

VALOR PRONÓSTICO DE LA P53, Ki67 Y LA PROTEÍNA Rb EN LOS TUMORES VESICALES INFILTRANTES

D. SÁNCHEZ ZALABARDO, D. ROSELL COSTA, J.M. FERNÁNDEZ MONTERO, J. LÓPEZ FERRANDIS, J. AROCENA GARCÍA-TAPIA, S. JIMÉNEZ GARÍN*, E. DE ÁLAVA CASADO*, J.E. ROBLES GARCÍA, J.J. ZUDAIRE BERGERA, J.M. BERIÁN POLO

*Departamento de Urología. *Departamento de Anatomía Patológica. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona (Navarra).*

PALABRAS CLAVE:

p53. Ki67. Prot Rb. Tumor vesical infiltrante.

KEY WORDS:

p53. Ki67. Prot Rb. Invasive bladder cancer.

Actas Urol Esp. 26 (2): 98-103, 2002

RESUMEN

OBJETIVOS: Valorar la capacidad pronóstica de la sobre-expresión de p53, la expresión del factor de proliferación nuclear Ki67 y de la pérdida de expresión de la proteína del retinoblastoma (prot. Rb), valorados mediante inmunohistoquímica, en los tumores vesicales infiltrantes.

MATERIAL Y MÉTODOS: 47 pacientes diagnosticados de tumor vesical profundo. 42 varones y 5 mujeres. Edad media 63 años. Mediana de seguimiento 10 meses. Recidiva en 19 pacientes (40%). Tiempo medio hasta la recidiva 8,5 meses. Se valoró la expresión de p53 y Ki67 en 47 pacientes y la de la prot. Rb en 40 pacientes.

RESULTADOS: p53: La media de expresión fue del 41%. Existen diferencias significativas en la expresión de p53 entre los pacientes que no presentaron recidiva y los que si lo hicieron ($p = 0,03$). Los pacientes con $p53 > 20\%$ tienen una supervivencia libre de progresión significativamente menor que los pacientes con $p53 < 20\%$ ($p = 0,04$). Ki67 y prot. Rb: No existen diferencias significativas en la aparición de recidivas ni en el tiempo libre de progresión con la sobre-expresión de Ki67 ni con la pérdida de expresión de prot. Rb. Existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 con la de Ki67 ($p = 0,001$) y la de prot. Rb ($p = 0,03$).

CONCLUSIONES: La oncoproteína p53 es un buen marcador para el pronóstico de recidivas y de supervivencia libre de enfermedad en los tumores vesicales profundos.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To determinate whether increased expression of the p53 and Ki67 and the of the tumour suppresor gene retinoblastoma (prot Rb), in an immunohistochemistry study, were associated with relapse in invasive bladder cancer.

MATERIALS AND METHODS: 47 patients with invasive bladder cancer. 42 men and 5 women. Mean age 63 years old. Relapse in 19 patients (40%). Mean time until recurrence 8.5 months. p53 and Ki67 were study in 47 patients and prot Rb in 40 patients.

RESULTS: p53: Mean expression 41%. There were significant differences in the increased expression of p53 between patients with and without relapse ($p = 0.03$). A statistically significant association was then observed between patients with $p53 > 20\%$ (vs $p53 < 20\%$) and adverse outcome of the disease ($p = 0.04$). Ki67 and prot Rb: There were no significant differences in relapse and progression free survival between $Ki67 > 40\%$ (vs $Ki67 < 40\%$) and prot Rb $< 10\%$ (vs prot Rb $> 10\%$). p53 expression showed a statistically significant correlation with Ki67 and prot Rb.

CONCLUSION: p53 is a good prognostic marker for the relapse and progression free survival in invasive bladder cancer.

El pronóstico de los tumores vesicales infiltrantes depende fundamentalmente del estadio patológico y del grado de diferenciación tumoral. En los últimos años se está intentando complementar estos factores pronósticos con estudios en los que se incluyen distintos factores moleculares. Las mutaciones de los genes que codifican las proteínas relacionadas con el ciclo celular así como los acúmulos patológicos de estas proteínas son los marcadores más estudiados.

