

# DETERMINACIÓN DE PLOIDÍA DE ADN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO, ÍNDICE Ki-67 Y SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNA P53 EN 121 CARCINOMAS SUPERFICIALES DE VEJIGA T1. ESTUDIO RETROSPECTIVO CORRELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÁSICAS

J.L. MOYANO CALVO, M. DE MIGUEL RODRÍGUEZ\*, A. ORTIZ GAMIZ,  
J.M. POYATO GALÁN, E. SÁNCHEZ SÁNCHEZ, E. BLANCO PALENCIANO,  
J.M. ARRIBAS RODRÍGUEZ, H. GALERA DAVIDSON\*,  
J. CASTIÑEIRAS FERNÁNDEZ

Servicio de Urología. \*Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario "Virgen Macarena". Sevilla.

## PALABRAS CLAVE:

Tumores de vejiga. Ploidía. Ki-67. Proteína p53.

## KEY WORDS:

Bladder tumors. Ploidy. Ki-67. p53 protein.

Actas Urol Esp. 24 (10): 785-795, 2000

## RESUMEN

**OBJETIVO:** Observar la correlación entre el índice Ki-67, la expresión de proteína p53 y la ploidía de ADN mediante citometría de flujo con las variables clásicas (grado, permeación linfática, volumen tumoral, multiplicidad, primario).

**MATERIAL Y MÉTODO:** 121 carcinomas vesicales T1. Nivel de corte para Ki-67 y p53 del 10%. Se considera aneuploide cuando el tumor tiene un índice de ADN distinto de 1 ó más del 20% de la población en fase G2-M.

**RESULTADOS:** Se aprecia una correlación estadísticamente significativa entre las tres técnicas y las variables grado y permeación linfática, así como de las tres técnicas entre sí. El índice Ki-67 y la expresión de proteína p53 distingue entre G1, G2 frente a G3 y Lx, L0 frente a L1. Se aprecia también relación entre volumen tumoral y positividad para p53.

**CONCLUSIONES:** La aneuploidía y la positividad para Ki-67 y p53 aumenta conforme aumenta el grado y la permeación linfática.

## ABSTRACT

**OBJETIVE:** Observe the correlation between Ki-67 label index, p53 expression and flow cytometry-DNA ploidy with the classic variables (grade, lymphatic permeation, multiplicity, volume, primary).

**MATERIAL AND METHOD:** 121 superficial bladder tumors T1. 10% Cut-off level for Ki-67 and p53. Aneuploidy is defined as a tumor with DNA index different of 1 or more than 20% in G2-M phase.

**RESULTS:** Statistical correlation with grade and lymphatic permeation. Ki-67 label index and p53 expression can distinguish between G1, G2 vs G3 and Lx, L0 vs. L1. The volumen correlates with positivity to p53.

**CONCLUSIONS:** Aneuploidy and positivity to Ki-67 and p53 increase with grade and lymphatic permeation.

Las variables utilizadas en el carcinoma de vejiga son fundamentalmente el grado histológico, la profundidad de la infiltración tumoral en la pared vesical, la permeación linfática, el tamaño y la multiplicidad tumoral, siendo las más utilizadas las dos primeras.

Con la aparición de nuevas técnicas en los últimos años, aspectos hasta hace poco inéditos de la célula pueden ser determinados y, lo que es más importante, cuantificados. Así mediante técnicas inmunohistoquímicas podemos determinar la expresión celular de numerosas proteínas (p53, Ki-67, PCNA, C-erb...). Mediante técnicas de citometría podemos conocer la cantidad de ADN de una célula, así como la distribución en el ciclo celular de un tejido.

La determinación de la ploidía de ADN mediante citometría de flujo permite obtener una estimación de los cambios cuantitativos del ADN de los cromosomas de las células neoplásicas, aunque no proporciona información específica de la aberración estructural o numérica<sup>1</sup>.

Los estudios del contenido de ADN han demostrado cantidades anormales en al menos tres cuartas partes de los carcinomas humanos<sup>2,3</sup>, con una amplia heterogeneidad en las características celulares, lo que ha permitido un incremento en la probabilidad de detectar células neoplásicas y de identificar subtipos celulares. A pesar de la naturaleza global de la información del contenido de ADN existe una correlación entre la aneuploidía del ADN y la agresividad de los tumores sólidos<sup>2,4-7</sup>. La asociación entre la ploidía ADN y el comportamiento biológico de los tumores puede explicarse por una relación directa de la ploidía ADN y el grado de reordenamiento del genoma de la célula tumoral, que en último término, interferirá con el funcionamiento apropiado de los programas de diferenciación celular y de control de la proliferación normal<sup>1,8,9</sup>. Sin embargo esta técnica no discrimina los acontecimientos genéticos específicos implicados en la iniciación y progresión tumorales y los cambios secundarios al incremento de la inestabilidad genética.

En los tumores de vejiga puede determinarse la ploidía de ADN tanto en células exfoliadas en la orina como en tejido tumoral resecado.

Dentro de las técnicas inmunohistoquímicas disponibles, la más utilizada en Urología es la determinación de la expresión de proteína p53.

La proteína p53 es la expresión del gen *p53*, que se localiza en el brazo corto del cromosoma 17. Este gen se encuentra implicado en más del 50% de los cánceres humanos, tanto hereditarios como esporádicos<sup>10</sup>. Su vida media es corta, alrededor de 15 minutos, y es posible detectarla mediante técnicas inmunohistoquímicas porque la mutación del gen produce una proteína alterada con una vida media más larga, de 4 a 6 horas<sup>10</sup>. Las funciones de la proteína p53 son fundamentalmente:

- Regulación de la actividad transcripcional.
- Control del daño del ADN. Estabilidad del genoma.
- Apoptosis.

