadores de microsatélites del brazo corto del cromosoma 9 donde está incluido el *D9S1747* (gen *p16*).

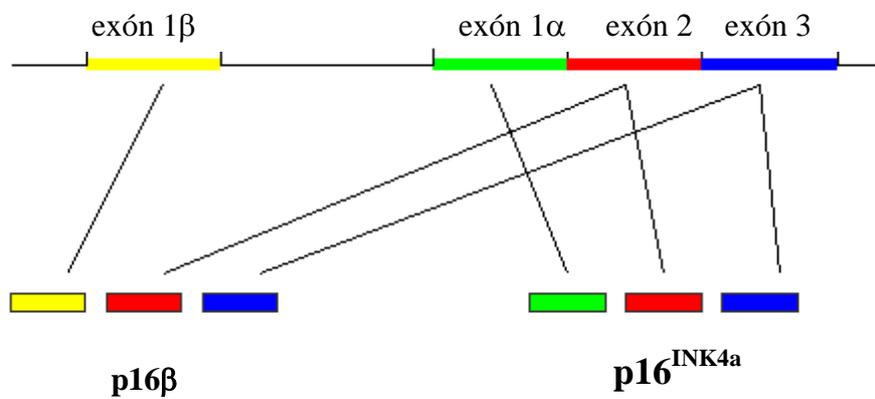


Figura 3. Organización genómica de p16 y p16β.

2. PROTEÍNA p16 Y REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

La serie de sucesos por los que una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular y comprende el periodo entre dos divisiones mitóticas. Consta de cuatro fases: G₁, S, G₂ y M. Hay células que pueden parar su progresión hacia la división celular y permanecer en un estado de reposo, periodo de quiescencia o fase G₀. La fase G₁ es el periodo de tiempo que sigue a una división celular, previa a la síntesis o replicación del DNA, que se produce en la fase S. Durante la fase G₁, la célula dobla su tamaño y su masa debido a la síntesis continua de todos sus componentes como resultado de la transcripción y traducción de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. En esta fase existe un punto de control llamado punto de control de restricción R en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de DNA, y que las condiciones ambientales sean favorables; es el punto de control y decisión más importante. Durante la fase S se produce la duplicación del DNA y antes de entrar en la mitosis, existe otro intervalo conocido como fase G₂ en el que la célula se prepara para iniciar la mitosis. En la fase M se produce el reparto equitativo del DNA a las células hijas (115, 116).

La maquinaria básica del ciclo celular está constituida por enzimas denominadas quinasas o proteína-quinasas (PK), capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato. El resultado de la fosforilación de una proteína es

generalmente un cambio en su actividad. En la proliferación celular, la fosforilación tiene un papel esencial como método para modular, activar o desactivar, la funcionalidad de proteínas. Las quinasas que coordinan los procesos de control del ciclo celular se denominan quinasas dependientes de ciclinas o CDKs porque su actividad de fosforilar proteínas está regulada por la asociación reversible de otras proteínas llamadas ciclinas. Las concentraciones de las ciclinas son críticas en la división celular. Durante las distintas fases del ciclo celular se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y CDKs. El control se ejerce a distintos niveles, sobre la transcripción de los genes de las ciclinas, su degradación y sobre la modificación de las CDKs por fosforilación e inhibición de su actividad (115, 116).

Cuando la célula sale de la fase quiescente G_0 y entra en la fase G_1 , comienza a sintetizar ciclinas para entrar en la fase S. Las ciclinas que regulan el punto de restricción R en la fase G_1 son de dos tipos, D y E. Las ciclinas de tipo D, llamadas D1, D2 y D3, se unen a varias quinasas dependientes de ciclina: CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6 formando complejos binarios, pero principalmente lo hacen a CDK4 y CDK6 durante un periodo muy concreto, el final de la fase G_1 y el inicio de la fase S. Las ciclinas E forman complejos con las CDK2, complejos implicados en el inicio de la fase S, es decir, en la replicación del DNA. Una de las funciones básicas del complejo ciclina D-CDK4 es fosforilar la proteína del retinoblastoma (Rb) (producto del gen supresor de tumores *Rb*) y activar así la expresión de genes necesarios para la entrada

en la fase S. Los complejos ciclina E-CDK2 también son capaces de fosforilar la proteína Rb. Cuando la proteína Rb está hipofosforilada se une e inhibe a varias proteínas, entre ellas algunos factores activadores de la transcripción como E2F, que controlan la expresión de genes críticos para la síntesis de DNA. De esta forma, Rb bloquea la progresión de las células, manteniéndolas en fase G₁. Sin embargo, tras su fosforilación en fase G₁, pRb es inactivada y ya no es capaz de unir y bloquear a estos factores activadores, promoviendo la entrada de la célula en la fase S (115, 116).

Los niveles de Rb no se alteran significativamente durante el ciclo de división celular, pero sí su grado de fosforilación, que modula su actividad. La proteína Rb está poco fosforilada durante las fases G₀ y G₁, mientras que al final de la fase G₁ o el inicio de la fase S es fosforilada en múltiples aminoácidos por las CDK. Al final de la fase M de mitosis, la proteína Rb vuelve a su estado hipofosforilado por acción de las fosfatasas. Su nivel de fosforilación modula su interacción con los E2F (1, 2 y 3), factores de transcripción necesarios para la progresión de la fase S, que se unen a secuencias TTTCGCGC (secuencia que se encuentra en la región promotora de importantes genes de proliferación celular). Cuando el nivel de fosforilación de la proteína Rb es bajo (fases G₀/G₁), Rb inhibe la acción activadora de E2F formando complejos Rb-E2F y de esta forma, bloquea la progresión de las células, manteniéndolas en la fase G₁; sin embargo, cuando el nivel de fosforilación de Rb es alto (fases S/M), E2F se libera y activa la transcripción de genes que son cruciales para

la proliferación celular, como los que codifican las enzimas timidina quinasa, timidilato sintetasa, dihidrofolato reductasa, y la DNA polimerasa α , que intervienen en la síntesis del DNA, así como *c-myc*, *B-myb*, *cdc2/CDK1*, y los genes de las ciclinas A y D1 y el propio gen *E2F-1* (115, 116).

Existe un mecanismo de regulación de los complejos ciclina-CDK que juega un papel crucial: la unión de proteínas que inhiben directamente la actividad quinasa. Estas proteínas se denominan inhibidores de complejos ciclinas-CDK o CDKIs. Se conocen dos clases de CDKIs que difieren en estructura, mecanismo de inhibición y especificidad. La primera está compuesta por las proteínas $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ y $p57^{KIP2}$. La segunda clase está compuesta por las proteínas $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ y $p19^{INK4d}$, las cuales forman complejos con las CDK4 y CDK6 inhibiendo su unión a las ciclinas D, pero no inhiben el resto de las CDKs. Los CDKIs inhiben la fosforilación del Rb y el resultado final es que las células se frenan en el punto de restricción R. Estas proteínas funcionan como supresores de tumores por su efecto bloqueante en el ciclo celular (116).

La proteína $p16^{INK4a}$ fue identificada inicialmente por el grupo de David Beach, como un inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas (110). La proteína $p16$ forma un complejo binario independiente con las CDKs ($p16$ -CDK), concretamente se une a CDK4 y CDK6 e inhibe la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6, como

consecuencia, evita la fosforilación de la proteína Rb y la progresión del ciclo celular (Figura 4). La proteína p16 ejerce su acción a través de la inhibición de la fosforilación de Rb. En realidad, la delección del gen que codifica p16^{INK4a}, la sobreexpresión de la ciclina D y la delección de *Rb* tienen el mismo efecto sobre la progresión del ciclo celular, representando una misma vía de tumorigénesis (110).

La proteína p16 β también inhibe el crecimiento tumoral. Esta proteína genera parada del ciclo celular tanto en la fase G₁ como en la fase G₂. Sin embargo, su mecanismo de actuación parece ser independiente de la vía del Rb y de p16 (113).

Existen muchos estudios que demuestran que la proteína p16, las quinasas CDK4 y CDK6, la ciclina D1 y la proteína pRb están implicadas en la misma vía de tumorigénesis (117-121). Cerca del 100% de los tumores primarios de pulmón, esófago, cabeza y cuello, tienen una alteración genética en al menos uno de los componentes de esta vía (109).

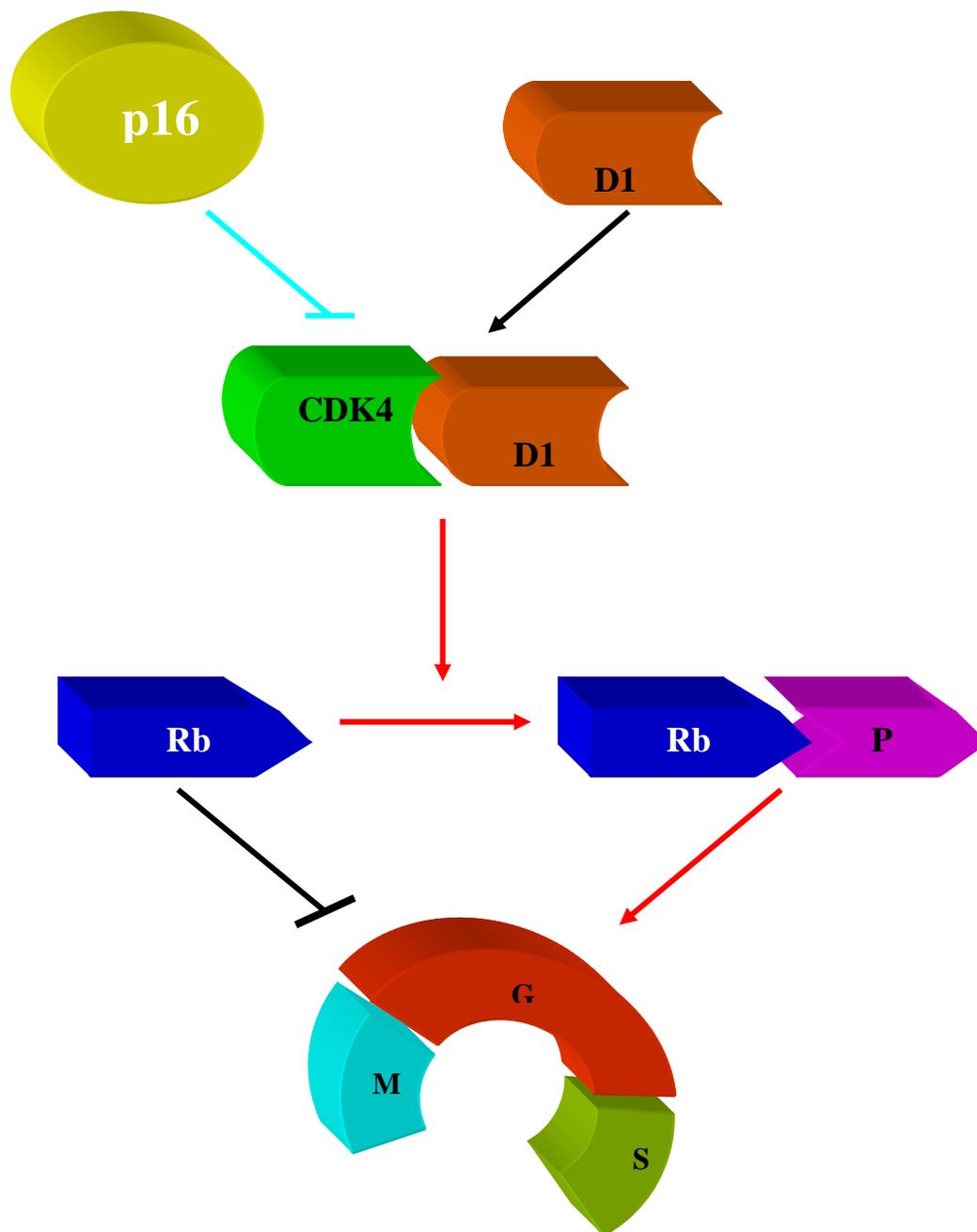


Figura 4. Mecanismo de acción de la proteína $p16^{\text{INK4a}}$ en el ciclo celular.

3. MECANISMOS DE INACTIVACIÓN DEL GEN *p16*

El gen *p16* es un gen supresor. Los genes supresores codifican proteínas necesarias para la función celular normal e intervienen en la parada del ciclo celular. A diferencia de los oncogenes, para que se produzca la inactivación del gen es necesario la pérdida de ambos alelos o la pérdida de uno de ellos e inactivación del otro mediante mutación, deleción, traslocación u otro mecanismo. Cuando se pierde uno solo de los alelos (LOH), el gen sigue conservando su función normal, es decir, sigue produciendo proteína. La mutación del segundo alelo o pérdida de éste sería necesaria para inactivar el gen. En los cánceres esporádicos, la inactivación de los genes supresores requiere dos acciones independientes (hipótesis de “dos golpes”) que modifiquen o alteren cada uno de los dos alelos. En el caso del cáncer hereditario (retinoblastoma, tumor de Wilms), el primer “golpe” es heredado y el segundo “golpe” es adquirido (mutación, deleción...).

A pesar de que otros genes supresores son inactivados mediante mutaciones puntuales, el mecanismo de inactivación más frecuente de *p16* en líneas celulares son pequeñas deleciones (< 200 kb) de ambos alelos, que dan lugar a pérdidas en el *locus* INK4a (122) y, en la mayoría de los casos (aproximadamente el 80%) afecta también al *locus* INK4b (124). Sin embargo, se han observado pocas deleciones homocigotas en carcinoma de vejiga, glioma, mesotelioma, leucemia linfoblástica aguda, melanoma, adenocarcinoma de próstata, sarcoma, adenocarcinoma de ovario y carcinoma de

células renales (122, 124-129). Deleciones homocigotas y mutaciones puntuales también se han hallado en el carcinoma de esófago, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de pulmón de células no microcíticas y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (130-134). Muchas de las mutaciones encontradas en el *locus* INK4a son mutaciones sin sentido y afectan a la proteína p16^{INK4a} o a ésta y a la proteína p16 β (113).

En la mayoría de los cánceres humanos existe inestabilidad genética de secuencias de microsatélites (115). La inestabilidad de microsatélites se debe a la presencia de alelos extras de tamaño diferente en el DNA tumoral que no están presentes en el DNA no tumoral. La aparición de estos alelos distintos en tamaño respecto al patrón alélico normal corresponde a errores de replicación. En ocasiones, se puede observar la desaparición de alelos enteros en las muestras tumorales, por lo que nos referimos a pérdidas alélicas. Parece claro que la inestabilidad de los microsatélites confiere peor pronóstico, aunque en el carcinoma renal no se ha demostrado todavía.

Además de la deleción homocigota y las mutaciones puntuales, otro mecanismo de inactivación del gen *p16* es la metilación de su región reguladora. La metilación de los genes es un mecanismo de regulación de la transcripción, y por lo tanto de la expresión génica (135). Se conocen dos tipos de metilación del DNA, la primera de ellas es conocida como “metilación de novo” y se produce durante la embriogénesis y

en determinados momentos de diferenciación de las células adultas. El segundo tipo es el que tiene lugar en las células adultas normales y está relacionado con los cambios asociados en muchos cánceres humanos (135, 136).

El nivel de metilación en el genoma humano es muy elevado, ya que, aproximadamente del 70 al 80% de los dinucleótidos CpG, los cuales están presentes en sólo un 5-10% del genoma humano (137), están metilado en la posición 5' de la C (citosina) (138). El mecanismo de la metilación está catalizado por la enzima DNA-metiltransferasa, encargada de introducir un grupo metilo en posición 5' de las citosinas transformándolos en 5'-metilcitosinas. Estos dinucleótidos no se encuentran metilados en ciertas regiones llamadas *islas CpG* que representan el 2% del genoma humano. Las *islas CpG* son pequeñas regiones ricas en dinucleótidos CpG, con un tamaño entre 0,5-5 kb y aparecen aproximadamente cada 100 kb (135, 138). Estas islas suelen estar asociadas a las regiones reguladoras de los genes (aproximadamente el 60% de los genes humanos tienen una *isla CpG* en su región reguladora), situándose en la posición 5' dentro de las mismas. El mantenimiento de dichas islas es importante en el proceso de transcripción de genes, de hecho, las *islas CpG* situadas en las regiones reguladoras están sin metilar excepto en la inactivación de genes como el cromosoma X inactivo de las mujeres y en los genes no transcritos de cromosomas autosómicos (138). Los genes humanos que contienen las *islas CpG* están totalmente sin metilar (138) ("housekeeping genes"), correlacionándose esta ausencia de metilación con una replicación temprana de

dichos genes; mientras que los que carecen de estas islas contienen sitios con dinucleótidos CpG en las áreas reguladoras de dichos genes, los cuales pueden ser metilados o no dependiendo del estado de transcripción del gen; así estos sitios CpG no son metilados si el gen se expresa activamente y sí lo están en aquellas células en las que el gen no se transcribe o lo hace muy poco (135, 136).

Durante los últimos 15-20 años se han observado patrones anormales en la metilación del DNA como un cambio molecular más en las neoplasias humanas. Células transformadas de todos los tipos presentan, simultáneamente, pérdidas de metilación en zonas normalmente metiladas, un aumento de la DNA-metiltransferasa y un aumento de las zonas de DNA hipermetiladas (139). Cada uno de estos cambios conlleva consecuencias importantes en la estructura y función del DNA. Holliday y otros autores observaron que la hipermetilación del promotor podía actuar como un cambio epigenético que tenía como consecuencia la ausencia de transcripción en genes de células en cultivo (140, 141). Estos hechos condujeron al planteamiento de la posibilidad de que distintos genes en células tumorales pudieran estar afectados de la misma forma. Así, Antequera et al observaron que múltiples *islas CpG*, algunas asociadas con genes, estaban hipermetiladas en células humanas y murinas inmortalizadas y postuló que aproximadamente la mitad de las islas en el genoma humano podrían estar alteradas de la misma manera (138). La metilación del DNA afecta a la expresión génica. La hipometilación facilita una expresión génica

anormalmente elevada, ya que causa la inducción de genes que no estaban siendo expresados. Esto puede contribuir a alteraciones que pueden representar un papel en la carcinogénesis, por ejemplo, incrementando la expresión de oncogenes. Por el contrario la hipermetilación del DNA puede ser oncogénica cuando el gen inactivado es un gen supresor. La adición de grupos metilo (CH₃-) a las bases de DNA en las regiones reguladoras (promotores) ocasiona generalmente la inhibición de la transcripción génica. Las modificaciones por metilación de bases, aunque no son mutaciones dado que no alteran las secuencias de bases de DNA y no causan cambios genéticos, suponen cambios con consecuencias funcionales semejantes a las mutaciones, denominándose cambios epigenéticos (115).

La metilación es un evento temprano en la aparición de algunos cánceres humanos, causa la inactivación de la transcripción génica y ésta es susceptible de ser heredada. La metilación de algunos genes representa un papel muy importante en la tumorigénesis. Se ha demostrado que el bloqueo de la transcripción de genes mediante la metilación de las *islas CpG* es un mecanismo alternativo de inactivación, y se ha descrito en varios genes como el gen del retinoblastoma, Von Hippel-Lindau, E-cadherin, *p15* y *p16* (142). Algunos carcinomas de células renales muestran metilación de las islas 5' CpG del gen de *VHL* y un pequeño número de retinoblastomas muestran metilación de novo en el gen *Rb* (101,143). La metilación de las islas 5'CpG del gen *p16* ha sido identificada y asociada con un bloqueo transcripcional e inactivación en

numerosos tumores como el de cabeza y cuello, pulmón, cerebro, mama, colon, esófago y vejiga (131, 134, 144-147), con una incidencia que varía desde un 20 a un 67% siendo incluso mayor en los cultivos celulares de los mismos tipos de tumor, donde, por ejemplo, el 90% de las células de cáncer de colon tienen el gen *p16* metilado. En el cáncer de cabeza y cuello, la metilación de *p16* ocurre en aproximadamente el 21% de los tumores y se correlaciona con la ausencia de proteína p16 por técnicas de inmunohistoquímica (130).

OBJETIVOS

1. Determinar la posible existencia de alteraciones genéticas en el gen *p16* localizado en el *locus* 9p21: pérdida de heterocigosidad y/o metilación del gen mediante técnicas de biología molecular y la expresión de la proteína p16 mediante técnicas de inmunohistoquímica en pacientes diagnosticados de carcinoma renal.
2. Conocer la relación existente entre estos marcadores y las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos en el cáncer renal.
3. Estudiar el valor pronóstico de los marcadores estudiados con relación a la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con carcinoma renal. Determinar cuál de ellos presenta valor pronóstico independiente.

PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES

1. PERIODO DE ESTUDIO

Este trabajo ha sido realizado durante el periodo de tiempo comprendido entre Marzo de 1993 y Mayo del 2000, en el seno de un equipo multidisciplinario dedicado a la atención de pacientes con cáncer renal, con la colaboración de los Servicios de Análisis Clínicos, Urología, Anatomía Patológica y la Unidad de Investigación del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y, el Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Los pacientes que forman parte de este estudio fueron intervenidos quirúrgicamente durante los años 1993 a 1998. El periodo de seguimiento se realizó hasta Mayo del 2000.

2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. La población objeto de nuestro estudio se compone de un total de 48 pacientes, tratados en el Servicio de Urología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Este grupo de pacientes fue intervenido quirúrgicamente por carcinoma renal y el diagnóstico fue confirmado por el análisis histológico de la pieza de resección y/o biopsia obtenida durante el acto quirúrgico en todos los casos.

MÉTODOS

1. METODOLOGÍA CLÍNICA

El estudio de estos pacientes se llevó a cabo en tres etapas: etapa preoperatoria, etapa operatoria y etapa postoperatoria.

- **Etapa preoperatoria**

En todos los pacientes, se realizó de forma sistemática una historia clínica detallada, estudios radiológicos, estudios ecográficos, biopsia mediante punción-aspiración con aguja fina (PAAF) y determinaciones analíticas básicas. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento previo de quimioterapia ni de radioterapia.

- **Etapa operatoria**

Durante el acto quirúrgico se procedió a la exéresis del tumor y, se realizó el tallaje de éste. A continuación se obtuvo una muestra del tumor de la zona macroscópicamente afectada y una muestra de tejido renal sano alejada de la periferia del tumor, distanciada del tumor al menos 10 cm. Se procedió al lavado de las mismas con abundante suero fisiológico, con el objeto de eliminar los restos de sangre y grasa.

La muestra de tejido tumoral se dividió en dos fragmentos, uno se utilizó para la determinación de las distintas alteraciones genéticas en el laboratorio y el otro fue

destinado al estudio histopatológico. La muestra de tejido renal sano fue destinada para las determinaciones del laboratorio como muestra control.

El primer fragmento de la muestra tumoral y de la muestra de tejido renal sano se introdujo en un tubo de plástico previamente identificado y, a continuación, en el mismo quirófano se congeló el tubo, introduciéndolo en un termo que contenía nitrógeno líquido. En ningún caso el tiempo transcurrido entre la extracción de la pieza quirúrgica y su congelación sobrepasó los 5 minutos.

Posteriormente las muestras fueron transportadas y almacenadas a -80°C en un congelador, hasta el momento de su procesamiento definitivo.

- **Etapa postoperatoria**

Con el objeto de analizar la posible influencia pronóstica que pudiera tener el análisis de las diferentes alteraciones genéticas realizadas en las muestras tumorales, se realizó un estudio y seguimiento clínico de los pacientes.

El seguimiento se realizó durante una media de 42 meses, con una desviación estándar de 16 meses. La mediana del tiempo de seguimiento fue de 42 meses con un rango entre 0 y 79 meses. No fue posible realizar el seguimiento en dos pacientes después de la cirugía.

De los 48 pacientes, 1 presentaba metástasis en el momento del diagnóstico y falleció antes de terminar el estudio. En el momento de realizar este análisis habían fallecido 2 pacientes (4,2%), incluido el que presentaba metástasis, como consecuencia de su patología tumoral.

Con respecto a la recidiva tumoral, durante nuestro periodo de estudio se detectó recidiva en 4 pacientes (8.3%) sin incluir al paciente que presentó metástasis en el diagnóstico. La localización de estas recidivas fue a distancia en los 4 pacientes y local en uno de ellos.

2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.1 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

El estudio anatomopatológico lo realizaron dos patólogos de forma independiente para este estudio. Se diagnosticó en cada caso el tipo histológico de la muestra.

El estudio histológico de los carcinomas renales resecaados comenzó con el estudio macroscópico de la pieza y la selección de las muestras para la realización de la microscopía óptica, incluyendo al menos dos cortes de la masa tumoral.

La muestra destinada al estudio histopatológico fue fijada inmediatamente en formol a 10% durante 12 horas, incluida en parafina y teñida con la técnica convencional de hematoxilina-eosina.

En cada muestra tumoral se determinó el tipo histológico según la clasificación propuesta por el grupo de Störkel (38) en 1997 de acuerdo con la Union Internationale Contre le Cancer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC). Debido a que la mayoría de las muestras se estudiaron antes de 1997, éstas fueron clasificadas según la clasificación de Thoenes de 1986, anterior a la clasificación actual de Störkel de 1997; fue necesario revisar de nuevo todas las histologías para adaptarlas a la nueva

clasificación. Así mismo, los tumores se distribuyeron atendiendo al grado de diferenciación según la clasificación de Furhman (61) en cuatro grados desde bien diferenciados hasta poco diferenciados.

2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para el procesamiento de las muestras tisulares, tumorales y de tejido renal sano, se siguieron los siguientes pasos: extracción del DNA y cuantificación de éste, determinación de las alteraciones genéticas del gen *p16*: estudio de la pérdida de heterocigosidad del *locus* 9p21 y estudio de la metilación de la región promotora del gen *p16* y, estudio inmunohistoquímico de la proteína p16.

2.2.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL DNA

A. EXTRACCIÓN DEL DNA

La extracción del DNA genómico se realizó tanto en las muestras de tejido tumoral como en las de tejido no tumoral. A continuación detallaremos los equipos y reactivos necesarios y el procedimiento.

□ Equipos y Reactivos

- Baño de agua (Unitronic 320 OR).
- Mortero.
- Pipetas y puntas.
- Eppendorfs.
- Agua destilada.
- Solución amortiguadora (TRIS 50 mM de Merck, EDTA 1mM de Sigma, NaCl de Merck).
- Dodecil Sulfato Sódico (SDS de Sigma).

- Proteínasa K (Proteinase K de Boehringer).
- Fenol-cloroformo (Amresco®).
- Etanol absoluto (Scharlan).

□ Procedimiento

El tejido fue triturado en un mortero con nitrógeno líquido para lisar las células y liberar el DNA. A continuación, las proteínas fueron digeridas con una solución que contenía 400 µL de solución amortiguadora (pH 7,5), 20 µL de SDS al 10% y 10 µL de proteínasa K durante 12 horas en un baño a 37°C con agitación. La extracción del DNA se realizó mediante un método convencional con 400 µL de fenol-cloroformo. El DNA se precipitó con 800 µL de etanol absoluto y se purificó con etanol al 70%. El precipitado se rehidrató en 400 µL y se dejó a temperatura ambiente hasta su cuantificación y almacenamiento.

B. CUANTIFICACIÓN DEL DNA

A continuación se cuantificó la cantidad de DNA genómico extraído y se diluyó hasta conseguir la concentración requerida para realizar las determinaciones de las alteraciones genéticas.

□ Equipos y Reactivos

- Espectrofotómetro (Pharmacia Gene Quant).
- Pipetas y puntas.
- Eppendorfs.
- Agua destilada.

□ Procedimiento

La concentración de DNA se determinó por espectrometría. Las bases púricas y pirimidínicas absorben en UV a 260 nm (D260). Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una solución de doble hebra de DNA de 50 µg/mL. Para evitar una eventual contaminación proteica, se efectuó a la vez, una segunda medida de absorbancia a 280 nm (D280), ya que las proteínas no solo absorben a 280nm, sino también a 260. Consideramos un DNA puro cuando la relación entre D260/D280 estaba comprendida entre 1,8 y 2.

Para realizar la lectura se tomó una dilución del DNA al 1/100. La cantidad de DNA se calculó a partir de la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración de DNA} = D260 \times 50 \text{ ug/mL} \times 100 \text{ (dilución)} \times 0.4 \text{ (volumen final)}$$

A continuación se realizaron diluciones del DNA con agua destilada hasta conseguir una concentración entre 50-100 ug/mL (concentración de DNA con la que trabajaremos en las técnicas siguientes), se identificaron los tubos de almacenamiento y se congelaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

2.2.2 DETERMINACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS

A. ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD DEL *locus* 9p21 (D9S1747)

A.1 Amplificación mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Realizamos una amplificación del microsatélite D9S1747 de acuerdo con la relación existente con el gen *p16* descrita por Kim et al (148).

□ Equipos y Reactivos

- Termociclador automático (GeneAmp PCR System 9600 de Perkin Elmer).
- Tampón estándar para PCR (10x PCR Buffer II de Roche). Proporciona el pH óptimo para la actividad enzimática (8,3-8,8).
- Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$ de Roche). Interviene en la hibridación de los cebadores al DNA, actividad y fidelidad de la Taq y en la especificidad del producto de amplificación.
- Primers, iniciadores o cebadores del marcador de microsatélite *D9S1747* (Progenetic) (Tabla VII). Son cortas cadenas de nucleótidos complementarios a las secuencias situadas en los extremos del fragmento de DNA que se desea amplificar. Inician el proceso de replicación.
- Nucleótidos (GeneAmp® dNTPs de Perkin Elmer). Son trifosfatos de desoxirribonucleósidos necesarios para la síntesis del DNA.
- Taq DNA polimerasa (Amplitaq® DNA Polimerase de Roche). Enzima termoestable aislada de *Thermus Aquaticus* que interviene en la síntesis del DNA.
- Puntas y pipetas.

- Eppendorfs.
- Agua destilada.

□ Procedimiento

La amplificación de la secuencia se realizó con el DNA de las muestras tumorales y no tumorales en un volumen final de 50 μ L que contenía: 50 ng de DNA genómico, 8 μ L de tampón estándar para PCR, 1.25 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada primer (Tabla VII), 200 μ M de dNTPs y 0.5 U de Taq DNA polimerasa.

La amplificación se realizó en un termociclador automático con programa de temperaturas de Perkin Elmer y comenzó con un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el DNA (separación de las dos hebras que forman la cadena de DNA mediante calor). Posteriormente se realizaron 30 ciclos en los que cada uno comprendía: 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C para la hibridación (hibridación de los cebadores con cada hebra de DNA) y 60 segundos a 70°C para la síntesis (la polimerasa extiende los cebadores con los nucleótidos presentes en la reacción). Se realizó un último ciclo a 70°C durante 10 minutos para la elongación final.

En cada amplificación se incorporó un control negativo que contenía todos los reactivos salvo el DNA que se sustituyó por agua destilada. Este control servía para garantizarnos que los reactivos no estaban contaminados.

Tabla VII. Secuencias de los primers utilizados en la amplificación del *locus* 9p21 mediante PCR.

<i>Cromosoma</i>	<i>Símbolo del locus</i>	<i>Banda</i>	<i>Primers: sense 5'→3'</i>	<i>Primer antisense 5'→3'</i>	<i>T^a</i>	<i>Tamaño bp</i>
9p	D9S1747	21	ATTCAACGAGTGGGATGAAG	TCCAGGTTGCTGCAAATGCC	55	150

A.2 Electroforesis

A continuación, los amplificados procedentes de la PCR fueron separados mediante la técnica de electroforesis.

□ Equipos y Reactivos

- Cámara de Electroforesis (Xcell II Mini Cell).
- TBE (Tris de Merck, EDTA de Sigma, ácido bórico de Merck).
- Acrilamida (Acryl/Bis 19:1 solution de Amresco®).
- Glicerol (Merck).
- Persulfato Amónico (Sigma).
- Temed (N,N,N',N'-Tetrametil-Etilendiamina de Eastman).
- Marcador o leader (Phix 174 DNA Hae III Markers de Promega).
- Azul de bromofenol (Blue/Orange 6x de Promega).
- Pipetas.
- Puntas de pipetas (Gelsaver Tip 1 – 200 µL).
- Eppendorfs de 200 µL.
- Agua destilada.

□ Procedimiento

Los fragmentos de DNA procedentes de la PCR se separaron en geles de poliacrilamida al 8% (que permiten separar fragmentos de DNA inferiores a 500 bp) de 1mm de espesor. Para preparar los geles se mezcló bien 2 mL de acrilamida al 40%, 7,5 mL de TBE al 0,5%, 0,5 mL de glicerol, 70 μ L de persulfato amónico y 5 μ L de Temed. Los monómeros de acrilamida se polimerizan en cadenas largas como consecuencia de una reacción que se inicia por la presencia de radicales libres aportados por el persulfato amónico y estabilizados por el Temed.

Las muestras de DNA amplificado se prepararon mezclando 10 μ L de la muestra y 2 μ L de azul de bromofenol. El blanco se preparó en las mismas condiciones. El marcador se preparó mezclando 10 μ L de agua destilada, 2 μ L de Azul de bromofenol y 2 μ L de marcador.

A continuación se preparó la cámara de electroforesis, se colocó el gel solidificado y se llenó la cámara con solución amortiguadora (TBE al 0,5%). Cada gel contenía 10 pocillos. Se cargaron los geles con 5 μ L de cada muestra amplificada (tumoral y no tumoral), el marcador (para comparar el tamaño de los fragmentos de la amplificación) y el blanco (para observar posibles contaminaciones). El azul de

bromofenol nos indicaba el final de la electroforesis que duraba aproximadamente 90 minutos.

A.3 Revelado

A continuación se procedió al revelado de los geles, mediante un método con tinción de plata para observar la presencia de pérdida de heterocigosidad.

□ Equipos y Reactivos

- Baño con agitación (Unitronic 320 OR).
- Etanol absoluto (EtOH de Scharlan).
- Ácido acético (AcOH de Probus).
- Nitrato de plata (AgNO_3 de Panreac).
- Hidróxido sódico (NaOH de Merck).
- Formaldehído (Merck).
- Carbonato sódico (NaCO_3 de Merck).
- Agua destilada.
- Cubetas de cristal.
- Puntas y pipetas.