En el presente estudio se valora la capacidad pronóstica de la expresión de la oncoproteína p53, la expresión del factor de proliferación nuclear Ki67, y la pérdida de expresión de la proteína del retinoblastoma (prot. Rb).

Se estudiaron 47 pacientes diagnosticados de tumor urotelial vesical con infiltración de la capa muscular en los que, mediante inmunohistoquímica, se valoró la alteración de cada uno de los marcadores tumorales, relacionando estas alteraciones con la aparición de recidivas y el tiempo libre de recidiva. También se estudió la posible asociación de los marcadores entre sí.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó el estudio inmunohistoquímico en 53 pacientes diagnosticados de tumor vesical infiltrante. De ellos se excluyeron del estudio 6 pacientes por presentar un adenocarcinoma vesical, 4 carcinomas escamosos y un carcinoma "in situ".

De los 47 pacientes incluidos en el estudio, 42 fueron varones y 5 mujeres. La edad media fue de 63 años (41-82 años).

El tratamiento consistió en cistectomía radical en 23 pacientes (49%), cistectomía más quimioterapia en otros 13 pacientes (27%) y quimioterapia más radioterapia en 11 pacientes (23%).

Se asoció quimioterapia en los pacientes que presentaron enfermedad localmente avanzada tras la cistectomía (pT4) y/o en pacientes que presentaron afectación ganglionar en el momento de la cistectomía.

En 11 pacientes se realizó un tratamiento de conservación vesical asociando quimio y radioterapia. Siguiendo la clasificación TNM 1997, tras la cistectomía 13 pacientes presentaron estadio pT2 (27%), 13 estadio pT3 (27%), 9 estadio pT4 (19%). En un paciente (2%) no se observó tumor en la

pieza de cistectomía (pT0). Todos los pacientes que siguieron la pauta de conservación vesical presentaban un estadio clínico T2 N0 M0.

Once pacientes (23%) presentaron afectación ganglionar en el momento de la cistectomía.

El tumor estaba bien diferenciado (G1) en tres pacientes (6,4%), moderadamente diferenciado (G2) en 13 pacientes (27,7%) y pobremente diferenciado (G3) en 31 pacientes (66%).

La media de seguimiento fue de 14 meses (1-51). Mediana 10 meses. Dos pacientes se perdieron a lo largo del seguimiento.

A lo largo del seguimiento, 19 pacientes (40,4%) presentaron recidiva local o metástasis a distancia. 16 pacientes (34%) fallecieron, 11 con progresión de la enfermedad y 5 por otras causas. El tiempo medio hasta la recidiva fue de 8,5 meses (mediana 6 meses). El tiempo medio hasta la muerte fue de 11,3 meses (mediana 10 meses).

Estudio inmunohistoquímico

Se realizó el estudio inmunohistoquímico sobre las piezas de cistectomía en los casos en los que el tratamiento definitivo fue la cirugía y sobre la resección transuretral diagnóstica en los casos en los que se realizó conservación vesical. En los 47 pacientes se valoró la expresión de p53 y Ki67, mientras que la prot Rb sólo pudo valorarse en 40 pacientes.

Todos los análisis inmunohistoquímicos se han realizado sobre secciones de 4 micrómetros, fijadas en formalina y obtenidas del tumor primario incluido en parafina. La inmunohistoquímica se ha llevado a la práctica con un inmunoteñidor automático (Techmate 500; Dako, Copenhague, Dinamarca) con el EnVisión + System (Dako), en el cual el anticuerpo secundario se acopla a un polímero de dextrano ligado a las moléculas de peroxidasa. La actividad de peroxidasa endógena se neutraliza con peróxido de hidrógeno al 5% en solución de metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. La recuperación de antígeno se realiza con un tratamiento de microondas durante 20 minutos en un aparato de microondas de 800 wats. Se ha usado suero de conejo para la fase de bloqueo. El anticuerpo primario se aplica durante 120 minutos a temperatura ambiente. Las secciones son entonces lavadas con buffer de lavado a temperatura ambiente. El siguiente paso

es la adición de reactivos con EnVisión + System e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas son lavadas con buffer de lavado y tratadas con una solución de 0,05% de hidrócloruro de diaminobencina y 0,1% de peróxido de hidrógeno 0,05 mL/I de TRIS-tampón salino a pH 7,4 a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Después del lavado en agua destilada durante 3 minutos las preparaciones son teñidas con una solución modificada de hematoxilina de Harris, deshidratada y montada. Para los controles negativos se usa suero normal de cordero en vez de anticuerpo primario.