La proteína participa en la carcinogénesis a través de varios posibles mecanismos<sup>3,11,12</sup>:

- Pérdida de Heterozigosidad y mutación del alelo restante dando lugar a una proteína con función alterada.
- Mutación en un sólo alelo con acción dominante sobre el otro alelo normal. Estas formas mutadas son incapaces de unirse al ADN o lo hacen con menor afinidad y, además, actúan impidiendo la unión de las proteínas normales con las que forman tetrameros, volviéndolos inactivos.
- Interacción con el producto del oncogén *mdm-2*.
- Interacción con los productos de los oncogenes virales *E6* del papiloma, antígeno T grande del virus SV40 y el *E1B* de adenovirus.

La alteración de la proteína P53 produce:

- Aumento de la capacidad proliferación celular.
- Disminución de la apoptosis.
- Aumento de la inestabilidad genética.
- Aumento de la angiogénesis.
- Aumento de la resistencia a quimioterápicos.

La proporción de células en proliferación, es decir la fracción de crecimiento, ha sido relacionada con el curso clínico y con el pronóstico de los tumores. La proliferación depende de dos factores:

- Número de células dentro del ciclo celular.
- Velocidad a la que este ciclo se realiza.

Hasta hace unos años la forma más fácil de medir la proliferación era contando el número de mitosis existentes en una muestra. Este método, tiene el problema que sólo refleja una parte del ciclo celular, la fase M, y que en casos de mitosis

muy lentas, aunque existe un alto recuento de células en mitosis, no reflejan una alta tasa de proliferación<sup>13</sup>.

El Ki-67<sup>14</sup> es un anticuerpo monoclonal murino IgG1 contra la fracción nuclear de las células de la línea L428 con enfermedad de Hodgkin, denominado así porque se desarrolló en la ciudad de Kiel (Alemania) y en el pozo nº 67 del plato de cultivo tisular. Gerdes y cols. observaron que no estaba presente en la fase G0 ni en las fases tempranas de la G1 (denominadas G1a, G1b) de las células que procedían de G0. Sin embargo estaba presente tanto en la fase G1 tardía como en la S, G2 y M, así como en las G1a, G1b de las células que entraban en el ciclo celular desde una célula recién dividida. Realizando experimentos con inhibidores de la síntesis proteica y de la síntesis de ADN observaron que su expresión era independiente de la síntesis de ADN y que en las células que procedían de G0 tenía que ser sintetizado de novo. Tras este estudio llegaron a la conclusión de que Ki-67 era un anticuerpo monoclonal que determinaba de una forma simple, rápida y fiable la fracción de crecimiento de una población celular. Posteriormente Sasaki y cols. apreciaron que su expresión aumentaba sensiblemente en las fases tardías de S, llegando a su máximo en G2 y M<sup>15,16</sup>.

La localización del antígeno dentro del núcleo parece ser ciclo dependiente. Durante la interfase se localiza en la región perinucleolar, aunque existe un fino granulado fuera del núcleo. En la mitosis durante la profase se localiza en la superficie de la cromatina condensada y durante la metafase en la superficie de los cromosomas, formando una especie de retícula<sup>17</sup>. Tras la división celular y antes de que se forme el nuevo núcleo se localiza en el nucleoplasma, desapareciendo rápidamente<sup>14,18</sup>.

Tras retirar el ADN y las histonas de la célula por fraccionamiento *in situ* es posible detectar Ki-67, ello sugiere que el antígeno está asociado a los filamentos intermedios de la matriz nuclear. Mediante el uso de técnicas electroforéticas se localiza el antígeno Ki-67 en el complejo ríbano-nucleoproteínico nuclear que forma parte de las proteínas no histonas del núcleo<sup>18-20</sup>.

La función exacta del Ki-67 es desconocida. Se ha propuesto que actúa como molécula-reloj a lo

largo del ciclo. Sin embargo no es necesaria para la proliferación celular ya que han proliferado células hibridas en ausencia de Ki-67.

Recientemente se ha determinado el gen que codifica al antígeno Ki-67. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 y consta de 15 exones y 14 intrones<sup>21</sup>.

El Ki-67, es un marcador de la fracción de crecimiento, habiendo sido confirmado comparando el índice Ki-67 con el método de conteo de mitosis<sup>17</sup>. La determinación de la fracción de crecimiento mediante el índice Ki-67 se ha mostrado útil en el cáncer de mama, cerebro, linfomas, tiroides, pulmón<sup>22-26</sup>.

Nosotros nos planteamos la utilidad de estas tres técnicas en los carcinomas superficiales de vejiga. El primer aspecto que quisimos comprobar era la correlación con las variables hasta ahora utilizadas.

## MATERIAL Y MÉTODO

Hemos determinado, además de las variables clásicas, la ploidía de ADN, el índice Ki-67 y la expresión de proteína p53 en 121 carcinomas superficiales de vejiga que reunían los siguientes requisitos:

- R.T.U. completa.
- Material de archivo suficiente para realizar todas las técnicas.
- Localización exclusivamente vesical.
- Ausencia de Tis asociado.
- Seguimiento mínimo de dos años.

La citometría de flujo se realizó siguiendo el método de Hedley modificado<sup>27</sup> realizándose el análisis con un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson), con un número mínimo de 30.000 núcleos por caso. El análisis del histograma ha sido realizado mediante el programa Lysis II que lleva incluido el software del citómetro del flujo y para la categorización de los picos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> se siguieron los criterios Dressler<sup>28</sup>. La interpretación de los histogramas se realizó siguiendo los criterios de Vindelov y Christensen<sup>29</sup>. Se calcularon los coeficientes de variación de los picos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub><sup>30</sup>. Se descartaron los casos en los que el coeficiente de variación fuera mayor del 7%.

Se consideró aneuploide aquella población con:

- Índice de ADN distinto de 1.
- Más de 20% de células en la fase G2+M mayor del 20%.

