

Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y Ciclina D1 en el cáncer de vejiga superficial. Estudio en un soporte de tissue microarray

Vallmanya Llena FR, Laborda Rodríguez A, Lloreta Trull J*, Cortadellas Ángel R, Placer Santos J, Gelabert Mas A.

Servicio y Cátedra de Urología. *Servicio de Anatomía Patológica. Hospital del Mar. Universitat Autònoma de Barcelona-Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

Actas Urol Esp. 2006;30(8):754-762

RESUMEN

EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE p53, p21, p16 Y CICLINA D1 EN EL CÁNCER DE VEJIGA SUPERFICIAL. ESTUDIO EN UN SOPORTE DE TISSUE MICROARRAY

Introducción y objetivos: Evaluar, de forma retrospectiva, la relación entre la expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y ciclina D1, con la recurrencia, progresión tumoral y supervivencia en los carcinomas vesicales superficiales.

Métodos: 163 pacientes sometidos a resección transuretral de tumor vesical superficial entre febrero de 1995 y marzo de 2004. Las muestras tumorales evaluadas estaban contenidas en un soporte de tissue microarray, al que se le realizaron varias secciones consecutivas para tinción inmunohistoquímica.

La asociación del grado y estadio tumoral con los marcadores se valoró según el test de Chi-cuadrado y para valorar la relación con la recurrencia, progresión y supervivencia se utilizaron las curvas de Kaplan-Meier y se compararon con el log-rank test.

Resultados: No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los marcadores según el grado y estadio tumoral a excepción de la Ciclina D1, que sí mostraba diferencias significativas según el estadio tumoral ($p=0,030$).

La expresión de p21 se relacionó con la recurrencia tumoral ($p=0,035$), progresión ($p=0,008$) y supervivencia ($p=0,034$). La expresión de p16 también se relacionó con la recurrencia ($p=0,048$) y supervivencia ($p=0,047$), pero no con la progresión tumoral ($p=0,116$).

La expresión de p53 y ciclina D1 no mostraron asociación estadísticamente significativa con la recurrencia y progresión tumoral ni con la supervivencia.

Conclusiones: En nuestra experiencia, sólo los marcadores p16 y p21 pueden ser útiles en el manejo de los tumores vesicales superficiales por ser predictores de recurrencia y supervivencia en pacientes con estadios Ta y T1.

Palabras clave: Ciclina D1. p53. p21. p16. Carcinoma urotelial. Micromatrizes tisulares.

ABSTRACT

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF P53, P21, P16, AND CYCLIN D1 IN SUPERFICIAL BLADDER CANCER. A TISSUE MICROARRAY STUDY.

Introduction and objectives: To retrospectively assess the relationship between immunohistochemical expression of p53, p21, p16, and cyclin D1, with recurrence, progression and survival in superficial bladder cancer.

Methods: 163 patients undergoing transurethral resection for superficial bladder cancer between February 1995 and March 2004. Tumor samples were included in a tissue microarray support that was serially sectioned for immunohistochemical staining.

Grade and stage associations for each marker were evaluated by the Chi-square test. Assessment of the relationship with recurrence, progression, and survival Kaplan-Meier curves and log-rank test were used.

Results: There were no statistically significant differences in marker expression depending on tumor grade and stage, with the exception of Cyclin D1, that was significantly different depending on tumor stage ($p=0.030$).

p21 expression was related to tumor recurrence ($p=0.035$), progression ($p=0.008$) and survival ($p=0.034$). p16 expression was also related to recurrence ($p=0.048$) and survival ($p=0.047$), but not to tumor progression ($p=0.116$).

p53 and Cyclin D1 were not statistically associated with tumor recurrence, progression or survival.

Conclusions: In our experience, only p16 and p21 may be useful in the management of superficial bladder tumors, as they are predictors of recurrence and survival in Ta and T1 patients.

Keywords: Cyclin D1. p53. p21. p16. Urothelial Carcinoma. Tissue Microarray.

La carcinogénesis y la progresión tumoral son el resultado del acumulo de múltiples alteraciones genéticas: activación de oncogenes, delección de regiones cromosómicas e inactivación de genes supresores tumorales¹. La sobreexpresión y las alteraciones en las proteínas codificadas por estos genes, producen alteraciones en el control del ciclo celular.