Anticuerpos utilizados: Para Ki67 usamos MIB 1 (Zymed) en una dilución de 1/800. Para p53 usamos DO7 (Novocastra) en una dilución de 1/1600. Para la prot Rb, anticuerpo Pharmin-Gen, en una dilución 1/50. La recuperación del antígeno por microondas se ha realizado para todos los anticuerpos.

En cada caso se ha expresado el resultado en porcentaje de núcleos teñidos.

El estudio de los resultados se ha realizado de dos maneras:

a) Comparando entre los grupos la media del porcentaje de células teñidas.

b) Agrupando a los pacientes de acuerdo con el porcentaje de expresión. En el caso del Ki67 en dos grupos, el que incluye los pacientes que expresan entre 0 y 40% y el que recoge a los pacientes que expresan más de 40% de las células. En el caso p53 se dividen en aquellos que expresan p53 entre el 0 y 20% y aquellos que tienen una expresión mayor del 20%. Para la pérdida de expresión de la prot Rb se utilizó como punto de corte el 10% de las células teñidas. El criterio para la agrupación se basa en lo publicado y en criterios propios.

Las preparaciones inmunohistoquímicas fueron estudiadas de forma independiente por dos anatomopatólogos. Cuando existía una discordancia de células teñidas mayor del 5% se efectuó una nueva evaluación de las preparaciones.

Estudio estadístico

Para el estudio de asociación de variables cualitativas se han utilizado tablas de contingencia 2 x 2, determinándose el Test exacto de Fisher. Para la comparación de medias se ha utilizado la prueba T para la comparación de medias. El coeficiente de

correlación de Pearson para la relación de variables cuantitativas y el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier con comparación de curvas de supervivencia (prueba Log-Rank).

El estudio estadístico se ha realizado con el programa estadístico SPSS.

RESULTADOS

La p53 se expresó en 40 pacientes (85%). La media de expresión fue del 41%. En los pacientes que presentaron recidiva tras el tratamiento, la media de p53 fue del 54% mientras en los pacientes que no tuvieron recidivas esta media fue del 31%. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p = 0,044$). 21 pacientes (44,6 %) presentaron p53 < 20% y 26 > 20%.

En todos los pacientes existía algún tipo de expresión de Ki67. La media de expresión en los pacientes en los que no se produjo recidiva, fue del 22% mientras que la media en los pacientes en los que si hubo recidiva fue del 28% ($p = 0,2$). 21 pacientes (44,6%) presentaron Ki67 < 40% y 26 > 40%.

En todos los pacientes existía algún grado de pérdida de expresión de la prot Rb. La media de expresión en pacientes que no habían recidivado fue del 54% mientras que en los pacientes con recidiva esta media fue del 31% ($p = 0,1$). 29 pacientes (71%) presentaron prot Rb > 10% y 11 < 10%.

Existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 con la expresión de Ki67 ($p = 0,001$) y con la pérdida de expresión de prot Rb ($p = 0,03$). Esta correlación no aparece cuando se comparan Ki67 con prot Rb ($p > 0,05$).

Relación de p53 Ki67 y prot Rb con la progresión (Tabla I)

Del grupo con una expresión de p53 < 20%, 16 pacientes no presentaron recidiva y 5 pacientes si lo hicieron. Del grupo con una expresión de p53 > 20%, 10 no presentaron recidiva y 14 si lo hicieron

TABLA I

RELACIÓN DE p53, Ki67 Y Rb CON LAS RECIDIVAS

		p53*		Ki67		Rb	
		< 20%	> 20%	< 40%	> 40%	> 10%	> 10%
Progresión	No	16	10	14	12	16	5
	Si	5	14	7	12	10	6

* $p = 0,034$

($p = 0,034$). En el estudio de regresión logística multivariado, la expresión de p53 deja de ser un factor influyente independiente en beneficio del estadio ($p = 0,05$ ExpB = 5,14).