La determinación de antígeno Ki-67 y proteína p53 se realizó de manera semiautomática por un aparato de inmunotinción "Ventana ES" (Ventana Medical Systems, Inc 3865 N Business Center Drive. Tucson, Arizona 85705).

Para el antígeno Ki-67 se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti-Ki-67 MIB-1 (Byosystems SA, Costa Brava 30, Barcelona). El MIB-1 reacciona tanto con las formas nativas del Ki-67 como con las recombinantes. Reconoce todos los estadios del ciclo celular excepto G0.

Para la proteína p53 se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a kappa anti-p53 BP53-12 (Byosystems SA, Costa Brava 30, Barcelona). El BP53-12 reconoce tanto la proteína p53 nativa como la mutante.

En ambos casos se estableció el nivel de 10% de células teñidas para considerar positivo el tumor.

En el análisis estadístico se ha utilizado el estadístico Chi cuadrado para las variables discretas con los siguientes criterios:

- P value menor de 0,05.
- Las conclusiones no son aceptables si la frecuencia esperada es menor de cinco en el 20% de las celdas o menor de 1 en una celda.
- La premisa anterior no es válida si podemos calcular el estadístico de la prueba exacta de Fisher, que sólo es posible calcularlo en tablas de 2x2.
- Aquellos valores de p-value menores de 0,1 se consideran casi significativos.

Para las variables continuas se han aplicado medios paramétricos cuando se ha comprobado mediante el test de Levene la homogeneidad de la varianza y se ha comprobado su normalidad. En caso de no cumplirse el anterior requisito se ha realizado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS

En la Tabla I se muestran las características de nuestra serie.

En la Tabla II los resultados de ploidía de ADN, Ki-67 y p53.

En la Tabla III la correlación de la ploidía con el resto de las variables. Se observa relación con el grado (p .0000), la permeación linfática (p .003), la positividad para Ki-67 (p .0000) y p53 (p .002).

TABLA I

CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE

Variable	Valor	Resultado
Sexo	Hombre Mujer	110 (90,9) 11 (9,1)
Edad		65,7 ± 10
Nº de tumores	Único Múltiple	78 (64,5) 43 (35,5)
Primario	No Si	33 (27,3) 88 (72,7)
Volumen		6,6 ± 8,7
Grado	Grado 1 Grado 2 Grado 3	39 (32,2) 57 (47,1) 25 (20,7)
Perm. linfática	LX LO L1	31 (25,6) 83 (68,6) 7 (5,8)

TABLA II

RESULTADOS DE PLOIDÍA DE ADN, EXPRESIÓN  
Ki-67 Y DE p53

Variable	Valor	Resultado
Diploide	Si No	91 (75,2) 30 (24,8)
Índice Ki-67		10,8 ± 9,1
Ki-67	Negativo Positivo	69 (57) 52 (43)
Prop. p53		10,9 ± 22,1
P53	Negativo Positivo	97 (80,2) 24 (19,8)

En la Tabla IV la correlación entre Ki-67 positivo y el resto de las variables. Como podemos ver se observa relación con el grado (p .00002), la permeación linfática (p .02), el ser primario (p .007) y la positividad para p53 (p .002).

En la Tabla V la correlación entre p53 positivo y el resto de las variables. Se relaciona con el grado (p .002), la permeación linfática (p .037) y el volumen tumoral.

En la Tabla VI se muestran la relación entre el índice Ki-67, independientemente del punto de corte y el resto de las variables. Como podemos

**TABLA III**  
CORRELACIÓN DIPLOIDE CON VARIABLES

Parámetro	Valores	Si	No	p
Grado	G1	38 (97,4)	1 (2,6)	.00000
	G2	43 (75,4)	14 (24,6)	
	G3	10 (40)	15 (60)	
Linfático	Lx	21 (67,7)	10 (32,3)	.003
	L0	68 (82)	15 (18)	
	L1	2 (28,5)	5 (71,5)	
Nº tumores	Único Múltiple	60 (76,9) 31 (72)	18 (32,1) 12 (28)	.555
Ki-67	Negativo Positivo	63 (91,3) 28 (53,8)	6 (8,7) 24 (46,2)	.00000
P53	Negativo Positivo	79 (81,4) 12 (50)	18 (18,6) 12 (50)	.002
Primario	Si No	67 (76,1) 24 (72,7)	21 (23,9) 9 (27,3)	.088
Volumen		6,06	8,47	.192

**TABLA IV**  
CORRELACIÓN DE Ki-67 CON LAS VARIABLES

Parámetro	Valores	Negativo	Positivo	p
Grado	G1	32 (82)	7 (18)	.00002
	G2	31 (53,4)	26 (45,6)	
	G3	6 (24)	19 (76)	
Linfático	Lx	15 (48,4)	16 (51,6)	.020
	L0	53 (62,6)	30 (37,4)	
	L1	1 (28,5)	6 (71,5)	
Nº tumores	Único Múltiple	46 (59) 23 (53,5)	32 (41) 20 (46,5)	.559
P53	Negativo Positivo	62 (63,4) 7 (29,1)	35 (36,5) 17 (70,8)	.002
Primario	Si No	55 (62,5) 14 (42,4)	33 (37,5) 6 (18,1)	.007
Volumen		5,62	8,04	.133

ver permite distinguir entre G1 y G2 frente a G3 (p .0001), entre Lx y L0 frente a L1 (p .001), ploidía (p .001) y positividad para p53 (p. 009).

En la Tabla VII se muestra la correlación de la expresión de p53, sin nivel de corte con el resto de las variables. Permite distinguir entre G1 y G2 frente a G3 (p .002), Lx y L0 frente a L1 (p .001), ploidía (p .034), positividad para Ki-67 (p .031).