La p53 es una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular. Actúa a nivel del paso de G1 a S y cuando se activa induce apoptosis en respuesta a la alteración del DNA. La p53 media su efecto en parte a través de la p21 y por ello se estudian normalmente de forma conjunta.

La p21 tiene efecto p53 dependiente y p53 independiente, y este último inhibe a su vez a ciclina-kinasas dependientes (CDKs), deteniendo el ciclo celular al inhibir la replicación de DNA^{2,3,4}.

Las CDKs son facilitadoras de la progresión del ciclo celular y también actúan en el paso de G1 a S, por lo que sus inhibidores pueden bloquear la progresión del ciclo celular.

La proteína p16 es un inhibidor de CDKs y compite por la unión de la ciclina D con CDK4 y CDK6, que a su vez tiene efecto sobre la función de pRb⁵. Cuando se une a las CDKs, la p16 inhibe la fosforilación de pRb inactivándolo, deteniéndose así el ciclo celular.

En el carcinoma urotelial (CU) de vejiga la expresión de p53 es el predictor más importante entre los marcadores, seguido por la de p21, sugiriendo que esta vía es la más importante para la progresión². La pérdida de p16 es a menudo un evento crítico en la progresión de muchos tumores⁶. Hasta la fecha, de los estudios que hay publicados, pocos demuestran una asociación estadísticamente significativa de la expresión de p16 con el pronóstico en el CU cuando se estudia de forma individual^{7,8}.

No sucede así en la expresión de ciclina D1 en el CU, que se ha estudiado más que la expresión de p16. La mayoría de estudios coinciden en que es un predictor importante de supervivencia^{9,10}.

En el presente estudio se pretende evaluar la relación existente de los factores pronósticos de recurrencia, progresión y supervivencia con la expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y ciclina D1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Se estudiaron un total de 187 carcinomas uroteliales, procedentes del archivo de registro de tumores del Servicio de Urología. Se seleccionaron los tumores obtenidos entre 1995 y 2004, que habían sido informados como estadios pTa y pT1, grados 2 y 3 según clasificaciones de la OMS de 1973 (casos desde 1995 hasta 1998) y de la OMS/ISUP de 1999 (los casos posteriores). Todos los casos fueron reevaluados por el mismo uropatólogo siguiendo los criterios de la OMS de 2004, objetivándose discrepancia por sobrevaloración del grado en 27 de los tumores clasificados como G2 en el dictamen histórico, etiquetados de tumores de bajo grado actualmente. El cómputo final fue, por lo tanto, de 160 tumores de alto grado y 27 tumores de bajo grado, 86 tumores pT1 y 101 tumores pTa.

Construcción de TMA

De los 187 bloques de parafina archivados, se seleccionaron las áreas más representativas de cada tumor obteniéndose un cilindro. De los casos más heterogéneos, y de los casos en que existía poca representación tumoral se obtuvieron 2 e incluso 3 cilindros, con el fin de no perder información histológica relevante. Se construyó un soporte de micromatrices tisulares (*tissue microarray*, TMA) formado por 231 cilindros de 0,6 milímetros de diámetro cada uno (Fig. 1).

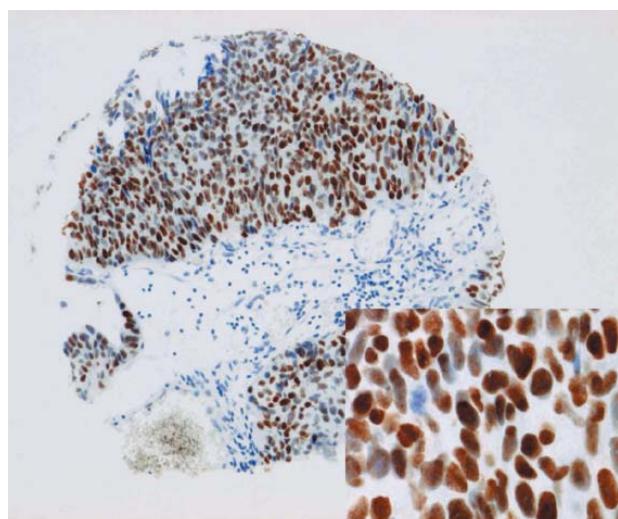


FIGURA 1: Cilindro de 0,6 mm de diámetro y con expresión de p53 positiva.