Los pacientes con una expresión de Ki67 < 40% presentaron recidiva en 7 ocasiones y 14 se encuentran libres de enfermedad. De los 24 pacientes seguidos con Ki67 > 40% la mitad recidivaron y la otra mitad no ($p = 0,3$) (Fig. 1).

16 pacientes con prot Rb > 10% no recidivaron mientras que 11 si lo hicieron. En el grupo con expresión de prot Rb < 10%, 5 no progresaron y 6 si lo hicieron ($p = 0,4$).

Relación de p53, Ki67 y prot Rb con el tiempo libre de recidiva.

Se compararon las curvas de supervivencia libre de enfermedad mediante la prueba de Log-Rank, los pacientes con p53 < 20% tienen un período libre de recurrencia mayor que los pacientes con p53 > 20%. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p = 0,03$).

No existen diferencias en el tiempo hasta la recidiva utilizando como marcadores el Ki67 ni la prot Rb.

Relación de p53, Ki67 y prot Rb con la diferenciación celular y la progresión tumoral

No existen diferencias significativas en el porcentaje de expresión de estos marcadores cuando se comparan lesiones G1/G2 con tumores G3.

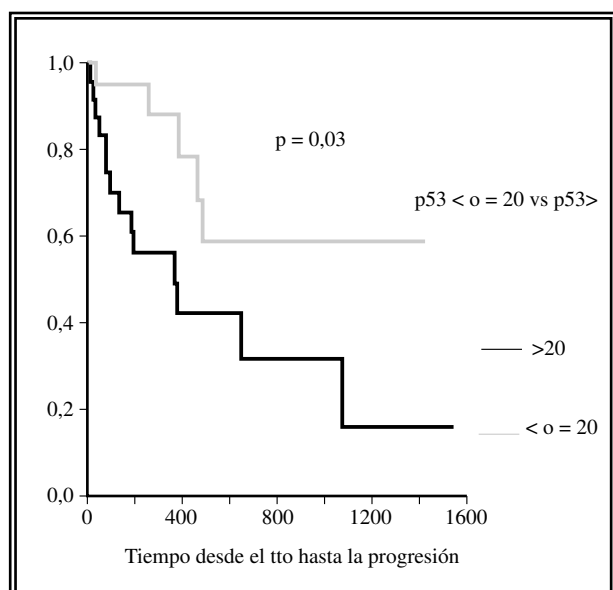


FIGURA 1. Supervivencia libre de progresión. p53 < 20 vs p53 > 20.

Si dividimos a los pacientes con tumores bien o moderadamente diferenciados (G1-G2) de los pobremente diferenciados (G3), se observa que en estos últimos, que la expresión de p53 por encima del 20% es un factor pronóstico estadísticamente significativo para la aparición de recidiva ($p = 0,033$) y para el tiempo libre de recidiva ($p = 0,040$).

DISCUSIÓN

La utilización de marcadores celulares está intentando complementar el pronóstico de distintos tumores que hasta ahora se basaba en datos clínicos y/o patológicos.

Los tumores vesicales no son una excepción. Se han intentado buscar marcadores que nos orienten en el pronóstico de recidivas y progresión de los tumores uroteliales superficiales y profundos.

En nuestro estudio utilizamos las oncoproteínas p53 y proteína Rb y el índice de proliferación nuclear Ki67. Existe una correlación entre el acúmulo de p53 con el aumento del índice de proliferación nuclear Ki67 así como con la pérdida de expresión de la proteína de la prot Rb, no encontrando relación de la pérdida de la prot Rb con el índice Ki67.

La proteína p53 es la más frecuentemente alterada en los tumores humanos¹. Es una fosfoproteína de 53 Kd de peso molecular codificada en el cromosoma 17p13.1 y sus funciones principales son provocar apoptosis, inhibir el ciclo celular y preservar la estabilidad genética. Además, está involucrado en la regulación de gran parte del ciclo celular. Las alteraciones morfológicas de la p53 provocan su acúmulo en el núcleo celular alterándose de esta forma todos los mecanismos de regulación del ciclo celular. Existe una concordancia entre la expresión por inmunohistoquímica y la presencia de mutaciones en el gen que codifica la proteína p53², aunque ésta no es completa. Existen mutaciones (tipo no missense) que dan lugar a proteínas no detectables por inmunohistoquímica³. El uso del anticuerpo monoclonal p1801 ha demostrado una sensibilidad del 90,3% considerándola positivo cuando el 20% o más de las células se tiñen positivamente⁴.