□ Procedimiento

El revelado se realizó en cubetas de cristal que estaban en continua agitación en un baño a 25°C, para conseguir una buena fijación y tinción de las bandas.

Se colocaron los geles en una solución de fijación (etanol al 10%, ácido acético al 0,5% y agua destilada) durante 5 minutos. Se repitió la fijación durante otros 5 minutos.

Se retiró la solución fijadora y se tiñeron los geles con una solución de AgNO_3 al 0,1% durante 15 minutos. Se realizaron dos cambios rápidos en agua destilada para lavar los geles.

Se dejaron los geles durante 10 minutos en una solución que contenía NaOH 5M y formaldehído al 40%. A continuación se retiró esta solución y se dejó que actuara una solución de Na_2CO_3 al 0,75% durante 5 minutos.

Los geles revelados se identificaron y posteriormente se escanearon identificando todas las muestras y el día del revelado.

A.4 Interpretación de los resultados

La pérdida de heterocigosidad fue definida como una reducción de la intensidad de uno de los alelos de la muestra tumoral (aproximadamente en más de un 50% visualmente) comparándolos con los dos alelos de la muestra no tumoral (control).

La imagen siguiente representa un gel en el que se ha estudiado la LOH en 9p21 de 3 muestras (Figura 5).

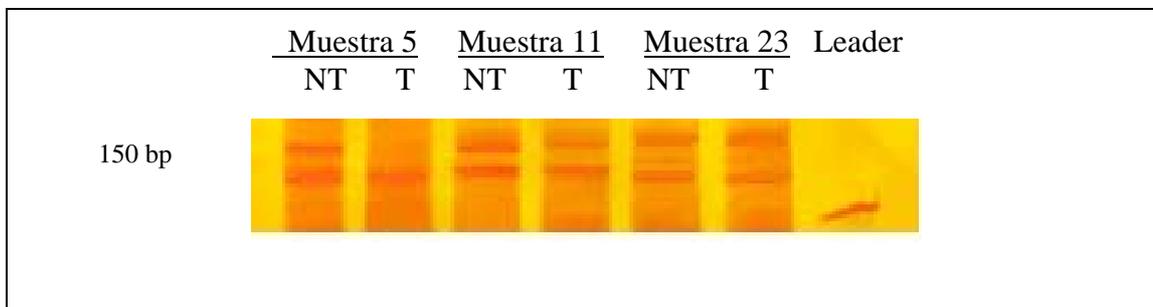


Figura 5. Gel de la LOH en 9p21 en 3 muestras. La muestra n° 5 presenta LOH.

B. ESTUDIO DE LA METILACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *p16*

El estudio de la metilación del promotor del gen *p16* se realizó mediante: tratamiento del DNA con bisulfito y purificación del DNA modificado, amplificación mediante PCR del DNA metilado y no metilado y, electroforesis y revelado.

B.1 Tratamiento del DNA con bisulfito y purificación del DNA modificado

Primero es necesario realizar una modificación inicial del DNA con bisulfito sódico para transformar las citosinas sin metilar en uracilos (pero no las metiladas). Este tratamiento con bisulfito requiere una desnaturalización inicial con tratamiento alcalino (NaOH) para separar las dos hebras de DNA y posteriormente una modificación con bisulfito para transformar las citosinas no metiladas en uracilos (Figura 6).

La desaminación de la citosina mediante el bisulfito y su conversión en uracilo implica tres pasos (Figura 7):

- PASO 1: adición de bisulfito sódico para producir un sulfonato de citosina. Este paso está controlado por la concentración de bisulfito, la temperatura y el pH. La reacción se favorece a pH ácido.
- PASO 2: desaminación hidrolítica para dar un sulfonato de uracilo. Este paso está catalizado por el sulfito, bisulfito y aniones acetato.
- PASO 3: eliminación del sulfonato con tratamiento alcalino. Mientras que la sulfonación está favorecida a pH ácido, la desulfonación está favorecida a pH alcalino.

Aunque la 5'-metilcitosina puede también reaccionar con el bisulfito, la reacción es extremadamente lenta y el equilibrio favorece a la molécula de 5'-metilcitosina frente a su derivado desaminado que sería la timina.

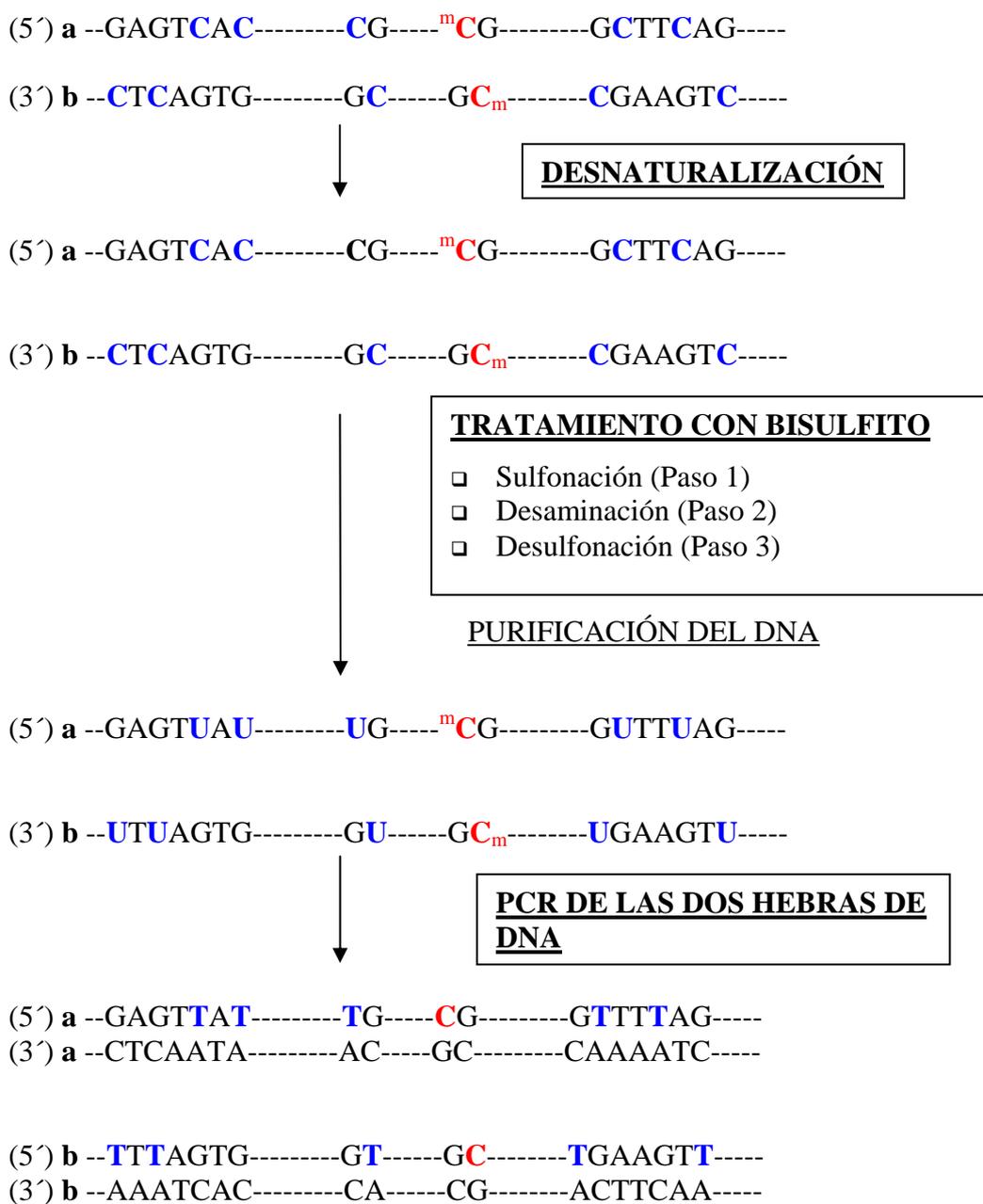


Figura 6. Secuencias del tratamiento con bisulfito.

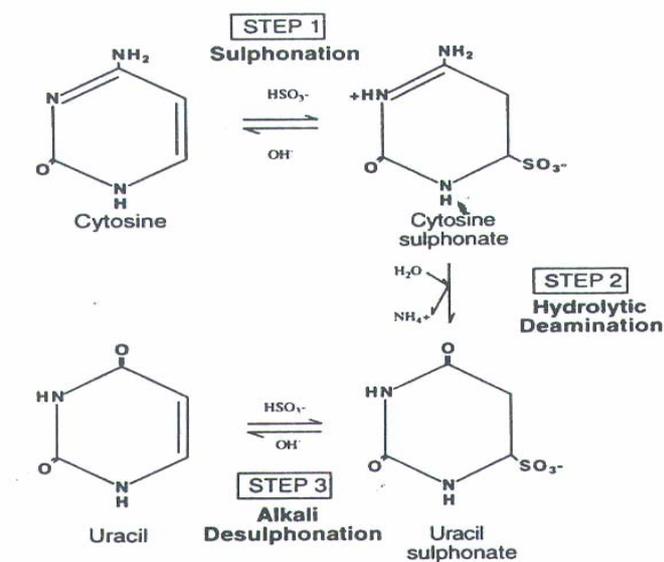


Figura 7. Esquema de la reacción del bisulfito.

□ Equipos y Reactivos

- Hidróxido sódico (NaOH de Sigma).
- Bisulfito sódico (Sigma H-1003)
- Hidroquinona (Sigma S-9000)
- Baño de agua (Unitronic 320 OR).
- Eppendorfs.
- Pipetas y puntas.
- Wizard DNA Clean Up System (Promega)
- Vac-Man Jr. Laboratory Vaccum Manifold (Promega).

- Jeringas Luer-Lock 3 O 5 Ml (Materlab).
- QIAamp Tissue Kit (Qiagen).
- Columnas con Filtro (Qiagen).
- Isopropanol (Panreac).
- Agua destilada.
- Acetato sódico (Sigma).
- Etanol absoluto (Scharlan).
- Microcentrífuga (Micro Centrifugette[®] 4214 ALC[®]).

□ Procedimiento

El tratamiento del DNA con bisulfito se realizó según el método de Herman et al (149). Se desnaturalizó 1 µg de DNA (muestra tumoral y no tumoral) en un volumen de 50 µL, con 5,5µL de NaOH 3M recién preparada (concentración en la reacción 0,3M), durante 15 minutos en un baño de agua a 37°C. En el método de Herman emplean NaOH 0,2M y 10 minutos; esto se ha modificado porque en el estudio de Clark et al (150) demostraron que éstas eran las condiciones óptimas. Para completar la desnaturalización, se incubaron las muestras a 80°C durante 1 minuto e inmediatamente se enfriaron en hielo.

Cada muestra fue tratada con 1 mL de bisulfito sódico 3M a pH 5 y 12,5 µL de hidroquinona 40 mM (es importante que ambos reactivos estén recién preparados) y se mezcló bien. Posteriormente, las muestras se incubaron a 50°C en el baño de agua durante 16 horas, cubriéndolas previamente con aceite mineral para evitar su evaporación.

El DNA modificado con bisulfito fue purificado mediante el método de resinas de purificación de DNA de Wizard (Wizard DNA Clean Up System) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y fue eluido en 50 μ L de agua destilada.

La modificación fue completada tratando las muestras con NaOH 3M (concentración en la reacción 0,3 M) e incubándolas a 37°C durante 15 minutos para eliminar los grupos sulfurosos; en el método de Herman et al, la incubación se realiza durante 5 minutos a temperatura ambiente pero, según Clark et al, las condiciones óptimas eran durante 15 minutos a 37°C.

La purificación del DNA se completó mediante las columnas de purificación de DNA QIAamp (QIAamp Tissue Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta modificación del método fue añadida por nuestro grupo ya que obtuvimos mejores resultados. El DNA fue eluido en 50 μ L con agua destilada.

B.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Tanto el DNA tumoral modificado con bisulfito, el metilado (p16-M) como el no metilado (p16-U) fueron amplificados mediante PCR con cebadores específicos para ello.

□ Equipos y Reactivos

- Termociclador (GeneAmp PCR System 9600 de Perkin Elmer).
- Tampón estándar para PCR (tampón 10x sin Mg de EcoTaq).
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$ de Promega).
- Primers (Progenetic).
- Nucleótidos (dNTPs de Promega).
- Taq polimerasa (EcoTaq de Promega).
- Eppendorfs.
- Pipetas y puntas.

□ Procedimiento

La amplificación de cada secuencia se realizó siguiendo el método de Herman et al en un volumen final de 50 μ L que contenía: aproximadamente 50 ng de DNA modificado con bisulfito, 5 μ L de tampón estándar para PCR, 2,5 mM de $MgCl_2$, 300 ng de cada cebador en la reacción (Tabla VIII), 200 μ M de dNTPs y 1,25 U de Taq polimerasa.

La amplificación se realizó en un termociclador con un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el DNA. Posteriormente, se realizaron 35 ciclos en los que

cada uno comprendía: 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 65°C (DNA modificado-metilado) o 60°C (DNA modificado con bisulfito-no metilado) y 30 segundos a 72°C para la hibridación y síntesis. Se realizó un último ciclo a 72°C durante 10 minutos para la elongación final. En cada amplificación se incorporó un control negativo que contenía agua destilada en lugar de DNA para evaluar posibles contaminaciones.

Tabla VIII. Secuencias de los cebadores utilizados en las amplificaciones mediante PCR.

Cromosoma	Símbolo del locus	Banda	Primers: sense 5'→3'	Primer antisense 5'→3'	Tª	Tamaño bp
9p	p16-M	21	TTATTAGAGGGTGGGG <u>CGGATCGC</u>	<u>GACCCCGAACC</u> CGACCGTAA	65	150
	p16-U		TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACA <u>ACCATAA</u>	60	151
	p16-M2		TTATTAGAGGGTGGGG <u>CGGATCGC</u>	CCACCTAAATCGACCTCCGACCG	65	234
	p16-U2		TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CCACCTAAATC <u>ACCTCCAACCA</u>	60	234

p16-M y p16-M2 representan los primers del DNA modificado y metilado.

p16-U y p16-U2 representan los primers del DNA modificado y no metilado.

Las diferencias entre las secuencias de los primers de DNA modificado metilado y no metilado están subrayadas.

B.3 Electroforesis y Revelado

El procedimiento de electroforesis y revelado se llevó a cabo igual que los descritos anteriormente para el estudio de la pérdida de heterocigosidad.

B.4 Interpretación de los resultados

En la interpretación de los resultados, se consideró que el DNA tumoral estaba metilado cuando aparecía una banda en la amplificación con cebadores para DNA

tratado-metilado (p16-M), independientemente que el tratado-no metilado (p16-U) tuviera banda, ya que la metilación del DNA puede ser total o parcial dependiendo del grado de metilación.

La imagen siguiente representa el ejemplo de un gel en el que se han estudiado 3 muestras (Figura 8).

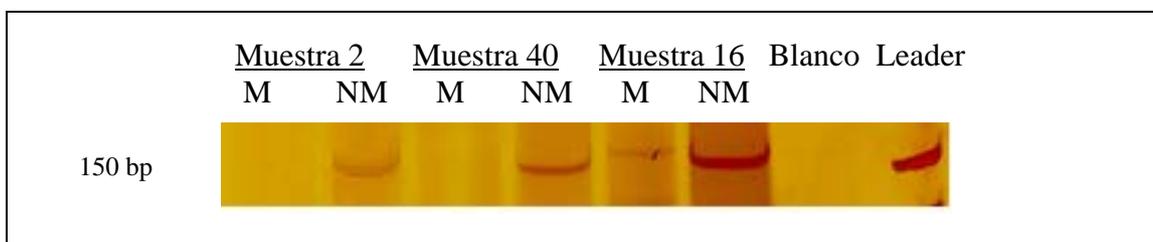


Figura 8. Gel de la metilación del gen *p16* en tres muestras tumorales. En las muestras 2 y 40 sólo amplifica el DNA no metilado mientras que en la muestra 16 se observa también la amplificación del DNA metilado.

C. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA p16 MEDIANTE LA TÉCNICA DE IMMUNOHISTOQUÍMICA

La detección de la expresión de la proteína p16 en las células se ha realizado mediante una técnica que consta de tres pasos, el primero consiste en la preparación de los portas y fijación del tejido para su estudio, el segundo paso es la tinción inmunohistoquímica y el tercero, el estudio de los tejidos teñidos.

C.1 Preparación de los portas y fijación del tejido

□ Equipos y Reactivos

- Portaobjetos.
- 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma A-3648).
- Acetona.
- Agua destilada.
- Formol tamponado a pH 7 (formol comercial al 35-40%, 900ml de agua destilada, 4g de monohidrato de fosfato ácido sódico y 6,5g de fosfato disódico anhidro).
- Alcohol de 70°, 80°, 96° y 100° y Xilol. Se utilizan para deshidratar el tejido.
- Estufa.
- Baño.
- Microtomo Leitz 1: 512.

□ Procedimiento

Preparación de los portaobjetos para desengrasar y adherir los cortes.

Los portaobjetos se sumergen en una cubeta con 3-aminopropyltriethoxy-silano al 2% en acetona. Se realizan dos lavados en agua destilada, para que no se forme una película. Se escurren y se dejan en una estufa toda la noche a 55°C.

Fijación de las piezas

Se fijan las piezas de tejido en formol tamponado a pH 7 durante 12 – 24 horas.

Deshidratación e inclusión en parafina

Se sumergen los portas en alcohol de 70° durante 30 minutos dos veces. A continuación, se dan dos pases en alcohol de 96° de una hora cada uno. Por último, se dan tres pases en alcohol a 100° de una hora cada uno. Se dan dos pases en xilol de 10 minutos cada uno y dos pases en parafina (punto de fusión 56°C) de una hora cada uno y se confecciona el bloque.

Corte

Se realizan cortes de 7 micras en el microtomo, un estirado en el baño a 47°C, se coloca el corte en el porta y se mantiene en la estufa a 37° C toda la noche.

Desparafinado e hidratación

Se dan dos pases en xilol de 15 minutos cada uno. Se realizan lavados en alcohol de gradación decreciente: 100°, 96°, 80° y 70°. Se realiza un lavado en agua destilada.

C.2 Técnica Inmunohistoquímica

□ Equipos y Reactivos

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se utiliza para inhibir la peroxidasa endógena.
- Metanol.
- Agua destilada.
- EDTA 1mM (600 ml de H₂O destilada, 1200 µl EDTA (Sigma E-7889).
- Microondas.
- Buffer TRIS: (6,05 g de Tris, 8.76 g de ClNa, 40 ml de ClH (1N) y completar con H₂O hasta 1 L, 1 ml de Tritón X-100). Ajustar el pH entre 7,4 –7,6.
- Suero bloqueante (Dako).
- p16 (Sta cruz, F-12), anticuerpo monoclonal IgG de ratón. Es el anticuerpo primario y se utiliza para marcar la proteína p16.
- EnVision, Peroxidase, Mouse (Dako, K4001), anticuerpo anti-inmunoglobulinas (Ig) de ratón conjugado con peroxidasa. Es el anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario.
- Diaminobencidina (DAB), substrato cromógeno. Se utiliza para el revelado.
- Hematoxilina. Se utiliza para la contratinción.
- Alcohol de 70°, 80°, 96° y 100° xilol y carboxilol. Se utilizan para deshidratar el tejido.
- Eukitt (Prolabo). Se utiliza para fijar y sellar el tejido al porta.

□ Procedimiento

Inhibición de la peroxidasa endógena: se sumergen los portas en una disolución formada por 3 ml de H₂O₂ y 98 ml de metanol durante 10 minutos en la oscuridad y luego se lavan con agua destilada. Este paso se realiza para eliminar el ruido de fondo.

Desenmascarar el epítipo: se sumergen los portas en una solución de EDTA 1mM a pH 8-8,2 y se lleva a ebullición en el microondas, se pone a T^a máxima durante 10 minutos, se saca 1 minuto fuera y se repite 3 veces; así se rompen las proteínas y se abren los poros de la membrana celular permitiendo la entrada del anticuerpo. Después se lava con buffer TRIS (pH 7,4-7,6).

Añadir el suero bloqueante: a cada porta se le añade una solución que contiene 2 ml de TRIS con 1 gota (50 µl) de suero durante 30 minutos en una cámara húmeda.

Añadir el anticuerpo primario monoclonal p16 (Sta cruz, F-12): se añade a cada uno de los portas una solución que contiene 1 ml de TRIS con 40 µl de anticuerpo durante toda la noche a 4°C en la cámara húmeda. Después se lava con buffer TRIS dos veces durante 10 minutos cada una.

Añadir el EnVision: a cada porta se vierte 1 ml de TRIS con 2 ml de EnVision durante 30 minutos y a continuación se lavan con buffer TRIS dos veces durante 10 minutos cada una.

Revelado con Diaminobencidina: se añade 1 ml de buffer del kit con 1 gota de DAB a cada porta y se incuba durante 5 minutos en la oscuridad. A continuación se lava con buffer TRIS, con agua y con agua destilada.

Contratinción con Hematoxilina: se añade hematoxilina en los portas y después se lavan con agua.

Montaje de las preparaciones: se realiza deshidratando las tinciones con alcoholes de graduación creciente (70°, 80°, 96°, 100°), xilol y carboxilol. Montar con el reactivo Eukitt.

C.3 Estudio de los tejidos e interpretación de los resultados

□ Equipos

- Microscopio NIKON OPTIPHOT
- Cámara NIKON FX-35^a

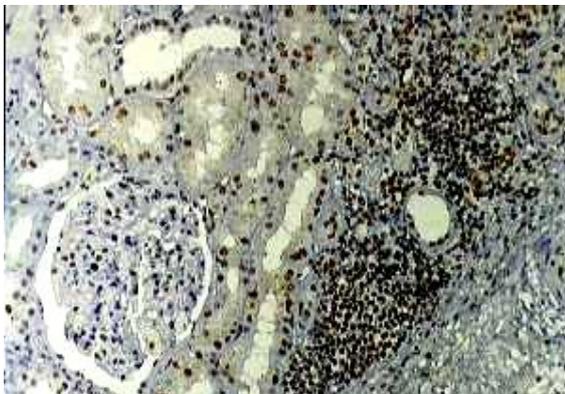
□ Procedimiento

Las preparaciones se estudiaron con el microscopio NIKON OPTIPHOT y se fotografiaron con una cámara NIKON FX-35^a.

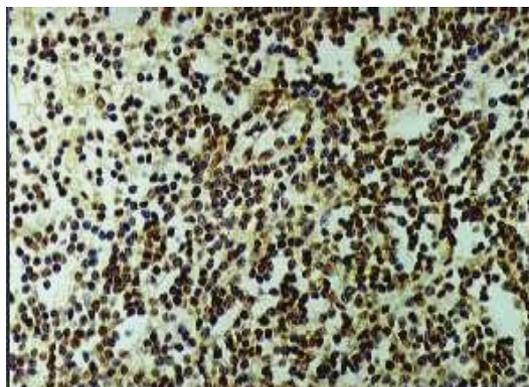
La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Un porcentaje de tinción de los núcleos (color marrón) superior al 10% se consideró inmunohistoquímica positiva y, por lo tanto, expresión de la proteína p16.
- La tinción del citoplasma (color marrón) o ausencia de tinción de los núcleos (color azul) se consideró inmunohistoquímica negativa y, por lo tanto, ausencia de expresión de proteína.
- La tinción de citoplasma y núcleos (color marrón) se consideró positiva cuando predominaron los núcleos y negativa cuando predominó la tinción citoplasmática.

Las figuras siguientes representan ejemplos de tinciones positivas y negativas de dos muestras diferentes (Figuras 9 y 10).

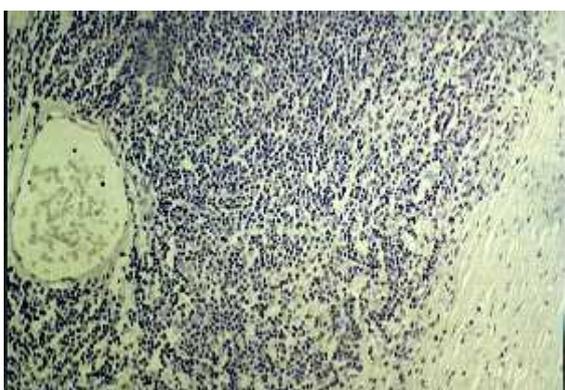


Muestra 34

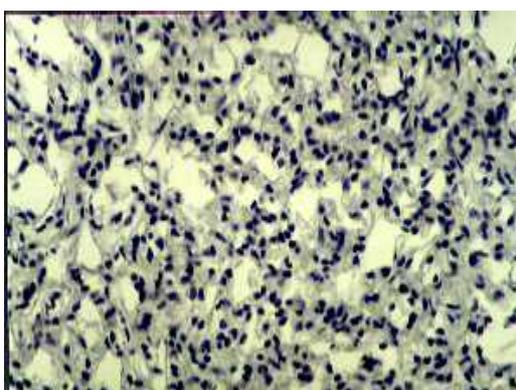


Muestra 34 ampliada

Figura 9. Expresión de la proteína p16 mediante inmunohistoquímica en la muestra tumoral nº 34. La expresión de la proteína p16 es positiva.



Muestra 38



Muestra 38 ampliada

Figura 10. Expresión de la proteína p16 mediante inmunohistoquímica en la muestra tumoral nº 38. La expresión de la proteína p16 es negativa.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media, desviación estándar (DE) y rango. En distribuciones asimétricas se presenta la mediana y su rango intercuartílico (Rango RIQ).

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de χ^2 y, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5, por la prueba exacta de Fisher. En el caso de variables ordinales se contrastó la hipótesis de tendencia ordinal de proporciones.

Se estimó la “Odds Ratio” (OR) o “razón de ventajas”, para los factores asociados a las alteraciones genéticas junto con su intervalo de confianza del 95%.

Se analizó el comportamiento de las variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la *t* de Student (en comparaciones de una variable con dos categorías) y/o el análisis de la varianza (ANOVA). Mediante esta técnica se han evaluado las diferencias de medias debido al efecto individual, o principal de cada factor y/o al efecto de sus interacciones.

En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

Se estimaron las funciones de supervivencia por el método de Kaplan-Meier para las variables independientes en el estudio de la supervivencia (SG) y de la supervivencia libre de enfermedad (SLE). Se presentan las gráficas de las curvas estimadas y la mediana de la distribución. Consiste en comparar el número de eventos observados en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula). La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizó mediante el test exacto de Breslow.

Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Este modelo permite identificar y evaluar la relación entre un conjunto de variables explicativas y el tiempo de ocurrencia de un evento y también predecir el tiempo de supervivencia de un determinado sujeto a partir de los valores que toma en las variables explicativas o pronósticas.

$$h(t;x) = h_0(t) \cdot e^{\beta \cdot X} = h_0(t) \cdot e^{\beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \dots + \beta_p \cdot X_p}$$

$h(t;x)$

Tasa de riesgo de un sujeto, con valores $x = (x_1; x_2; \dots; x_p)$ en las variables explicativas, en el instante t . Es la variable respuesta que se modeliza. Representa el riesgo de fallecer o recidivar en el instante t de los sujetos que tienen un determinado patrón de valores x en las variables explicativas.

 $e^{\beta \cdot X}$

Función exponencial, cuyo exponente es la combinación lineal, sin término constante, de las p variables explicativas x_i .

 $h_0(t)$

Función de riesgo de referencia ("baseline" o "underlying hazard function), que sólo depende del tiempo, llamada así porque representa las tasas instantáneas de riesgo de un sujeto hipotético con valor 0 en todas las variables predictivas.

Se evaluó la existencia de interacciones, introduciendo las variables independientes multiplicativas con pruebas de significación estadística y se mantienen en el modelo los términos de interacción estadísticamente significativos. Se presentan los "riesgos relativos" (RR) o "razón de tasas" ajustados junto a sus Intervalos de Confianza (IC) 95%. La interpretación de los parámetros del modelo con signos positivos indican el aumento de la tasa instantánea de riesgo, es decir, un peor pronóstico de un sujeto para un valor alto en la variable x . La contribución de una

variable x se valora en el exponente e^{β} , que es el factor por el cual se multiplica la tasa de riesgo instantáneo de un sujeto cuando la variable x se incrementa en una unidad. Este exponente se interpreta como el riesgo relativo en el instante t de los sujetos. En variables dicotómicas es pasar de la ausencia (0) a la presencia (1) del factor x . En variables cuantitativas el incremento lineal de la tasa de riesgo cuando se incrementa la variable x en una unidad. Este aumento es proporcional en todos los valores que toma la variable. En variables policotómicas (más de dos categorías) una categoría se toma como referencia y por lo tanto el RR es de 1. El resto de las categorías se comparan frente a la de referencia.

Los supuestos básicos que deben cumplir los datos para poder aplicar dicho modelo son sobre todo de la parte paramétrica ya que la contribución de las diferentes variables explicativas en la predicción de la supervivencia, o más precisamente, de la tasa instantánea de riesgo, es la misma en cualquier momento del tiempo de seguimiento. La parte no paramétrica del modelo no impone ningún supuesto sobre la forma de distribución de los tiempos de supervivencia.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 9.0.

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

La población objeto de nuestro estudio se compone de un total de 48 pacientes, 33 varones y 15 mujeres diagnosticados de cáncer renal. La edad media fue de 60,8 años, con un rango comprendido entre 36 y 84 años y, una desviación estándar de 12,1.

En el momento del diagnóstico, 29 pacientes (60,4%) presentaban síntomas mientras que el diagnóstico fue incidental en 19 pacientes (39,6%). Se constataron antecedentes familiares de cáncer en 8 pacientes (16,7%).

La descripción de las variables clínico-patológicas de nuestra población se describe en la Tabla IX.

Tabla IX. Descripción de las variables clínico-patológicas. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

VARIABLE	%	n
SEXO		
Varón	68,8	33
Mujer	31,2	15
DIAGNÓSTICO		
Sintomático	60,4	29
Incidental	39,6	19
ANTECEDENTES FAMILIARES		
Si	16,7	8
No	35,4	17

CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES

Tipo histológico

La distribución de los 48 tumores renales, respecto al tipo histológico de acuerdo con la clasificación de Störkel (38), fue: 31 convencional o de células claras (64,6%), 7 cromóforos (14,6%), 4 papilares (8,3%), 4 túbulos colectores o de Bellini (8,3%) y 2 inclasificables (4,2%) (Figura 11).

Estadio tumoral

Según la clasificación TNM propuesta por la Union Internationale Contre le Cancer (U.I.C.C.) y el American Joint Committee on Cancer (A.J.C.C.) en 1997 (43-45), nuestro grupo de 48 pacientes se distribuyó en: 25 pacientes en estadio I (52,1%), 2 pacientes en estadio II (4,2%), 20 pacientes en estadio III (41,7%) y 1 paciente en estadio IV (2,1%) (Figura 12).

Tamaño tumoral

De acuerdo con la clasificación TNM (43-45), los tumores se clasificaron según el tamaño tumoral en: 25 tumores (52,1%) en T1, 3 tumores (6,3%) en T2 y 20 tumores (41,7%) en T3. Ninguno de los tumores era del grupo T4 (Figura 13). Dentro del grupo T3 se clasificaron en otros tres grupos: 11 tumores (22,9%) en T3a, 8 tumores (16,7%) en T3b y 1 tumor (2,1%) en T3c.

Afectación ganglionar

Con relación a la afectación tumoral de los ganglios, se clasificaron en tres grupos: 45 tumores (93,8%) sin afectación (N0), 3 tumores (6,3%) con afectación de un ganglio (N1) y ningún tumor con más de un ganglio afectado (N2) (Figura 14).

Metástasis

En el estudio previo a la cirugía se diagnosticó un paciente (2,1%) con metástasis a distancia (M1).

Grado de diferenciación

Respecto al grado de diferenciación nuclear, los tumores se distribuyeron según la clasificación de Fuhrman (61) en cuatro grupos: 11 tumores (22,9%) de grado 1, 27 tumores (56,3%) de grado 2, 9 tumores (18,8%) de grado 3 y 1 tumor (2,1%) de grado 4 (Figura 15).

Aunque no son factores pronóstico clásicos, también hemos descrito otras variables macroscópicas del tumor renal en la tabla X.