Se incluyeron de forma aleatoria 10 cilindros de otros tejidos para control, que sirvieron además para la orientación de la lectura y el análisis.

Inmunohistoquímica

Se realizaron varias secciones consecutivas del bloque de parafina; cuatro se utilizaron para tinción inmunohistoquímica con anticuerpos (Ac) para p53 (DO7, Novocastra, Reino Unido, dilución 1:50), p21 (anti p21^{Waf1} SX118, DakoCytomation, Dinamarca, dilución 1:25), p16 (p16^{INK4a} EGH4, DakoCytomation, Dinamarca, prediluido) y ciclina D1 (DCS-6, DakoCytomation, Dinamarca, dilución 1:25). La visualización de la reacción inmunohistoquímica se hizo mediante el sistema de polímeros de dextrano conjugados con anticuerpo secundario (Envision, DakoCytomation, Dinamarca), seguido de revelado con diaminobencidina. Para cada anticuerpo, se utilizaron controles positivos y negativos adecuados, a partir de líneas celulares y tejidos tumorales.

La lectura de la expresión en cada campo se hizo midiéndose el porcentaje de células teñidas a intensidad alta (++, +++, +++) y fue realizada por tres observadores, sin conocimiento de la evolución clínica del tumor, y en los casos en que existía discrepancia se llegó a solución de consenso.

El punto de corte, para considerar la expresión de p53, p21 y ciclina D1 como positivos o negativos, se estableció en el 10% y para p16 se estableció en el 15%, haciendo varias estimaciones para buscar el punto de corte con la máxima potencia estadística para cada marcador. Los puntos de corte seleccionados coincidían con los más frecuentemente utilizados en la literatura para cada molécula.

Así, se consideró que la expresión de p53 era positiva o alterada cuando el porcentaje de núcleos teñidos fue >10%; la de p21 negativa (estado alterado) cuando el porcentaje de núcleos fue ≤10%, p16 alterada o negativa cuando el porcentaje de células teñidas fue <15% y ciclina D1 alterada o negativa cuando el porcentaje de núcleos teñidos fue <10%.

Selección de casos

Con intención de homogeneizar la serie, sólo se incluyeron en el estudio 163 tumores (22 de bajo grado, 141 de alto grado; 94 Ta y 69 T1) de pacientes afectos de tumor vesical superficial sometidos a resección transuretral (RTU) de vejiga entre febrero de 1995 y marzo de 2004. Todos ellos fueron tumores iniciales y realizaron instilaciones intravesicales con quimioterapia o Bacillus Calmette-Guérin (BCG) según el protocolo del momento en nuestro servicio. Los casos excluidos, así como los criterios de exclusión, se muestran en la Tabla 1.

Análisis estadístico

Mediante el programa estadístico (SPSS, Inc., USA) se determinó la relación de los cuatro marcadores con el grado y estadio anatomo-patológico y su relación con la recurrencia, progresión tumoral y supervivencia. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

La asociación del grado y estadio tumoral con los marcadores se valoró según el test no paramétrico de Chi-Cuadrado y para valorar la relación con la recurrencia, progresión y supervivencia se utilizó las curvas de Kaplan-Meier y el log-rank test. Las variables significativas fueron incluidas en el análisis multifactorial que se realizó con un modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Tabla 1
Pacientes excluidos del estudio

Motivo de exclusión del paciente	Número de casos
Tumor de vías (sometidos a nefroureterectomía)	5
Controlado en otro centro tras el diagnóstico	3
Diverticulectomía	1
Asociación a Cis	2
Cistoprostatectomía	3
por sospecha de infraestadiaje	1
por tumor extenso	1
por adenocarcinoma de próstata asociado	1
Sometidos a cistectomía parcial	3
Sometidos a RTU hemostática	1
por enfermedad concomitante de mal pronóstico	
Cistectomía parcial previa en otro centro	1
Sometidos a RTU previa en otro centro	4
Sometidos a RTU previa en nuestro centro	2

RESULTADOS

163 pacientes (138 hombres, 25 mujeres), con una media de edad de 69,06 años (rango, 41- 91 años). La media de seguimiento fue de 45 meses (rango 1-127 meses). 97 pacientes presentaron recurrencia tumoral (59,9%), 34 presentaron progresión tumoral (20,9%) y 20 (12,3%), tuvieron muerte enfermedad-específica.