**TABLA V**  
CORRELACIÓN p53 POSITIVO CON LAS VARIABLES

Parámetro	Valores	Negativo	Positivo	p
Grado	G1	37 (94,8)	2 (5,2)	.002
	G2	45 (79)	12 (21)	
	G3	15 (21)	10 (40)	
Linfático	Lx	25 (80,6)	6 (19,4)	.037
	L0	69 (83,19)	14 (16,9)	
	L1	3 (42,8)	4 (57,2)	
Nº tumores	Único Múltiple	60 (72) 37 (86)	18 (23) 6 (14)	.228
Primario	Si No	70 (79,59) 27 (81,8)	18 (20,6) 6 (18,1)	.098
Volumen		5,53	11,22	.044

**TABLA VI**  
CORRELACIÓN ÍNDICE Ki-67 CON EL RESTO  
DE LAS VARIABLES

Parámetro	Valores	Índice Ki-67	p (entre valores)	p
Grado	G1	7,3	con G3 con G3 -	.0001
	G2	10,2		
	G3	17,7		
Linfático	Lx	11,5	con L1 con L1 -	.001
	L0	9,8		
	L1	20,1		
Nº tumores	Único Múltiple	10,62 11,86		.765
Diploide	Si No	8,8 17,1	.001	
P53	Negativo Positivo	4,2 17,6	.009	
Volumen		1,549		.090

## DISCUSIÓN

A nuestro juicio, la utilización de una nueva técnica para establecer un pronóstico en los tumores superficiales de vejiga, exige a ésta como primer requisito una buena correlación con las variables consideradas clásicas.

La determinación de la ploidía de ADN mediante citometría de flujo es utilizada en el carcinoma vesical desde hace veinte años. Muy pocos autores distinguen entre los distintos tipos de aneuploidía considerando aneuploides todos aquellos con un índice de ADN distinto de 1<sup>4,5,8,32-36</sup>.

**TABLA VII**  
CORRELACIÓN PROPORCIÓN P53 CON EL RESTO DE LAS VARIABLES

Parámetro	Valores	Prop. p53	p (entre valores)	p
Grado	G1	2,3	con G3	.0002
	G2	10,7	con G3	
	G3	25	-	
Linfático	Lx	11,3	con L1	.001
	L0	8	con L1	
	L1	44,6	-	
Nº tumores	Único Múltiple	10,9 11,6		.973
Diploide	Si No	7,33 22,61		.034
Ki-67	Negativo Positivo	6,7 16,65		.031
Volumen		.0838		.4235

La literatura revisada<sup>4,5,31,32,35,37-48</sup> muestra una buena correlación entre grado histológico, estadio clínico y la ploidía de ADN. Así conforme aumentan el grado y el estadio aumenta la aneuploidía, tal y como se muestra en el Cuadro 1.

La incidencia de metástasis ganglionares se presenta entre el 34% y el 46% de los tumores aneuploides y entre el 0% y el 13% de los diploides<sup>49-51</sup>. Las metástasis aumentaron con la proporción de células en fase S, todos aquellos tumores con más del 20% desarrollaron metástasis ganglionares, un 50% de los que tenían 10-20% de células en fase S y un 33% cuando la proporción era de menos del 10%<sup>50</sup>.

En nuestra serie los valores de aneuploidía obtenidos, son similares aunque inferiores a los comunicados en la literatura. También hemos constatado un aumento de la aneuploidía con el aumento del grado histológico, pero siempre con cifras menores a los de la literatura.

#### CUADRO 1

#### RELACIÓN ENTRE ANEUPLOIDÍA CON GRADO Y ESTADIO

Autor	Casos	G1	G2	G3	Tis	Ta	T1	T2-T4
Conjunto	1.467	0-47	11-63	78-100	84-100	15-4036-55	67-100	
Autores		14,3	40,3	88,5	93	25,4	47	80,8
<b>Nosotros</b>	<b>121</b>	<b>2,6</b>	<b>24,6</b>	<b>60</b>	-	-	<b>24,8</b>	-

Esa diferencia se hace mayor en los G3, sensiblemente menor que la referida por la mayoría de los autores (78-100%).

Pensamos que el menor índice de aneuploidía es debido a:

- El límite inferior para considerar un tumor tetraploide es 20% de células en fase G2-M mientras que la mayoría de los autores establecen el límite en 10%.
- Nuestra población de estudio es fundamentalmente T1, mientras que la mayoría de los autores tienen estadios superiores en su análisis. Además la incidencia de la aneuploidía en nuestra población es menor a la comunicada en la literatura, 21% vs. 36-56%.

Dentro de los tumores con grado histológico G2, la CMF establece dos subgrupos según sea diploide o aneuploide el tumor, comportándose los G2 diploides como los G1 y los G2 aneuploides como los G3<sup>31,35,42,45,46</sup>. En nuestra experiencia aunque existe una clara tendencia a este hecho no llega a alcanzar significación estadística (p .140), posiblemente porque nuestra proporción de G2 aneuploides es inferior a la encontrada por ellos (24% vs 33%-60%).

Observamos correlación entre ploidía y permeación linfática a pesar del corto número de tumores L1, la permeación linfática no es contemplada por los autores consultados.

No encontramos correlación entre ploidía y volumen tumoral, creemos que ello es debido a que la ploidía es expresión de la cantidad de ADN por célula y no de la proliferación tumoral.

La expresión de Ki-67 por el epitelio vesical normal es muy baja, entre el 0,07% y el 3%<sup>51-55</sup>. Su localización es variable, así en el epitelio sano las células positivas para Ki-67 se localizan cerca de la membrana basal. En los casos con Tis las células se localizan por todo el espesor de la mucosa. En los TCC papilares las células tienden

a localizarse cerca de la membrana basal, mientras que en los tumores invasivos se extienden por todo el epitelio<sup>52,56</sup>.