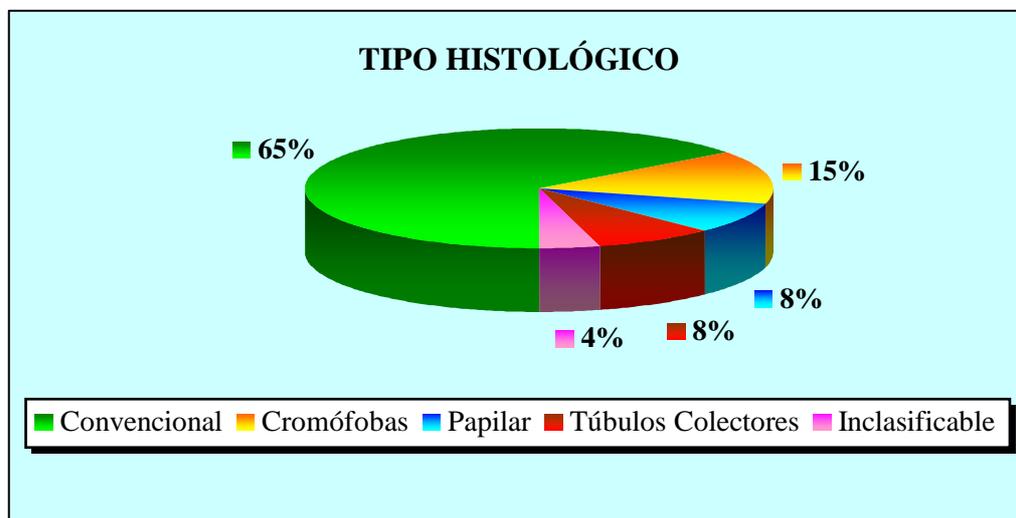


Figura 11. Distribución de los tumores según el tipo histológico. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

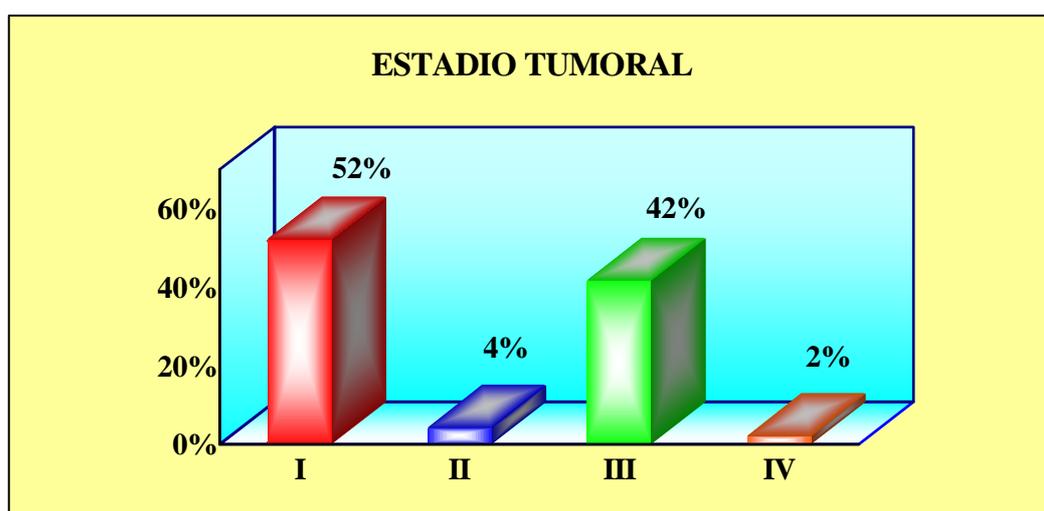


Figura 12. Distribución de los tumores según el estadio tumoral. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

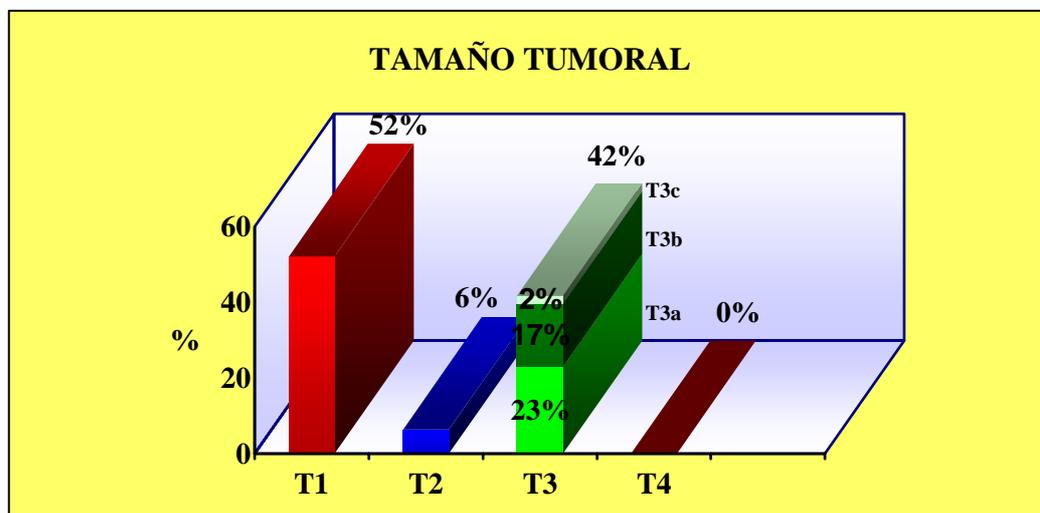


Figura 13. Distribución de los tumores según el tamaño tumoral. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

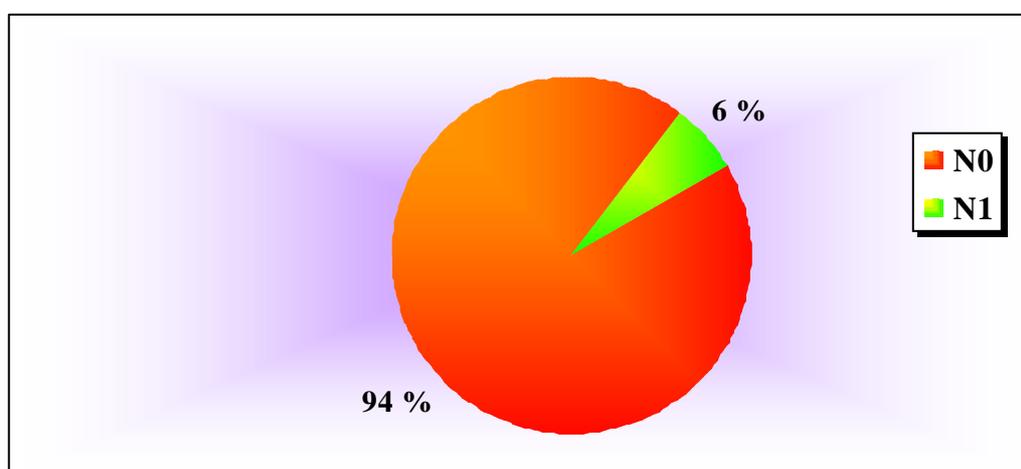


Figura 14. Distribución de los tumores según la afectación ganglionar. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

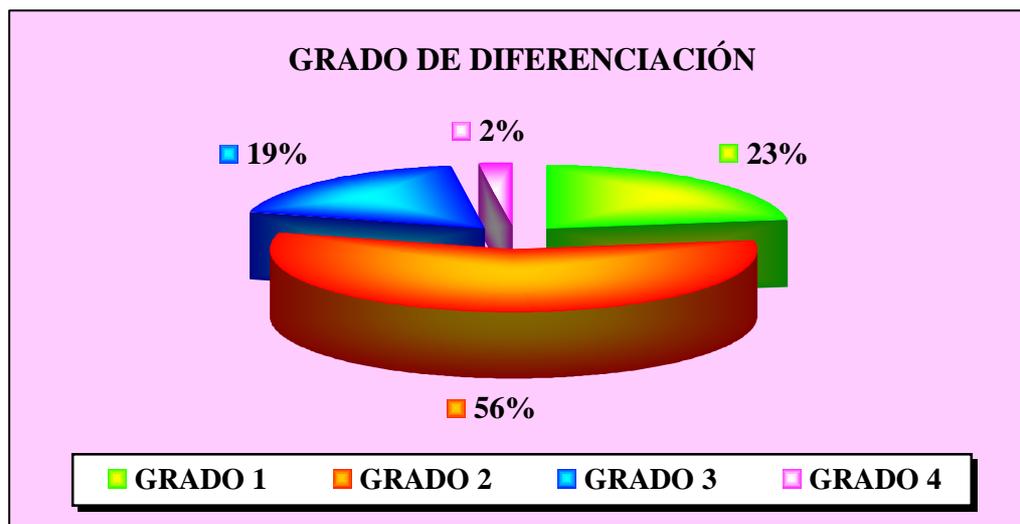


Figura 15. Distribución de los tumores según el grado de diferenciación. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Tabla X. Descripción de las variables macroscópicas tumorales. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

VARIABLE	%	n
MASA DEL TUMOR (ECOGRAFÍA)		
Sólida	70,8	34
Mixta	25,0	12
Quística	0,0	0
LOCALIZACIÓN TUMORAL		
Polo superior	33,3	16
Polo inferior	18,8	9
Mesorión	20,8	10
Polo superior y mesorión	6,3	3
Polo inferior y mesorión	14,6	7
Bilateral	2,1	1
Todo	4,2	2
MULTIFOCALIDAD		
Si	16,7	8
No	83,3	40

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS DEL GEN *p16* Y SU PROTEÍNA

Este estudio consta de cuatro partes:

1. Estudio de las alteraciones genéticas en el *locus* 9p21 (*D9S1747*)
 - 1.1 Estudio de la LOH
 - 1.2 Estudio de la inestabilidad cromosómica
 - 1.3 Estudio de la LOH y/o inestabilidad cromosómica
2. Análisis de la metilación del promotor del gen *p16*
3. Determinar la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16*
4. Estudio de la proteína p16

1. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL *locus* 9p21 (*D9S1747*)

En este estudio hemos analizado si nuestra serie de 48 pacientes diagnosticados de cáncer renal tenía pérdidas alélicas (LOH) en la región 9p21. Para ello, hemos utilizado el marcador de microsatélites *D9S1747*. También hemos estudiado la presencia de inestabilidad cromosómica en esta región.

En nuestra serie de 48 pacientes, el 25% (12 pacientes) presentaba LOH en 9p21, el 4,2% (2 pacientes) presentaba inestabilidad cromosómica en este microsatélite y el 68,8% (33 pacientes) no presentaba ninguna de estas alteraciones. En un paciente (2,1%) no se pudo observar la presencia de estas alteraciones debido a que era homocigoto para este alelo (Figura 16).

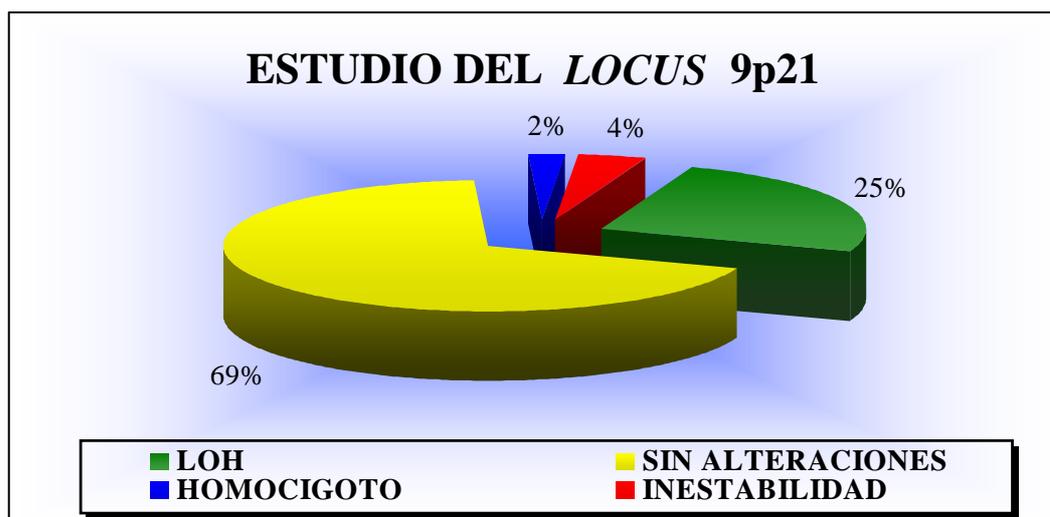


Figura 16. Estudio de las alteraciones genéticas en el *locus* 9p21. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

1.1. ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH)

El 25% de los pacientes estudiados (12 pacientes) presentaron LOH en el *locus* 9p21.

A. Relación con las variables clínico-patológicas

Respecto al estudio de la relación de la LOH en 9p21 con las variables clínico-patológicas (Tabla XI), observamos el 21,9% de los hombres y el 33,5% de las mujeres presentaban esta alteración ($p=0,48$). El 32% de los pacientes mayores de 60 años y el 18,2% de los menores o igual a 60 años presentaban LOH en 9p21 ($p=0,33$). El 50% de los pacientes que tenían antecedentes familiares de cáncer y el 25% de los que no los tenían, presentaban esta alteración genética ($p=0,36$).

Respecto a las variables macroscópicas del tumor, el 30,3% de los tumores sólidos y el 16,7% de los tumores mixtos presentaban pérdida de heterocigosidad ($p=0,47$). El 12,5% de los tumores multifocales y el 28,2% de los tumores sin multifocalidad tenían LOH ($p=0,66$).

Tabla XI. Prevalencia de la LOH en el *locus* 9p21 en relación con las variables clínico-patológicas. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA LOH		O.R.	I.C.(95%)	p
	%	n			
SEXO					
Varón	21,9	7	0,56	0,14 – 2,19	0,48
Mujer	33,5	5	1		
EDAD					
> 60	32,0	8	2,12	0,54 – 8,34	0,33
≤ 60	18,2	4	1		
ANTECEDENTES FAMILIARES					
Si	50,0	4	3,00	0,50 – 17,95	0,36
No	25,0	4	1		
MASA DEL TUMOR					
Sólida	30,3	10	2,17	0,40 – 11,78	0,47
Mixta	16,7	2	1		
MULTIFOCALIDAD					
Si	12,5	1	0,36	0,04 – 3,31	0,66
No	28,2	11	1		

B. Relación con los factores pronóstico-clásicos

En la relación de la LOH en el *locus* 9p21 con los factores pronóstico clásicos (Tabla XII), hemos observado que en cuanto al tipo histológico, el 30% de los tumores convencionales o células claras, el 25% de los papilares, el 14,3% de las cromóforos y el 25% de los túbulos colectores presentaban LOH en el *locus* 9p21 ($p=0,83$) (Figura 17).

Respecto al grado de diferenciación nuclear, el 27,3% de grado 1, el 26,9% de grado 2 y el 22,2% de grado 3 presentaban esta alteración ($p=0,93$) (Figura 18).

En cuanto al estadio tumoral, el 29,2% de los tumores de estadio I y el 25% de estadio III presentaban LOH y ninguno de los tumores de los estadios II y IV tenían dicha alteración ($p=0,75$) (Figura 19). El 29,2% y 25% de los tumores de tamaño tumoral T1 y T3 respectivamente, estaban alterados ($p=0,55$) y el 27,3% de los tumores que no tenían afectación ganglionar presentaban LOH ($p=0,56$).

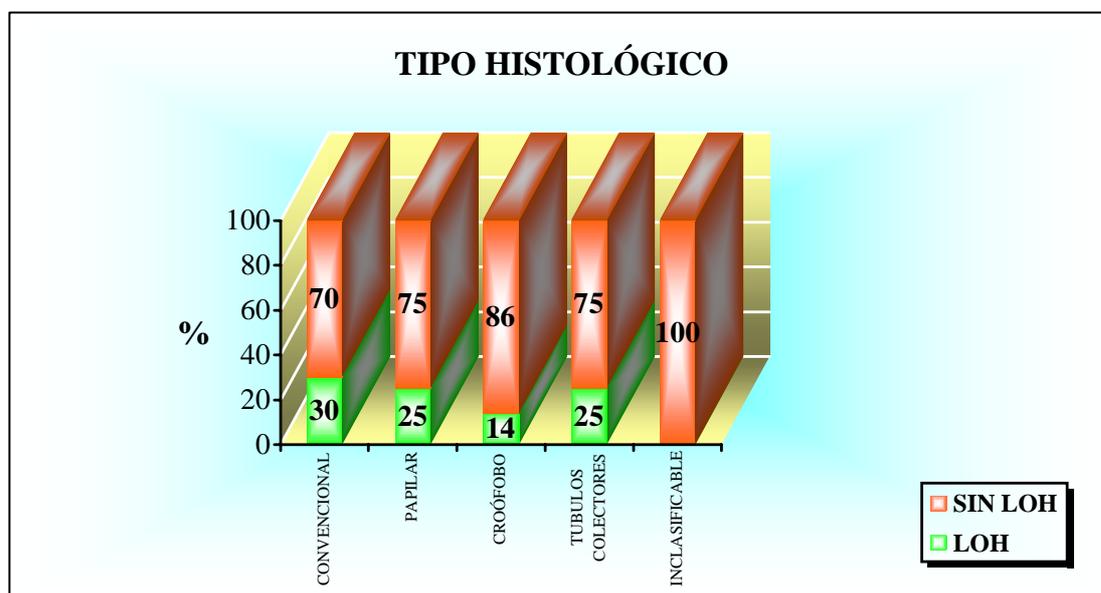


Figura 17. Distribución del porcentaje de LOH en el *locus* 9p21 según el tipo histológico. Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

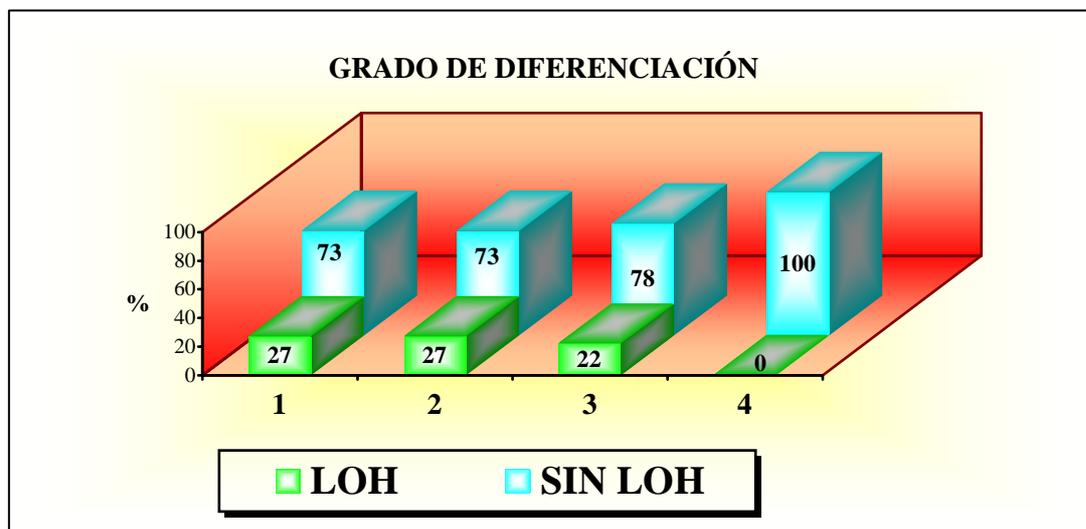


Figura 18. Distribución del porcentaje de LOH en el *locus* 9p21 según el grado de diferenciación. Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

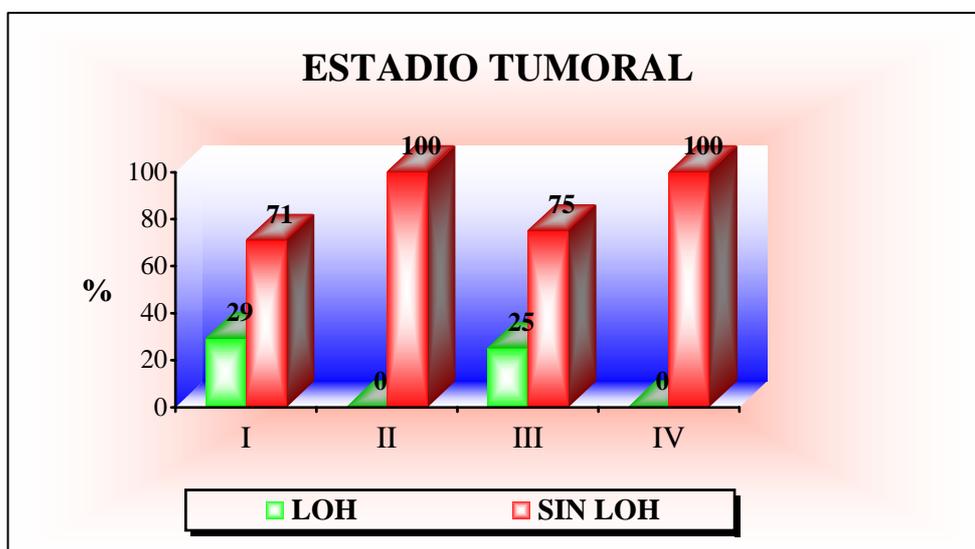


Figura 19. Distribución del porcentaje de la LOH en el *locus* 9p21 según el estadio tumoral. Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Tabla XII. Prevalencia de la LOH en el locus 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA LOH		P
	%	n	
TIPO HISTOLÓGICO			
Convencional (células claras)	30,0	9	0,83
Papilar	25,0	1	
Cromóforas	14,3	1	
Túbulos colectores	25,0	1	
Inclasificable	0,00	0	
GRADO DE DIFERENCIACIÓN			
1	27,3	3	0,93
2	26,9	7	
3	22,2	2	
4	0,00	0	
ESTADIO			
I	29,2	7	0,75
II	0,00	0	
III	25,0	5	
IV	0,00	0	
TAMAÑO TUMORAL (T)			
T1	29,2	7	0,55
T2	0,00	0	
T3	25,0	5	
GANGLIOS (N)			
N0	27,3	12	0,56
N1	0,00	0	
METÁSTASIS			
M0	26,1	12	1,00
M1	0,00	0	

Los factores pronóstico clásicos han sido agrupados para relacionarlos con la LOH en el *locus* en 9p21; a su vez, hemos creado una variable relacionada con el tamaño tumoral basándonos en la anterior clasificación de tumores de riñón de 1986 en la que consideraba el límite del tamaño del tumor limitado al riñón en 2,5 cm (Tabla XIII).

Ninguno de los tumores inferiores a 25 mm y el 27,9% de los mayores o igual a 25 mm presentaban LOH en el *locus* 9p21 ($p=0,56$).

Atendiendo a las clasificaciones históricas del carcinoma renal en carcinoma de células claras y células granulares, para realizar este estudio hemos agrupado nuestra serie en dos grupos, tumores de células convencionales y el resto de los tumores de la clasificación actual, y hemos obtenido que el 30% de los tumores convencionales y el 17,6% de los no convencionales presentaban esta alteración en 9p21 ($p=0,49$). Aunque no existen diferencias genéticas entre los tumores papilares y no papilares en *p16*, en la literatura se sigue haciendo referencia a este tipo de tumores atendiendo a las diferencias genéticas encontradas en el brazo corto del cromosoma 3. En nuestro trabajo, el 25% de los tumores papilares y el 25,6 de los no papilares presentan LOH en 9p21 ($p=1,00$).

En cuanto al grado, el 27% de los tumores diferenciados (grado 1 y 2) y el 20% de los tumores indiferenciados (grado 3 y 4) presentaban alteración del gen ($p=1,00$).

Agrupando los estadios en dos grupos, el 26,9% de los tumores en estadio precoz (estadio I y II) y el 23,8% de los tumores en estadio avanzado (III y IV) presentaban esta alteración genética ($p=1,00$).

Tabla XIII. Prevalencia de la LOH en el *locus* 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA LOH		O.R.	I.C. (95%)	p
	%	n			
TAMAÑO					
<25	0,00	0	1	Indefinido	0,56
≥25	27,9	12	1,39		
TIPO HISTOLÓGICO				0,46 – 8,71	0,49
Claras	30,0	9	2,00		
No claras	17,6	3	1		
TIPO HISTOLÓGICO				0,09 – 10,32	1,00
Papilares	25,0	1	1		
No papilares	25,6	11	2,00		
GRADO				0,12 – 3,70	1,00
1 y 2	27,0	10	1		
3 y 4	20,0	2	0,67		
ESTADIO				0,23 – 3,23	1,00
I y II	26,9	7	1		
III y II	23,8	5	0,85		

1.2 ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD CROMÓSÓMICA

El 4,2% (2 pacientes) de la serie de 48 pacientes diagnosticados de cáncer renal, presentaron inestabilidad cromosómica en el *locus* 9p21. Debido a que el tamaño muestral es pequeño, no hemos realizado un estudio estadístico de estos dos pacientes con las diferentes variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos. A continuación describiremos las características de estos pacientes.

Uno de ellos es varón, de 67 años de edad, sin antecedentes familiares de cáncer y su diagnóstico fue incidental. La masa del tumor es quística de 20 mm tamaño y presenta multifocalidad. El tumor es de células convencionales y el grado de diferenciación 1. Según el TNM, es T1, no tiene afectación ganglionar ni metástasis a distancia (estadio tumoral I). No presenta recidiva y permanece vivo hasta el final de este estudio.

El otro paciente es un varón de 62 años de edad, sin antecedentes familiares de cáncer, su diagnóstico fue incidental. La masa del tumor es sólida de 55 mm tamaño y no presenta multifocalidad. El tumor es de células convencionales y el grado de diferenciación 2. Según el TNM, es T1, no tiene afectación ganglionar ni metástasis a distancia (estadio tumoral I). No presenta recidiva y permanece vivo hasta el final de este estudio.

1.3 ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH) E INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

Estas dos alteraciones genéticas han sido agrupadas en una sola variable, LOH y/o inestabilidad en el *locus* 9p21 para relacionarlas con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos.

El 29% (14 pacientes) de la serie de 48 pacientes estudiados presenta LOH y/o inestabilidad cromosómica en el *locus* 9p21.

A. Relación con las variables clínico-patológicas

Respecto a la relación de la LOH y/o inestabilidad en 9p21 con las variables clínico-patológicas (Tabla XIV), encontramos que en cuanto al sexo, el 28,1% de los hombres y el 33,3% de las mujeres presentaban esta alteración ($p=0,74$). El 36% de los pacientes mayores de 60 años y el 22,7% de los menores o igual a 60 años tenían esta alteración ($p=0,36$). El 50% de los pacientes que presentaban antecedentes familiares de cáncer tenían alteraciones genéticas en el *locus* 9p21 ($p=0,67$).

Según la masa tumoral, el 33,3% de los tumores sólidos y el 25% de los tumores mixtos presentaban alteración en el *locus* ($p=0,73$). El 25% de los tumores multifocales y el 30,8% de los tumores sin multifocalidad tenían alteración ($p=1,00$).

Tabla XIV. Prevalencia de la LOH y/o inestabilidad en 9p21 en relación con las variables clínico-patológicas. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA LOH y/o INESTABILIDAD		O.R.	I.C.(95%)	P
	%	n			
SEXO					
Varón	28,1	9	0,78	0,21 – 2,93	0,74
Mujer	33,3	5	1		
EDAD					
> 60	36,0	9	1,91	0,53 – 6,94	0,36
≤ 60	22,7	5	1		
ANTECEDENTES FAMILIARES					
Si	50,0	4	1,67	0,30 – 9,27	0,67
No	37,5	6	1		
MASA DEL TUMOR					
Sólida	33,3	11	1,50	0,34 – 6,68	0,73
Mixta	25,0	3	1		
MULTIFOCALIDAD					
Si	25,0	2	0,75	0,13 – 4,27	1,00
No	30,8	12	1		

B. Relación con los factores pronóstico-clásicos

Respecto a la relación de la LOH y/o inestabilidad en 9p21 con los factores pronóstico clásicos (Tabla XV), hemos observado que en cuanto al tipo histológico, el 36,7% de los tumores convencionales o células claras, el 25% de los papilares, el 14,3% de los cromófobos y el 25% de los túbulos colectores presentaban alteraciones en el *locus* 9p21 ($p=0,66$) (Figura 20).

En cuanto al grado de diferenciación nuclear, el 36,4% de grado 1, el 30,8% de grado 2, el 22,2% de grado 3 y ningún tumor de grado 4 presentaban alteración genética ($p=0,82$) (Figura 21).

El 37,5% de los tumores de estadio I y el 25% de estadio III tenían alteraciones ($p=0,54$) (Figura 22). De acuerdo con el tamaño tumoral, el 37,5% de T1, ningún T2 y el 25% de T3 tenían alteraciones en este *locus* ($p=0,34$). El 31% de los que no tenían afectación tumoral de los ganglios presentaban alteraciones genéticas mientras que ninguno de los que presentaban afectación ganglionar tenían LOH y/o inestabilidad ($p=0,54$). El único paciente que tenía metástasis a distancia no presentaba estas alteraciones genéticas ($p=1,00$).

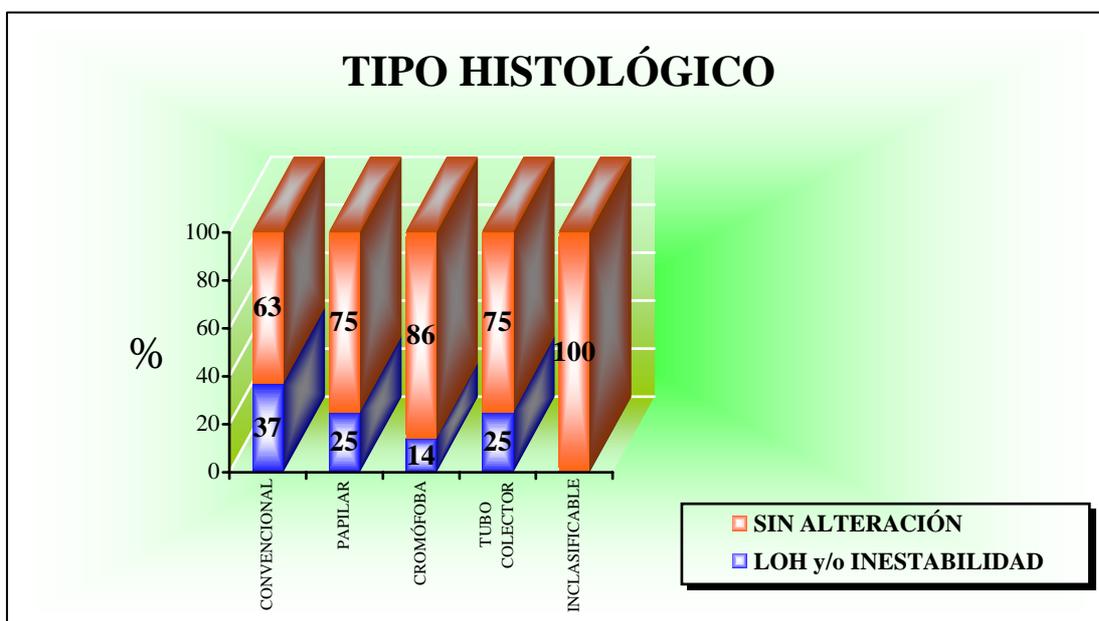


Figura 20. Distribución del porcentaje de la LOH y/o inestabilidad en el *locus* 9p21 según el tipo histológico. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

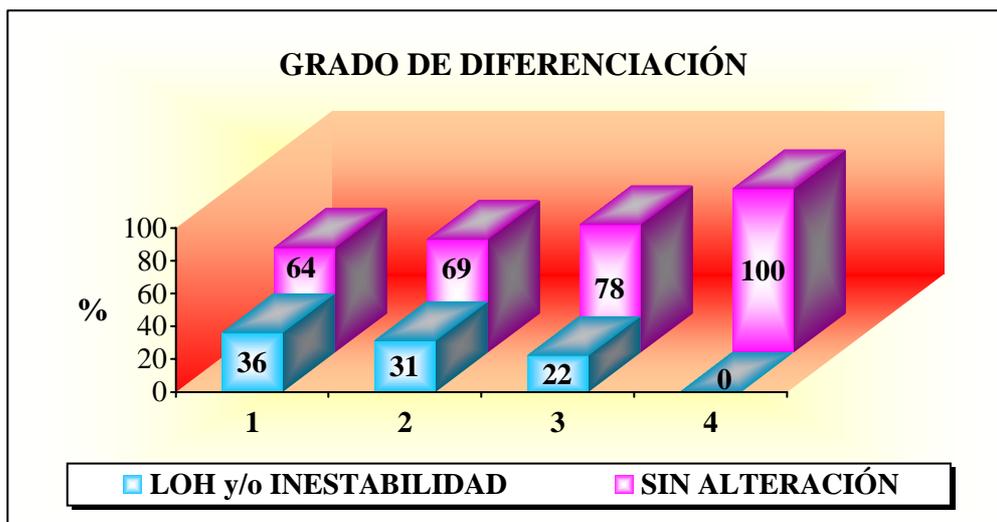


Figura 21. Distribución del porcentaje de la LOH y/o inestabilidad en el *locus* 9p21 según el grado de diferenciación. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

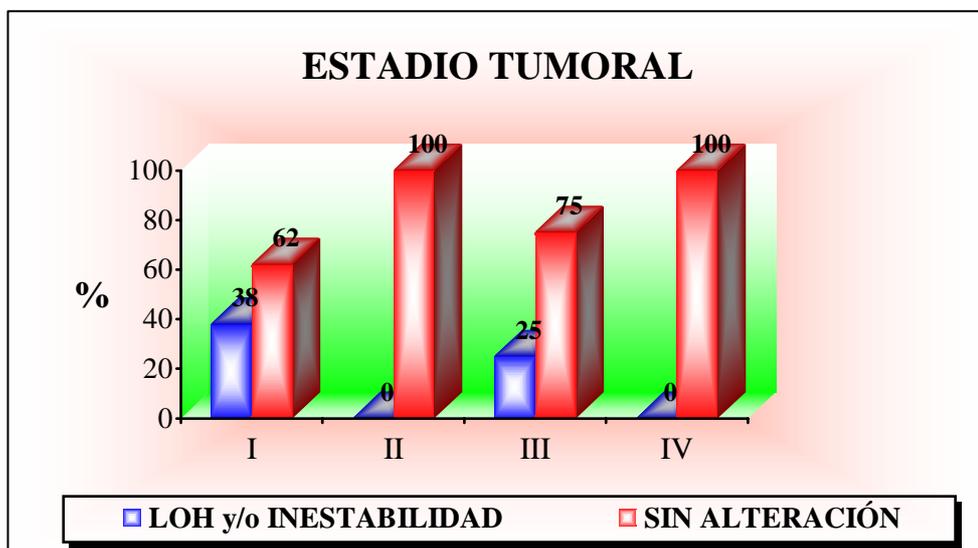


Figura 22. Distribución del porcentaje de la LOH y/o inestabilidad en el *locus* 9p21 según el estadio tumoral. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Tabla XV. Prevalencia de la LOH y/o inestabilidad en 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA LOH y/o INESTABILIDAD		P
	%	n	
TIPO HISTOLÓGICO			
Convencional (células claras)	36,7	11	0,66
Papilar	25,0	1	
Cromóforas	14,3	1	
Túbulos colectores	25,0	1	
Inclasificable	0,0	0	
GRADO DE DIFERENCIACIÓN			
1	36,4	4	0,82
2	30,8	8	
3	22,2	2	
4	0,0	0	
ESTADIO			
I	37,5	9	0,54
II	0,0	0	
III	25,0	5	
IV	0,0	0	
TAMAÑO TUMORAL (T)			
T1	37,5	9	0,34
T2	0,00	0	
T3	25,0	5	
GANGLIOS (N)			
N0	31,0	14	0,54
N1	0,0	0	
METÁSTASIS			
M0	30,4	14	1,00
M1	0,0	0	

La relación de la LOH y/o inestabilidad con los factores pronóstico clásicos agrupados está descrita en la Tabla XVI.