Asociación de la expresión de p53, p21, p16 y ciclina D1 con el grado y estadio tumoral

No se encontró relación estadísticamente significativa de la expresión de p53, p21, p16 y ciclina D1 con el grado tumoral ($p=0,497$, $p=0,362$, $p=0,205$ y $p=0,668$ respectivamente).

Según estadio, sólo se encontró significación estadística con la expresión de ciclina D1 ($p=0,030$) (Tabla 2).

Asociación de la expresión de p53, p21, p16 y ciclina D1 con la recurrencia y progresión tumoral y la supervivencia

En cuanto a la relación de los marcadores con la recurrencia, progresión tumoral y supervivencia, sólo la expresión de p21 y p16 mostraron asociación significativa (Tabla 3).

Expresión de p21

Las curvas de Kaplan-Meier mostraron que cuando la expresión de p21 era \leq al 10%, estado alterado, el tiempo medio de recurrencia era de 17 meses, mientras que cuando la expresión de p21 era $>10\%$, p21 positiva, el tiempo medio de recurrencia era de 43 meses.

Así, de los 96 casos con expresión de p21 alterada, 64 (66,7%) presentaron recidiva tumoral y 32 (33,3%) no. En contraposición, de los 66 casos

Tabla 2

Asociación de la expresión de p53, p21, p16 y Ciclina D1 con el grado y estadio tumoral.

	Grado tumoral				Valor de p	Estadio tumoral				Valor de p
	Bajo grado		Alto grado			nº pac.	%	nº pac.	%	
total casos	22	13,5	141	86,5		94	57,7	69	42,3	
p53	(+)/alt	4	10,3	35	0,497	21	53,8	18	46,2	0,580
	(-)	18	14,5	106		73	58,9	51	41,1	
p21	(+)	11	16,4	56	0,362	37	55,2	30	44,8	0,598
	(-)/alt	11	11,5	85		57	59,4	39	40,6	
p16	(+)	9	18,8	39	0,205	35	58,3	25	41,7	0,896
	(-)/alt	13	11,4	102		59	57,3	44	42,7	
CD1	(+)	13	12,6	90	0,668	66	64,1	37	35,9	0,030
	(-)/alt	9	15,0	51		28	46,7	32	53,3	

Nota: nº pac, número de pacientes; (+), inmunorreactividad positiva; (-), inmunorreactividad negativa; alt, estado alterado

Tabla 3

Asociación de la expresión de p53, p21, p16 y Ciclina D1 con la recidiva, progresión tumoral y supervivencia.

	Recidiva tumoral			Progresión tumoral			Muerte enf. específica			
	nº pac.	%	Valor de p	nº pac.	%	Valor de p	nº pac.	%	Valor de p	
total casos	97	59,9		34	21,0		20	12,3		
p53	(+)/alt	22	56,4	0,854	6	15,4	0,369	5	12,8	0,940
	(-)	75	61		28	22,8		15	12,2	
p21	(+)	33	50,0	0,035	7	10,6	0,008	4	6,1	0,034
	(-)/alt	64	66,6		27	28,1		16	16,7	
p16	(+)	22	46,8	0,048	6	12,5	0,116	2	4,2	0,047
	(-)/alt	75	65,8		28	24,6		18	15,8	
CD1	(+)	59	57,8	0,301	19	18,6	0,280	10	9,8	0,178
	(-)/alt	38	63,3		15	25		10	16,7	

Nota: nº pac, número de pacientes; (+), inmunorreactividad positiva; (-), inmunorreactividad negativa; alt, estado alterado; muerte enfermedad específica, muerte enfermedad específica.

con expresión de p21 positiva, 33 (50%) presentaron recidiva tumoral y 33 (50%) no. La asociación resultó estadísticamente significativa ($p=0,035$).

De los 96 casos con expresión de p21 alterada, 27 (28,1%) presentaron progresión tumoral y 69 (71,9%) no. De los 66 casos con expresión p21 positiva, 7 (10,6%) presentaron progresión tumoral y 59 (89,4%) no. La asociación resultó estadísticamente significativa ($p=0,008$).

En cuanto a la supervivencia, de los casos con expresión de p21 alterada, 16 (16,7%) presentaron muerte enfermedad-específica y 80 (83,3%) no. De los casos con p21 positiva, 4 (6,1%) presentaron muerte enfermedad-específica y 62 (93,9%) no. La asociación también resultó estadísticamente significativa ($p=0,034$) (Figs. 2a, 2b y 2c).

