

ESTUDIO DE LAS NEOPLASIAS VESICALES MEDIANTE MARCADORES

M.A. Torregrosa, I. Bonet, V.J. Götzens, A. Tejado

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona

RESUMEN

Se analiza el valor de la inmunohistoquímica como técnica complementaria en el estadiaje de los carcinomas transicionales de vejiga.

Se determina la presencia y distribución de CEA, HCG y laminina en cortes histológicos de tumores de diferentes grados y estadios en el momento del diagnóstico.

El estudio estadístico indicará el tipo de relación entre estos marcadores y la evolución del tumor.

La presencia de CEA y HCG se correlaciona con el grado histológico de la neoplasia mientras que el grado de infiltración solo se correlaciona con la presencia de CEA en el tejido. La HCG sería, además, un indicativo de la recidiva posterior.

Por lo que respecta a la laminina, su grado de estructuración en una membrana subepitelial continua indica el grado de invasividad del tumor.

En los casos en los que la anatomía patológica del carcinoma transicional

no ofrezca una idea clara de su comportamiento posterior, el estudio combinado de varios determinantes antigénicos relacionados con otros parámetros ya aceptados como criterios de malignidad, permite caracterizar con más detalle el comportamiento biológico de cada uno de los tumores uroteliales.

SUMMARY

The value of immunohistochemistry as a complementary technique in the staging of the urinary bladder's transitional cell carcinoma is analyzed.

The presence and distribution of CEA, HCG and laminin in histologic sections from tumours of different grades and stages at the time of diagnosis are studied.

A statistical study shows the correlation between the presence of these markers with the tumour's evolution.

The existence of CEA and HCG is re-

lated to the histologic grade of the neoplasm, while the infiltration grade is only related to the presence of CEA in the tissue. The HCG is an indicator of future recurrence of the disease.

The lamina's degree of structuration in a continuous subepithelial membrane shows the tumour's grade of invasion.

Therefore, in cases in which the histology of the transitional carcinoma does not give a clear idea of its development, the combined study of several antigenic determinants in relation to other accepted criteria of malignancy, enables to characterize the biological behaviour of the urothelial tumours.

INTRODUCCION

El carcinoma transicional representa más del 90% del total de las neoplasias vesicales. La subclasificación y estadiaje de estos tumores depende de varios parámetros tales como su configuración o no en papilas, grado de invasión y alteraciones citológicas (Brodsky, 1992). Este último es uno de los factores más importantes que permite identificar a los pacientes con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad (Lützefer et. al., 1982).

Está en discusión el valor de los diferentes criterios diagnósticos al intentar ajustarlos al máximo al pronóstico de cada uno de los pacientes. Este problema es mayor en los tumores papilares de bajo grado debido, en parte, a que el urotelio puede mostrar un espectro continuo de cambios proliferativos que van desde la hiperplasia urotelial simple sin atipia citológica hasta el car-

cinoma (Murphy y Soloway, 1982). Este hecho genera diferencias considerables de opinión en el momento de establecer la categoría y grado de las neoplasias papilares.

El establecimiento del grado histológico de un tumor urotelial no está exento de subjetividad (Helander et. al., 1984) con muy escaso valor predictivo de su evolución en los grados intermedios (Jordan et. al., 1987).

La utilización de técnicas complementarias, cada una de ellas con sus inconvenientes particulares, ayudan a incrementar el valor pronóstico del grado histológico. Como ejemplos pueden citarse la determinación del área nuclear (Helander et. al., 1984), volumen nuclear (Nielsen et. al., 1986), uso de técnicas de citometría de flujo (Gustafson et. al., 1982) y estudios de la distribución de los antígenos de superficie ABO (Javadpour, 1982).

La mayoría de las células que constituyen un tumor presentan algún grado determinado de detención en una u otra fase de su línea de citodiferenciación. Esto confiere al tumor una cierta homogeneidad en su estado de madurez celular lo que permite clasificar a los tumores con un grado común (Lainer, 1981).

En el presente estudio, se utiliza una batería de determinantes antigénicos (CEA, HCG y lamina) que permitan precisar mejor el comportamiento biológico de los tumores uroteliales en el momento del diagnóstico.

MATERIAL Y METODOS

Se utiliza material de biopsia de pacientes intervenidos de tumor vesical

desde 1980 a 1989 en el Servicio de Urología del Hospital de la Cruz Roja de Barcelona. En todos los casos se siguió la pauta siguiente:

- Diagnóstico clínico
- Resección transuretral
- Diagnóstico anatomopatológico
- Seguimiento mediante cistoscopias.