El 25% de los tumores inferiores a 25 mm y el 30,2% de los mayores presentaban LOH y/o inestabilidad en el *locus* 9p21 ($p=1,00$).

Respecto al tipo histológico agrupado en células claras y no claras, el 36,7% de los tumores convencionales presentaban alteración en 9p21 y también el 17,6% de los no convencionales ($p=0,20$).

En cuanto al grado, el 32,4% de los tumores diferenciados (grado 1 y 2) y el 20% de los tumores indiferenciados (grado 3 y 4) presentaban LOH y/o inestabilidad cromosómica ($p=0,70$).

El 34,6% de los tumores en estadio precoz (estadio I y II) y el 23,8% de los tumores en estadio avanzado (III y IV) presentaban alteraciones en este *locus* ($p=0,53$).

Tabla XVI. Prevalencia de la LOH y/o inestabilidad en el *locus* 9p21 en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA LOH y/o INESTABILIDAD		O.R.	I.C. (95%)	p
	%	n			
TAMAÑO					
<25	25,0	1	1	0,12 – 13,70	1,00
≥25	30,2	13	1,30		
TIPO HISTOLÓGICO					
Claros	36,7	11	2,70	0,63 – 11,53	0,20
No claros	17,6	3	1		
GRADO					
1 y 2	32,4	12	1	0,09 – 2,86	0,70
3 y 4	20,0	2	0,52		
ESTADIO					
I y II	34,6	9	1	0,16 – 2,13	0,53
III y II	23,8	5	0,59		

2. ESTUDIO DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *p16*

Se realizó el estudio de la metilación de la región promotora del gen *p16* en nuestra serie de 48 pacientes diagnosticados de carcinoma renal. El 22,9% de los pacientes (11 pacientes) presentaban metilación del gen *p16* (Figura 23).

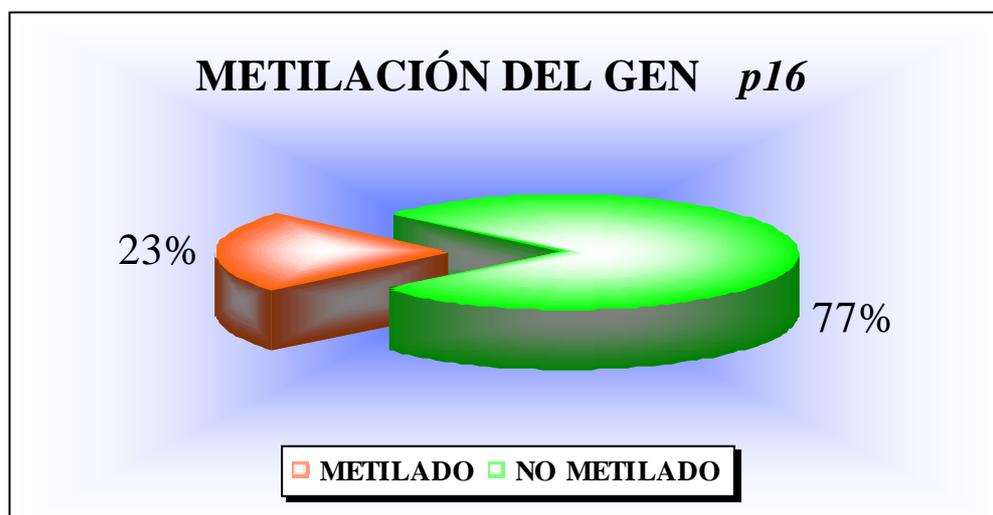


Figura 23. Porcentaje de metilación del promotor del gen *p16*. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Al igual que en el estudio anterior, la metilación del gen *p16* se relacionó con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos.

A. Relación con las variables clínico-patológicas

Respecto la relación de la metilación del gen *p16* con las variables clínico-patológicas (Tabla XVII), el 24,2% de los hombres y el 20,0% de las mujeres presentaban metilación del gen ($p=1,00$).

Existía una diferencia significativa en el porcentaje de metilación del gen en cuanto a la edad. El 39,1% de los tumores de los pacientes menores o igual a 60 años y el 8% de los pacientes mayores de 60 años presentaban alterado el gen *p16* ($p=0,01$).

El 25% de los pacientes que presentaban antecedentes familiares de cáncer y el 17,6% que no presentaban antecedentes tenía metilado el gen ($p=1,00$).

El 17,6% de los tumores sólidos y el 41,7% de los tumores mixtos presentaban alteración del gen ($p=0,12$). El 27,5% de los tumores solitarios y ninguno de los tumores multifocales tenían alteración ($p=0,17$).

Tabla XVII. Prevalencia de la metilación del promotor del gen *p16* en relación con las variables clínico-patológicas. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA METILACIÓN		O.R.	I.C. (95%)	p
	%	n			
SEXO					
Varón	24,2	8	1,28	0,29 – 5,71	1,00
Mujer	20,0	3	1		
EDAD					
> 60	8,0	2	0,14	0,03 – 0,72	0,01
≤ 60	39,1	9	1		
ANTECEDENTES FAMILIARES					
Si	25,0	2	1,56	0,21 – 11,83	1,00
No	17,6	3	1		
MASA DEL TUMOR					
Sólida	17,6	6	0,30	0,07 – 1,28	0,12
Mixta	41,7	5	1		
MULTIFOCALIDAD					
Si	0,0	0	0,72	0,59 – 0,87	0,17
No	27,5	11	1		

B. Relación con los factores pronóstico-clásicos

Respecto a la relación de la metilación del gen *p16* con los factores pronóstico clásicos (Tabla XVIII), hemos observado que en cuanto al tipo histológico, el 19,4% de los tumores convencionales, ningún tumor papilar, el 57,1% de los cromóforos y el 25% de los túbulos colectores presentaban metilación ($p=0,16$) (Figura 24).

El 36,4% de grado 1, el 18,5% de grado 2, el 22,2% de grado 3 y ninguno de grado 4 presentaban metilación del gen ($p=0,63$) (Figura 25).

En cuanto al estadio tumoral según la clasificación TNM, el 20% de los estadio I, el 100% del estadio II y el 20,0% del estadio III presentaban metilación (**$p=0,06$**) (Figura 26). El 20% de T1, el 66,7% de T2 y el 20% de T3 tenían metilado *p16* ($p=0,18$). Ningún tumor de los que presentaban afectación ganglionar y el 24,4% de los que no estaban afectados, presentaban esta alteración ($p=1,00$). El único paciente que tenía metástasis a distancia no presentaba alteración y el 23,4% de los que no tenían metástasis si presentaban esta alteración genética ($p=1,00$).

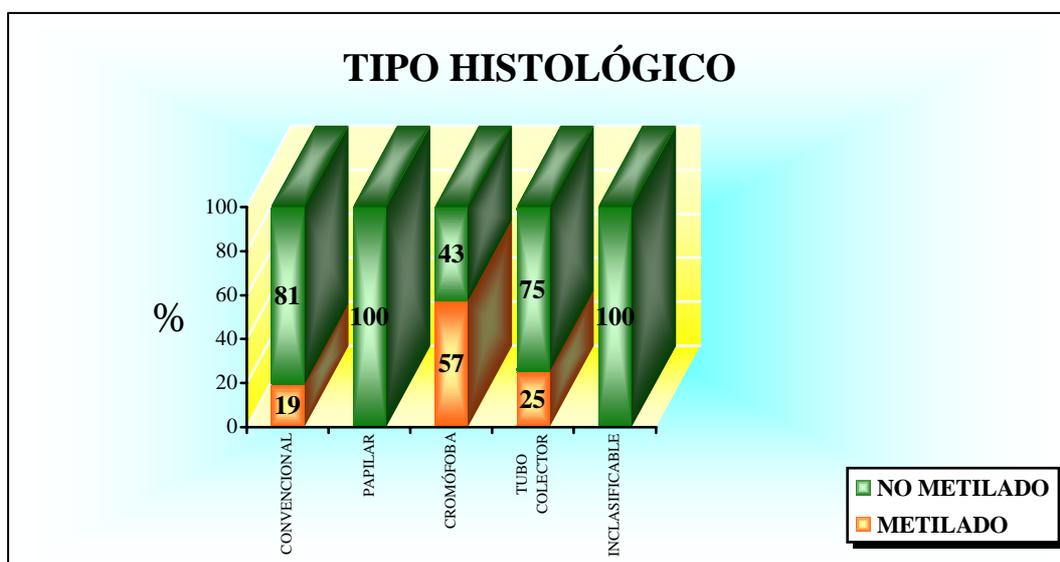


Figura 24. Distribución del porcentaje de metilación del promotor del gen *p16* según el tipo histológico. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

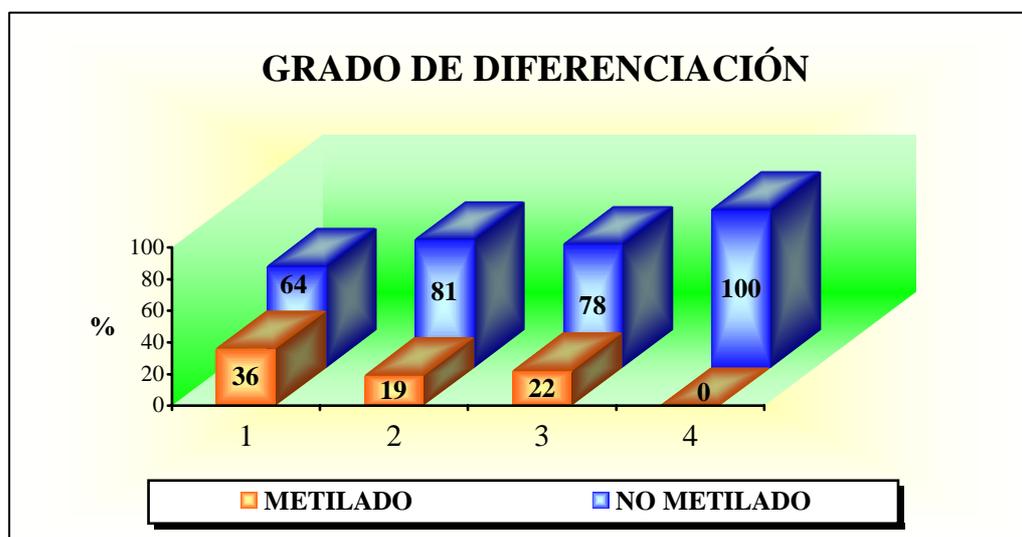


Figura 25. Distribución del porcentaje de metilación del promotor del gen *p16* según el grado de diferenciación. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

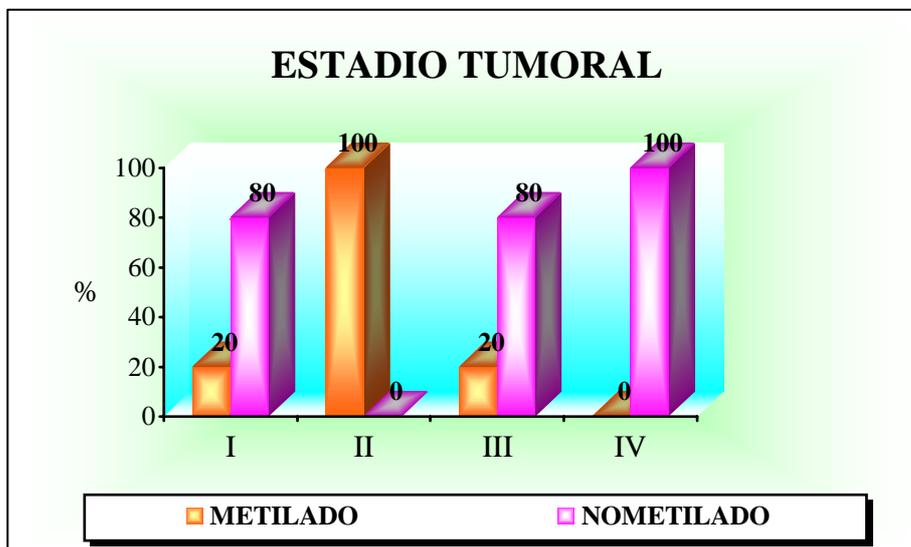


Figura 26. Distribución del porcentaje de metilación del promotor del gen *p16* según el estadio tumoral. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Tabla XVIII. Prevalencia de la metilación del promotor del gen *p16* en relación con los factores pronóstico clásicos. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA METILACIÓN		p
	%	n	
TIPO HISTOLÓGICO			
Convencional (células claras)	19,4	6	0,16
Papilar	0,0	0	
Cromófobos	57,1	4	
Túbulos colectores	25,0	1	
Inclasificable	0,0	0	
GRADO DE DIFERENCIACIÓN			
1	36,4	4	0,63
2	18,5	5	
3	22,2	2	
4	0,0	0	
ESTADIO			
I	20,0	5	0,06
II	100,0	2	
III	20,0	4	
IV	0,0	0	
TAMAÑO TUMORAL (T)			
T1	20,0	5	0,18
T2	66,7	2	
T3	20,0	4	
GANGLIOS (N)			
N0	24,4	11	1,00
N1	0,0	0	
METÁSTASIS			
M0	23,4	11	1,00
M1	0	0	

Los factores pronóstico clásicos agrupados se han relacionado con la metilación del promotor del gen *p16* (Tabla XIX).

El 25% de los tumores mayores o igual a 25 mm presentaban metilación del gen y ninguno de los tumores inferiores a 25 mm estaba alterado ($p=0,56$).

El 19,4% de los tumores convencionales presentaban alteración y el 29,4% de los no convencionales no ($p=0,49$). Ninguno de los tumores papilares presentaba metilación del gen *p16* y el 25% de los tumores no papilares estaban alterados ($p=0,56$).

Respecto al grado, el 23,7% de los tumores diferenciados (grado 1 y 2) y el 20% de los tumores indiferenciados (grado 3 y 4) presentaban alteración genética del gen ($p=1,00$).

El 25,9% de los tumores en estadio precoz (estadio I y II) y el 19% de los tumores en estadio avanzado (III y IV) presentaba alteración ($p=0,73$).

Tabla XIX. Prevalencia de la metilación del promotor del gen *p16* en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA METILACIÓN		O.R.	I.C. (95%)	p
	%	n			
TAMAÑO					
<25	0,0	0	1		0,56
≥25	25,0	11	1,33	Indefinido	
TIPO HISTOLÓGICO					
Claras	19,4	6	0,58	0,44 – 0,87	0,49
No claras	29,4	5	1		
TIPO HISTOLÓGICO					
Papilar	0,0	0	1	Indefinido	0,56
No papilar	25,0	11	1,33		
GRADO					
1 y 2	23,7	9	1	0,14 – 4,54	1,00
3 y 4	20,0	2	0,80		
ESTADIO					
I y II	25,9	7	1	0,16 – 2,70	0,73
III y IV	19,0	4	0,67		

3. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE AL MENOS UNA DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN *p16*

En este análisis hemos estudiado a todos los pacientes que presentan al menos una de las alteraciones genéticas: LOH en el *locus* 9p21 y/o inestabilidad cromosómica en dicho *locus* y/o metilación del promotor del gen *p16* frente a los pacientes que no presentan ninguna alteración.

El 51 % de nuestra serie de pacientes (24 pacientes) presentaban al menos una de las alteraciones genéticas en el gen *p16* (Figura 27).

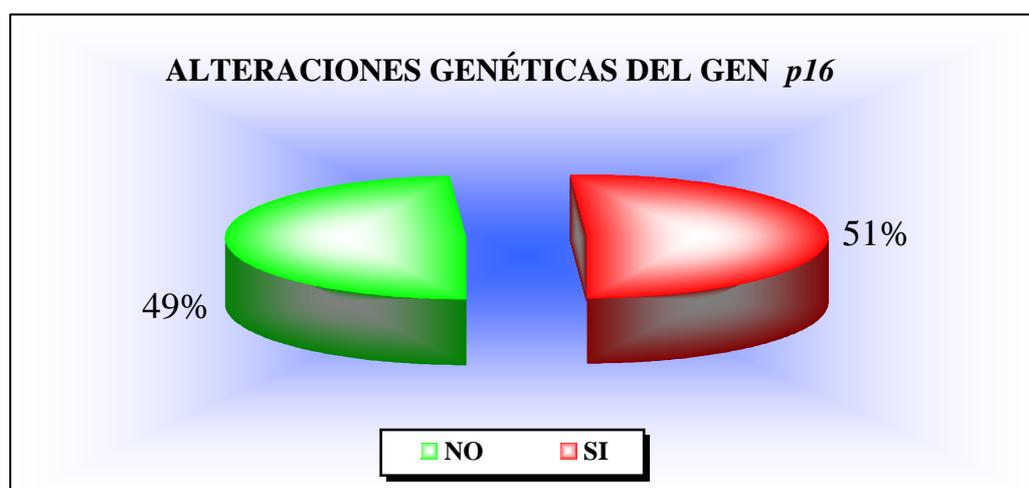


Figura 27. Porcentaje de la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16*. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Al igual que en las variables anteriores, la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* se ha relacionado con las variables clínico-patológicas (Tabla XX) y con los factores pronóstico clásicos (Tabla XXI).

A. Relación con las variables clínico-patológicas

Respecto al sexo, el 50% de los hombres y el 40% de las mujeres presentaban al menos una alteración del gen ($p=0,55$). El 40% de los pacientes mayores de 60 años y el 54,5% de los menores o igual a 60 años tenían alterado el gen ($p=0,39$).

El 75% de los pacientes que presentaban antecedentes familiares de cáncer y el 50% que no presentaban antecedentes tenían alteraciones genéticas ($p=0,39$).

El 45,5% de los tumores sólidos y el 58,3% de los tumores mixtos presentaban alteración ($p=0,51$). El 25% de los tumores multifocales y el 51,3% de los solitarios tenían al menos una alteración en el gen *p16* ($p=0,25$).

Tabla XX. Prevalencia de la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* en relación con las variables clínico-patológicas. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA		O.R.	I.C.(95%)	P
	%	n			
SEXO					
Varón	50,0	16	0,67	0,19 – 2,31	0,55
Mujer	40,0	6	1		
EDAD					
>60	40,0	10	0,55	0,17 – 1,75	0,39
≤ 60	54,5	12	1		
ANTECEDENTES FAMILIARES					
Si	75,0	6	0,33	0,05 – 2,18	0,39
No	50,0	8	1		
MASA DEL TUMOR					
Sólida	45,5	15	1,68	0,44 – 6,40	0,51
Mixta	58,3	7	1		
MULTIFOCALIDAD					
Si	25,0	2	3,16	0,57 – 17,62	0,25
No	51,3	20	1		

B. Relación con los factores pronóstico-clásicos

En cuanto al tipo histológico, el 50% de los tumores convencionales, el 25% de los papilares, el 57,1% de los cromófobos y el 50% de los túbulos colectores presentaban al menos una alteración genética de *p16* ($p=0,56$) (Figura 28).

Respecto al grado de diferenciación nuclear, el 63,6% de grado I, el 42,3% de grado II y el 44,4% de grado III presentaban alguna alteración ($p=0,50$) (Figura 29).

Según el estadio tumoral de acuerdo con la clasificación TNM, el 54,2% de los tumores de estadio I, el 100% de estadio II y el 35,0% de estadio III presentaban alteraciones genéticas ($p=0,19$) (Figura 30). El 54,2% de T1, el 66,7% de T2 y el 35% de T3 tienen alterado el gen ($p=0,35$). En cuanto a la afectación ganglionar, el 50% de los que no estaban afectados presentaban alguna alteración mientras que ninguno de los que presentaban afectación ganglionar tenía alterado el gen ($p=0,24$). El único paciente que tenía metástasis a distancia no presentaba alteración y el 47,8% de los que no tenían metástasis presentaba al menos una alteración genética del gen.

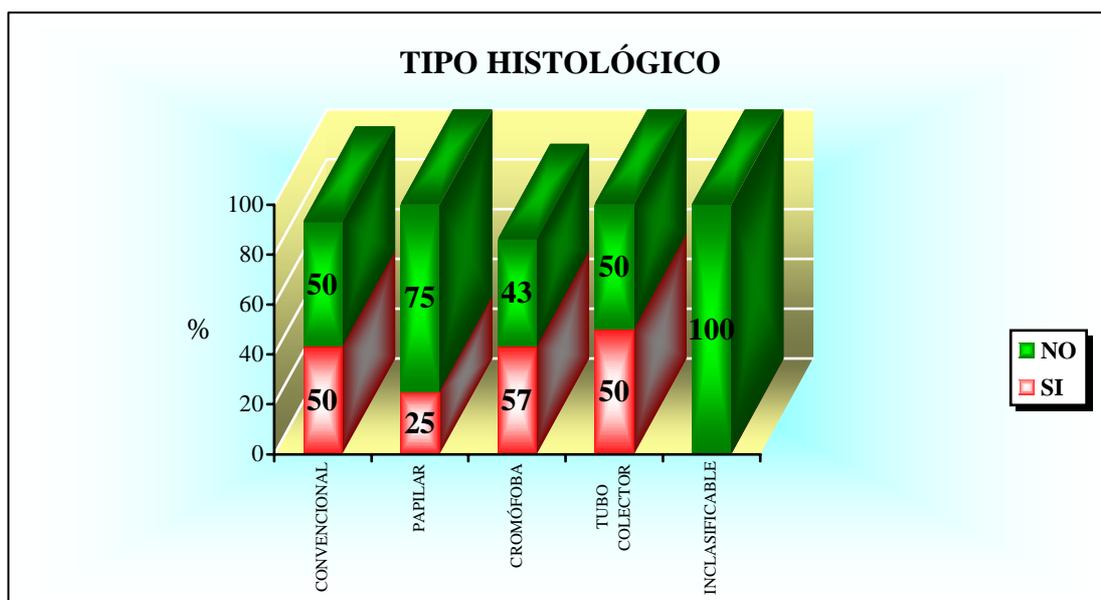


Figura 28. Distribución del porcentaje de presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* según el tipo histológico. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

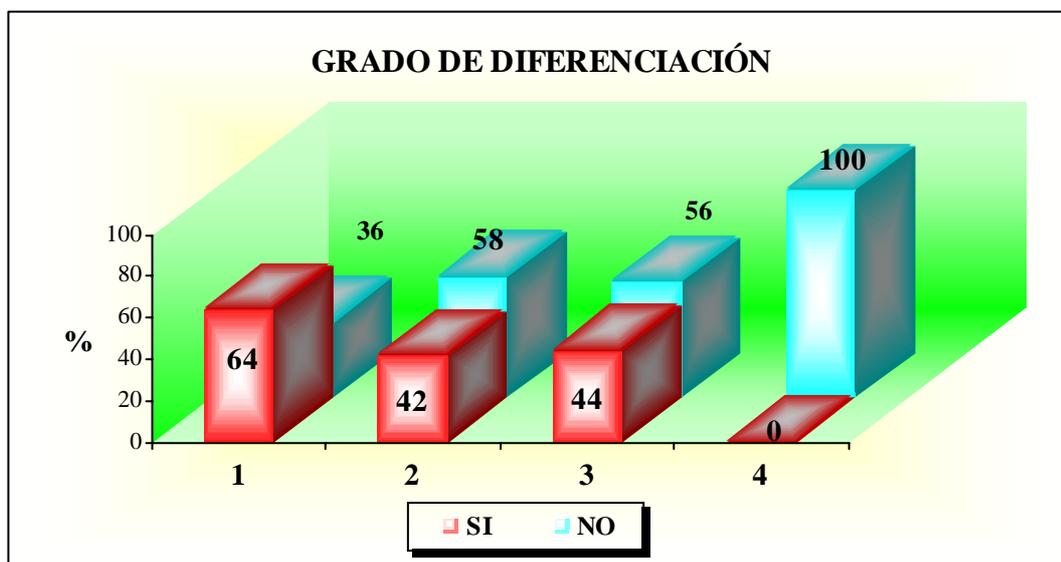


Figura 29. Distribución del porcentaje de la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* según el grado de diferenciación. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

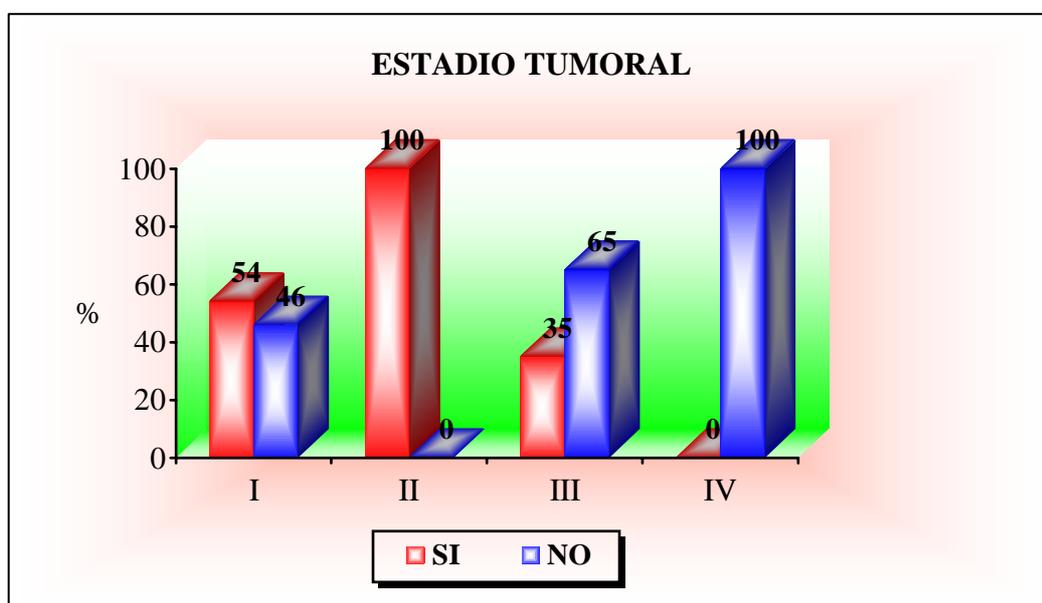


Figura 30. Distribución del porcentaje de la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* según el estadio tumoral. Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Tabla XXI. Prevalencia de la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* en relación con los factores pronóstico clásicos. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA		p
	%	n	
TIPO HISTOLÓGICO			
Convencional	50,0	15	0,56
Papilar	25,0	1	
Cromófobos	57,1	4	
Túbulos colectores	50,0	2	
Inclasificable	0,0	0	
GRADO DE DIFERENCIACIÓN			
1	63,6	7	0,50
2	42,3	11	
3	44,4	4	
4	0,0	0	
ESTADIO			
I	54,2	13	0,19
II	100,0	2	
III	35,0	7	
IV	0,0	0	
TAMAÑO TUMORAL (T)			
T1	54,2	13	0,35
T2	66,7	2	
T3	35,0	7	
GANGLIOS (N)			
N0	50,0	22	0,24
N1	0,0	0	
METÁSTASIS			
M0	47,8	22	1,00
M1	0,0	0	

Los factores pronóstico clásicos agrupados se han relacionado con la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* (Tabla XXII).

El 25% de los tumores inferiores a 25 mm y el 48,8% de los mayores presentaban al menos una alteración del gen ($p=0,61$).

Agrupando los tumores según el tipo histológico en dos grupos, el 50% de los tumores convencionales presentaban alguna alteración y el 41,2% de los no convencionales también ($p=0,76$).

Respecto al grado, el 48,6% de los tumores diferenciados (grado 1 y 2) y el 40% de los tumores indiferenciados (grado 3 y 4) presentaban alteración ($p=0,73$).

El 57,7% de los tumores en estadio precoz (estadio I y II) presentaba al menos una alteración y también el 33,3% de los tumores en estadio avanzado (III y IV) ($p=0,14$).

Tabla XXII. Prevalencia de la presencia de al menos una alteración genética en el gen *p16* en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. *Serie de 48 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	PREVALENCIA		O.R.	I.C. (95%)	p
	%	n			
TAMAÑO					
<25	25,0	1	1		0,61
≥25	48,8	21	2,85	0,28 – 33,33	
TIPO HISTOLÓGICO					
Claras	50,0	15	1,42	0,42 – 4,76	0,76
No claras	41,2	7	1		
TIPO HISTOLÓGICO					
Papilares	25,0	1	1		0,65
No papilares	30,2	13	1,31	0,12 – 14,28	
GRADO					
1 y 2	48,6	18	1		0,73
3 y 4	40,0	4	0,70	0,17 – 2,91	
ESTADIO					
I y II	57,7	15	1		0,14
III y IV	33,3	7	0,37	0,11 – 1,21	

4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p16

En este estudio hemos analizado la expresión de la proteína p16 en muestras de tejido tumoral y no tumoral mediante técnicas de inmunohistoquímica, en un subgrupo de 34 pacientes debido a la falta de muestra en los 14 pacientes restantes. Se analizó la relación entre la expresión de la proteína p16 con las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos. También se analizó la relación que existía entre la expresión de la proteína y los mecanismos de inactivación estudiados en el gen *p16*.

En nuestra serie de 34 pacientes, el 50% (17 pacientes) expresaron la proteína p16 (Figura 31).

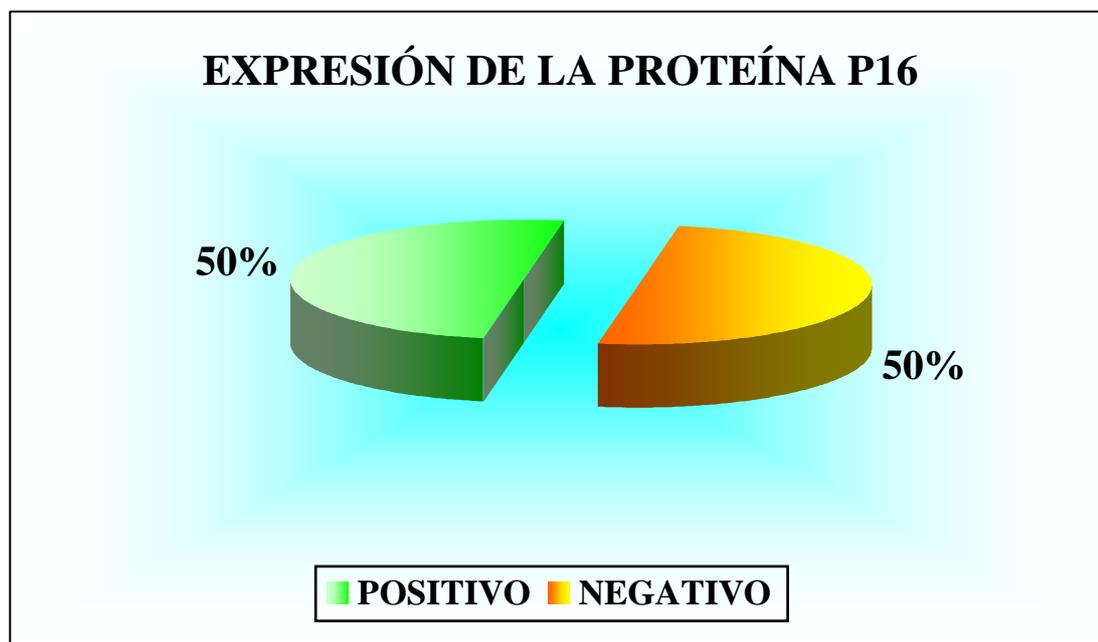


Figura 31. Porcentaje de expresión de la proteína p16. Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

A. Relación con las variables clínico-patológicas

Respecto al estudio de la expresión de la proteína p16 con las variables clínico-patológicas (Tabla XXIII), encontramos que en cuanto al sexo, el 52,2% de los hombres y el 45,5% de las mujeres no expresan la proteína ($p=1,00$). El 50% de los pacientes mayores de 61 años y el 50% de los pacientes de 60 años o menos, no expresan p16 ($p=1,00$). El 57,1% de los pacientes que presentaban antecedentes familiares de cáncer y el 45,5% que no presentaban antecedentes no expresaban la proteína p16 ($p=1,00$).

El 50% de los tumores sólidos y el 40% de los tumores mixtos no expresaban la proteína ($p=1,00$). El 25% de los tumores no multifocales y el 53,3% de los multifocales tenían esta alteración ($p=0,6$).

Tabla XXIII. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína p16 en relación con las variables clínico-patológicas. *Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	NO EXPRESAN PROTEÍNA p16		O.R.	I.C. (95%)	p
	%	n			
SEXO					
Varón	52,2	12	1,31	0,31 – 5,52	1,00
Mujer	45,5	5	1		
EDAD					
> 60	50,0	9	1,00	0,26-3,85	1,00
≤ 60	50,0	8	1		
ANTECEDENTES FAMILIARES					
Si	57,1	4	1,60	0,24 – 10,75	1,00
No	45,5	5	1		
MASA DEL TUMOR					
Sólida	50,0	14	1,50	0,22 – 10,42	1,00
Mixta	40,0	2	1		
MULTIFOCALIDAD					
Si	25,0	1	0,29	0,03 – 3,13	0,60
No	53,3	16	1		

B. Relación con los factores pronóstico-clásicos

Respecto a la relación de la expresión de la proteína p16 con los factores pronóstico clásicos (Tabla XXIV), hemos observado que, en cuanto al tipo histológico, el 50% de los tumores convencionales, ningún tumor papilar, el 60% de los cromóforos y el 66,7% de los túbulos colectores no expresan la proteína p16 ($p=0,46$) (Figura 32).

El 55,6% de grado 1, el 44,4% de grado 2, el 57,1% de grado 3 y ninguno de grado 4 no expresan la proteína ($p=0,78$) (Figura 33).