Expresión de p16

Las curvas de Kaplan-Meier mostraron que cuando la expresión de p16 era \leq al 15%, estado alterado, el tiempo medio de recurrencia era de 23 meses, mientras que cuando la expresión de p16 era $>15\%$, p16 positiva, el tiempo medio de recurrencia era de 53 meses.

De los 114 casos con expresión de p16 alterada, 75 (65,8%) presentaron recidiva tumoral y 39 (34,2%) no. De los 48 casos con expresión de p16 positiva, 22 (45,8%) presentaron recidiva tumoral y 26 (54,2%) no. La asociación resultó estadísticamente significativa ($p=0,048$).

De los casos con expresión de p16 alterada, 18 (15,8%) presentaron muerte enfermedad-específica y 96 (84,2%) no. De los casos con expresión de p16 positiva, 2 (4,2%) presentaron muerte enfermedad-específica y 46 (95,8%) no. La asociación resultó estadísticamente significativa ($p=0,047$).

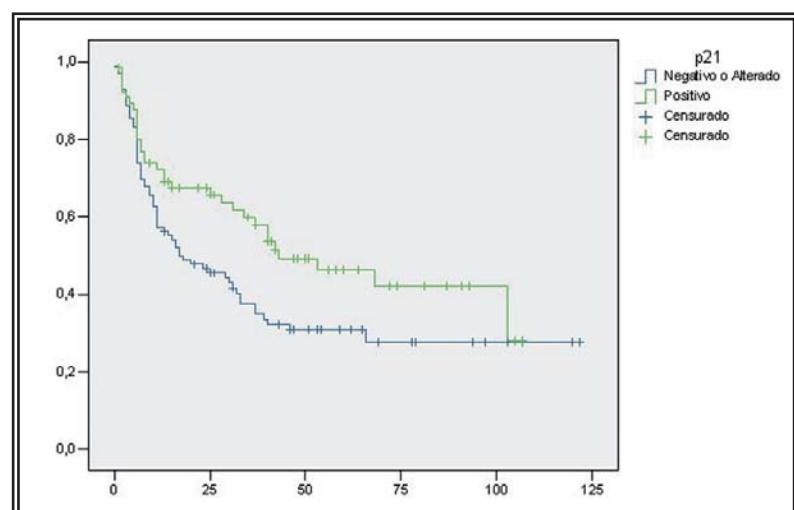


FIGURA 2a. p21: Tiempo libre de recurrencia (en meses).

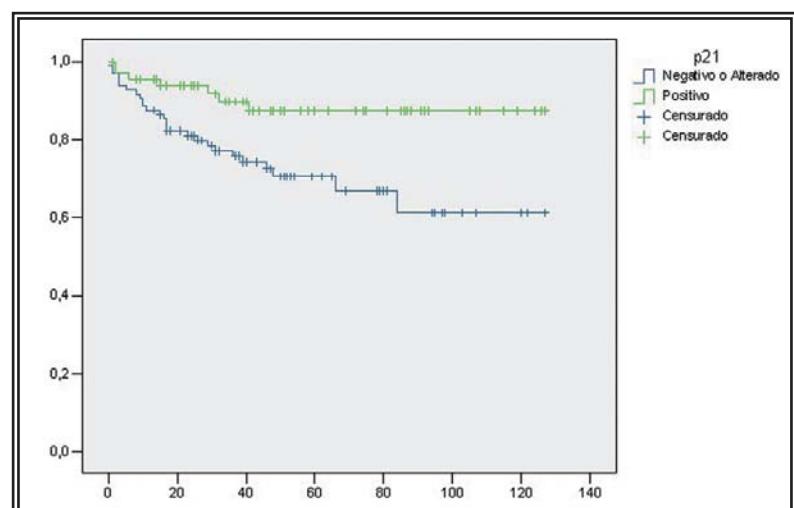


FIGURA 2b. p21: Tiempo libre de progresión (en meses).