El gen del retinoblastoma fue el primer reconocido como gen de supresión tumoral. La proteína que codifica (prot Rb) regula la progresión del ciclo

celular en G1 ante la falta de estímulos de crecimiento. Su mecanismo regulador está íntimamente relacionado con la actividad del p53^{5,6}.

El antígeno de proliferación nuclear Ki67 es un anticuerpo que reconoce proteínas nucleares pertenecientes al complejo ADN-replicasa⁷. Se trata de un marcador relacionado con la actividad celular y puede expresarse en todas las fases celulares excepto en G0^{8,9}.

La proteína p53 es la oncoproteína más estudiada en los tumores vesicales. Su utilidad pronóstica ha sido estudiada tanto en tumores vesicales superficiales como en tumores profundos, aunque en estos últimos existen resultados contradictorios. En la mayoría de los casos se ha encontrado una relación de la sobre-expresión de p53 con la aparición de recidivas, progresión y con la disminución del tiempo libre de progresión^{2,10-15}. Aunque existen pocos estudios en los que únicamente se incluyan tumores infiltrantes. En nuestra serie se reproducen estos resultados. Si se clasifican los pacientes según la diferenciación celular puede observarse una diferencia significativa de expresión de p53 entre los tumores indiferenciados y los bien/moderadamente diferenciados¹⁰, en nuestro caso, no encontramos estas diferencias, pero si seleccionamos únicamente los tumores indiferenciados, el p53 sí es un factor pronóstico significativo en la aparición de recidivas y en el tiempo libre de enfermedad. Cuando se comparan los distintos estadios patológicos, existen diferencias de expresión entre los tumores superficiales e infiltrantes, aunque muy pocos autores encuentran diferencias significativas entre los distintos tumores infiltrantes^{11,13-15}. Otros autores sin embargo, no encuentran diferencias en el número de recidivas ni en el tiempo libre de enfermedad con los aumentos de expresión de p53 de forma global ni cuando se estudian distintos grupos de pacientes^{10,16-20}.

El Ki67 tiene un comportamiento paralelo al p53, con el que está estadísticamente relacionado en casi todos los estudios¹¹. Se expresa en la mayoría de los tejidos tumorales como fue en nuestro caso (100% de pacientes expresaban Ki67) aunque se considera patológico cuando supera el 40% de expresión. El aumento de actividad nuclear se relaciona directamente con una peor diferenciación celular y con un estadio más

avanzado, aunque dentro de los tumores infiltrantes no está totalmente demostrada esta diferenciación^{7-9,11}. En nuestro caso no aparece relación entre este marcador con la progresión tumoral tras el tratamiento ni con el periodo libre de enfermedad.

La prot Rb es un marcador menos estudiado en tumores vesicales. Su pérdida de expresión suele asociarse a un aumento de la expresión de p53 con el que está funcionalmente relacionado. Cuando se estudia la prot Rb distintos autores demuestran una disminución de la supervivencia global de los pacientes^{2,21,22} con la pérdida de expresión de esta proteína, aunque existen resultados contradictorios en este sentido¹⁴. Nosotros tampoco encontramos esta relación con la progresión de la enfermedad ni con la supervivencia libre de enfermedad.

CONCLUSIONES

Existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 con el factor de proliferación nuclear Ki67 y con la pérdida de expresión de la proteína del retinoblastoma.

La oncoproteína p53 es un buen marcador para el pronóstico de recidivas y de supervivencia libre de enfermedad en los tumores vesicales infiltrantes, especialmente en los indiferenciados.

No encontramos diferencias significativas en la aparición de recidivas ni en el tiempo libre de enfermedad en los pacientes con sobre-expresión de Ki67 ni en los pacientes con pérdida de expresión de la prot. Rb.