Respecto al grado histológico la mayoría de los autores aprecian diferencias significativas en la expresión de Ki-67 entre los distintos grados, aunque con variaciones según los distintos autores. Así mientras unos encuentran diferencias entre todos los grados<sup>51,53,54,56,57</sup>, otros la encuentran entre G1-G2 con G3<sup>58-60</sup> y otros entre G1 y G2-G3<sup>57,61</sup>.

La expresión de Ki-67 varía también de manera significativa respecto al estadio tumoral. La mayoría de los autores coinciden en que distingue entre tumores superficiales (Ta, T1) e infiltrantes (T2, T3, T4)<sup>53,55,56,58,59,61,62</sup>. Otros autores<sup>51,53,57</sup> aprecian diferencias significativas dentro de los superficiales, pero no de los T1 con los infiltrantes<sup>51,63</sup>. En los Tis el índice de Ki-67 es similar al de los tumores infiltrantes<sup>52,54</sup>, tal como muestra el Cuadro 2.

Nuestra serie se muestra acorde con los resultados presentados por la literatura. El índice de Ki-67 en los tumores T1 varía entre 4,3% y 15,6%<sup>51-53,58,59,61</sup>, siendo nuestros resultados muy similares con un índice de Ki-67 de 10,8% y como podemos observar, en nuestra serie también aumenta el índice Ki-67 conforme lo hace el grado histológico (Cuadro 2).

El índice Ki-67 nos permite diferenciar de manera significativa dos grandes grupos: tumores G1-G2 y tumores G3. Coincidimos en ello con Mellon y Wright<sup>58,59</sup>. Otros autores encuentran

diferencias entre G1 y G2-G3<sup>57,61</sup> y otros entre cada uno de los grados<sup>51,53,54,57</sup>. Creemos que ello es reflejo de la distinta proporción existente entre las series en su distribución por grados, y a la heterogeneidad del G2. Los tumores G2 conforman un grupo muy heterogéneo. En nuestra experiencia el índice Ki-67 varía de manera significativa según recidive o no el tumor: 12,31% vs 8,3% ( $p < 0,05$ ). Coincidimos en ellos con otros autores como Okamura y Limas<sup>52,53</sup>.

Asimismo existe un aumento del índice Ki-67 con la permeación linfática. No encontramos literatura en referencia a este aspecto en los tumores superficiales de vejiga.

La correlación con el volumen tumoral está cercana a la significación estadística. Ello es lógico ya que Ki-67 es marcador de proliferación tumoral y toda proliferación conlleva a un aumento del volumen del tumor.

La determinación mediante técnicas inmunohistoquímicas de la proteína p53 es sin duda la más frecuentemente realizada en los carcinomas uroteliales. Sin embargo la gran variabilidad en el criterio de positividad, entre el 17% y el 78%, los distintos niveles a partir de los cuales se considera positivo dificulta poder realizar comparaciones y llegar a obtener conclusiones<sup>34,56,64-87</sup>.

La positividad p53 aumenta conforme lo hace el grado y el estadio, tal como muestra el Cuadro 3, resumen de las cifras comunicadas por los distintos autores<sup>34,56,57,61,65-67,69-77,79-82</sup>. Como podemos

## CUADRO 2

### RELACIÓN ÍNDICE KI-67 CON GRADO Y ESTADIO

<b>Autor</b>	<b>n</b>	<b>Tis</b>	<b>Ta</b>	<b>T1</b>	<b>T2-T4</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>
Conjunto	1.193	3237	4-22	4-70	12-80	2-19	14-42	12-84
Autores		51,5	11,3	23,6	32,6	7,8	18	25
<b>Nosotros</b>	<b>121</b>			<b>10,8</b>		<b>7,3</b>	<b>10,2</b>	<b>17,7</b>

## CUADRO 3

### RELACIÓN p53 CON GRADO Y ESTADIO

<b>p53 positivo</b>	<b>G1 (%)</b>	<b>G2 (%)</b>	<b>G3 (%)</b>	<b>Tis (%)</b>	<b>Ta-T1 (%)</b>	<b>T2-T4 (%)</b>
Conjunto	9-22	13-55	17-100	61	13-68	38-70
Autores	10,6	38,2	61,3	61	24,8	57,7
<b>Nosotros</b>	<b>5,2</b>	<b>21</b>	<b>40</b>	–	<b>19,8</b>	–

apreciar la positividad para p53 aumenta conforme lo hace el grado histológico y el estadio, presentando el Tis una positividad similar a los tumores infiltrantes.

En nuestra serie la positividad para p53, con un nivel de corte del 10% aumenta conforme lo hace el grado. Coincidimos en este aspecto con la mayoría de los autores. Asimismo si no establecemos un nivel de corte, la positividad para p53 permite establecer dos grupos G3 y G1-G2.

También apreciamos correlación entre permeación linfática y positividad para p53, sin que hallamos encontrado literatura que avale nuestras observaciones. La permeación linfática implica la capacidad de metastatizar a distancia, siendo una de las últimas etapas de la carcinogénesis. Numerosos autores consideran a la mutación del gen supresor p53 un hecho tardío en la carcinogénesis, por lo que creemos que ambos fenómenos podrían ir asociados. No podemos olvidar tampoco el papel modulador de la proteína p53 en la angiogénesis a través de la Trombospondina.

Sí encontramos relación entre volumen tumoral y positividad para p53, hecho lógico a nuestro juicio, ya que al inhibirse la apoptosis y favorecer la replicación celular sin control, la consecuencia inmediata es el aumento del volumen tumoral.

Otro aspecto importante a analizar es la correlación de las variables ploidía ADN, índice Ki-67 y p53 entre sí.

Así podemos observar que en nuestra experiencia la correlación ploidía y positividad para p53 alcanza significación estadística. Nakopoulou y Thomas<sup>34,56</sup> obtienen similares resultados a los nuestros.

La correlación Ki-67 y policía alcanza en nuestra serie significación estadística, siendo Ki-67 positivo el 31% de los diploides y el 82% de los aneuploides, coincidiendo con Mulder<sup>62</sup> quien obtiene un 41% de positividad en los diploides y un 75% en los aneuploides.