Inmunohistoquímica

Piezas fijadas en formol e incluidas en parafina se procesan según el método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) en tres estratos según la técnica descrita por Strenberger (1986). Antes de las incubaciones con los anticuerpos, los cortes se tratan con tripsina (0.1% en PBS 10' a 37° C). Posteriormente se inhibe la peroxidasa endógena con H2O2 al 0.3% en metanol (5' a temperatura ambiente).

Las incubaciones con los anticuerpos se realizan a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Para CEA y HCG se utiliza una batería comercial DAKO PAP KIT SYSTEM 20. Para la laminina se utiliza un anticuerpo monoclonal antilaminina humana obtenido en rata (Miles) a una dilución 1:50 en PBS.

El tiempo de las incubaciones es de 1 h. Se revela con DAB (0.05% en PBS con 0.01% de H2O2 15'). Se contrasta con hematoxilina y los cortes se montan en DPX.

Como controles negativos se sustituye el anticuerpo primario por suero no inmune.

RESULTADOS

Se han estudiado 38 tumores vesica-

les (6 GI; 17 GII; 13GIII y 2 indiferenciados). Como controles se estudia urotelio normal obtenido mediante cistoscopia de vejigas no neoplásicas.

Ninguna de las muestras control presentó positividad para CEA ni para HCG mientras que la laminina aparece organizada en una lámina continua subepitelial y alrededor de los vasos.

CEA

Las células positivas al CEA presentan un patrón de citoplasma y tienden a localizarse agrupadas.

Se han observado un total de 20 tumores positivos y 8 con reactividad focal distribuidos de la siguiente manera:

- Según el grado anatomopatológico: GI 0 casos; GII 9(+) y 5(+/-); GIII 9(+) y 3(+/-); indiferenciados 2(+). El estudio de la X2 demuestra diferencias significativas ($X^2=22.069$; g.l.=6; $p<0.01$) que permiten relacionar la presencia de CEA con un mayor grado de malignidad. El mismo estudio estadístico no puede otorgar validez a la reactividad focal (+/-).
- Según la infiltración en el momento del diagnóstico: limitados a mucosa (2(+), 1(+/-) y 2(-)); infiltrando lámina propia (1(+), 6(+/-) y 1(-)); afectando muscular (3(+) y 1(-)) y con invasión perivesical o metástasis a distancia (5(+)). Existe una correlación estadística entre la expresión de CEA y el grado de infiltración ($X^2=22.562$; g.l.=6; $p<0.001$).
- Según la recidiva posterior: 12 casos no recidivaron (8(+), 13(+/-) y



Figura 1
Inmunohistoquímica. CEA: La reactividad al CEA presenta un patrón citoplasmático en grupos de células con un alto grado de anaplasia distribuidos al azar en el seno del tumor. (X 90).

1(-)) y 9 recidivaron en controles posteriores (4(+), 2(+/-) y 6 (-)). No se demuestra correlación estadística en este apartado.

HCG

Las células positivas pueden encontrarse en la parte más superficial del epitelio neoplásico o bien en la interfase entre el estroma y el tumor o también adosadas a la pared de vasos sanguíneos. Estas células tienden a encontrarse aisladas y presentan un núcleo único o múltiple de gran tamaño con citoplasma amplio, de forma ovoide pudiendo presentar prolongaciones dendríticas. La morfología de estas células remeda, en ocasiones, a la de las células sincitiales placentarias. Todos los casos positivos para la HCG lo fueron también para el CEA y la distribución es la siguiente:

- a) Según grado histopatológico: GI 0 casos; GII 5(+/-); GIII 2(+) y 4(+/-); indiferenciados 2(+). El test de la X^2 ($X^2=23.053$; g.l.=6; $p<0.001$) revela una correlación entre la presencia de células positivas a la HCG y el grado histológico.
- b) Según el grado de infiltración: de 11 tumores limitados a mucosa solo 1 presentó reactividad focal. De los 19 afectando lámina propia (1(+) y 6(+/-)). 3 tumores invadían muscular (1(+) y 1(+/-)). Los casos con afectación perivesical o metástasis fueron 2(+), 2(-) y 1(+/-). La X^2 no permite relacionar la HCG con el grado de infiltración.
- c) Según la recidiva posterior: los 12 casos que no recidivaron fueron (-). De los 12 que presentaron recidiva 2(+)

y 3(+/-). Hay una relación entre la presencia de HCG y la recidiva posterior ($X^2=6.316$; g.l.=2; $p<0.05$).