En cuanto al estadio tumoral según la clasificación TNM, el 33,3% del estadio I, el 100% del estadio II y el 64,3% del estadio III no expresan *p16* ($p=0,07$) (Figura 34). El 33,3% de T1, el 100% de T2 y el 64,3% de T3 no expresan la proteína ($p=0,07$). Ningún tumor de los que presentaban afectación ganglionar y el 51,5% de los que no estaban afectados presentaban esta alteración ($p=1,00$). En el único paciente que tenía metástasis a distancia no se pudo interpretar la expresión de la proteína y el 50% de los que no tenían metástasis si presentaban esta alteración genética.

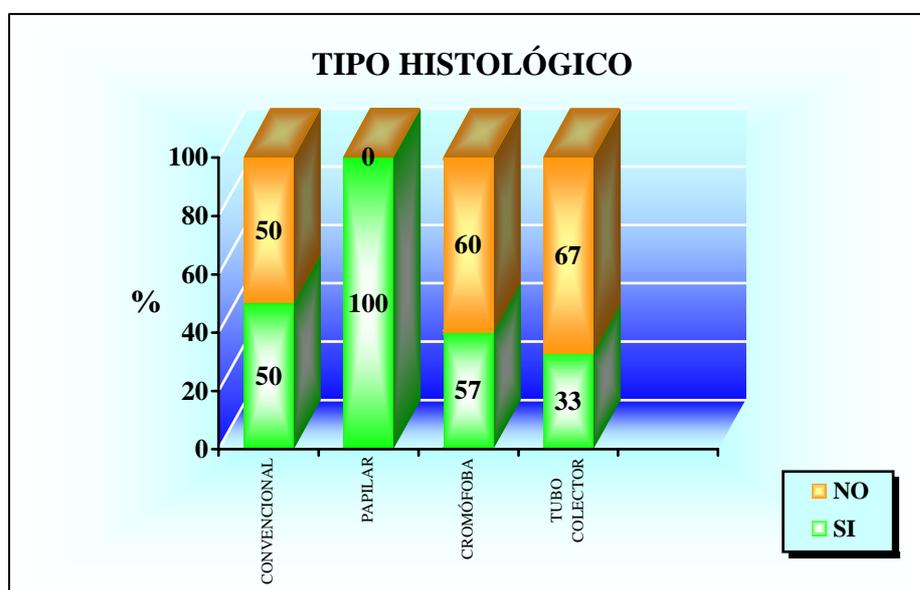


Figura 32. Distribución del porcentaje de expresión de la proteína *p16* según el tipo histológico. Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

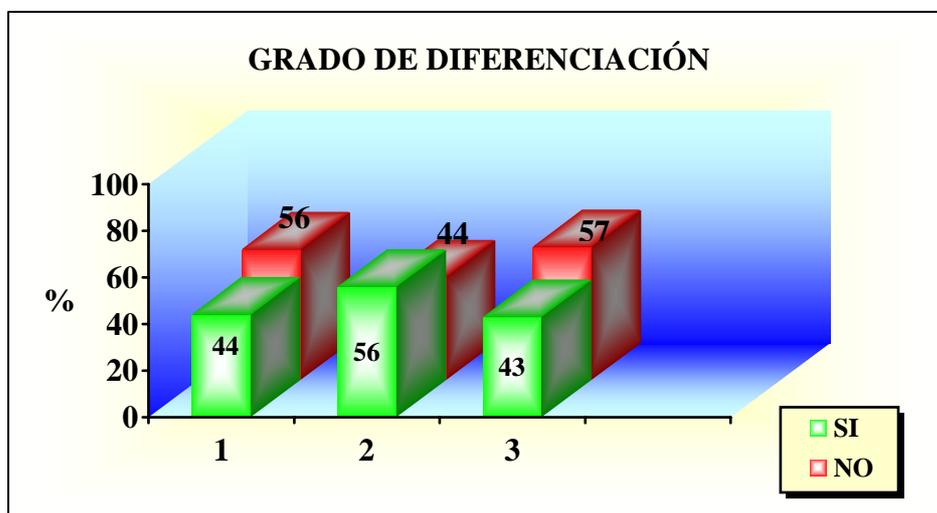


Figura 33. Distribución del porcentaje de la expresión de la proteína p16 según el grado de diferenciación. *Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

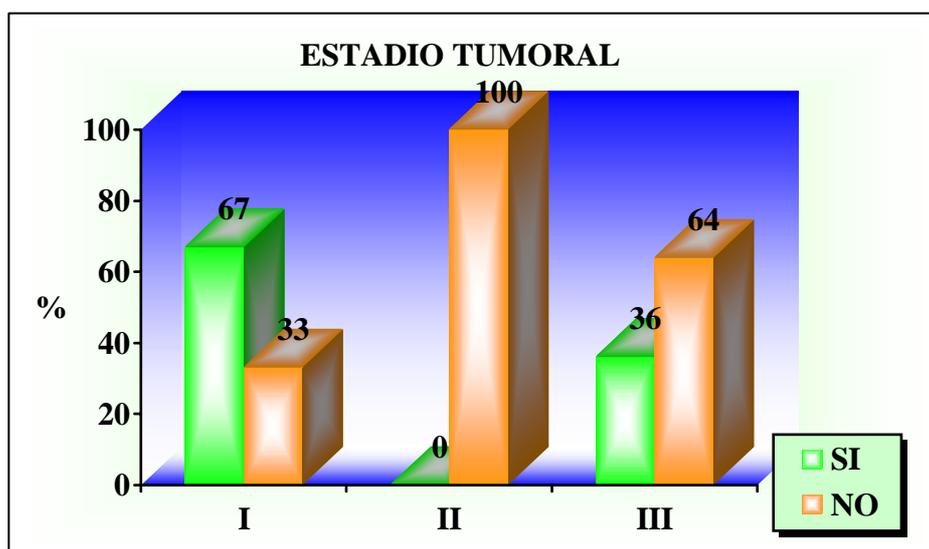


Figura 34. Distribución del porcentaje de la expresión de la proteína p16 según el estadio tumoral. *Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

Tabla XXIV. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína p16 en relación con los factores pronóstico clásicos. *Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	NO EXPRESAN PROTEÍNA p16		p
	%	n	
TIPO HISTOLÓGICO			
Convencional (células claras)	50,0	12	0,46
Papilar	0,0	0	
Cromófobos	60,0	3	
Túbulos colectores	66,7	2	
GRADO DE DIFERENCIACIÓN			
1	55,6	5	0,78
2	44,4	8	
3	57,1	4	
4	0,0	0	
ESTADIO			
I	33,3	6	0,07
II	100,0	2	
III	64,3	9	
IV	0,0	0	
TAMAÑO TUMORAL (T)			
T1	33,3	6	0,07
T2	100,0	2	
T3	64,3	9	
GANGLIOS (N)			
N0	51,5	17	1,00
N1	0,0	0	
METÁSTASIS			
M0	50,0	17	1,00
M1	0,0	0	

Los factores pronóstico clásicos agrupados se han relacionado con la expresión de la proteína p16 (Tabla XXV).

El 53,1% de los tumores mayores o igual a 25 mm no expresaba la proteína y todos los tumores inferiores a 25 mm la expresaban (p=0,48).

El 50% de los tumores convencionales presentaban alteración y el 50,0% de los no convencionales no ($p=1,00$). Todos los tumores papilares expresaban la proteína y el 53,1% del resto de las histologías no expresaban *p16* ($p=0,48$).

Respecto al grado, el 48,1% de los tumores diferenciados (grado 1 y 2) y el 57,1% de los tumores indiferenciados (grado 3 y 4) no expresaban *p16* gen ($p=1,00$).

El 40% de los tumores en estadio precoz (estadio I y II) y el 64,3% de los tumores en estadio avanzado (III y IV) no expresan la proteína ($p=0,29$).

Tabla XXV. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína *p16* en relación con los factores pronóstico clásicos agrupados. *Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	NO EXPRESAN PROTEÍNA <i>p16</i>		O.R.	I.C. (95%)	p
	%	n			
TAMAÑO					
<25	0,0	0	1		0,48
≥25	53,1	17	2,13	Indefinido	
TIPO HISTOLÓGICO					
Claras	50,0	12	1,00	0,23 – 4,37	1,00
No claras	50,0	5	1		
TIPO HISTOLÓGICO					
Papilar	0,0	0	1		0,48
No papilar	53,1	17	2,32	Indefinido	
GRADO					
1 y 2	48,1	13	1		1,00
3 y 4	57,1	4	1,44	0,27 – 7,68	
ESTADIO					
I y II	40,0	8	1		0,29
III y IV	64,3	9	2,70	0,65 – 11,09	

C. Relación de la expresión de la proteína con las alteraciones genéticas

Respecto a la relación entre la expresión de la proteína y el mecanismo de inactivación de la metilación, de los 17 pacientes que expresan la proteína *p16*, el 100% no tienen el gen *p16* metilado.

De los 17 pacientes que no expresan la proteína *p16*, el 47% (8 pacientes) presentan el gen *p16* inactivado mediante el mecanismo de metilación y el 53% (9 pacientes) no presentan metilación ($p= 0,01$) (Figura 35).

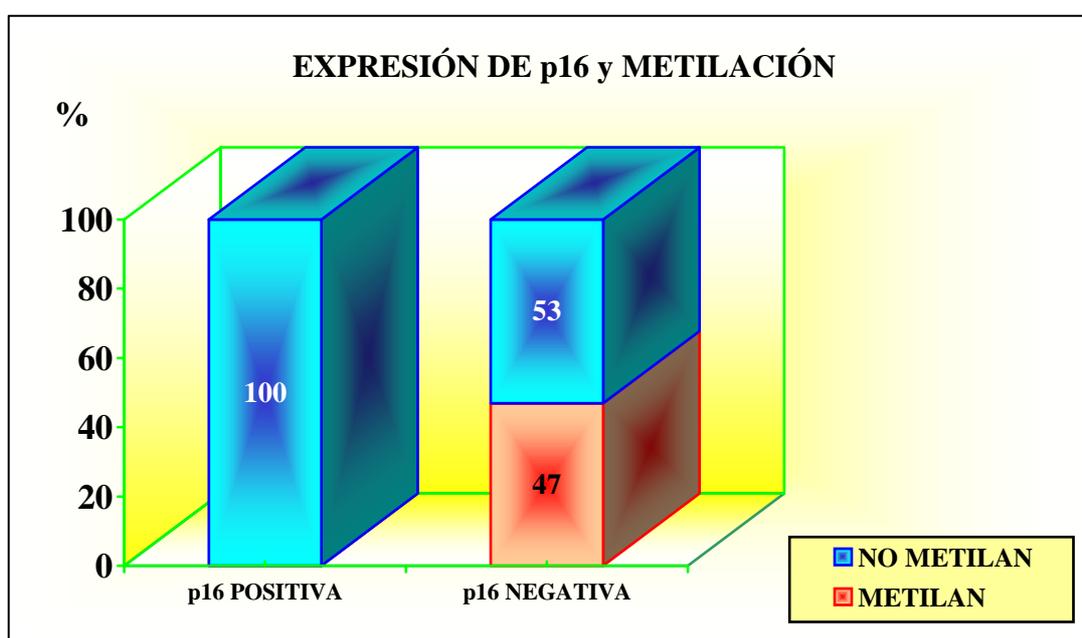


Figura 35. Relación de la expresión de la proteína *p16* y el mecanismo de la metilación. Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

Respecto a la relación de la expresión de la proteína p16 y la existencia de al menos una alteración genética en el gen *p16*, de los 17 pacientes que no expresan proteína, el 77% (13 tumores) tienen al menos una de las alteraciones genéticas estudiadas y el 23% restante (4 tumores) no presentan ninguna de estas alteraciones ($p=0,01$) (Figura 36).

De los 17 pacientes que expresan la proteína p16, el 69% (11 tumores) no presentan ninguna de las alteraciones estudiadas y el 31% (5 tumores) presenta al menos una alteración que corresponde con LOH en 9p21 ($p=0,01$) (Figura 36).

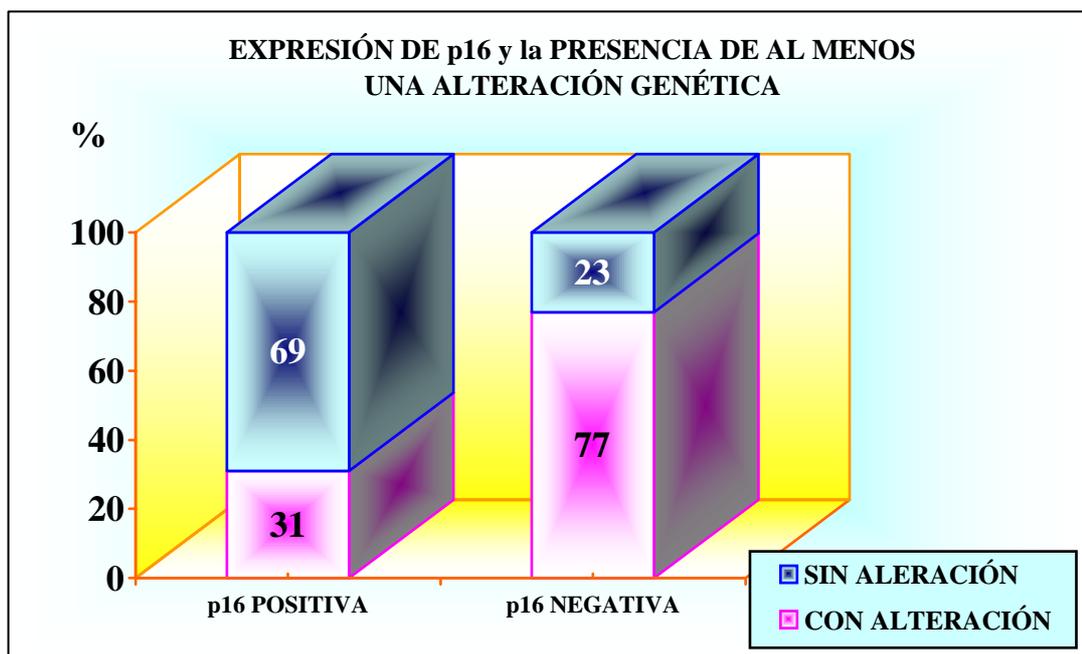


Figura 36. Relación de la expresión de la proteína p16 y la presencia de alguna alteración genética del gen *p16*. Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).

La relación entre la expresión de la proteína p16 y los mecanismos de inactivación del gen se presentan en las Tablas XXVI y XXVII.

Tabla XXVI. Prevalencia de la ausencia de expresión de la proteína p16 en relación con los mecanismos de inactivación del gen. *Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	NO EXPRESAN PROTEÍNA p16		O.R.	I.C.(95%)	p
	%	n			
LOH					
Si	41	7	0,47	0,11-2,11	0,46
No	59	10	1		
LOH y/o INESTABILIDAD					
Si	41	7	0,07	0,16-2,72	0,72
No	59	10	1		
METILACIÓN					
Si	47	8	0,07	0,01-0,66	0,01
No	53	9	1		
AL MENOS 1 ALTERACIÓN					
Si	77	13	7,15	1,53-33,37	0,01
No	23	4	1		

Tabla XXVII. Prevalencia de la presencia de expresión de la proteína p16 en relación con los mecanismos de inactivación del gen. *Serie de 34 pacientes con carcinoma renal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1993-2000).*

VARIABLE	EXPRESAN PROTEÍNA p16		O.R.	I.C.(95%)	p
	%	n			
LOH					
Si	25	4	0,47	0,11-2,11	0,46
No	75	12	1		
LOH y/o INESTABILIDAD					
Si	31	5	0,07	0,16-2,72	0,72
No	69	11	1		
METILACIÓN					
Si	0	0	0,07	0,01-0,66	0,01
No	100	17	1		
AL MENOS 1 ALTERACIÓN					
Si	31	4	1		0,01
No	69	13	7,15	1,53-33,37	

EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA RENAL. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA

1. SUPERVIVENCIA GLOBAL

La Supervivencia Global (SG) de los pacientes diagnosticados de carcinoma renal fue estudiada mediante el método de Kaplan Meyer, y la comparación entre curvas de probabilidad se realizó mediante el test de Breslow. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la del fallecimiento.

De los 48 pacientes, fallecieron 2 pacientes como consecuencia del carcinoma renal en el transcurso de su seguimiento. La mediana del tiempo de seguimiento fue de 42 meses. En nuestra población la S.G. al año fue del 97,9% y a los 3,5 años del 95,7% (Figura 37).

Uno de ellos es varón, de 52 años de edad, sin antecedentes familiares de cáncer. El diagnóstico del cáncer fue sintomático. La masa del tumor es sólida de 50 mm tamaño y no presenta multifocalidad. El tumor según el tipo histológico es inclasificable y el grado de diferenciación 4. Según el TNM, es T3c, tiene afectación ganglionar y metástasis a distancia (estadio tumoral IV). Presenta recidiva local y adenopatías

paraaórticas a los dos meses y fallece a los 4 meses de la cirugía. El tumor no presenta ninguna alteración genética.

El otro paciente es una mujer de 57 años de edad, sin antecedentes familiares de cáncer. El diagnóstico del cáncer fue sintomático. La masa del tumor es sólida de 95 mm tamaño y no presenta multifocalidad. El tumor es de túbulos colectores (túbulos de Bellini) y grado de diferenciación 3. Según el TNM, es T3b, no tiene afectación ganglionar ni metástasis a distancia (estadio tumoral III). Presenta recidiva a los 5 meses de la cirugía y 4 meses más tarde metástasis óseas y cerebrales falleciendo 1 año después de la cirugía. El tumor no presenta ninguna alteración genética.

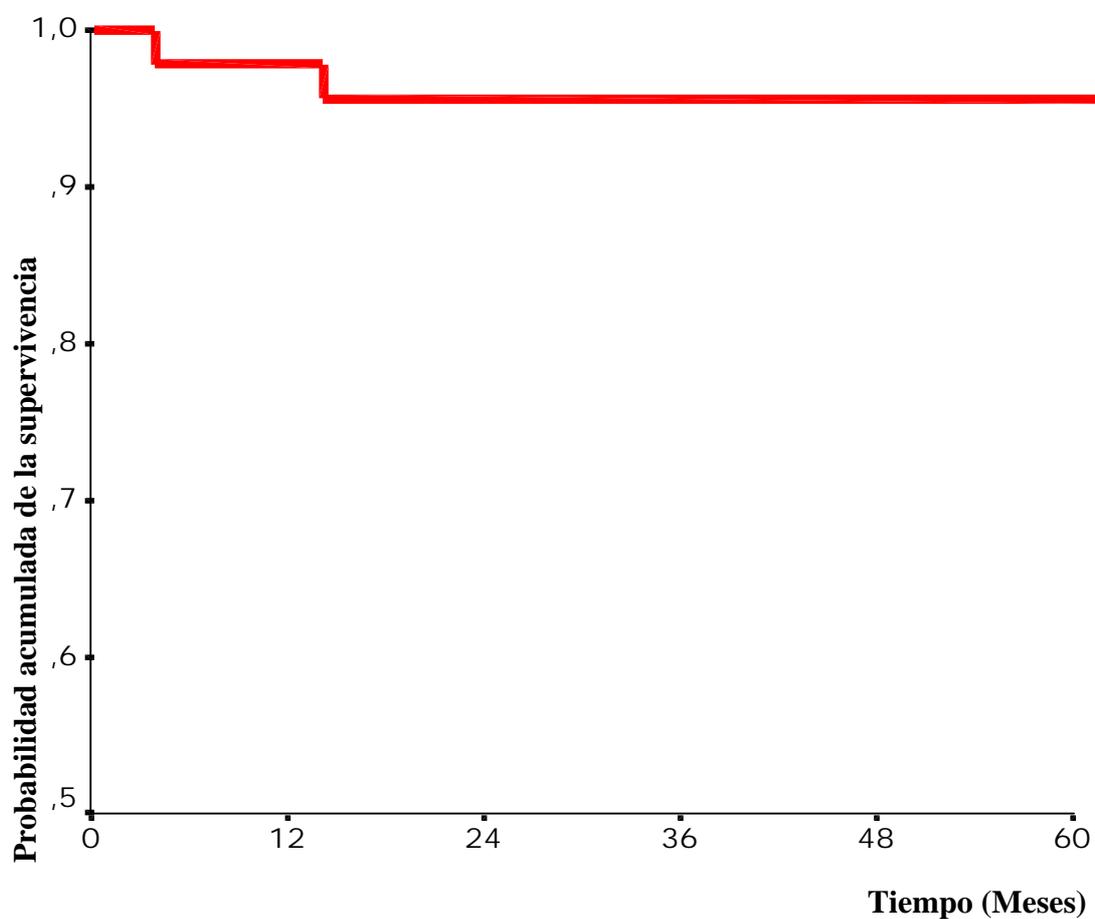


Figura 37. Curva de SG acumulada de los pacientes con carcinoma renal. *Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA RENAL. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

La Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) de los pacientes diagnosticados de carcinoma renal fue estudiada mediante el método de Kaplan Meyer, y la comparación entre curvas de probabilidad se realizó mediante el test de Breslow.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 42 meses (3,5 años). En nuestra población el porcentaje acumulado de pacientes libre de enfermedad al año fue del 93,4% y a los 3,5 años del 89,5%. De los 47 pacientes con cáncer renal, el 16,2% (4 pacientes) presentaron recidiva (Figura 38).

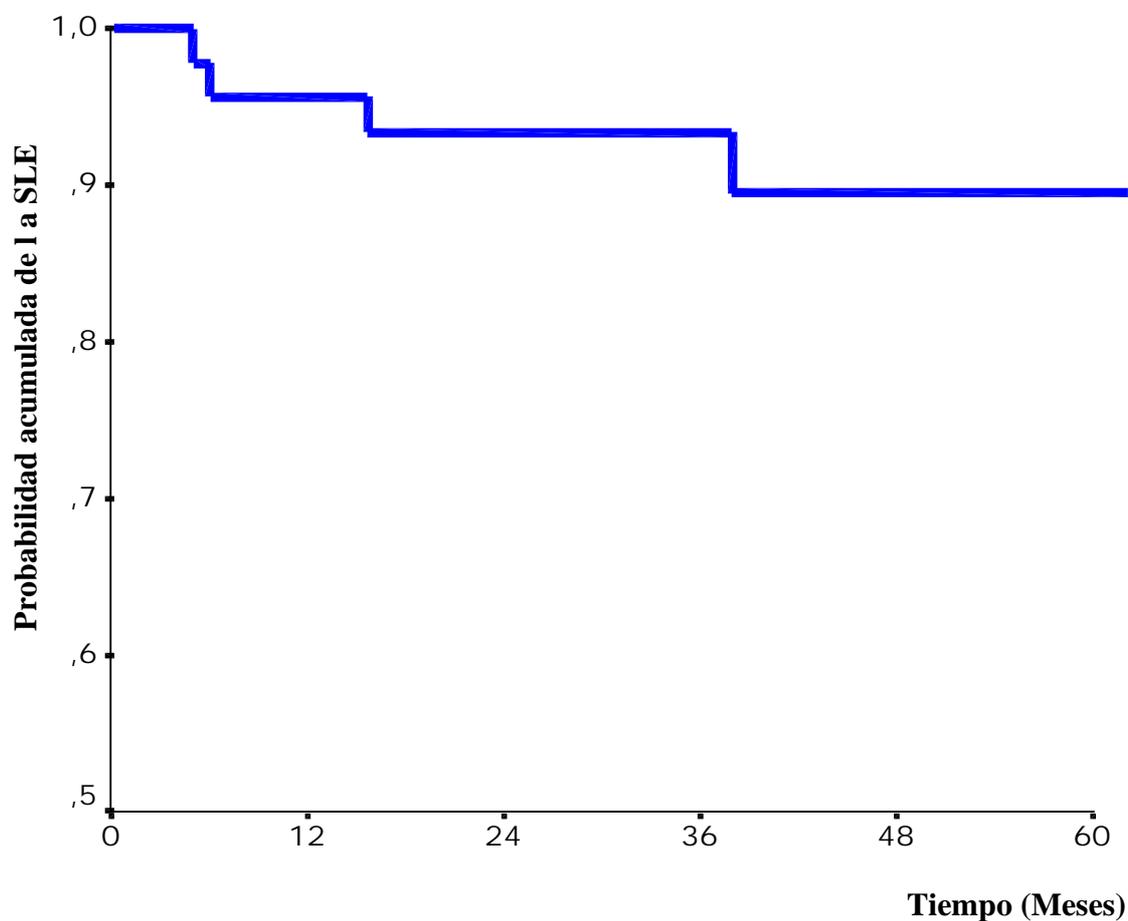


Figura 38. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad. *Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA PROBABILIDAD ACUMULADA DE RECIDIVA DE LOS PACIENTES CON CÁNCER RENAL EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

Para el análisis de la SLE se estudió la relación de las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos con la SLE de los pacientes.

En la Tabla XXVIII se muestra el número de pacientes con cáncer renal para cada una de las variables clínico-patológicas estudiadas (sexo, edad, antecedentes familiares de cáncer).

La Tabla XXIX presenta el mismo análisis realizado con los factores pronóstico clásicos (tipo histológico, grado de diferenciación, estadio, tamaño tumoral, afectación ganglionar...).

Tabla XXVIII. Análisis univariante de la SLE en relación con las variables clínico-patológicas. *Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

Variable	Nº	Recidivas	Probabilidad acumulada (%)				R.R.	IC (95%)	p
			12	24	36	42			
SEXO									
Varón	32	2	100	96,67	96,67	91,30	0,42		0,39
Mujer	15	2	86,67	86,67	86,67	86,67	1	(0,06 – 3,01)	
EDAD									
> 60	25	3	95,83	91,48	91,48	84,44	1		0,36
≤ 60	22	1	95,45	95,45	95,45	95,45	0,37	(0,04 – 3,57)	
A. FAMILIARES									
Si	8	1	87,50	87,50	87,50	87,50	2,91	(0,17 – 48,26)	0,46
No	17	1	100	100	100	91,67	1		
MASA DEL TUMOR									
Sólida	33	3	93,75	93,75	93,75	87,05	1,35	(0,14 – 13,08)	0,79
Mixta	12	1	100	100	91,67	91,67	1		
MULTIFOCALIDAD									
Si	8	0	100	100	100	100	0,03	(0 – 1139)	0,18
No	39	4	94,74	92,03	92,03	86,62	1		

R.R.: Razón de tasas de recidivar

I.C. (95%): Intervalo de Confianza del 95%

p: significación estadística

Ninguna de las variables clínico-patológicas presentó significado pronóstico en la SLE.

Tabla XXIX. Análisis univariante de la SLE en relación con los factores pronóstico clásicos. *Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

Variables	Casos	Recidivas	Probabilidad acumulada (%)				p
			12	24	36	42	
TIPO HISTOLÓGICO							
Convencional	31	3	96,67	93,21	93,21	86,04	0,44
Cromóforas	7	0	100	100	100	100	
Papilar	4	0	100	100	100	100	
Túbulos colectores	4	1	75,00	75,00	75,00	75,00	
Inclasificable	1	0	100	100	100	100	
TIPO HISTOLÓGICO							
Claras	31	3	96,67	93,21	93,21	86,04	0,89
No Claras	16	1	93,75	93,75	93,75	93,75	
GRADO DE DIFEREN.							
I	11	0	100	100	100	100	0,02
2	27	1	100	100	100	94,44	
3	9	3	77,78	64,81	64,81	64,81	
4	0						
GRADO DE DIFEREN.							
1 y 2	38	1	100	100	100	95,24	0,008
3	9	3	77,78	64,81	64,81	64,81	
ESTADIO							
I	25	0	100	100	100	100	0,03
II	2	0	100	100	100	100	
III	20	4	89,47	83,88	83,88	76,25	
IV	0						
ESTADIO							
I y II	27	0	100	100	100	100	0,008
III	20	4	89,47	83,88	83,88	76,26	
TAMAÑO TUMORAL (T)							
T1	25	0	100	100	100	100	0,02
T2	3	0	100	100	100	100	
T3	19	4	88,89	82,96	82,96	74,67	
TAMAÑO							
<25 mm	4	0	100	100	100	100	0,40
≥ 25 mm	43	4	95,24	92,80	92,80	88,58	
GANGLIOS (N)							
N0	45	4	95,45	93,13	93,13	89,08	0,56
N1	2	0	100	100	100	100	

Los factores pronóstico clásicos que presentaron significado pronóstico fueron el grado de diferenciación nuclear ($p=0,008$), el estadio tumoral ($p=0,008$) y el tamaño tumoral (T) ($p=0,02$).

Los pacientes con tumores indiferenciados (grados 3) presentan un riesgo 16 veces mayor de recidivar que los pacientes que tienen tumores bien diferenciados (grados 1 y 2) ($p=0,008$) (Figura 39).

Al agrupar los pacientes según el estadio tumoral en dos grupos, los pacientes de estadios avanzados tienen un riesgo de recidivar 100 veces superior a los pacientes de estadios precoces ($p=0,008$) (Figura 40).

Con respecto al tamaño tumoral según la clasificación TNM, los pacientes con tumores T3 tiene un riesgo 118 veces superior de recidivar que aquellos con tumores T1 y T2 ($p=0,02$) (Figura 41).

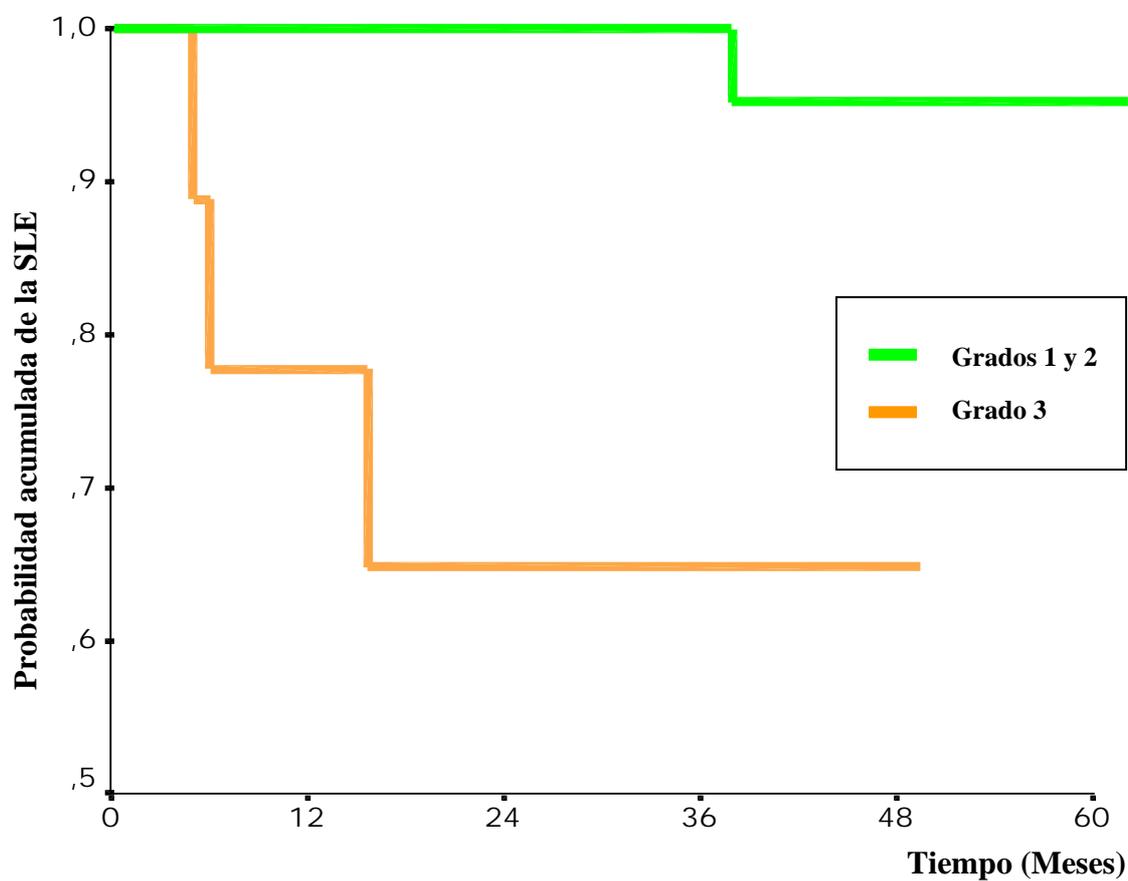


Figura 39. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según el grado de diferenciación nuclear. *Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

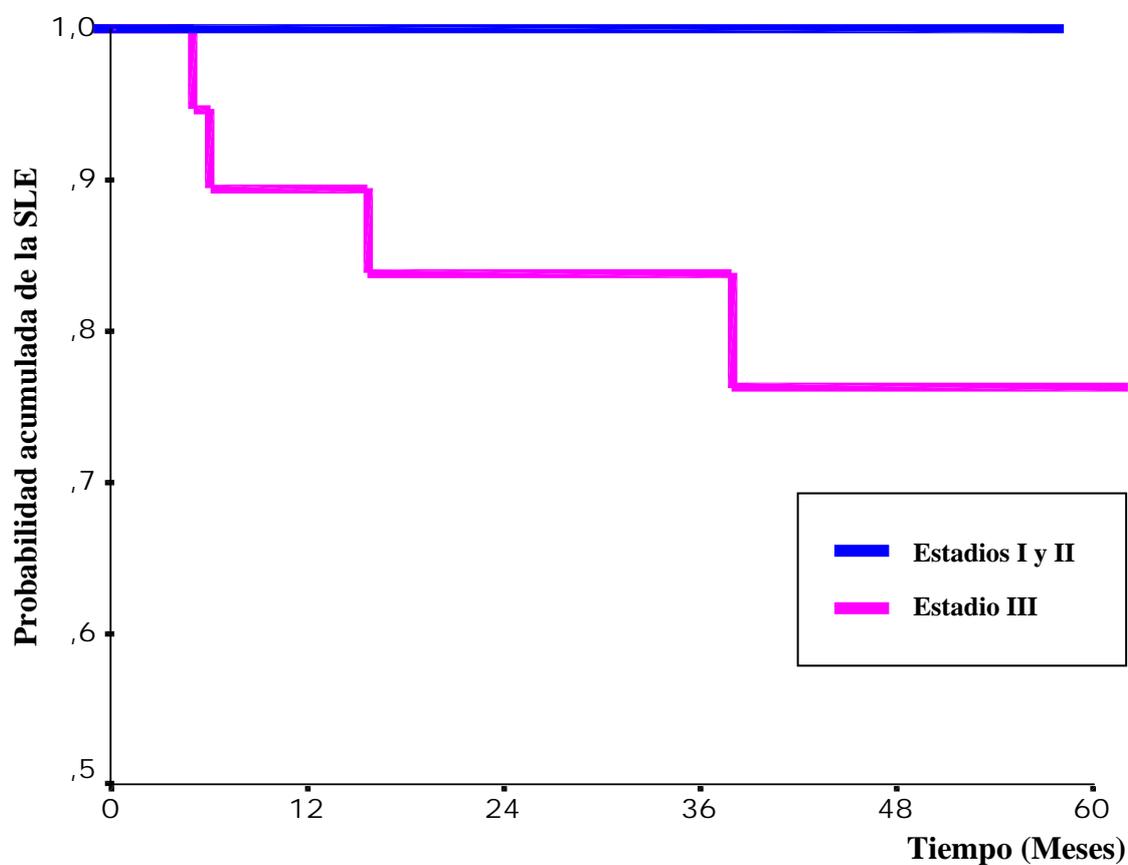


Figura 40. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según el estadio tumoral. Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).