Coincidimos con la mayoría de los autores<sup>55,57,59,61,78,88</sup> en que el índice Ki-67 se correlaciona de manera directamente proporcional con la positividad para p53, resultados en consonancia con los nuestros, en los que son KI-67 positivo el 70,8% de los tumores p53 positivos frente al 36,5% de los p53 negativos.

## CONCLUSIONES

Como conclusiones podemos obtener las siguientes:

- Buena correlación entre los tres criterios y los parámetros clásicos grado y permeación linfática.
- El índice Ki-67 y la proporción p53 permite distinguir entre:
  - G3 y G2-G1.
  - L1 y L0-Lx.
- Existe correlación entre volumen tumoral y expresión de p53.

## REFERENCIAS

1. CORNELISSE CJ, TANKE HJ: Flow cytometry. En: Bibbo M de *Comprehensive cytopathology*. Filadelfia, WB Saunders Co 1991; 984-1.010.
2. JOHNSON TS, KATZ RL, PERSHOUSE M: Flow cytometric applications in citopathology. *Anal Quant Cytol Histol* 1988; **10**: 423-458.
3. MUÑOZ A: *Cancer. Genes y Nuevas terapias*. Capítulos 4, 6, 7 ,8. *Editorial Hélice* 1997. Madrid.
4. TRIBUKAIT B, GUSTAFSON H, EPOSTI PL: The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumours: a study of 100 untreated cases. *Br J Urol* 1982; **54**: 130-135.
5. GUSTAFSON H, TRIBUKAIT B, EPOSTI PL: DNA pattern, histological grade and multiplicity related to recurrence rate in superficial bladder tumours. *Scand J Urol Hephrol* 1982; **16**: 135-139.
6. SHAPIRO HM: Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity. *Arch Pathol Lab Med* 1989; **113**: 591-597.
7. WIJKSTROM H, TRIBUKAIT B: Deoxyribonucleic acid flow cytometry in predicting response to radical radiotherapy of bladder cancer. *J Urol* 1990; **144**: 646-650.
8. COON JS, LANDAY AL, WINSTEIN RS: Biology of disease. Advances y flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 1987; **57**: 453-479.
9. BARLOGIE B, RABER MN, SCUMANN J y cols.: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983; **43**: 3.982-3.987.
10. LEVINE AJ, MOMAND J, FINLAY CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; **35**: 453-456.
11. VOGELSTEIN B, KINZLER KW: p53, function and dysfunction. *Cell* 1992; **70**: 523-526.
12. HARRIS CC, HOLLSTEIN M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Eng J Med* 1993; **329**: 1.318-1.326.
13. BROWN DC, GATTER KC: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathol* 1990; **17**: 489-503.
14. GERDES J, LEMKE H, BAISCH H y cols.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol* 1984; **133**: 1.710-1.715.
15. SASAKI K, MURAKAMI T, KAWASAKI M y cols.: The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987; **133**: 579-584.