Laminina

A nivel de la lamina propia, en comparación con el urotelio normal, la laminina presenta una reactividad mayor y en particular en la zona subyacente a la membrana basal del epitelio neoplásico.

En los tumores limitados a mucosa, la laminina se distribuye de forma continua a nivel de la membrana basal presentando puntos de refuerzo o duplicación.

En los tumores invasores, el marcador se distribuye sobre la membrana basal de forma discontinua. En las proximidades al punto de rotura de la lámina basal, la laminina se negativiza pudiendo observarse una zona de transición en la que la reactividad va disminuyendo hasta no ser detectable en el punto de invasión.

En los tumores más invasores y de mayor grado de malignidad, es frecuente encontrar una pérdida de la malla fibroconectiva tumoral y células tumorales con citoplasma positivo a la laminina.

DISCUSION

Las distintas subpoblaciones celulares que forman un tumor serían un indicador de la inestabilidad genética y del índice de mutabilidad de estas células (Isaacs et. al., 1982) más que una explicación de su origen.

El CEA no es un antígeno especí-

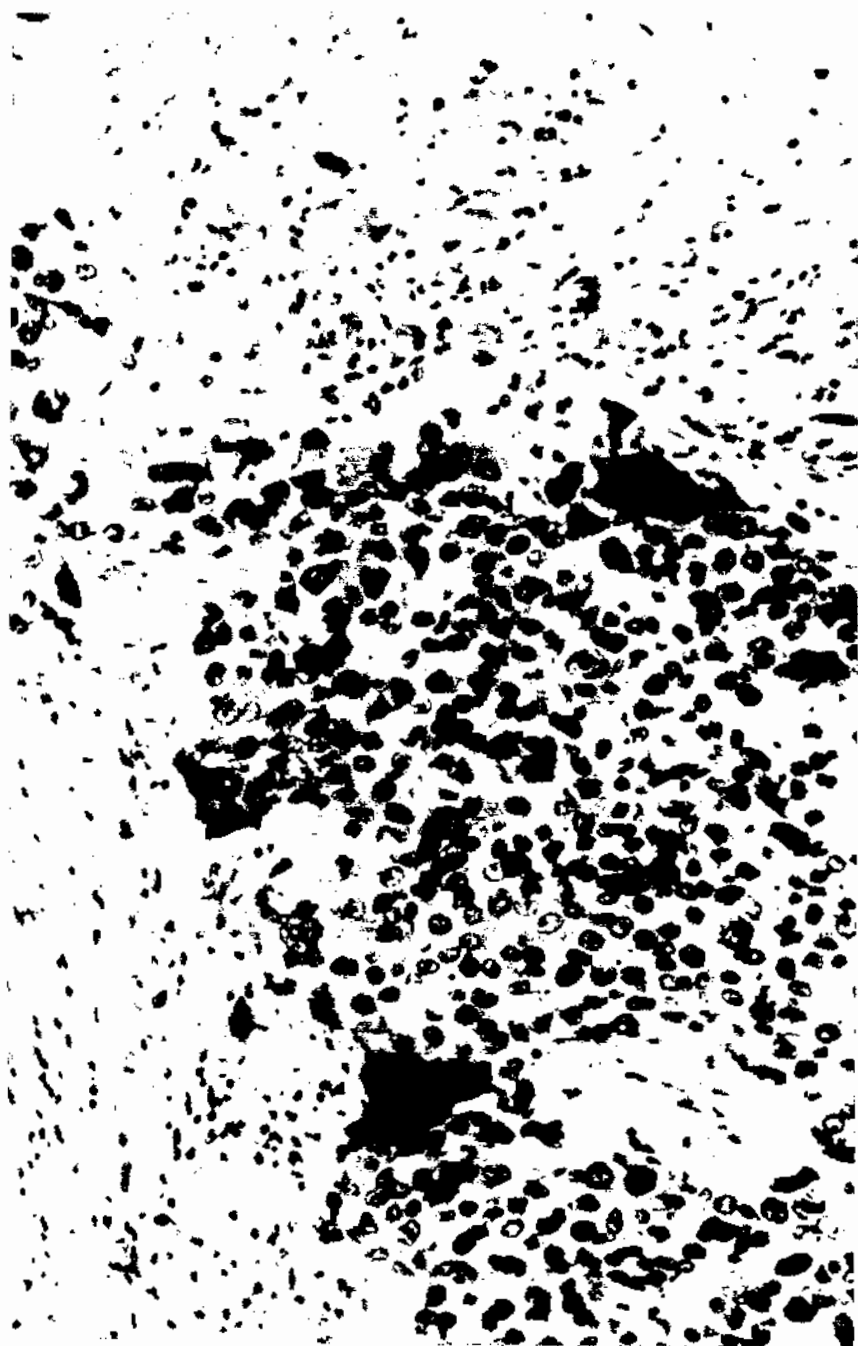


Figura 2

Inmunohistoquímica. HCG: La HCG se encuentra en el citoplasma de células localizadas en la interfase entre el estroma y el tumor así como adosadas a la pared de vasos de mediano calibre. Las células positivas son de gran tamaño, con frecuencia multinucleadas y remedan a las células sincitiales. (X 120).



Figura 3
Inmunohistoquímica. Laminina: En los tumores no invasores la laminina se localiza formando una banda continua a lo largo de la membrana basal y alrededor de las estructuras vasculares. (X 90).



Figura 4
Inmunohistoquímica. Laminina. En los tumores invasores, la laminina se negativiza en las zonas próximas a la ruptura de la membrana basal y se localiza en forma de acúmulos dispuestos irregularmente en el estroma subyacente. (X 120).

fico de un tipo determinado de tumor. Su utilidad y significado varían de un tumor a otro aunque en líneas generales se considera asociado a las neoplasias de carácter más agresivo y de crecimiento rápido (Parbhoo, 1987).

Los resultados obtenidos relacionan la presencia de CEA con el grado de malignidad local. Estos resultados encuentran un paralelismo en los obtenidos por Asamoto et. al. (1989) que descartan las posibles reacciones cruzadas entre los anticuerpos antiCEA y los tumores uroteliales. Puede pensarse que la presencia de CEA indicaría, si no un grado determinado de diferenciación celular, un tipo concreto de organización histológica.