REFERENCIAS

1. NÚÑEZ DOMÉNECH L, ESCUÍN BORRÁS D, BAR-NADAS MOLINS A: p53: Gen supresor de tumores. *Arán ed. Oncología clínica y molecular* 2000; **11**: 109-117.
2. BURCHARDT M, BURCHARDT T, SHABSIGH A et al.: Current concepts in biomarker technology for bladder cancers. *Clinical Chemistry* 2000; **46**: 595-605.
3. MARTÍN-MARQUINA A: Estudio de los oncogenes supresores tumorales p53 y p16 en el carcinoma transicional de vejiga. Tesis doctoral. Universidad de Navarra, 1999.
4. CORDÓN-CARDO C, DABAGNI G, SÁEZ GT et al.: p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994; **56**: 347-353.
5. SOLÉ BALCELLS F, CHÉCHILE G, ALGABA F, VILLAVICENCIO H: Biología molecular de los tumores urológicos. Tema monográfico LX Congreso Nacional de Urología. Junio, 1995.

6. TARÓN ROCA M: Ciclo celular. *Arán Ed. Oncología clínica y molecular* 2000; **4**: 49-57.
7. BUSH C, PRICE P, NORTON J et al.: Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: its potential clinical importance. *Br J Cancer* 1991; **64**: 357-360.
8. OKAMURA K, MIYAKE K, KOSHIKAWA T, ASAI J: Growth fractions of transitional carcinomas of the bladder defined by monoclonal antibody Ki-67. *J Urol* 1990; **144**: 875-878.
9. FONTANA D, BELLINA M, GUBETTA L et al.: Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol* 1992; **148**: 1.149-1.151.
10. JAHNSON S, KARLSSON M: Tumor mapping of regional immunostaining for p21, p53, and mdm2 in locally advanced bladder carcinoma. *Cancer* 2000; **89**: 619-629.
11. POPOV Z, HOZNEK A, COLOMBEL M et al.: 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.
12. KONG G, SHIN KY, OH YH et al.: Bcl-2 and p53 expression in invasive bladder cancers. *Acta Oncol* 1998; **37**: 715-720.
13. NAKOPOULOU L, VOURLAKOU C, ZERVAS A et al.: The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transicional carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 1998; **29**: 146-154.
14. WRIGHT C, THOMAS D, MELLON K, NEAL DE, WILSON CH: Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation with Ki67 index. *Br J Urol* 1995; **75**: 173-179.
15. VOLLMER RT, HUMPHREY PA, SWANSON PE, WICK MR, HUDSON MA: Invasion of the bladder by transitional carcinoma. Its relation to histologic grade and expression of p53, MIB-1, c-erb B-2, epidermal grow factor receptor and bcl-2. *Cancer* 1998; **82**: 715-723.
16. FLESHNER N, KAPUSTA L, EZER D, HERSCHORN S, KLONTZ L: p53 nuclear accumulation is not associated with decreased disease-free survival in patients with node positive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2000; **164**: 1.177-1.182.
17. PLASTIRAS D, MOUTZOURIS G, BARBATIS C, PRESVELOS V, PETRAKOS M, THEODOROU C: Can p53 over-expression, Bcl-2 accumulation and PCNA status be of prognostic significance in high-risk superficial and invasive bladder tumours?. *Eur J Surg Oncol* 1999; **25**: 61-65.
18. NIEHANS GA, KRATZKE RA, FROBERG MK et al.: G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Br J Cancer* 1999; **80**: 1.175-1.184.
19. YUGE F, HIRAKATA H, IGARADHI H et al.: Immunohistochemical study of p53 and Ki-67 antigen expression in bladder carcinoma. *Hinyokika Kyo* 1999; **45**: 453-456.
20. LIANES P, CHARYTONOWICZ E, CORDON CARDO C et al.: Biomarker study of primary nonmetastatic versus metastatic invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998; **7**: 1.267-1.271.
21. CORDÓN CARDO C, WARTINGER D, PETRYLAK D et al.: Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**: 1.251-1.256.
22. LOGOTHETIS CJ, XU HJ, RO JY et al.: Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**: 1.256-1.261.

Dr. D. Sánchez Zalabardo
Departamento de Urología. Clínica Universitaria
Apartado 4209
31080 Pamplona (Navarra)

(Trabajo recibido el 18 julio de 2001)