16. LÓPEZ F, BELLOC F, LACOMBE F y cols.: Modalities of synthesis of Ki-67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 1991; **12**: 42-49.
17. VERHEIJEN R, KUIJPERS HJH, VAN DRIEL R y cols.: Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 1989; **92**: 531-540.
18. ISOLA J, HELIN H, KALLIONIEMI OP: Immunoelectron-microscopic localisation of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. *Histochem J* 1990; **22**: 498-506.
19. SCOTT RJ, HALL PA, HALDANE S y cols.: A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Path* 1991; **165**: 173-178.
20. GERDES J, LILI, SCHLUETER C y cols.: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; **138**: 867-873.
21. DUCHROW M, SCHLÜTER C, WOHLENBERG C y cols.: Molecular characterisation of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif* 1996; **29**: 1-12.
22. VERONESE S, GAMBACORTA M: Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1991; **95**: 30-34.
23. TAMURA Y: Quantitative analysis of brain tumor growth potential by nuclear DNA measurement and Ki-67 labelling index. *Kitakanto Igaku* 1993; **43**: 609-626.
24. WEISS LM, STRICKLER JG, MEDEIROS LJ y cols.: Proliferative rates of non-hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. *Hum Pathol* 1987; **18**: 1.155-1.159.
25. CARR K, HEFFESS C, JIN L y cols.: Immunohistochemical analysis of thyroid carcinomas utilizing antibodies to p53 and Ki-67. *Applied Immunohistochem* 1993; **1**: 201-207.
26. FONTANINI G, PINGITORE R, BIGINI D y cols.: Growth fraction in non-small cell lung cancer estimated by proliferating cell nuclear antigen and comparison with Ki-67 labelling and DNA flow cytometry data. *Am J Pathol* 1992; **141**: 1.285-1.290.
27. HEDLEY DW, FRIEDLANDER ML, TAYLOR IW y cols.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; **31**: 1.333-1.335.
28. DRESSLER LG, BARROW SA: DNA flow cytometry in solid tumours: Practical aspects and clinical applications. *Semin Diagn Pathol* 1989; **6**: 55-82.
29. VINDELOV LL, CHRISTENSEN IJ: A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1990; **11**: 753-770.
30. WERSTO RP, LIBLIT RL, KOS LG: Flow Cytometric DNA analysis of human solid tumours: a review of the interpretation on DNA Histograms. *Hum Pathol* 1991; **22**: 1.085-1.098.
31. BLOMJOUS CEM, SCHIPPER NW, BAAK JPA y cols.: Retrospective study of prognostic importance of DNA flow cytometry of urinary bladder carcinoma. *J Clin Pathol* 1988; **41**: 21-25.
32. MURPHY WM, CHANDLER RW, TRAFFORD RM: Flow cytometry of deparaffined nuclei compared to histological grading for the pathological evaluation of transitional cell carcinomas. *J Urol* 1986; **135**: 694-697.
33. MALMSTRÖM PU, NORKEN BJ, ANDERSSON B y cols.: Recurrence, progression and survival in bladder cancer. A retrospective analysis of 232 patients with more than 5 year follow up. *Scand J Urol Nephrol* 1987; **21**: 185-195.
34. THOMAS DJ, ROBINSON MC, CHARLTON R y cols.: P53 expression, ploidy and progression in pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1994; **73**: 533-537.
35. VASKO J: Prognosis in bladder cancer. A study of cytometric, morphometric and immunohistochemical techniques. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1994; **160**: 1-73.
36. NAKOPOULOU L, CONSTANTINIDES C, PAPANDROPOULOS J y cols.: Evaluation of overexpression of p53 tumour suppressor protein in superficial and invasive transitional cell bladder cancer: comparison with DNA ploidy. *Urology* 1995; **46**: 334-340.
37. DEVITA R, FORTE D, MAGGI F y cols.: Cellular DNA content and proliferative activity evaluated by flow cytometry versus histopathological and staging classifications in human bladder tumours. *Eur Urol* 1991; **19**: 65-73.
38. TETU B, ALLARD P, FRADET Y y cols.: Prognostic significance of nuclear DNA content and S-phase fraction by flow cytometry in primary papillary superficial bladder cancer. *Hum Pathol* 1996; **27**: 922-926.
39. PICH A, CHIUSA L, COMINO A y cols.: Cell proliferation indices, morphometry and DNA flow cytometry provide objective criteria for distinguish low and high grade bladder carcinomas. *Virchows Arch* 1994; **424**: 143-148.
40. MIYAKAWA A, TACHIBANA M, TAZAKI H: Flow cytometric measurements of deoxyribonucleic acid ploidy and proliferative activity for evaluating malignant potential human bladder cancers. *Cancer Detect Prev* 1995; **19**: 165-172.
41. LIPONNEN PK, ESKELINEN MJ, NORDLING S: Progression and survival in transitional bladder cancer: a comparison of established prognostic factors, S-phase fraction and DNA ploidy. *Eur J Cancer* 1991; **27**: 887-881.
42. GUSTAFSON H, TRIBUKAIT B: Characterisation of bladder carcinomas by flow DNA analysis. *Eur Urol* 1985; **11**: 410-417.
43. NORMING U, TRIBUKAIT B, GUSTAFSON H y cols.: Deoxyribonucleic acid profile and tumour progression in primary carcinoma in situ of the bladder: a study of 63 patients with grade 3. *J Urol* 1992; **147**: 11-15.
44. KLEIN FA, HERR HW, SOGANI PC, WHITMORE WF, MELAMED NR: Detection and follow-up of carcinoma of the urinary bladder by flow cytometry. *Cancer* 1982; **50**: 389-395.

45. MALMSTRÖM PU, NORLÉN BJ, ANDERSSON B y cols.: Combination of Blood group ABH antigen status and DNA ploidy as independent prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *British J Urol* 1989; **64**: 49-55.
46. FARSUND T, HOESTMARK JG, LAERUM OD: Relation between flow cytometric DNA distribution and pathology in human bladder cancer. *Cancer* 1984; **54**: 1.771-1.777.
47. LIEDL T: Flow Cytometric DNA/cytokeratin analysis of bladder lavage: methodical aspects and clinical implications. *Urol Int* 1995; **54**: 22-47.
48. LEE S, KIM Y: Flow cytometric determination of DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder: predictability of ploidy with regard to pelvic lymph node metastasis. *Int J Urol* 1994; **1**: 232-236.
49. SHAABAN AA, TRIBUKAIT B, EL-BEDEIWIY AF y cols.: Prediction of lymph node metastases in bladder carcinoma with deoxyribonucleic acid flow cytometry. *J Urol* 1990; **144** (4): 884-847.
50. TOYOTA K, NAGAMOIRI S, KASHIWAGI A, y cols.: Flow cytometric analysis of DNA content of urinary bladder cancers. Study on primary and metastasized lymph nodes. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1995; **86**: 1.435-1.439.
51. STRAVOPOULOS EN, IOACKIM-VELOGIANNI E, HASTAZERIS K, y cols.: Growth fractions in bladder cancer defined by Ki-67: association with cancer grade, category and recurrence rate of superficial lesions. *Br J Urol* 1993; **72**: 736-739.
52. LIMAS C, BIGLER A, BAIR R y cols.: Proliferative activity of urothelial neoplasms: comparison of BrDU incorporation, Ki-67 expression, and nuclear organizer regions. *J Clin Pathol* 1993, **46**: 159-165.
53. OKAMURA K, MIYAKE K, KOSHIKAWA T y cols.: Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol* 1990; **144**: 875-878.
54. KRÜGER S, MÜLLER H: Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol* 1995; **75** (4): 480-484.
55. POPOV Z, HOZNEK A, COLOMBEL M y cols.: The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997; **80**: 1.472-1.481.
56. NAKAPOULOU L, VOULAKOV C, ZERVAS A y cols.: The prevalence of bcl-2, p53 and Ki-67 immunoreactivity in transitional bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 1998; **29**: 146-154.
57. LIUKKUNEN TJO, LIPPONEN PK, HELLE M y cols.: Immunoreactivity of bcl-2, p53 and EGFr is associated with tumour stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. *Urol Res* 1997; **25**: 1-8.
58. MELLON K, NEAL DE, ROBINSON MC y cols.: Cell cycling in bladder carcinoma determined by monoclonal antibody Ki-67. *Br J Urol* 1990; **66**: 281-285.
59. WRIGTH C, THOMAS D, MELLON K y cols.: Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation con Ki-67 index. *Br J Urol* 1995; **75**: 173-179.
60. JONES HL, DELAHUNT B, BETHWAITE PB, THORNTON A: Polyclonal Ki-67 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Pathology* 1997; **29** (1): 84-87.
61. MOCH H, SAUTER G, MIHATSCH y cols.: p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumour proliferation in urinary bladder cancer. *Hum Pathol* 1994; **25**: 1.346-1.351.
62. MULDERS AH, VAN HOOTEGEM JC y cols.: Prognostic factors in bladder carcinoma: histological parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen Ki-67. *J Pathol* 1992; **166**: 37-43.
63. PFISTER C, BUZELIN F, CVASSE C y cols.: Comparative analysis of MIB1 and p53 expression in human bladder tumours and their correlation with cancer progression. *Eur Urol* 1998; **33**: 278-284.
64. SOINI Y, TURPEENNIEMI-HUJANEN T, KAMEL D y cols.: p53 immunohistochemistry in transitional cell carcinoma and dysplasia of the urinary bladder correlates with disease progress. *Br J of Cancer* 1993; **68**: 1.029-1.035.
65. SARKIS AS, DALBAGNI G, CORDON CARDO C y cols.: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 53-59.
66. ESRIG D, SPRUCK Ch III, NICHOLS PW y cols.: P53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumour grade and stage in bladder cancer. *American J of Pathol* 1993; **43**: 1.389-1.397.
67. SARKIS AS, DALBAGNI G, CORDON CARDO C y cols.: Association of p53 nuclear overexpression and tumour progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994; **152**: 388-392.
68. ESRIG D, ELMAIJAN D, GROSHEM S y cols.: Accumulation of nuclear p53 and tumour progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; **331**: 1.259-1.264.
69. SERTH J, KUCZYK MA, BOKERMAYER C y cols.: p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J of Cancer* 1995; **71**: 201-205.
70. SARKIS AS, BAJORIN DF, REUTER VE y cols.: Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 1.384-1.390.
71. VATNE V, MAARTMANN-MOE H, HOESTMARK J: The prognostic value of p53 in superficially infiltrating transitional cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 1995; **29**: 491-495.
72. VET JA, BRINGUIER PP, SCHAAFSMA HE y cols.: Comparison of p53 protein overexpression with p53 mutation in bladder cancer: clinical and biologic aspects. *Lab Inves* 1995; **73**: 837-843.
73. POPOV Z, HOZNEK A, COLOMBEL M y cols.: Evaluations de la surexpression de la protéine p53 dans le cancer de la vessie: valeur pronostique. *Chirurgie* 1996; **121**: 461-469.
74. UNDERWOOD MA, REEVES J, SMITH G y cols.: Overexpression of p53 protein and its significance for recurrent progressive bladder tumours. *Br J Urol* 1996; **77**: 659-666.