La HCG es una hormona glucoprotéica sintetizada normalmente por el sincitiotrofoblasto de la placenta (Mann y Karl, 1983).

La subunidad beta de la HCG es uno de los marcadores más representativos de los tumores malignos de células germinales (Brown, 1983).

El significado biológico de la HCG puede buscarse en el hecho de que la diferenciación a trofoblasto a partir de los blastómeros ocurre antes de establecer el contacto con el endometrio materno y que, precisamente, éstas son las células encargadas de establecer la interfase feto-materna. Las células trofoblásticas tienen unas propiedades de membrana únicas haciéndolas muy resistentes a los mecanismos líticos de las células citotóxicas. Cabe añadir que el trofoblasto sin-

tetiza moléculas inmunosupresoras a elevadas concentraciones locales capaces de evitar la respuesta inmunitaria (Lala et. al., 1986).

Los resultados obtenidos permiten relacionar la presencia de HCG con un grado más indiferenciado y no con el grado de infiltración de las neoplasias uroteliales. Estos datos, junto a las observaciones de Wurgel et. al. (1987) que detectan células positivas a la HCG en carcinomas *in situ* vesicales, además de en los de mayor grado, llevan a pensar que la HCG sería el producto de una línea de citodiferenciación, adoptada por las células neoplásicas menos maduras, más que el resultado de un avance en la secuencia de hechos que definen el desarrollo de una neoplasia.

La observación de células positivas a la HCG puede interpretarse como una forma muy primitiva de establecer contacto con los tejidos del huésped además de intervenir en la formación de un entorno celular permisivo para el desarrollo y proliferación de los tejidos inmaduros.

La laminina es una glicoproteína sintetizada por las células epiteliales y se localiza en las membranas basales sobre las que descansan estas células. Las células tumorales invasoras pueden afectar a la matriz extracelular de diferentes maneras: sintetizando enzimas proteolíticos específicos para los componentes de la membrana basal; inducir en las células del huésped una acumulación de componentes matriciales o bien puede darse la síntesis de los componentes de la membrana basal por parte de las células tumorales (Liotta, 1984).

En el presente trabajo, en los tumores que presentaron algún tipo de infiltración, no se observó una reactividad continúa a lo largo de la membrana basal. Al igual que en los estudios realizados con colágeno IV se ha observado que las interrupciones en la tinción aumentan a medida que aumenta la profundidad de invasión y que el tumor es menos diferenciado (Zuk et.

al., 1989).