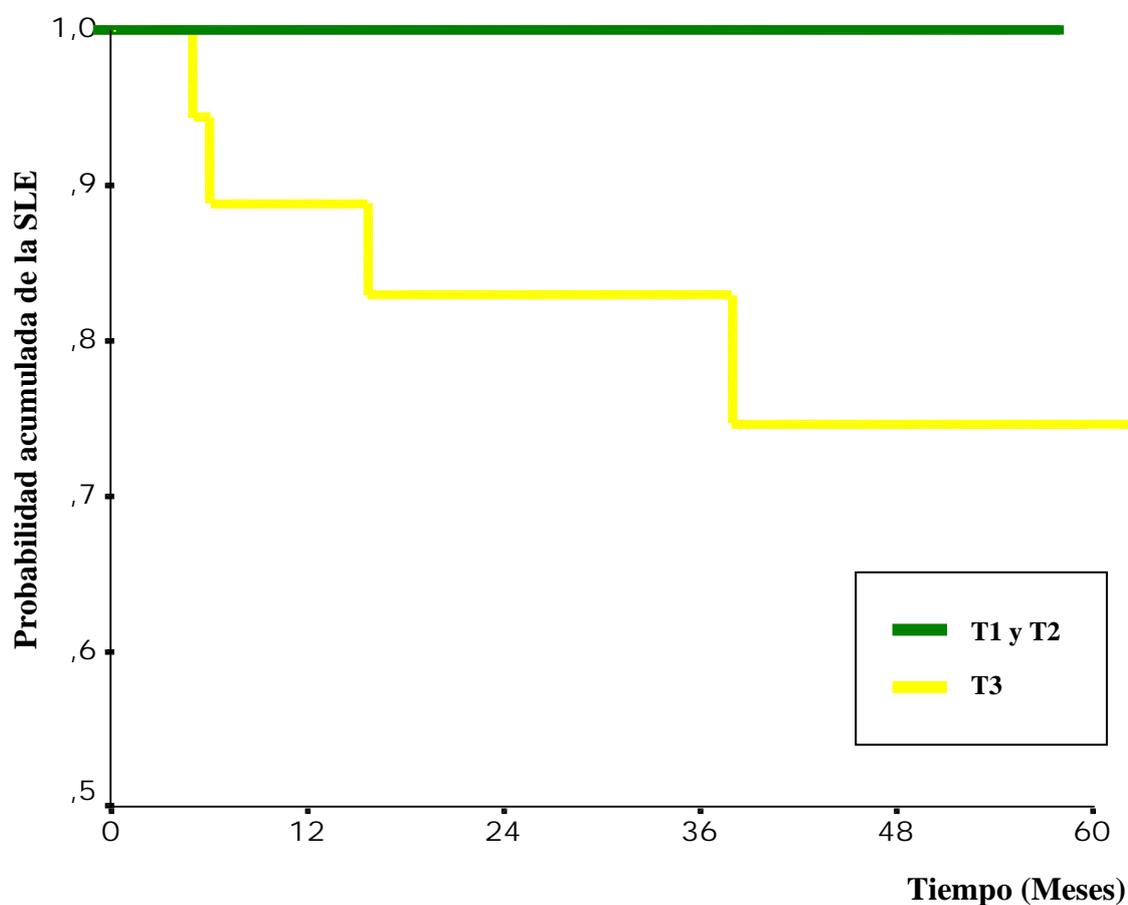


Figura 41. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según el tamaño tumoral (T). Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).

3. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA PROBABILIDAD ACUMULADA DE RECIDIVA DE LOS PACIENTES CON CÁNCER RENAL EN RELACIÓN CON LOS NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO

Hemos estudiado sí cada una de las variables LOH, LOH y/o inestabilidad en 9p21, metilación del gen *p16*, la presencia de al menos una alteración genética y la expresión de la proteína p16 tienen relación con la SLE de los pacientes.

En la Tabla XXX queda reflejado el número de los pacientes con cáncer renal para cada una de las variables considerada como nuevo factor pronóstico.

La SLE de los pacientes que presentaban LOH en el *locus* 9p21 fue del 90,9% a los 3,5 años. En los pacientes que no presentaban LOH fue del 88,8% a los 3,5 años.

Los pacientes que presentaban LOH y/o inestabilidad cromosómica en el *locus* 9p21 tenían una SLE del 92,3% a los 3,5 años. Los pacientes que no tenían esta alteración presentaban una S.L.E. del 88,1% a los 3,5 años.

Los pacientes que presentaban metilación del promotor del gen *p16* tenían una SLE del 90,9% a los 3,5 años. Aquellos pacientes que no presentaban esta alteración tenían una SLE del 89,3% a los 3,5 años.

La SLE a los 3,5 años de los pacientes que presentaban al menos una alteración genética fue del 89,5%, y del 89,9% en los pacientes que no presentaban ninguna alteración genética.

Los pacientes que no expresaban la proteína p16 tenían una SLE del 78,1% a los 3,5 años. Aquellos pacientes que no presentaban esta alteración tenían una S.L.E. del 94,1% a los 3,5 años.

Como se puede observar en la tabla XXX, ninguna de las variables considerada como nuevo factor pronóstico presentaba significado pronóstico. Sin embargo, mostraron una ligera tendencia a recaer aquellos pacientes que presentaban una alteración del gen o no expresaban la proteína p16. Los pacientes que presentaban LOH o metilación tenían un RR de recaer de 1,02 y 1,07 veces más ($p=0,98$ $p=0,95$), respectivamente. La tendencia es más acusada en los pacientes que presentan al menos una de las alteraciones genéticas; estos pacientes tienen un RR de presentar una recidiva de 1,45 veces más que los que no tienen ninguna alteración ($p=0,87$). Sólo en el caso de presentar LOH y/o inestabilidad, los pacientes que presentan esta alteración tienen un RR de presentar recidiva del 0,81 frente a los que no presentan alguna de estas alteraciones ($p=0,85$) (Figuras 42, 43, 44 y 45).

En el caso de la expresión de la proteína, los pacientes que no expresan p16 tienen un riesgo de recidivar de 2,04 veces más que los que expresan proteína ($p=0,55$) (Figura 46).

Tabla XXX. Análisis univariante de la SLE en relación con los nuevos factores pronóstico. *Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

Variable	Casos	Recidivas	Probabilidad acumulada (%)				R.R.	IC (95%)	p
			12	24	36	42			
LOH									
Si	12	1	90,91	90,91	90,91	90,91	1,02	(0,11 – 9,84)	0,98
No	34	3	97,06	94,03	94,03	88,80	1		
LOH y/o INESTABILIDAD									
Si	14	1	92,31	92,31	92,31	92,31	0,81	(0,08 – 7,83)	0,85
No	32	3	96,88	93,65	93,65	88,14	1		
METILACIÓN									
Si	11	1	100	90,91	90,91	90,91	1,07	(0,11 – 10,34)	0,95
No	36	3	94,29	94,29	94,29	89,32	1		
AL MENOS UNA ALTERACIÓN									
Si	20	2	94,74	89,47	89,47	89,47	1,45	(0,20 – 11,11)	0,70
No	27	2	96,30	96,30	96,30	89,88	1		
EXPRESIÓN DE p16									
Si	17	1	94,12	94,12	94,12	94,12	1	(0,04-5,40)	0,55
No	17	2	93,75	93,75	93,75	78,13	2,04		

R.R.: Riesgo Relativo de recidivar

I.C. (95%): Intervalo de Confianza del 95%

p: significación estadística

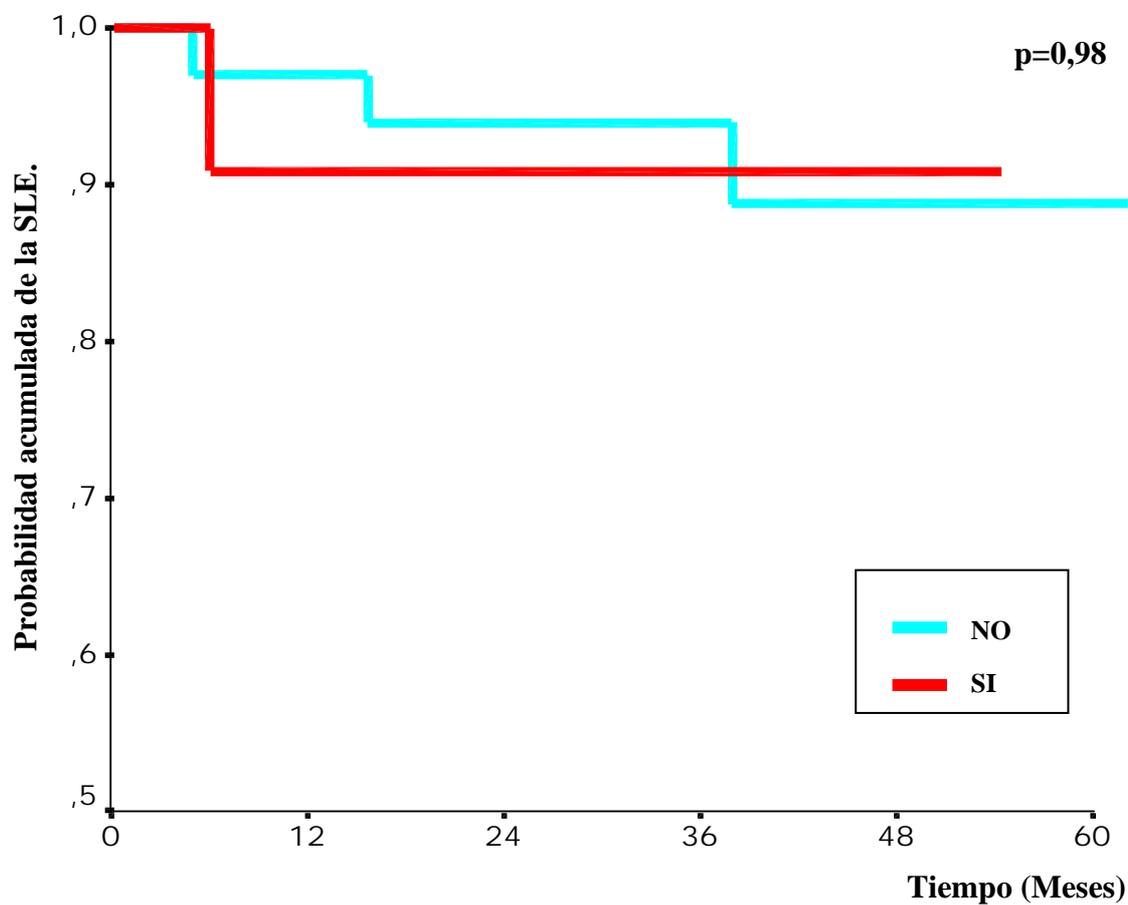


Figura 42. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de LOH en el locus 9p21. Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).

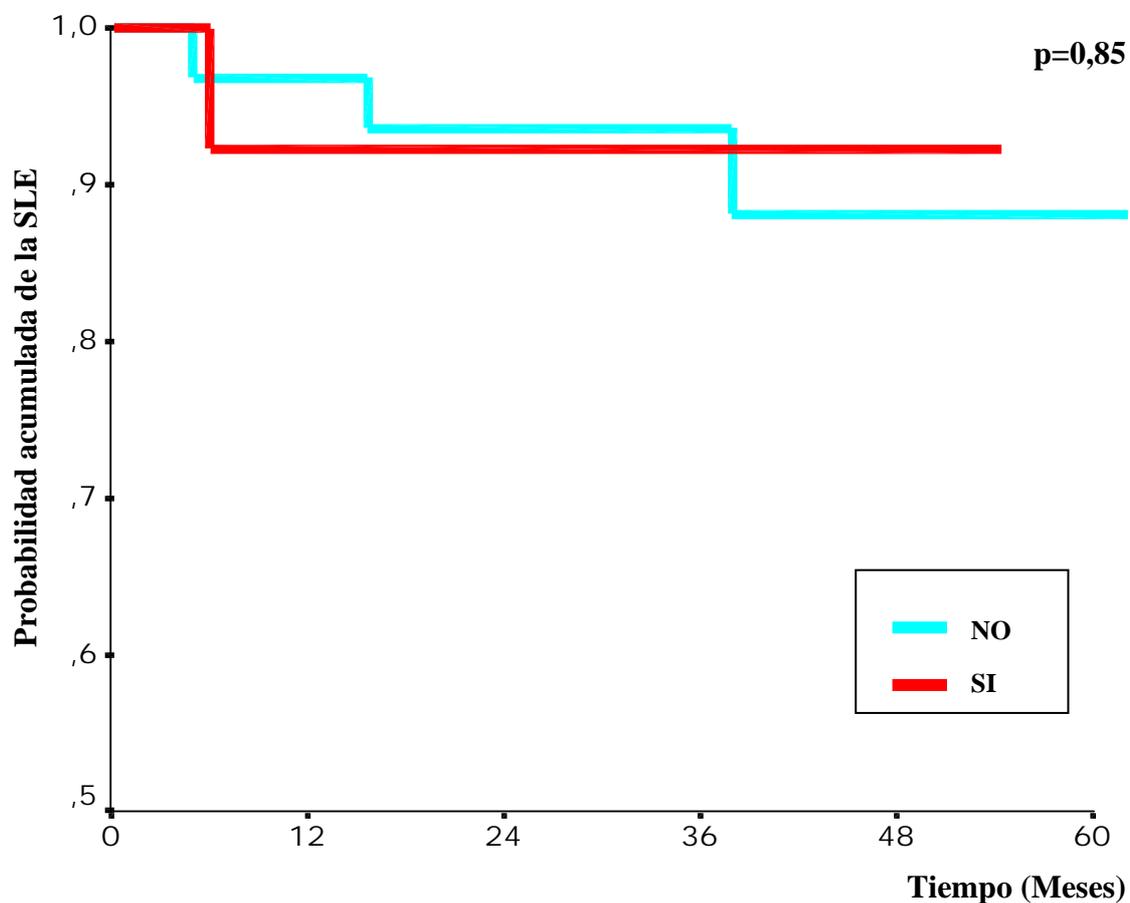


Figura 43. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de LOH y/o Inestabilidad en el locus 9p21. Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).

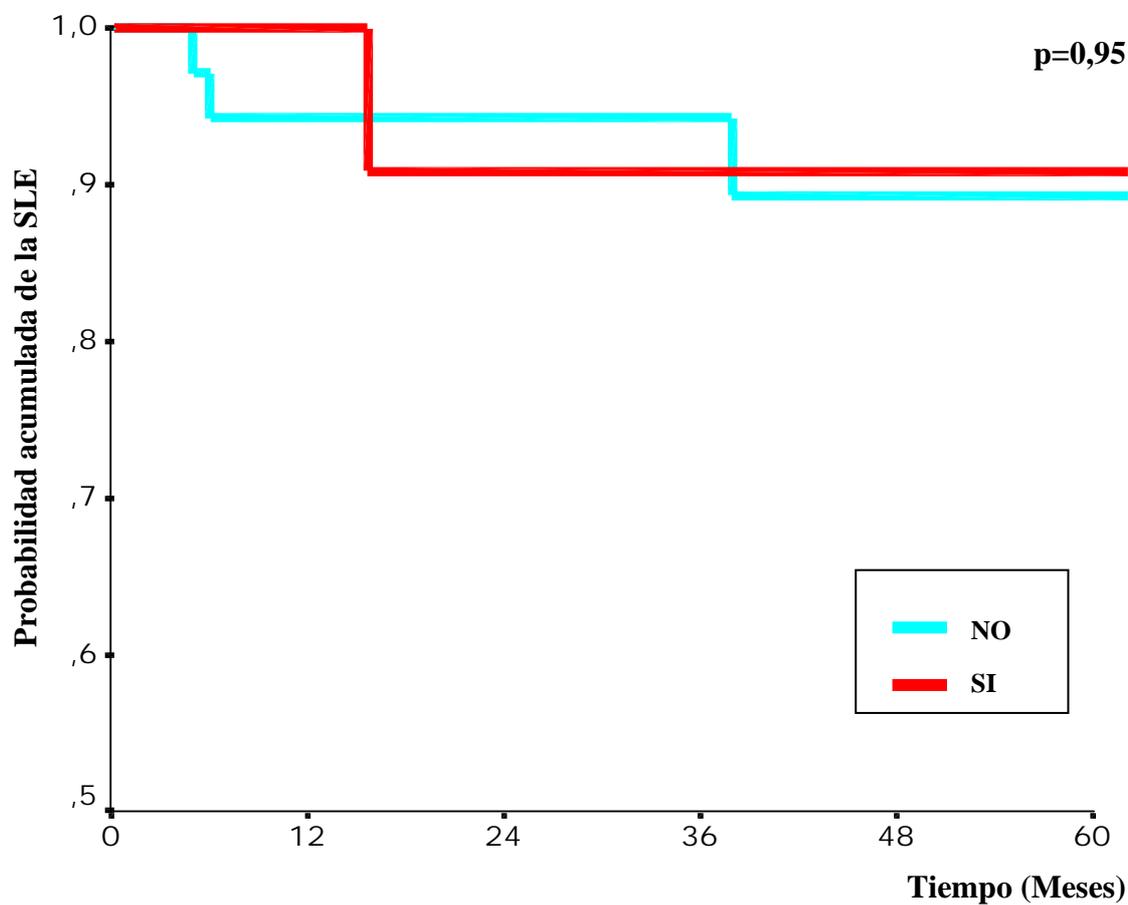


Figura 44. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de metilación en el gen *p16*. Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).

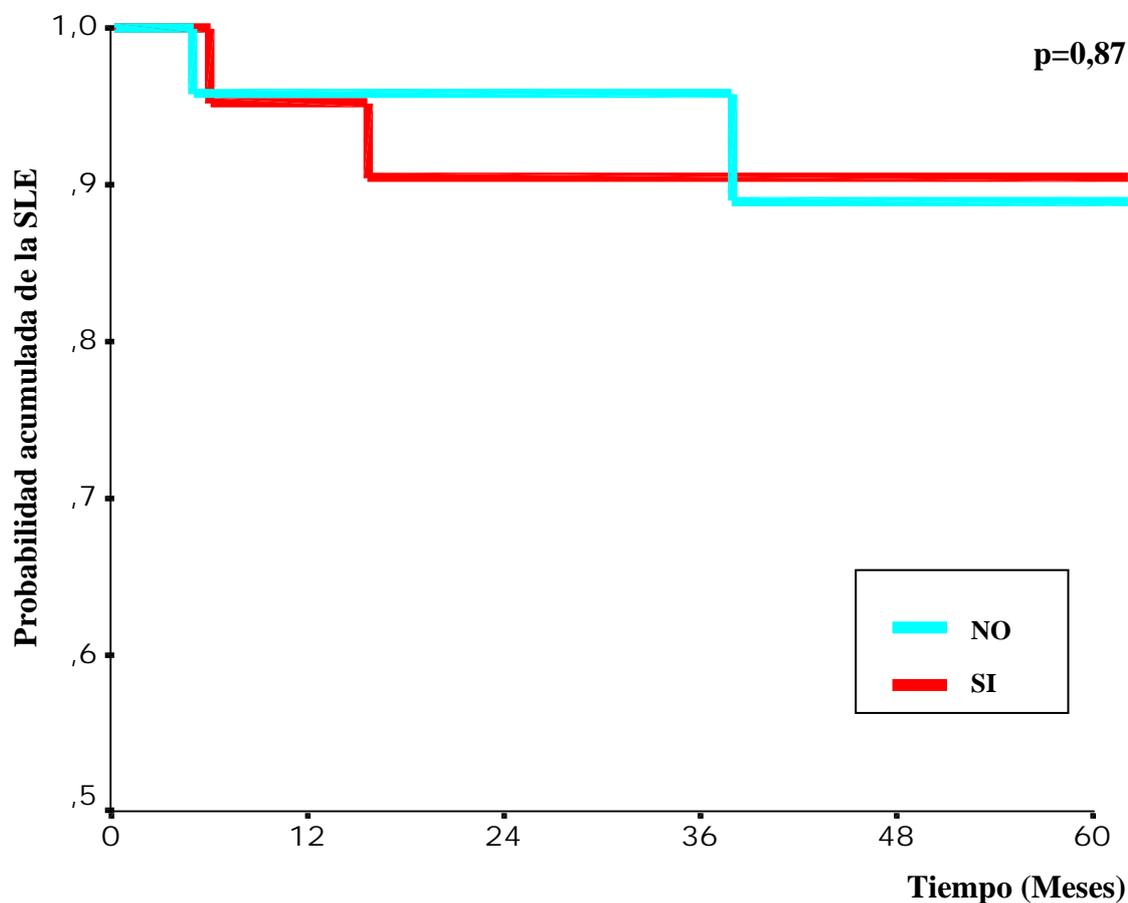


Figura 45. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de al menos una alteración genética. *Serie de 48 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).*

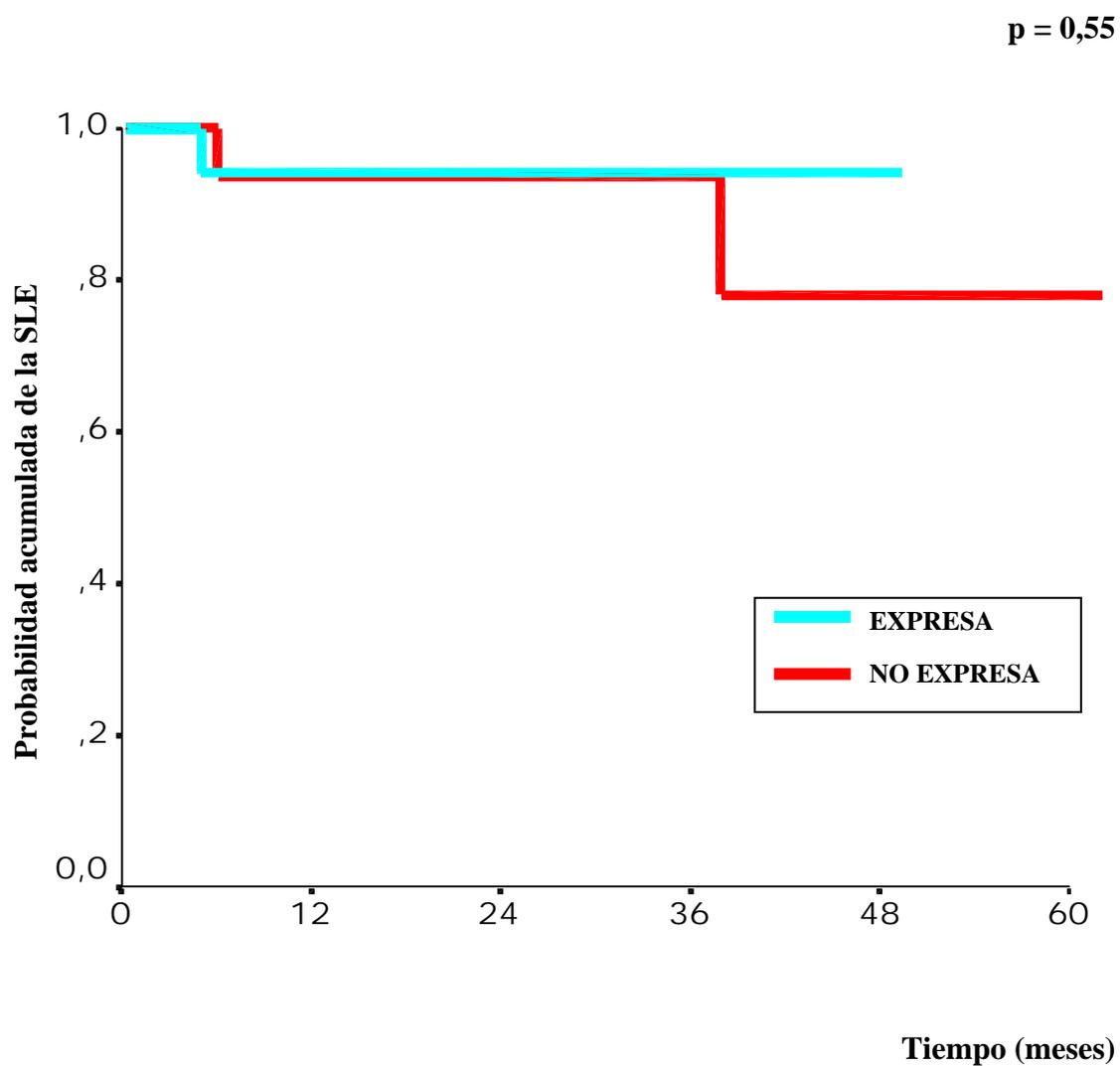


Figura 46. Curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad según la presencia de expresión de la proteína *p16*. Serie de 34 pacientes con cáncer renal. Hospital Clínico San Carlos (1993-2000).

4. ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Cuando se estratificó para estudiar el efecto de cada variable según el sexo, la edad, el tipo histológico, el grado de diferenciación, el estadio y el tamaño tumoral agrupados en estratos o categorías de la variable, se observó que ninguno de estos factores tenía significación sobre las variables consideradas como nuevos factores pronóstico (Tabla XXXI).

Se aprecia que la metilación puede ser un factor pronóstico en los pacientes mayores de 60 años ($p= 0,04$) pero no en los menores o igual a 60 años ($p=0,41$). La edad es un factor que produce interacción en la variable metilación, de tal forma que, eliminando el efecto que la edad ejerce en el riesgo de recidivar, se observa que los pacientes con tumores metilados tenían un riesgo de recidivar 2,16 veces más respecto a los que no metilan ($p=0,57$), mientras que dependiendo de la edad el riesgo de recidivar era 1,07.

Tabla XXXI. Nivel de significación en el estudio de la LOH, LOH y/o inestabilidad, *p16* metilada y presencia de al menos una alteración según los factores pronóstico considerados.

Variable	LOH	LOH y/o INESTABILIDAD	METILACIÓN	AL MENOS UNA ALTERACIÓN
SEXO				
Varón	0,47	0,39	0,24	0,72
Mujer	0,68	0,68	0,47	0,84
EDAD				
> 60	0,61	0,76	0,04	0,13
<= 60	0,63	0,57	0,41	0,24
HISTOLOGÍA				
Claras	0,59	0,80	0,38	0,25
No Claras	0,63	0,63	0,50	0,38
GRADO				
1 y 2	0,53	0,48	0,58	0,34
3	0,59	0,59	1,00	0,65
ESTADIO				
I y II	1,00	1,00	1,00	1,00
III y IV	0,70	0,70	0,88	0,35
TAMAÑO (T)				
T1 y T2	1,00	1,00	1,00	1,00
T3	0,75	0,75	0,94	0,40

5. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Al realizar el análisis multivariante, únicamente el grado de diferenciación presentó significado pronóstico independiente en la SLE.

El grado de diferenciación es un factor que produce confusión en la variable metilación. Eliminando el efecto que el grado ejerce en el riesgo de recidivar (los pacientes con tumores de grado 3 tienen mayor riesgo de recidivar que los de grado 1 y 2) y realizando una media ponderada entre los riesgos relativos, se observa que los pacientes con tumores metilados tienen un riesgo de recidivar 16,24 veces más respecto a los que no metilan con un IC (95%) entre 1,68-158, ($p=0,01$), mientras que sin eliminar el efecto del grado, el riesgo de recidivar de los tumores metilados frente a los no metilados era de 1,07.

DISCUSIÓN

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, en los que una de cada cinco personas fallece debido a esta enfermedad. Aunque se encuentra detrás de las enfermedades cardiovasculares en cuanto al número total de muertes, el cáncer ocupa el primer lugar si se tiene en cuenta las muertes prematuras, tomando como indicador los años de vida perdidos. El aumento paralelo de la incidencia del cáncer, con respecto a la esperanza de vida de la población, explica el interés médico y social de esta enfermedad.

Actualmente no disponemos de tratamientos eficaces contra el cáncer debido básicamente a un conocimiento insuficiente de los mecanismos biológicos que causan la aparición y progresión de la enfermedad. Aunque en las últimas décadas se ha avanzado enormemente en el desciframiento de las bases moleculares y celulares del cáncer y se ha progresado en su tratamiento clínico, no parece inminente el control definitivo de esta enfermedad.

En los últimos años, la investigación se ha centrado en la identificación de factores pronóstico que sirvan de ayuda en el tratamiento y seguimiento de los pacientes de una forma más individualizada. Hasta el momento, las decisiones terapéuticas se han basado en parámetros clínicos e histopatológicos clásicos, los cuales no resultan lo suficientemente sensibles y específicos. Pacientes con el mismo estado TNM pueden presentar evoluciones diferentes, debido probablemente a las diferentes características moleculares que presentan los tumores. De aquí surge la necesidad de disponer de

nuevos factores pronóstico biológicos. El conocimiento del comportamiento biológico de esta enfermedad es primordial para conocer la evolución de la enfermedad, así como para conseguir una terapia eficaz.

El cáncer es una enfermedad causada por la alteración de genes implicados en la proliferación y diferenciación celular, que da lugar a que la célula se multiplique sin control. El comportamiento del tumor es el reflejo de las anomalías genéticas presentes en él. En la incidencia del cáncer desempeñan un papel fundamental dos clases de genes implicados en diversas funciones dentro del control normal del ciclo celular, incluidas la proliferación, la estabilidad genómica, la apoptosis y la diferenciación celular. Los protooncogenes activan el crecimiento, mientras que los genes supresores lo inhiben. Cuando mutan, los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes capaces de dirigir una multiplicación desenfrenada. Las mutaciones pueden hacer que el oncogén produzca un exceso de proteína estimuladora del crecimiento, o una forma hiperactiva de ésta. Los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al desarrollo del cáncer cuando las mutaciones lo anulan funcionalmente. La falta de proteína supresora funcional priva a la célula del freno que impide el crecimiento desmesurado.

En la célula, para que se produzca la pérdida del control de crecimiento tienen que perderse o inactivarse los dos alelos del gen supresor de tumores (genes recesivos), mientras que la mutación de una sola copia del oncogén es suficiente para producir el mismo efecto.

Actualmente, sabemos que se requiere la activación conjunta de varios oncogenes y la inactivación de, por lo menos, un gen supresor en el mecanismo de la tumorigénesis. El número de alteraciones genéticas necesarias se desconoce, aunque se ha descrito que debe haber, al menos cinco. Hay que destacar la gran heterogeneidad molecular y fenotípica que se observa en la mayoría de los tumores, lo que se debe a las diferentes alteraciones oncogénicas que se van acumulando en las diferentes etapas de la carcinogénesis. Aunque estas alteraciones genéticas aparecen algunas veces en la línea germinal, como sucede en los síndromes familiares con predisposición al cáncer, estas mutaciones hereditarias son una excepción.

En el carcinoma renal se han observado múltiples alteraciones genéticas. El estudio de la LOH en diferentes cromosomas de estos tumores indica su origen poligénico, es decir, son necesarias múltiples alteraciones genéticas para que se desarrolle el tumor renal (103, 151). La LOH en los cromosomas 3p, 6q, 8p, 9p y 14q está asociada a los carcinomas renales no papilares. La LOH en 3p es la más frecuente (95%) y está asociada a deleciones en *locus* de 6q, 8p o 14q. En el caso de los tumores papilares, la LOH más frecuente se asocia a los cromosomas 6p, 9p, 11q, 14q y 21q. Así como se ha asociado la pérdida de material genético en 3p y 8p con tumores no papilares y pérdidas en 11q y 21q con tumores papilares, no se pueden asociar pérdidas específicas en otro tipo de tumores renales (103). Existe la posibilidad de que existan genes supresores de tumor en los cromosomas 6q, 9p y 14q que pueden estar implicados en el desarrollo y/o progresión del carcinoma renal (103). En el brazo corto del

cromosoma 9 se encuentra el gen *p16*, cuya inactivación se ha asociado a numerosos tumores humanos.

En este trabajo hemos estudiado el gen *p16*; es un gen supresor implicado en el desarrollo del carcinoma renal y es uno de los nuevos factores pronóstico que debe ser estudiado según la Union Internationale Contre le Cancer (91). Numerosos estudios han demostrado que alteraciones en el gen *p16* están asociadas a tumores humanos como el melanoma, vejiga, glioma, mesotelioma, esófago, cabeza y cuello, páncreas, pulmón... La proteína p16, codificada por el gen *p16*, está implicada en la vía p16/CDK4-6/Ciclina D1/pRB y regula el ciclo celular en el punto de control de la fase G1. Cerca del 100% de los tumores primarios de pulmón, esófago, cabeza y cuello, tienen una alteración genética en al menos uno de los componentes de esta vía (109).

ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN *p16*. RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

Desde el descubrimiento del gen *p16* por Serrano et al (110) se han publicado en los últimos años numerosos trabajos relacionados con las alteraciones genéticas más frecuentes del gen *p16* en diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos y en tumores primarios.

En las primeras publicaciones, dos grupos de investigación diferentes identificaron una alta frecuencia de deleciones homocigotas en 9p21 en líneas celulares derivadas de numerosos tumores humanos (104, 105). Aunque la frecuencia de esta alteración era elevada; sin embargo, se encontraron diferencias significativas en estudios realizados en tumores primarios, donde la deleción homocigota no era tan frecuente (106, 125, 127, 152-154). Por ejemplo, en los estudios en líneas celulares de tumores de mama, el rango de deleciones homocigotas se encontraba entre el 40-60%; sin embargo, ninguna deleción homocigota y ninguna mutación fueron observadas en tumores primarios de mama (105, 146, 154). Algunos carcinomas como el de colon y próstata no presentan deleciones homocigotas de *p16* ni en las líneas celulares (105, 122, 146, 152) ni en los tumores primarios (146).

En un principio, se pensó que uno de los mecanismos más frecuentes de

inactivación del gen eran las mutaciones; sin embargo, distintos autores (106, 152) demostraron que las mutaciones en *p16* no eran un hecho frecuente en tumores como el de pulmón, vejiga, cabeza y cuello, riñón, mama, cerebro, colon y ovario. Sin embargo, en otro tipo de tumores como el melanoma, el carcinoma de células escamosas de esófago y el carcinoma de páncreas, las mutaciones de este gen sí eran un hecho frecuente (127, 131,133).

Otro de los mecanismos de inactivación del gen *p16* es la metilación de su promotor. La metilación de las regiones 5' o de las regiones de dinucleótidos CG llamadas CpG es un mecanismo muy importante en la represión transcripcional (135). Durante los últimos 15-20 años se han observado patrones anormales en la metilación del DNA como un cambio molecular más en las neoplasias. La metilación de algunos genes juega un papel muy importante en la tumorigénesis como mecanismo de inactivación génica. Se ha demostrado que el bloqueo transcripcional de genes mediante la metilación de las islas CpG es un mecanismo alternativo de inactivación y se ha descrito en genes como el gen de *Von Hippel-Lindau*, el gen del *retinoblastoma*, *p15* y *p16* (142). Algunos carcinomas de células renales muestran metilación de las islas 5'CpG del gen *VHL* (19%) y algunos retinoblastomas presentan metilación de novo en el gen *Rb* (101, 143). La metilación del gen *p16* ha sido identificada y asociada con un bloqueo transcripcional en carcinomas como el de vejiga, pulmón no microcítico, glioma, células escamosas de cabeza y cuello, cerebro, mama, colon, próstata, esófago y carcinoma renal (130, 131, 134, 144-147). La incidencia de la metilación en diferentes

tumores varía desde un 20 a un 67%, siendo incluso mayor en los cultivos celulares de los mismos tipos de tumor; donde, por ejemplo, el 90% de las células de cáncer de colon tienen el gen *p16* metilado.

En nuestro trabajo nos hemos centrado fundamentalmente en el estudio de las alteraciones genéticas más frecuentes descritas en el gen *p16* (LOH y metilación) y en el estudio de la expresión de la proteína p16 codificada por este gen.

El 25% de nuestra serie de pacientes presentó LOH en 9p21. En la literatura encontramos muy pocos trabajos que estudien la LOH en 9p21 en tumores renales, pero los porcentajes de LOH coinciden con los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo. El primer trabajo publicado sobre la LOH en diferentes *locus* del cromosoma 9 y sobre deleciones homocigotas en la región 9p21-22 en carcinoma primario de células renales fue realizado por el grupo de Cairns et al en 1995 (155). Se estudiaron 18 marcadores de microsatélites en 42 tumores renales en los que el 33% (14/42) presentaban deleciones del cromosoma 9. De estos 14 tumores, 12 presentaban LOH en la región 9p21-22, por lo tanto la LOH era del 28%, coincidiendo con nuestros resultados. En un estudio realizado el mismo año por Thrash-Bingham et al (151) en líneas celulares procedentes de tumores renales, la LOH en 9p era del 21% (5/24), de los cuales 3 tumores eran no papilares y 2 eran papilares.

En nuestro trabajo no hemos encontrado ninguna deleción homocigota. Aunque

hay publicaciones en la literatura que describen las deleciones homocigotas en 9p21, la mayoría de ellas se refieren a líneas celulares. Como hemos comentado anteriormente, los resultados obtenidos en las líneas celulares no se pueden comparar con los tumores primarios ya que la frecuencia de las alteraciones en las líneas suele ser bastante superior (158). El porcentaje de deleciones homocigotas que presentaban las líneas celulares derivadas de tumores renales en las primeras publicaciones (105) era del 56%, coincidiendo con un estudio realizado posteriormente por Herman et al (146), donde el porcentaje de deleciones homocigotas en líneas celulares de cáncer renal era del 50% (13/26). El grupo de Kinoshita et al (158) realizó un trabajo en líneas celulares y tumores primarios de riñón, y encontraron que 9 de 10 líneas celulares presentaban deleciones homocigotas en el gen *p16*, y, sin embargo, sólo 1 de 55 tumores renales presentaba esta alteración. En el trabajo de Cairns et al (155) sólo se encontró una deleción homocigota y ninguna mutación del gen *p16* en 42 tumores renales primarios. Recientemente, el grupo de Schraml et al (159) no ha detectado ninguna deleción homocigota en una serie de 113 tumores renales de células claras. En el caso del cáncer de células transicionales de vejiga tampoco se han detectado deleciones homocigotas ni mutaciones según varios estudios realizados en tumores primarios (106, 145, 153). En los estudios en líneas celulares de tumores de mama, el rango de deleciones homocigotas se encontraba entre el 40-60%, sin embargo, ninguna deleción homocigota y ninguna mutación fue observada en tumores primarios de mama (105, 146, 154).

Al igual que en la mayoría de los trabajos publicados en tumores renales y en

otro tipo de tumores, no hemos observado relación entre la LOH y las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos (grado y estadio). En nuestra serie de pacientes, la LOH aunque no es significativo estadísticamente, tiene tendencia a relacionarse con los estadios precoces y con los grados bien diferenciados. Los tumores más diferenciados tienen más LOH que los menos diferenciados (27% y 20%, respectivamente), y los estadios precoces también presentan mayor porcentaje de LOH que los tumores de estadio avanzado (27% y 24%, respectivamente). En el estudio que Thrash-Bingham et al realizaron en líneas celulares procedentes de tumores renales, la LOH no se relacionó con el grado de diferenciación y el estadio (103). Cairns et al (155) tampoco encontraron relación entre la LOH y los factores pronóstico clásicos como el grado y el estadio, en tumores primarios. En el trabajo realizado por el grupo de Schullerus (156) se relacionó una mayor frecuencia de LOH en 9p21 con tumores menos diferenciados en cánceres no papilares. Según Kinoshita et al (158), las deleciones en 9p21-22 son un hecho relativamente tardío en tumores renales y se asocian a metástasis, el 50% de los tumores metastásicos presentaban LOH frente al 13% de los no metastásicos ($p=0,025$). En nuestra serie de pacientes, el 30% de los tumores de células claras (tipo histológico que presenta mayor porcentaje de LOH) y el 25% de los túbulos colectores presentaban LOH en 9p21. Según Fogt et al (160), la LOH en *p16* es del 33% en el carcinoma de células claras, coincidiendo con nuestros resultados, y los porcentajes en el carcinoma de túbulos colectores es superior (50%). En nuestro estudio, todos los tipos histológicos presentaban LOH en 9p21, lo cual indica, que *p16* es un gen supresor que se asocia a cualquier tipo histológico como

sugieren los trabajos realizados por Thrash-Bingham et al (103, 151), a diferencia de otros genes supresores como los que se encuentran en 3p y 8p, que se asocian a tumores no papilares y en 11q y 21q que se asocian a tumores papilares. En nuestro trabajo, el 25,6 % de los tumores no papilares presentaron LOH en 9p21 coincidiendo con el trabajo publicado por el grupo de Schullerus (156) que realizó un estudio en 105 carcinomas renales no papilares y la LOH obtenida en 9p21 fue del 33%. En un estudio posterior realizado por Schraml et al (157) en 37 carcinomas renales papilares, la LOH fue del 5% en el mismo *locus* a diferencia de nuestros resultados que eran de un 25%.

En el caso de otro tipo de tumores existe una gran controversia al relacionar la LOH con los factores pronóstico clásicos. En general, la LOH se asocia a estadios precoces del tumor y se considera un evento temprano. En el trabajo publicado por González et al (161) sobre la LOH en 9p21 en tumores primarios de cabeza y cuello, la incidencia de LOH es del 75% y se asocia a estadios precoces, aunque este dato no es significativo, sin embargo, en el estudio de Jares et al (162), la LOH en 9p21 (57%) se relaciona con estadios avanzados, afectación ganglionar y metástasis.

En nuestra serie de pacientes, el 23% presenta metilación del promotor del gen *p16*. En la literatura no hemos encontrado ningún trabajo publicado que estudie el estado de metilación del gen *p16* en tumores renales primarios. En el trabajo de Herman et al (146), el 23% (6/23) de las líneas celulares de cáncer renal presentaban el gen *p16* hipermetilado, coincidiendo con nuestros resultados. Aunque realizaron estudios en

tumores primarios renales, la estadística no fue publicada. Así como en las deleciones homocigotas y en las mutaciones no se podía comparar los resultados obtenidos de las líneas celulares con los de los tumores, en el caso de la metilación las coincidencias son mayores. En el trabajo de Herman et al (146), el porcentaje de metilación en líneas celulares de tumores de mama y tumores primarios de mama coincide (33% y 31%, respectivamente). En el caso de tumores de vejiga, el porcentaje de metilación en líneas celulares coincide con el de en tumores primarios en un 67% según publican Gonzalez-Zulueta et al (145). La inactivación de *p16* mediante el mecanismo de metilación se ha asociado a diferentes tumores y el porcentaje de metilación del gen varía de unos a otros, según el tipo de tumor. Los tumores gástricos presentan un elevado porcentaje de metilación (87%) (164). Otros tumores como los tumores de vejiga (67%), colon y esófago (40%), hepáticos y pulmón no microcítico (35%, 34%) (145, 146, 165, 166, 167, 142) también presentan porcentajes elevados de metilación. La metilación es menos frecuente en tumores nasofaríngeos y cabeza y cuello (22%), melanomas (10%), laringe (7%) y endometrio (0,7%) (168, 169, 170, 162, 171).

Al evaluar la inactivación del gen mediante el mecanismo de la metilación, el porcentaje de metilación varía dentro del mismo tipo de tumor según la técnica empleada. Frente a métodos que utilizan enzimas de restricción sensibles a la metilación, está el método utilizado por nosotros en este trabajo, el MSP (Methylation-Specific PCR), que fue introducido por Herman et al en 1996 (149). Este método es sencillo, sensible y específico para la determinación del estado de metilación de las

regiones ricas en CpG. Una de las ventajas es la pequeña cantidad de DNA necesaria, del orden de nanogramos, frente a los microgramos requeridos en otras técnicas, siendo la sensibilidad para detectar los alelos metilados $>10^{-4}$, y la otra ventaja es que los primers utilizados reconocen los alelos metilados y los no metilados, eliminando los falsos positivos de otras técnicas (digestión parcial al utilizar enzimas de restricción). En el carcinoma de pulmón no microcítico el porcentaje de metilación varía según la técnica empleada, de un 26% a un 61% según diferentes estudios. Cuando el estudio se realiza con la técnica MSP, Kasiwabara et al (142) encontraron que el 34% de su serie tenía *p16* metilado, Ahrendt et al (172) el 38%, Esteller et al (173) el 41% y Belinsky et al (174) el 61,1%, aunque este estudio se realizó sólo en tumores epidermoides. Mediante otras técnicas que utilizan enzimas de restricción sensibles a la metilación los porcentajes de metilación observados son inferiores; Merlo et al (147) encuentran un 26% de metilación, Gourgoulis et al (175) un 26% y Tanaka et al (176) un 27%.

Al relacionar el estado de metilación del gen *p16* con las variables clínico-patológicas estudiadas (sexo, edad y antecedentes familiares), encontramos que existía una diferencia significativa en el porcentaje de metilación en cuanto a la edad, esta relación es irrelevante y no existen referencias en la literatura. Al relacionar la metilación con los factores pronóstico clásicos, el estado de metilación del gen *p16* se relacionó de forma significativa con el estadio. En nuestro trabajo, la metilación de *p16* en los tumores de estadio precoz es más frecuente que en los tumores de estadio avanzado (26 y 19%, respectivamente) ($p=0,06$), por lo tanto, la metilación es un evento

precoz en la aparición del cáncer renal. Al estudiar el grado de diferenciación, los tumores de grado I presentan un porcentaje de metilación (36,4%) superior al de los de grado 2, 3 y 4 (18,5%, 22,2% y 0% respectivamente), no siendo significativo. También en la LOH en 9p21 (otra alteración genética de *p16*) era más frecuente en estadios precoces y tumores bien diferenciados. Podemos destacar que ningún tumor papilar presentó metilación del gen. El porcentaje mayor de metilación lo presentaron los tumores de células cromóforas (57,1%) frente a un 25% en los tumores de túbulo colector y un 19,4% en los tumores convencionales o de células claras. Tampoco fue significativo, pero ninguno de los tumores multifocales, característica de los tumores papilares, presentó metilación.

No existen estudios publicados que relacionen de forma significativa la metilación y los factores pronóstico clásicos, en los tumores renales ni en otro tipo de tumores. Kasiwabara et al (142) no encuentran una asociación entre las características clínico-patológicas como la edad y el sexo, y factores pronóstico clásicos como la histología o el estadio, y el estado de metilación de *p16* en carcinoma de pulmón, aunque este autor al igual que Belinsky et al (174), sugieren que la metilación de *p16* podría ser un hecho precoz en la aparición del carcinoma de pulmón no microcítico. Merlo et al (147) sugieren también que la metilación es un evento precoz en tumores de vejiga y en cáncer de pulmón no microcítico.

En nuestro trabajo, de los dos pacientes que tienen inestabilidad cromosómica en

la región 9p21, sólo uno de ellos presenta metilado el gen (50%). En un estudio realizado por Ahuja et al (178) en tumores de colon, el 60% de los tumores que presentaban inestabilidad cromosómica estaban metilados y se asoció la hipermetilación a la inestabilidad de microsatélites, ($p=0,02$).

Al agrupar todas las alteraciones genéticas estudiadas, hemos observado que el 51% de los tumores renales estudiados presentan al menos un tipo de alteración (LOH, metilación y/o inestabilidad cromosómica) en el gen *p16*, por lo tanto podemos decir que las alteraciones de *p16* son un hecho frecuente en el carcinoma de células renales al igual que en otro tipo de tumores. No encontramos relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos. En la literatura no existen trabajos publicados que estudien los distintos mecanismos de inactivación del gen *p16* en el carcinoma renal pero si existen estudios realizados en otros tumores donde las alteraciones de *p16* son un hecho frecuente, siendo su significado pronóstico todavía incierto. Según un trabajo publicado, el 65% de tumores de pulmón no microcítico presentan el gen alterado debido a un 40% de LOH y un 16% de inestabilidad cromosómica (175); en otro estudio, las alteraciones genéticas en el carcinoma de laringe son debidas a la hipermetilación del gen (22%) y deleciones (57%) (162); en un estudio realizado en tumores de cabeza y cuello las alteraciones del gen son las deleciones homocigotas (20%) y la metilación (20%) (169).

Con el fin de observar si las alteraciones genéticas estudiadas tienen

consecuencia en la proteína codificada, realizamos el estudio de la expresión de la proteína p16 mediante inmunohistoquímica y encontramos que el 50% (17/38) de nuestros pacientes, no expresaba la proteína p16 en el tejido tumoral, por lo que confirmamos que las alteraciones génicas de *p16* producen un bloqueo de la transcripción y son un hecho frecuente en el carcinoma de células renales. Del grupo de pacientes que no expresa proteína p16, el 69% tienen al menos una de las alteraciones genéticas estudiadas y el 47% se debe a la metilación del gen *p16*.

En la literatura no hemos hallado ningún trabajo sobre la expresión de la proteína p16 en riñón, pero sí en otros tumores. El porcentaje de expresión de la proteína p16 varía de unos tumores a otros desde un 77% hasta un 11%. Por ejemplo, el 56% de los glioblastomas y el 77,5% de los astrocitomas (179) no expresan proteína p16. El 46,5% de los tumores de pulmón no microcítico no expresan esta proteína (176) aunque en estudios realizados posteriormente asciende al 58% (180); el 34% de los tumores de ovario (182), el 45% de los melanomas (183), el 44% de los carcinomas hepatocelulares (184) y el 14% de los tumores de endometrio (171) no expresan p16. En los carcinomas gástricos, el porcentaje de no expresión de p16 varía de un 22% a un 11% según diferentes autores (164, 185). La expresión de la proteína p16 se estudia mediante inmunohistoquímica pero los resultados obtenidos mediante esta técnica son dispares (186). Esto se debe, por un lado, a que algunos estudios utilizan anticuerpos monoclonales y otros utilizan anticuerpos policlonales, estos últimos son mucho menos específicos y pueden ocasionar falsos positivos. Por otro lado, en la técnica influye el

tipo de fijación y conservación del material, ya que la proteína p16 es muy susceptible al daño y degeneración dependiendo de las condiciones de fijación y/o preservación de los tejidos. Por último, aunque todos los autores consideran que existe expresión de p16 cuando se tiñen los núcleos de las células, no todos los estudios se ponen de acuerdo en el número de núcleos teñidos para establecer si el tumor expresa proteína. Así por ejemplo, el porcentaje de expresión de p16 en tumores de pulmón no microcítico varía de un 27% a un 66% según las técnicas empleadas (142, 176, 180, 187). En el trabajo de Kasiwahara et al (142), el 66% de los tumores no expresan proteína; el anticuerpo utilizado para marcar la proteína p16 es un anticuerpo monoclonal y utiliza los criterios de Geradts (186) para interpretar los resultados: células p16 positivas cuando los núcleos están teñidos, sin especificar el número de núcleos y células p16 negativas cuando hay ausencia de núcleos teñidos, siendo la tinción del citoplasma variable. En el trabajo de Taga et al (187), el 27% de los tumores de pulmón no expresan proteína p16; el método utilizado es una técnica en parafina con anticuerpo policlonal y considera la tinción positiva cuando más del 10% de los núcleos están teñidos. En nuestro estudio, hemos empleado un anticuerpo monoclonal y hemos utilizado los criterios de Geradts para interpretar las tinciones considerado expresión de la proteína cuando se teñían más del 10 % de los núcleos.

En nuestro trabajo, en el grupo de pacientes que expresa proteína p16, es decir, que no tienen el gen *p16* inactivado, el 69% no presenta ninguna de las alteraciones estudiadas y el 31% presenta al menos una de ellas ($p=0,01$); la alteración genética que

presentaba este 31% es la LOH. Este hecho es consecuencia de que el gen *p16* es un gen supresor de tumores. Esto significa que para que se produzca la inactivación del gen es necesario la pérdida de los dos alelos o bien la pérdida de uno de ellos e inactivación del segundo alelo. Aunque exista la pérdida genética de un alelo (LOH), la célula exprese la proteína. La LOH supone ya un riesgo genético al faltar la mitad de la dotación protectora y la célula afectada se convierte, por lo tanto, en una célula iniciada que pasará a la fase de promoción y progresión en el momento que se produzca una alteración en el segundo alelo. Del grupo de pacientes que no expresa la proteína p16, es decir, que tienen el gen *p16* inactivado, el 77% tienen al menos una de las alteraciones genéticas y el 23% restante no presenta ninguna alteración. Esto sugiere que en ese 23% existe otro mecanismo de inactivación del gen *p16* diferente a los estudiados, un proceso alternativo relacionado con la regulación transcripcional y/o traslacional que inactive el gen. En otros estudios también se ha observado la elevada ausencia de expresión de p16 y, sin embargo, el gen *p16* no está inactivado por deleciones homocigotas, mutaciones o por la metilación. En el trabajo de Marchini et al (188) en tumores de ovario, no se detecta el RNA de la proteína p16 en un 26% de los tumores y no encontraron mecanismos de inactivación conocidos que inactiven el gen. En el estudio de Kasiwabara et al (142), el 66% de los tumores de pulmón no expresan la proteína p16 y tan sólo el 34% metilan; debido a que las deleciones homocigotas y las mutaciones son infrecuentes, sugieren al igual que nosotros, otro mecanismo de inactivación del gen.

En este trabajo hemos relacionado la expresión de la proteína con el estado de la metilación del gen, y en nuestra serie de pacientes, el 100% de los tumores que expresan la proteína no tienen el gen inactivado mediante este mecanismo. Dentro de la serie de pacientes que no expresan *p16*, el 47% se debe a la metilación del gen *p16* y el 53% restante se debe a otros mecanismos de inactivación ($p=0,01$). Diversos estudios coinciden con nosotros en que existe una relación entre la metilación del gen y la ausencia de expresión de la proteína en los mismos tumores. El grupo de Kasiwabara et al (142) afirman que todos los tumores que tienen el gen metilado no expresan proteína *p16* en tumores de pulmón. En el estudio realizado en tumores de pulmón por Betticher et al (189), se relaciona de forma significativa el estado de la metilación del gen con la no expresión de la proteína ($p=0,04$). Belisky et al (174) también relacionan la metilación del gen con la expresión de la proteína. En el trabajo de González-Zulueta et al (145) realizado en tumores de vejiga, existe una relación significativa entre la metilación del gen *p16* y la inactivación transcripcional del gen ($p=0,00001$). En el trabajo de Tsujie et al (185) en carcinomas gástricos, también existe una relación entre la metilación y la ausencia de proteína ($p=0,0013$).

Al relacionar la expresión de la proteína *p16* con las variables clínico-patológicas estudiadas (sexo, edad y antecedentes familiares), no encontramos diferencias significativas. Tampoco los factores pronóstico clásicos se relacionaron de forma significativa con la expresión de la proteína. Podemos destacar que todos los tumores papilares expresan proteína y, por lo tanto, ninguno presenta metilación del

gen. El mayor porcentaje de ausencia de *p16* lo presentaron los tumores de túbulo colectores (66,7%) en los que el 50% presenta alguna de las alteraciones genéticas estudiadas siendo un 25% la metilación. Los tumores de células cromóforas no expresan *p16* en un 60% y el 57% tiene una alteración que coincide con la metilación. En los tumores de células claras en las que el 50% no expresa proteína el 50% tiene una alteración (19,4% metilación, y 0,6% inestabilidad cromosómica). La ausencia de expresión de la proteína *p16* es un evento tardío en nuestra serie de pacientes. Existe una mayor tendencia a no expresar proteína en los tumores en estadio avanzado (64,3%) que en los tumores en estadio precoz (40%) a diferencia de las alteraciones genéticas, que eran más frecuentes en estadios precoces. También los tumores menos diferenciados expresen menos proteína que los más diferenciados (57,1 y 48,1% respectivamente). Esta diferencia encontrada entre las alteraciones genéticas y la expresión de la proteína puede ser consecuencia de la existencia de otro mecanismo de inactivación del gen diferente a los estudiados en este trabajo, que inclinaría la balanza hacia los estadios más avanzados y los tumores más indiferenciados.

En la literatura, en general, no existe acuerdo sobre la relación entre la expresión de la proteína *p16* y las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Taga et al (187) en tumores de pulmón, no existe relación entre la expresión de la proteína *p16* y la edad, sexo, histología y grado; en el trabajo en tumores de ovario de Marchini et al (188), tampoco existe relación con el estadio, grado e histología. Sin embargo, en el trabajo de Tsujie et al (185) sugieren

que la falta de expresión de la proteína se asocia a carcinomas gástricos poco diferenciados ($p=0,0133$); el grupo de Straume et al (182) encontró relación significativa entre la pérdida de proteína y la invasión vascular ($p=0,001$) y metástasis ($p=0,0001$). Salvensen et al (171) asocian significativamente la falta de expresión en endometrio al incremento de edad, estadio avanzado, al tipo histológico y a un alto grado de diferenciación del tumor. Hui et al (183) relacionan la falta de expresión con la metástasis (74% en tumores metastásicos frente a 36% en los no metastásicos, $p=0,001$) y con tumores poco diferenciados. En el trabajo de Nishida et al (190) realizado en hepatocarcinomas, las alteraciones de *p16* son poco frecuentes y se asocian a un comportamiento agresivo del tumor, es más frecuente en tumores avanzados y se asocia a mal pronóstico. En el trabajo de Marchetti et al (191) en tumores de pulmón, las anomalías del gen *p16* son evento tardío probablemente relacionado con la adquisición de fenotipo metastásico. No observaron relación entre alteraciones de *p16* y la edad, tamaño, histología y grado.

ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN *p16*. RELACIÓN CON EL PRONÓSTICO

Es importante conocer si las alteraciones genéticas estudiadas son capaces de predecir de forma independiente el pronóstico de los pacientes con carcinoma renal.

Respecto a los factores pronóstico clásicos, se confirma que el grado de diferenciación nuclear, el estadio tumoral y el tamaño tumoral (T), presentan significado pronóstico. Los pacientes con tumores indiferenciados (grados 3) presentan un riesgo 16 veces mayor de recidivar que los bien diferenciados (grados 1 y 2) ($p=0,008$); los pacientes en estadios avanzados (estadios III y IV) tienen un riesgo de recidivar 100 veces superior a los de estadios precoces (estadios I y II) ($p=0,008$) y los pacientes con tumores T3 según TNM tienen un riesgo 118 veces superior de recidivar que los T1 y T2 ($p=0,002$). Aunque no es significativo, los tipos histológicos que presentan peor pronóstico son los tumores convencionales o de células claras y los tumores de túbulos colectores.

En el estudio univariante de la implicación pronóstica de las alteraciones genéticas en el gen *p16* observamos que ninguna de estas alteraciones presenta significado pronóstico, sin embargo, en el caso de la expresión de la proteína, los pacientes que no expresan *p16* tienen un riesgo de recidivar de 2,04 veces más que los que expresan proteína ($p=0,55$). Tienen una mayor tendencia de recidivar aquellos

pacientes que presentan alguna alteración genética (LOH o metilación). La tendencia es más acusada en los pacientes que presentan al menos una de las alteraciones (LOH y/o metilación) donde el riesgo relativo de recaer es 1,45 veces superior a los que no tienen ninguna alteración.

Al observar la tendencia de las alteraciones genéticas en *p16* a ser un factor de mal pronóstico, realizamos un análisis estratificado para estudiar el efecto de cada variable según el sexo, la edad, el tipo histológico, el grado de diferenciación, el estadio y el tamaño tumoral agrupados en estratos o categorías de la variable y se observó que ninguno de estos factores salvo la edad tenía significación sobre las variables consideradas como nuevos factores pronóstico. La edad es un factor que produce interacción en la variable metilación, de tal forma que, eliminando el efecto que la edad ejerce en el riesgo de recaer, se observa que los pacientes con tumores metilados tenían un riesgo de recaer 2,16 veces más respecto a los que no metilan ($p=0,57$), mientras que dependiendo de la edad el riesgo de recaer era 1,07. Se aprecia que la metilación puede ser un factor pronóstico en los pacientes mayores de 60 años ($p= 0,04$) pero no en los menores o igual a 60 años ($p=0,41$).

El análisis multivariante mostró que ninguna de las alteraciones genéticas presentó significado pronóstico independiente en la S.L.E. De los factores pronóstico clásicos, el grado de diferenciación nos proporciona información independiente en cuanto al riesgo de recaer. El grado de diferenciación es un factor que produce

confusión en la variable metilación, eliminando el efecto que el grado ejerce en el riesgo de recidivar (los pacientes con tumores de grado 3 tienen mayor riesgo de recidivar que los de grado 1 y 2) y realizando una media ponderada entre los riesgos relativos de ambos estratos, se observa que los pacientes con tumores metilados tienen un riesgo de recidivar 16,24 veces más respecto a los que no metilan con un IC (95%) entre 1,68-158, ($p=0,01$), mientras que sin eliminar el efecto del grado, el riesgo de recidivar de los tumores metilados frente a los no metilados era de 1,07.

En la literatura no existen publicaciones que nos informen sobre el valor pronóstico de las alteraciones genéticas gen *p16* y la expresión de la proteína p16 en el cáncer renal. Solamente, en el estudio realizado por Schraml et al (159) en una serie de tumores renales de células claras, la LOH en el cromosoma 9p21 se asoció a una menor supervivencia en pacientes con tumores T3 ($p=0,01$).

En otro tipo de tumores como el melanoma, la falta de expresión de la proteína p16 se asocia de forma significativa a una menor supervivencia; el porcentaje de supervivencia a los 10 años es de un 37% cuando no expresan proteína frente a un 67% cuando expresan proteína ($p=0,0003$) (183). En el carcinoma de colon, la presencia de alteraciones genéticas en p16 se asocia con una peor supervivencia, aunque no tiene significado estadístico (165). Según Puduvalli et al (179), la expresión de p16 no es un factor pronóstico de supervivencia independiente en los gliomas. En cáncer de endometrio, la S.G. a los 5 años fue del 47% en pacientes que no expresaban p16 frente

al 81% en pacientes que expresaban *p16* ($p=0,0001$), según Salvensen et al (171) es un factor pronóstico independiente.

La presencia de alteraciones genéticas en el gen *p16* y la consiguiente falta de expresión de la proteína codificada en el tejido tumoral es un hecho frecuente en el carcinoma renal. Con el fin de obtener unos resultados más concluyentes sobre su prevalencia y su valor pronóstico tanto en la S.L.E. como en la S.G., es importante ampliar el estudio de este gen en el carcinoma renal aumentando la casuística. De esta forma podríamos consolidar su papel en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes diagnosticados de carcinoma renal.

CONCLUSIONES

1. Las alteraciones genéticas del gen supresor *p16* son un hecho frecuente en nuestra serie de pacientes diagnosticados de cáncer renal: el 50% no expresa la proteína p16.
2. El 51% presenta al menos una de las alteraciones genéticas estudiadas. La LOH en 9p21 (25%) y la metilación del promotor del gen *p16* (23%) son hechos frecuentes. Menos frecuente es la inestabilidad cromosómica que se observa en el 4,2% y la delección homocigota que no está presente en ningún tumor.
3. El 47% de los tumores que no expresan la proteína se debe a la metilación del gen *p16* ($p=0,01$). El 100% de los tumores que expresan la proteína no tienen el gen inactivado mediante el mecanismo de la metilación.
4. En el 23% de los tumores con ausencia de proteína no se ha detectado ninguna alteración genética. Esto sugiere la presencia de otro mecanismo de inactivación del gen *p16* diferente a los estudiados, un proceso alternativo relacionado con la regulación transcripcional y/o traslacional que inactive el gen.
5. No se observó relación entre las alteraciones genéticas de *p16* y la expresión de la proteína con las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos estudiados. En nuestra serie de pacientes, la LOH y la metilación tienen tendencia a relacionarse con los estadios precoces y grados diferenciados y, la ausencia de expresión de la proteína p16 tiende a ser un evento tardío.

6. Los pacientes que presentan al menos una de las alteraciones (LOH y/o metilación) tienen un riesgo relativo de recidivar 1,45 veces superior a los que no tienen ninguna alteración y los pacientes que no expresan p16 tienen un riesgo de recidivar de 2,04 veces más que los que expresan proteína, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativa.

7. Se observa que la metilación puede ser un factor pronóstico en los pacientes mayores de 60 años ($p=0,04$) pero no en los menores o igual a 60 años ($p=0,41$). Eliminando el efecto que la edad ejerce en el riesgo de recidivar, los pacientes con tumores metilados tienen un riesgo de recidivar 2,16 veces más respecto a los que no metilan ($p=0,57$), mientras que dependiendo de la edad el riesgo de recidivar era 1,07.

8. Únicamente el grado de diferenciación presentó significado pronóstico independiente en la SLE. Eliminando el efecto que el grado de diferenciación ejerce en el riesgo de recidivar, los pacientes con tumores metilados tienen un riesgo de recidivar 16,24 veces más respecto a los que no metilan ($p=0,01$), mientras que sin eliminar el efecto del grado, el riesgo de recidivar de los tumores metilados frente a los no metilados era de 1,07.

BIBLIOGRAFÍA

1. INE. Movimiento Natural de la Población Española: Defunciones según la causa de muerte 1990. Madrid: INE, 1993.
2. Ries L.A.G., Kosary C.L., Hankey B.F., Miller B.A., Hurray A., Edwards B.A., eds. SEER cancer statistics review, 1973-1994. National Cancer Institute. Bethesda: NIH Publication 97-2789, 1997.
3. Landis S.H., Murray T., Bolden S., Wingo P.A. Cancer Statistics, 1999. CA Cancer J. Clin., 1999; 49: 8-31.
4. Parker S.L., Tong T., Bolden S., Wingo P.A. Cancer Statistics, 1997. CA Cancer J. Clin., 1997; 47:5-27.
5. Black R.J., Bray F., Ferlay J., Parkin D.M. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. Eur. J. Cancer 1997; 33: 1075-1107.
6. Atlas de mortalidad por cáncer y otras causas en España: 1978-1992.
7. Leuschner I., Harms D., Schmidt D. Renal cell carcinoma in children: histology, immunohistochemistry, and follow-up of 10 cases. Med. Pediatr. Oncol., 1991; 19: 33-41.
8. Kosary C.L., McLaughlin J.K. Kidney and renal pelvis. In: Miller B.A., Ries L.A.G., Hankey B.F., et al., eds. SEER cancer statistics review, 1973-1990. National Cancer Institute. Bethesda: NIH Publication 93-2789, 1993.
9. Golimbu M., Joshi P., Sperber A., Tessler A., Al-Askari S., Morales P. Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. Urology, 1986; 27: 291-301.