75. GLICK SH, HOWELL LP, DEVERE WHITE RW: Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1996; **155**: 1.754-1.757.
76. LACOMBE L, DALBAGNI G, ZHANG ZF y cols.: Overexpression of p53 protein in a high risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guerin therapy: correlation to clinical outcome. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 2.646-2.652.
77. WU CS, POLLACH A, CZERNIAK B y cols.: Prognostic value of p53 in muscle-invasive bladder cancer treated with preoperative radiotherapy. *Urology* 1996; **47**: 305-310.
78. TSUJI M, KOJIMA K, MURAKAMI Y y cols.: Prognostic value of Ki-67 antigen y p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997; **79**: 367-372.
79. CORDON CARDO C, ZHANG ZF, DALBAGNI G y cols.: Co-operative effects of p53 and pRb alterations in the primary superficial bladder tumours. *Cancer Res* 1997; **57**: 1.217-1.221.
80. BURKHARD FC, MARKWALDER R, THALMANN GN y cols.: Inmunohistochemical determination of p53 overexpression. AN easy and readily method to identify progression in superficial bladder cancer?. *Urol Res* 1997; **25 (Suppl 1)**: 31-35.
81. LEE E, PARK Y, LEE C: Prognostic markers of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for multiple high grade stage T1 bladder cancer. *Int J Urol* 1997; **4**: 552-556.
82. RAITANEN MP, TAMMELA TLJ, KALLIOINEN M y cols.: P53 accumulation, deoxyribonucleic acid ploidy and progression of bladder cancer. *J Urol* 1997; **157**: 1.250-1.253.
83. PAGES F, FLAM TA, VIEILLEFOND A y cols.: P53 status does not predict initial clinical response to bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in T1 bladder tumours. *J Urol* 1988; **159**: 1.079-1.084.
84. GARDINER RA, WALS MD, ALLEN V y cols.: Immunohistochemical expression of p53 in primary pt1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. *Br J Urol* 1994; **73**: 526-532.
85. MENENDEZ V, MOLINA R, ALCARAZ A, ALVAREZ-VIJANDE R, ALCOVER JA, BALLESTA MA, CARRTERO P: Expresión del gen supresor tumoral p53 en los carcinomas transicionales superficiales de vejiga. *Actas Urol Esp* 1998; **22**: 642-649.
86. JAHNSEN S, KAERLSSON MG: Predictive value of p53 and pRb immunostaining in locally advanced bladder cancer treated with cystectomy. *J Urol* 1998; **160**: 1.291-1.296.
87. HERMANN GS, HORN T, STEVEN K: The influence of the level of lamina propria invasion and the prevalence of p53 nuclear accumulation on survival in stage T1 transitional cellbladder cancer. *J Urol* 1998; **159**: 91-94.
88. VOLLMER RT, HUMPHREY PA, SWANSON PE y cols.: Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: its relation to histologic grade and expression of p53, MIB-1, c-erb2, epidermal growth factor and bcl-2. *Cancer* 1998; **82**: 715-723.

---

Dr. J.L. Moyano Calvo  
C/ Bogotá, 19, Portal 3 - 2º B  
41013 Sevilla

(Trabajo recibido el 5 Junio de 2000)