El hecho de encontrar acúmulos de laminina en el espacio intercelular de la neoplasia y células positivas a la laminina en los tumores de más alto grado apoyan la idea de que predominaría una organización defectuosa matricial sobre un incremento en la degradación en las neoplasias vesicales.

BIBLIOGRAFIA

1. ASAMOTO, M.; FUKUSHIMA, S.; TATEMOTO, Y.; YAMADA, K.; YUBA, R and MORI, M.: Immunohistochemical evaluation of non-specific cross reactive antigen and carcinoembryonic antigen (CEA) in urinary bladder carcinoma. *Anticancer Res.*, 9:319-326, 1989.
2. BRODSKY, G.L.: Pathology of bladder carcinoma. *Hematol. Oncol. Clinics North America*, 6: 59-80, 1992.
3. BROWN, P.N.: The origin of germ cell tumors of the testis. *Cancer*, 51: 1610-1614, 1983.
4. GUSTAFSON, M.; TRIBUKAIT, B. and EPOSTI, P.L.: DNA pattern, histological grade and multiplicity related to recurrence rate in superficial bladder tumours. *Scand. J. Urol. Nephrol*, 16: 135-139, 1982.
5. HELANDER, K.; MOFER, P.A. and HOLMBERG, G.: Karyometric investigations on urinary bladder carcinoma. Correlations to histopathological grading. *Virchows Archiv. (Pathol. Anat.)*, 403: 117-125, 1984.
6. ISAACS, J.T.; WAKE, N.; COFFEY, D.S. and SANDBERG, A.A.: Genetic instability coupled to clonal selection as a mechanism for tumor progression in the Dunning R-3327 rat prostatic carcinoma system. *Cancer Res.*, 42: 2353-2361, 1982.
7. JAVADPOUR, N.: Oncofetoproteins and others markers in genitourinary cancer. In: *Recent advances in urologic cancer*. Williams and Wilkins. Baltimore, p. 47, 1982.
8. JORDAN, A.; WEINGARTEN, J. and MURPHY, W.M.: Transitional cell neoplasm of the urinary bladder. *Cancer*, 60: 2766-2774, 1987.
9. LAINER, L.L.; WARNER, N.L.; LEDBATTER, J.A. and HERGENBERG, L.: Quantitative immunofluorescent analysis of surface phenotypes of murine beta cell lymphomas and plasmacytomas with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 127: 1691-1697, 1981.
10. LALA, P.K.; KEARNS, M.; PARHAS, R.S.; SCODRAS, J. and JOHNSON, S.: Immunological role of the cellular constituents of the decidua in the maintenance of semiallogenic pregnancy. In: *Nidation*. K. Yoshinaga (ed.). *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 476: 183-205, 1986.

11. Liotta, L.A.: Tumor invasion and metastases: Role of the basement membrane. *Amer. J. Pathol.*, 117: 339-347, 1984.
12. Lütze, W.; Rübber, M. and Dahm, H.: Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. *J. Urol.*, 127: 250-252, 1982.
13. MANN, K. and KARL, H.J.: Molecular heterogeneity of human chorionic gonadotropin and its subunits in testicular cancer. *Cancer*, 52: 654-660, 1983.
14. MURPHY, W.M. and SOLOWAY, M.S.: Developing carcinoma (dysplasia) of the urinary bladder. *Pathol. Annu.*, 17: 197, 1982.
15. NIELSEN, K.; COLSTRUP, M.; NILSSON, T. and GUNDERSEN, H.G.J.: Stereological estimates of nuclear volume correlated with histopathological grading and prognosis of the bladder tumours. *Virchows Archiv (Cell Pathol.)*, 52: 41-54, 1986.
16. PARBHOO, S.P.: Clinical pointers to rapid growth. In: *Pointers to Cancer Prognosis*. B.A. Stoll (ed.) Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands, p.p. 3-19, 1987.
17. STRENGER, L.A.: *Immunocytochemistry*. Third Edition. John Wiley and sons. New York, p.p. 90-209, 1986.
18. WURGEL, R.S.; YAMADA, H.T. and NICH, P.T.: Ectopic production of human chorionic gonadotropin by poorly differentiated transitional cell tumors of the urinary tract. *J. Urol.*, 137: 502-504, 1987.
19. ZUK, R.J.; BAITHUN, S.I.; MARTINS, I.E.; COX, E.L. and REVELL, P.A.: The immunocytochemical demonstration of basement membrane deposition in transitional cell carcinoma of bladder. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)*, 414: 447-452, 1989.