10. Vogelzang N.J., Stadler W.M. Kidney cancer. *Lancet*, 1998; 352: 1691-96.
11. McLaughlin J.K., Mandel J.S., Blot W.J., Schuman L.M., Mehl E.S., Fraumeni J.F. Jr. A population-based case control study of renal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984; 72: 275-284.
12. Mellempgaard A., Engholm G., McLaughlin J.K., Olsen J.H. Risk factors for renal cell carcinoma in Denmark. I. Role of socioeconomic status, tobacco use, beverages, and family history. *Cancer Causes Control*, 1994; 5: 105-13.
13. Schlehofer B., Heuer C., Blettner M., Niehoff D., Wahrendorf J. Occupation, smoking and demographic factors, and renal cell carcinoma in Germany. *Int. J. Epidemiol.*, 1995; 24: 51-7.
14. Coughlin S.S., Neaton J.D., Randall B., Sengupta A. Predictors of mortality from kidney cancer in 332,574 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Cancer*, 1997; 79: 2171-7.
15. McLaughlin J.K., Lindblad P., Mellempgaard A., McCredie M., Mandel J.S., Schlehofer B., et al. International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int. J. Cancer*, 1995; 60: 194-8.
16. Godley P.A., Stinchcombe T.E. Renal cell carcinoma. *Curr. Opin. Oncol*, 1999; 11: 213-7.
17. Mellempgaard A., Lindblad P., Schlehofer B., Bergstrom R., Mandel J.S., McCredie M., et al. International renal-cell cancer study. III. Role of weight, height, physical activity, and use of amphetamines. *Int. J. Cancer*, 1995; 60: 350-4.

18. Wolk A., Lindblad P., Adami H.O. Nutrition and renal cell cancer. *Cancer Causes Control*, 1996; 7: 5-18.
19. Shapiro J.A., Williams M.A., Weiss N.S. Body mass index and risk of renal cell carcinoma. *Epidemiology*, 1999; 10: 188-191.
20. Grossman E., Messerli F.H., Goldbourt U. Does diuretic therapy increase the risk of renal cell carcinoma? *Am. J. Cardiol*, 1999; 83: 1090-3.
21. Kreiger N., Marrett L.D., Dodds L., Hildicht S., Darlington G.A. Risk factors for renal cell carcinoma: results of a population-based case-control study. *Cancer Causes Control*, 1993; 4: 101-10.
22. Lindblad P., McLaughlin J.K., Mellempgaard A., Adami H.O. Risk of kidney cancer among patients using analgesics and diuretics: population-based cohort study. *Int. J. Cancer*, 1993; 55: 5-9.
23. McCredie M., Pommer W., McLaughlin J.K., Stewart J.H., Lindblad P., Mandel J.S., et al. International renal-cell cancer study. II. Analgesics. *Int. J. Cancer*, 1995; 60: 345-9.
24. McLaughlin J.K., Blot W.J., Devesa S.S., Fraumeni J.F. Jr. Renal Cancer. In: Schottenfeld D., Fraumeni J.F. Jr, eds. *Cancer epidemiology and prevention*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, 1996: 1142-1153.
25. Wolk A., Gridley G., Niwa S., Lindblad P., McCredie M., Mellempgaard A., et al. International renal cell cancer study. VII. Role of diet. *Int. J. Cancer*, 1996; 65: 67-73.

26. Mellempgaard A., McLaughlin J.K., Overvad K., Olsen J.H. Dietary risk factors for renal cell carcinoma in Denmark. *Eur. J. Cancer*, 1996; 32A: 673-82.
27. Tavani A., La Vecchia C. Epidemiology of renal-cell carcinoma. *J. Nephrol*, 1997; 10: 93-106.
28. Godley P.A., Escobar M.A. Renal cell carcinoma. *Curr. Opin. Oncol.*, 1998; 10: 261-5.
29. McLaughlin J.K., Chow W.H., Mandel J.S., Mellempgaard A., McCredie M., Lindblad P., et al. International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension. *Int. J. Cancer*, 1995; 63: 216-21.
30. Yuan J.M., Castelao J.E., Gago-Dominguez M., Ross R.K., Yu M.C. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 1998; 77: 1508-13.
31. Mandel J.S., McLaughlin J.K., Schlehofer B., Mellempgaard A., Helmert U., Lindblad P., et al. International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int. J. Cancer*, 1995; 61: 601-5.
32. Boffetta P., Jourenkova N., Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, 1997; 8: 444-72.
33. Mellempgaard A., Engholm G., McLaughlin J.K., Olsen J.H. Occupational risk factors for renal-cell carcinoma in Denmark. *Scand. J. Work Environ. Health*, 1994; 20: 160-5.

34. Hanash K.A., Aquilina J.W., Barrett D.M., Blute M.L., Cockett A.T.K., Corica F.A., et al. Clinical research priorities in renal cell carcinoma: renal cell carcinoma chemoprevention strategies including target populations, proposed agents, and clinical trial designs. Workgroup n° 6. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 999-1001.
35. Ishikawa I., Kovacs G. High incidence of papillary renal cell tumours in patients on chronic haemodialysis. *Histopathology*, 1993; 22: 135-9.
36. Washecka R., Hanna M. Malignant renal tumors in tuberous sclerosis. *Urology*, 1991; 37: 340-3.
37. Thoenes W., Störkel S., Rumpel H.J. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol. Res. Pract.*; 1986, 181: 125-43.
38. Störkel S., Eble J.N., Adlakha K., Amin M., Blute M.L., Bostwick D.G., et al. Classification of renal cell carcinoma. Workgroup n° 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 987-989.
39. Gelb, A.B. Renal cell carcinoma: current prognostic factors. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 981-6.

40. Motzer R.J., Bander N.H., Nanus D.M. Renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 1996; 335: 865-75.
41. Long G.D. Renal cell carcinoma. *Curr.Opin. Oncol.*, 1997; 9: 301-6.
42. Robson C.J., Churchill B.M., Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 1969; 101: 297-301.
43. Sobin L.H., Wittekind Ch., editions. International Union Against Cancer (U.I.C.C). TNM classification of malignant tumors. 5th ed. New York: 1997: 180-182.
44. Fleming I.D., et al., editions. American Joint Committee on Cancer (A.J.C.C.). A.J.C.C. manual for staging of cancer. Philadelphia: JB Lippincott. In press.
45. Guinan P., Sobin L.H., Algaba F., Badellino F., Kameyama S., MacLennan G., et al. TNM staging of renal cell carcinoma. Workgroup n° 3. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 992-3.
46. Takashi M., Nakano Y., Sakata T., Miyake K., Hamajima N. Multivariate evaluation of prognostic determinants for renal cell carcinoma. *Urol. Int.*, 1993; 50: 6-12.
47. Behars O.H., Henson D.E., Hutter R.V.P., Kennedy B.J. Handbook for staging of cancer: from the manual for staging of cancer. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1993.
48. Gelb A.B., Shibuya R.B., Weiss L.M., Medeiros L.J. Stage I renal cell carcinoma. A clinicopathologic study of 82 cases. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1993, 17: 275-86.

49. Guinan P.D., Vogelzang N.J., Fremgen A.M., Chmiel J.S., Sylvester J.L., Sener S.F., et al. Renal cell carcinoma: tumor size, stage and survival. Members of the Cancer Incidence and End Results Committee. *J. Urol.*, 1995; 153: 901-3.
50. Hermanek P., Schrott K.M. Evaluation of the new tumor, nodes and metastases classification of renal cell carcinoma. *J. Urol.* 1990; 144: 238-41; discussion: 241-2.
51. Takashi M., Nakano Y., Sakata T., Miyake K., Hamajima N. Multivariate evaluation of prognostic determinants for renal cell carcinoma. *Urol. Int.*, 1993; 50: 6-12.
52. Gilberti C., Oneto F., Martorana G., Rovida S., Carmignani G. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors on a series of 328 cases. *Eur. Urol.*, 1997; 31: 40-8.
53. Skinner D.G., Colvin R.B., Vermillion C.D., Pfister R.C., Leadbetter W.F. Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*, 1971; 28: 1165-77.
54. Masuda H., Kurita Y., Suzuki A., Kanbayashi T., Suzuki K., Fujita K. Prognostic factors for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 320 cases. *Int. J. Urol.*, 1997; 4: 247-53.
55. Ritchie A.W., Chisholm G.D. The natural history of renal carcinoma. *Semin. Oncol.*, 1983; 10: 390-400.
56. Rabinovitch R.A., Zelefsky M.J., Gaynor J.J., Fuks Z. Patterns of failure following surgical resection of renal cell carcinoma: implications for adjuvant local and systemic therapy. *J. Clin. Oncol.*, 1994; 12: 206-12.

57. Sandock D.S., Seftel A.D., Resnick M.I. A new protocol for the followup of renal cell carcinoma based on pathological stage. *J. Urol.*, 1995; 154: 28-31.
58. Green L.K., Ayala A.G., Ro J.Y., Swanson D.A., Grignon D.J., Giacco G.G., et al. Role of nuclear grading in stage I renal cell carcinoma. *Urology*, 1989; 34: 310-315.
59. Goldstein N.S. The current state of renal cell carcinoma grading. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 977 –80.
60. Hand J.R., Broders A. Carcinoma of kidney: the degree of malignancy in relation to factors bearing on prognosis. *J. Urol.*, 1932; 28: 199-216.
61. Fuhrman S.A., Lasky L.C., Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1982; 6: 655-63.
62. Medeiros L.J., Gelb A.B., Weis L.M. Renal cell carcinoma. Prognostic significance of morphologic parameters in 121 cases. *Cancer*, 1988; 61: 1639-51.
63. Medeiros L.J., Jones E.C., Aizawa S., Aldape H.C., Cheville J.C., Goldstein N.S. et al. Grading of renal cell carcinoma. Workgroup n° 2. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 977 –80. *Cancer*, 1997; 82: 990-1.
64. Srigley J.R., Hutter R.V., Gelb A.B., Henson D.E., Kenney G., King B.F., et al. Current prognostic factors-renal cell carcinoma. Workgroup n° 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 994-6.

65. Mydlo J.H. Bard R.H. Analysis of papillary renal adenocarcinoma. *Urology*, 1987; 30: 529-34.
66. Thoenes W., Störkel S., Rumpelt H.J., Moll R., Baum H.P. Werner S. Chromophobe cell renal carcinoma and its variants, a report on 32 cases. *J. Pathol.*, 1988; 155: 277-87.
67. Weiss L.M., Gelb A.B., Medeiros L.J. Adult renal epithelial neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1995; 103: 624-35.
68. Fleming S., Lewi HJ. Collecting duct carcinoma of the kidney. *Histopathology*, 1986; 10: 1131-41.
69. Tomera K.M., Farrow G.M., Lieber M.M. Sarcomatoid renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 1983; 130:657-9.
70. Baer S.C., Ro J.Y., Ordonez N.G., Maiese R.L., Loose J.H., Grignon DJ., et al. Sarcomatoid collecting duct carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases. *Hum. Pathol.*, 1993; 24: 1017-22.
71. Delahunt B., Becker R.L., Bethwaite P.B., Ribas J.L. Computerized nuclear morphometry and survival in renal cell carcinoma: comparison with other prognostic indicators. *Pathology*, 1994; 26: 353-8.
72. Monge J.M., Val-Bernal J.F., Buelta L., García-Castrillo L., Asensio L. Selective nuclear morphometry as a prognostic factor of survival in renal cell carcinoma. *Histol. Histopathol.*, 1999; 14: 119-23.
73. ASCO Tumor marker expert panel. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1996; 14: 2843-2877.

74. Lanigan D., McLean P.A., Murphy D.M., Donovan M.G., Curran B., Leader M. Ploidy and prognosis in renal carcinoma. *Br. J. Urol.*, 1993; 71: 21-4.
75. Flint A., Grossman H.B., Liebert M., Lloyd R.V., Bromberg J. DNA and PCNA content of renal cell carcinoma and prognosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1995; 103: 14-9.
76. Gelb A.B., Sudilovsky D., Wu C.D., Weiss L.M., Medeiros L.J. Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content, and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer*, 1997; 80: 1768-75.
77. Eskelinen M., Lipponen P., Nordling S. Prognostic evaluation of DNA flow cytometry and histo-morphological criteria in renal cell carcinoma. *Anticancer Res.*, 1995; 15: 2279-83.
78. Larsson P., Roos G., Stenling R., Ljungberg B. Tumor-cell proliferation and prognosis in renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 1993; 21: 566-70.
79. Tannapfel A., Hahn H.A., Katalinic A., Fietkau R.J., Kuhn R., Wittekind C.W. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. *Cancer*, 1996; 77: 164-71.
80. de Riese W.T., Crabtree W.N., Allhoff E.P., Werner M., Liedke S., Lenis G., et al. Prognostic significance of Ki-67 immunostaining in nonmetastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 1993; 11: 1804-8.
81. Jochum W., Schroder S., al-Taha R., August C., Gross A.J., Berger J. et al. Prognostic significance of nuclear DNA content and proliferative activity in renal

- cell carcinomas. A clinicopathologic study of 58 patients using mitotic count, MIB-1 staining, and DNA cytophotometry. *Cancer*, 1996; 77: 514-21.
82. Tannapfel A., Hahn H.A., Katalinic A., Fietkau R.J., Kuhn R., Wittekind C.W. Incidence of apoptosis, cell proliferation and p53 expression in renal cell carcinomas. *Anticancer Res.*, 1997; 17: 1155-62.
83. Aaltomaa S., Lipponen P., Ala-Opas M., Eskelinen M., Syrjanen K. Prognostic value of Ki-67 expression in renal cell carcinomas. *Eur. Urol.*, 1997; 31: 350-5.
84. Yokogi H. Flow cytometric quantitation of the proliferation-associated nuclear antigen p105 and DNA content in patients with renal cell carcinoma. *Cancer*, 1996; 78: 819-26.
85. Bot F.J., Godschalk J.C., Krishnadath K.K., van der Kwast T.H., Bosman F.T. Prognostic factors in renal-cell carcinoma: immunohistochemical detection of p53 protein versus clinico-pathological parameters. *Int. J. Cancer*, 1994; 57: 634-7.
86. Imai Y., Strohmeyer T.G., Fleischhacker M., Slamon D.J., Koeffler H.P. p53 mutations and MDM-2 amplification in renal cell cancers. *Mod. Pathol.*, 1994; 7: 766-70.
87. Shalitin C., Epelbaum R., Moskovitz B., Segal R., Valansi C., Werner M., et al. Increased levels of 21-kDa protein in the circulation of tumor-bearing patients. *Cancer Detect. Prev.*, 1994; 18: 357-65.
88. Yoshimo S., Kato M., Okada K. Prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.*, 1995; 2: 156-60.

89. Yoshino S., Kato M., Okada K. Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.*, 1998; 5: 119-23.
90. Mac Lennan G.T. Bostwick D.G. Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. *Urology*, 1995; 46: 27-30.
91. Swanson D.A., Rothenberg H.J., Boynton A.L., Consigliere D., Halling K.C., Oda H., et al. Future prognostic factors for renal cell carcinoma. Workgroup n° 5. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 1997; 80: 997-998.
92. Moch H., Presti J., Sauter G., Buchholz N., Jordan P., Mihatsch M.J., Waldman F. M. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 1996; 56: 27-30.
93. Wu S.Q., Hafez G.R., Xing W., Newton M., Chen X.R., Messing E. The correlation between the loss of chromosome 14q with histologic tumor grade, pathologic stage, and outcome of patients with nonpapillary renal cell carcinoma. *Cancer*, 1996; 77: 1154-60.
94. Wilhelm V., Burget P., Kenck C., Staehler G., Kovacs G. Terminal deletion of chromosome 3p sequences in nonpapillary renal cell carcinomas: a breakpoint cluster between loci D3S1285 and D3S1603. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5383-5.

95. Druck T., Kastury K., Hadaczek P., Podolski J., Toloczko A., Sikorski A., et al. Loss of heterozygosity at the familial RCC t(3;8) locus in most clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5348-53.
96. Zbar B., Brauch H., Talmadge C., Linehan M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*, 1987; 327: 721-4.
97. Maher E.R., Yates J.R. Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects. *Br. J. Cancer*, 1991; 63: 176-9.
98. Latif F., Tory K., Gnarr J., Yao M., Duh F.M., Orcutt M.L., et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 1993; 260: 1317-20.
99. Chen F., Kishida T., Duh F.M., Renbaum P., Orcutt M.L., Schmidt L., Zbar B. Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res.*, 1995; 55: 4804-7.
100. Foster K., Prowse A., van den Berg A., Fleming S., Hulsbeek M.M., Crossey P.A., et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* , 1994; 3: 2169-73.
101. Herman J.G., Latif F., Weng Y., Lerman M.I., Zbar B., Liu S., et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 9700-4.
102. Shirdhar V., Rivard S., Shirdhar R., Mullins C., Bostick L., Sakr W., et al. A gene from human chromosomal band 3p21.1 encodes a highly conserved arginine-rich protein and is mutated in renal cell carcinomas. *Oncogene*, 1996; 12: 1931-9.

103. Thrash-Bingham C.A., Salazar H., Freed J., Greenberg R.E., Tartof K.D. Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer Res.*, 1995; 55: 6189-95.
104. Nobori T., Miura K., Wu D.J., Lois A., Takabayashi K., Carson D.A. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994; 368: 753-6.
105. Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harshman K., Tavitigian S.V., et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994; 264: 436-40.
106. Cairns P., Mao L., Merlo A., Lee D.J., Schwab D., Eby Y., et al. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science*, 1994; 265: 415-7.
107. Goldstein A.M., Dracopoli N.C., Engelstein M., Fraser M.C., Clark W.H.Jr, Tucker M.A. Linkage of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet*, 1994; 54: 489-96.
108. MacGeoch C., Bishop J.A., Bataille V., Bishop D.T., Frischauf A.M., Meloni R., et al. Genetic heterogeneity in familial malignant melanoma. *Hum. Mol. Genet.*, 1994; 3: 2195-200.
109. Liggett W.H., Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1998; 16: 1197-1206.
110. Serrano M., Hannon G.J., Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993; 366: 704-7.

111. Mao L., Merlo A., Bedi G., Shapiro G.I., Edwards C.D., Rollins B.J., et al. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res.*, 1995; 55: 2995-7.
112. Liggett W.H. Jr., Sewell D.A., Rocco J., Ahrendt S.A., Koch W., Sidransky D. p16 and p16 β are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.*, 1996; 56: 4119-4123.
113. Quelle D.E., Zindy F., Ashmun R.A., Sherr C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 1995; 83: 993-1000.
114. Hannon G.J., Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994; 371: 257-261.
115. Muñoz A. Cáncer. Genes y nuevas terapias, ed. Hélice, capítulo 4; 1997.
116. Sherr C.J. Cancer cell cycles. *Science*, 1996; 274: 1672-1677.
117. Knudson A.G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971; 68: 820-823.
118. Wang T.C., Cardiff R.D., Zukerberg L., Lees E., Arnold A., Schmidt E.V. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*, 1994; 369: 699-671.
119. Sicinski P., Donaher J.L., Parker S.B., Li T., Fazeli A., Gardner H., et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*, 1995; 82: 621-630.

120. Costello J.F., Plass C., Arap W., Chapman V.M., Held W.A., Berger M.S., et al. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res.*, 1997; 57: 1250-1254.
121. Zuo L., Weger J., Yang Q., Goldstein A.M., Tucker M.A., Walker G.J., et al. Germline mutations in the p16^{INK4a} binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat. Genet.*, 1996; 12: 97-99.
122. Cairns P., Polascik T.J., Eby Y., Tokino K., Califano J., Merlo A., et al. Frequency of homozygous deletion at *p16/CDKN2* in primary human tumors. *Nature Genet.*, 1995; 11: 210-212.
123. Stone S., Dayananth P., Jiang P., Weaver-Feldhaus J.M., Tavtigian S.V., Cannon-Albright L., et al. Genomic structure, expression and mutational analysis of the p15 (MTS2) gene. *Oncogene*, 1995; 11: 987-991.
124. Jen J., Harper J.W., Bigner S.H., Bigner D.D., Papadopoulos N., Markowitz S., et al. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer*, 1994; 54: 6353-6358.
125. Cheng J.Q., Jhanwar S.C., Klein W.M., Bell D.W., Lee W.C., Altomare D.A., et al. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res.*, 1994; 54: 5547-5551.
126. Hebert J., Cayuela J.M., Berkeley J., Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16^{INK4a}) and MTS2 (p15^{INK4b}) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood*, 1994; 84: 4038-4044.

127. Ohta M., Nagai H., Shimizu M., Rasio D., Berd D., Mastranfgelo M., et al. Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, *CDK4I*, in melanoma. *Cancer Res.*, 1994; 54: 5269-5272.
128. Schultz D.C., Vanderveer L., Buetow K.H., Boente M.P., Ozols R.F., Hamilton T.C., et al. Characterization of chromosome 9 in human ovarian neoplasia identifies frequent genetic imbalance of 9q and rare alterations involving 9p including *CDKN2*. *Cancer Res.*, 1995; 55: 2150-2157.
129. Maelandsmo G.M., Berner J.M., Florenes V.A., Forus A., Hoving E., Fodstad O., et al. Homozygous deletion frequency and expression levels of the *CDKN2* gene in human sarcomas. Relationship to amplification and mRNA levels of *CDK4* and *CCND1*. *Br. J. Cancer*, 1995; 72: 393-398.
130. Reed A.L., Califano J. Cairns P., Westra W.H., Jones R.M., Koch W., et al. High frequency of *p16* (*CDKN2/MTS-1/INK4A*) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 1996; 56: 3630-3633.
131. Mori T., Miura K., Aoki T., Nishihira T., Mori S., Nakamura Y. Frequent somatic mutation of the *MTS1/CDK4I* (multiple tumor supressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 1994; 54: 3396-3397.
132. Maesawa C., Tamura G., Nishizuka S., Ogasawara S., Ishida K., Terashima M., et al. Inactivation of the *CDKN2* gene by homozygous deletion and the novo methylation is associated with advanced stage esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 1996; 56: 3875-3878.

133. Caldas C., Hahn S.A., da Costa L.T., Redston M.S., Schutte M., Seymour A.B., et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the *p16* (*MTS-1*) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat. Genet.*, 1994; 8: 27-32.
134. Shapiro G.I., Edwards C.D., Kobzik L., Glodleski J., Richards W., Sugarbaker D.J., et al. Reciprocal Rb inactivation and *p16^{INK4a}* expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res.*, 1995; 55: 505-509.
135. Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, 1992; 70: 5-8.
136. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*, 1998; 53: 3-4.
137. Antequera F., Bird A. In "DNA methylation: molecular biology and biological significance. J.P. Jost and H.P. Salud Eds., pp, 169-185. Basel, Birkhauser Verlag.
138. Antequera F., Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.. USA*, 1993; 90: 11995-11999.
139. Baylin S.B., Makos M., Wu J.J., Yen R.W., de Bustros A., Vertino P. et al. Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progresion. *Cancer Cells*, 1991; 3: 383-390.
140. Holliday R., Jeggo P.A. Mechanism for changing gene expression and their possible relationship to carcinogenesis. *Cancer Surv.*, 1985; 4: 557-581.
141. Holliday R. DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1990; 326: 329-338.
142. Kashiwabara K., Oyama T., Sano T., Fukuda T., Nakajima T. Correlation between methylation status of the *p16/CDKN2* gene and the expression of *p16* and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int. J. Cancer*, 1998; 79: 215-220.

143. Sakai T., Toguchida J., Ohtani N., Yandell D.W., Rapaport J.M., Dryja T.P. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991; 48: 880-888.
144. Costello J.F., Berger M.S., Huang H.J.S., Cavenee W.K. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res.*, 1996; 56: 2405-2410.
145. Gonzalez-Zulueta M., Bender C.M., Yang A.S., Nguyen T., Beart R.W., Van Tornout J.M., et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.*, 1995; 55: 4531-4535.
146. Herman J.G., Merlo A., Mao L., Lapidus R.G., Issa J.P., Davidson N.E., et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.*, 1995; 55: 4525-4530.
147. Merlo A., Herman J.g., Mao L., Lee D.J., Gabrielson E., Burger P.C., et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.*, 1995; 1: 686-692.
148. Kim S.K., Ro J.Y., Kemp B.L., Lee J.S., Kwon T.J., Wong K.M., et al. Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Can. Res.*, 1997; 57: 400-403.
149. Herman J.G, Graff J.R, Myöhänen S, Nelkin B.D, Baylin S.B. Methylation specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93:9821-9826.

150. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic. Acids. Research*, 1994; 22: 2990-2997.
151. Thrash-Bingham C.A., Greenberg R.E., Howard S., Bruzel A., Bremer G., Goll A., et al. Comprehensive allelotyping of human renal cell carcinomas using microsatellite DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995; 92:2854-2858
152. Okamoto A., Demetrick D.J., Spillare E.A., Hagiwara K., Hussain S.P., Bennett W.P., Forrester K., et al. Mutations and altered expression of p16^{INK4} in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91: 11045-11049.
153. Spruck C.H., Gonzalez-Zulueta M., Shibata A., Simoneau A.R., Lin M., Gonzales F. et al. *p16* gene in uncultured tumours, 1994; *Nature*, 370: 183-184.
154. Xu L., SgROI D., Sterner C.J., Beauchamp R.L., Pinney D.M., Keel S. Et al. Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/p16ink4) in human breast carcinomas, 1994; *Cancer Res.*, 54: 5262-5264.
155. Cairns P., Tokino K., Eby Y. And Sidransky. Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.*, 1995; 55: 224-227.
156. Schullerus D, Herbers J, Chudek J, Kanamaru H, Kovacs G. Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p, and 14q is associated with stage and grade of non-papillary renal cell carcinomas. *J Pathol.*, 1997; 183:151-5.
157. Schraml P, Muller D, Bednar R, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. J Allelic loss at the D9S171 locus on chromosome 9p13 is associated with progression of papillary renal cell carcinoma. *J. Pathol.*, 2000; 190:457-61.

158. Kinoshita H, Yamada H, Ogawa O, Kakehi Y, Osaka M, Nakamura E., et al. Contribution of chromosome 9p21-22 deletion to the progression of human renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 1995; 86: 795-9.
159. Schraml P, Struckmann K, Bednar R, Fu W, Gasser T, Wilber K, et al. CDKN2A mutation analysis, protein expression, and deletion mapping of chromosome 9p in conventional clear-cell renal carcinomas: evidence for a second tumor suppressor gene proximal to CDKN2A. *Am J Pathol.*, 2001; 158: 593-601.
160. Fogt F, Zhuang Z, Linehan WM, Merino MJ. Collecting duct carcinomas of the kidney: a comparative loss of heterozygosity study with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.*, 1998; 5: 923-6.
161. Gonzalez M.V., Pello M.F., López-Larrea C., Suárez C., Menéndez M.J. and Coto E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and Neck, 1995; *Clin. Cancer Res.*, 1: 1043-1049.
162. Jares P., Fernández P.L., Nadal A., Cazorla M., Hernández L., Pinyol M., et al. p16^{MTS1/CDK4I} mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of larynx, 1997; *Oncogene*, 15:1445-1453.
163. Uchida T., Wada C., Wang C., Egawa S., Ohtani H. and Koshiba K. Genomic instability of microsatellite repeats and mutations of H-, K-, and N-ras, and p53 genes in renal cell carcinoma, 1994; *Cancer Res.*, 54: 3682-3685.

164. Song S.H., Jong H.S., Choi H.H., Kang S.H., Ryu M.H., Kim N.K. et al. methylation os specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16 (INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 2000; 87: 236-40.
165. Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Manges R, Germa JR, Herman JG, Capella G, Peinado MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol.*, 2001; 19: 299-304.
166. Xing E.P., Nie Y., Song Y., Yang G.Y., Cai Y.C., Wang L.D., et al. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 2704-13.
167. Jin M., Piao Z., Kim NG., Park C., Shin EC., Park J.H., et al. p16 is a major target in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2000; 89: 60-8.
168. Lo K., Cheung S., Leung S., Hasselt A., Tsang Y., Mak K., et al. Hypermethylation of the p16 gene en nasofharyngeal carcinoma. *Cancer Res.*, 1996; 56: 2721-2725.
169. González M.V., Pello M.F., López-Larrea C., Suárez C., Menéndez M.J. and Coto E. Deletion and methylation of the tumour suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 1997; 50: 509-512.
170. Gonzalgo M.L., Bender C.M., You E.W., Glendening M., Flores J.F., Walker G.J. et al. Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res.*, 1997; 57: 5336-5347.

171. Salvensen H.B., Das S., Akslen L.A. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinoma with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 153-9.
172. Ahrendt S., Chow J., Xu L., Yang S., Eisenberger C., Esteller M., et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J. Nat. Can. Inst.*, 1999; 91: 332-339.
173. Esteller M., Sánchez-Céspedes M., Rosell R., Sidransky D., Baylin S., Herman J. Deletion of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.*, 1999; 59: 67-70.
174. Belinsky S., Nikula K., Palmisano W., Michels R., Saccomanno G., Gabrielson E. et al. Aberrant methylation of p16 INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998; 95: 11892-11986.
175. Gorgoulis V., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Kyroudy A., Veslemes M., et al. Alterations of the p16-Rb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas. *Am. J. Path.*, 1998; 153: 1749-1765.
176. Tanaka H., Fujii Y., Hirabayashi H., Miyoshi S., Sakaguchi M., Yoon H., et al. disruption of the Rb pathway and cell-proliferative activity in non-small cell lung cancers. *Int. J. Cancer*; 1998; 79: 111-115.
177. Kovacs G. The value of molecular genetic analysis in the diagnosis and prognosis of renal cell tumours. *World J. Urol*, 1994; 12: 64-68.

178. Ahuja N., Mohan A.L., Li Q., Stolker J.M., Herman J.G., Hamilton S.R., et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 1997; 57: 3370-3374.
179. Puduvalli VK, Kyritsis AP, Hess KR, Bondy ML, Fuller GN, Kouraklis GP, Levin VA, Bruner JM. Patterns of expression of Rb and p16 in astrocytic gliomas, and correlation with survival. *Int J Oncol*, 2000; 17: 963-9.
180. Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol*, 1999; 188: 351-60.
181. Sui L, Dong Y, Ohno M, Goto M, Inohara T, Sugimoto K, Tai Y, Hando T, Tokuda M. Inverse expression of Cdk4 and p16 in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, 2000; 79: 230-7.
182. Kusume T, Tsuda H, Kawabata M, Inoue T, Umesaki N, Suzuki T, Yamamoto K. The p16-cyclin D1/CDK4-pRb pathway and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.*, 1999; 5: 4152-7.
183. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 1845-53.
184. Hui A.M., Shi YZ., Li X., Takayama T., Makuuchi M. Loss of p16 (INK4) protein, alone and together with loss of retinoblastoma protein, correlate with hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Lett.*, 2000; 154: 93-9.

185. Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I et al. Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer.
186. Gerardts J., Hruban RH., Schutte M., Kern SE., Maynard R. Immunohistochemical p16INK4a analysis of archival tumors with deletion, hypermethylation, or mutation of CDKN2/MTS1 gene. A comparison of four commercial antibodies. Appl. Immunohistochem. Molecul. Morphol., 2000; 8: 71-9.
187. Taga S., Osaki T., Ohgami A., Imoto H., Yoshimatsu T., Yoshino I et al. Prognostic value of immunohistochemical detection of p16 INK4 expression in nonsmall cell lung carcinoma. cancer, 1997; 80: 389-395.
188. Marchini S., Codegoni A.M., Bonazzi C., Chiari S., and Brogгинi. Absence of deletions but frequent loss of expression of p16 INK4 in human ovarian tumours. British J. Cancer, 1997; 76: 146-149.
189. Betticher C., White G., Vonlanthen S., Liu X., Kappeler A., Altermatt H., et al. G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small cell lung cancer. Int. J. Cancer, 1997; 74: 556-562.
190. Nishida N., Fukuda Y., Ishizaki K., Nakao K. Alteration of cell cycle-related genes in hepatocarcinogenesis. Histol. Histopathol., 1997; 12: 1019-1025.
191. Marchetti A., Buttitta F., Pellegrini S., Bertacca G., Chella A., Carnicelli V. Et al. alterations of p16 (MTS1) in node-positive non-small cell lung carcinomas. Journal of Pathology, 1997; 181: 178-182.

ABREVIATURAS

- ACS: Sociedad Americana del Cáncer
- CCRF: Carcinoma de células Claras Renales Familiar
- CCR: Carcinoma de Células Renales
- VHL: Von Hippel-Lindau
- UICC: Union Internationale Contre le Cancer
- AJCC: American Joint Committee on Cancer
- PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
- FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico
- VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vasculare
- LOH: Pérdida de Heterocigosidad
- MTS-1: Major Tumor Suppressor
- *INK4a*: Inhibidor de Quinasas 4a dependientes de Ciclinas
- *CDKN2A*: Inhibidor 2A de Quinasas dependientes de Ciclina
- *CDK4I*: Inhibidor de Quinasas 4 dependientes de Ciclina
- TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante
- PK: Proteína Quinasas
- CDKs: Quinasas dependientes de Ciclinas
- Rb: Retinoblastoma
- PAAF: Punción-Aspiración con Aguja Fina
- SDS: Dodecil Sulfato Sódico
- UV: Ultravioleta

- PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa
- DNTPs: Nucleótidos
- TBE: Tris - Bórico - EDTA
- Temed: N,N,N',N'-Tetrametil-Etilendiamina
- DAB: Diaminobencidina
- DE: Desviación Estándar
- RIQ: Intercuartílico
- OR: Odds Ratio
- ANOVA: Análisis de la Varianza
- SG: Supervivencia Global
- SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad
- RR: Riesgo Relativo
- IC 95%: Intervalos de Confianza del 95%