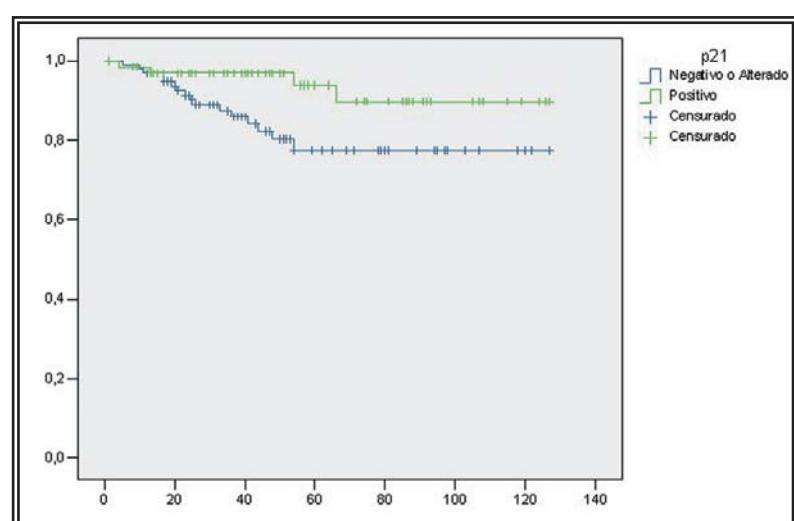


FIGURA 2c. p21: Tiempo de supervivencia (en meses).

No existió asociación estadísticamente significativa entre la expresión de p16 y la progresión tumoral ($p=0,116$) (Figs. 3a, 3b y 3c).

Finalmente, p21 y p16 fueron incluidas en el análisis multifactorial que se realizó con un modelo de riesgos proporcionales de Cox, pero se perdía la significación de ambos parámetros.

DISCUSIÓN

Existe gran discrepancia e incluso posturas enfrentadas en la valoración de los resultados obtenidos, en los distintos estudios publicados en los que se realiza un análisis inmunohistoquímico de la expresión de p53, p21, p16 y ciclina D1 en el cáncer superficial de vejiga. Este hecho puede ser debido a la variabilidad de las cohortes tumorales estudiadas (tumores no invasivos, invasivos o ambos) y a las distintas técnicas inmunohistoquímicas utilizadas¹¹. Otros motivos de discrepancia se deben fundamentalmente a la diversidad metodológica utilizada tanto en el proceso de inmunotinción como en su posterior valoración¹². Estas controversias limitan la comparación entre estudios.

Respecto al proceso de inmunotinción, constituyen factores de perturbación los distintos medios en los que está fijada la muestra (congelada, formalina, etc.) así como la calidad de la fijación, los métodos de recuperación del antígeno (calentamiento en microondas, autoclave, recuperación enzimática, etc.) y el tipo de anticuerpo empleado (monoclonales o policlonales, de distintas clonadas y calidades, etc.)^{13,14}.

A la hora de valorar el resultado de la lectura de un estudio inmunohistoquímico deben tenerse en cuenta también la existencia de diferencias intere e incluso intra-observador, así como los distintos criterios de evaluación aplicados.

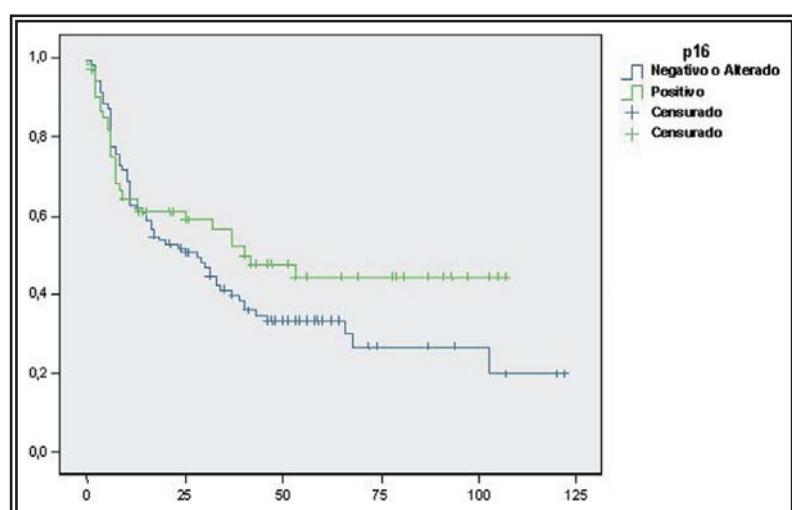


FIGURA 3a. p16: Tiempo libre de recurrencia (en meses).

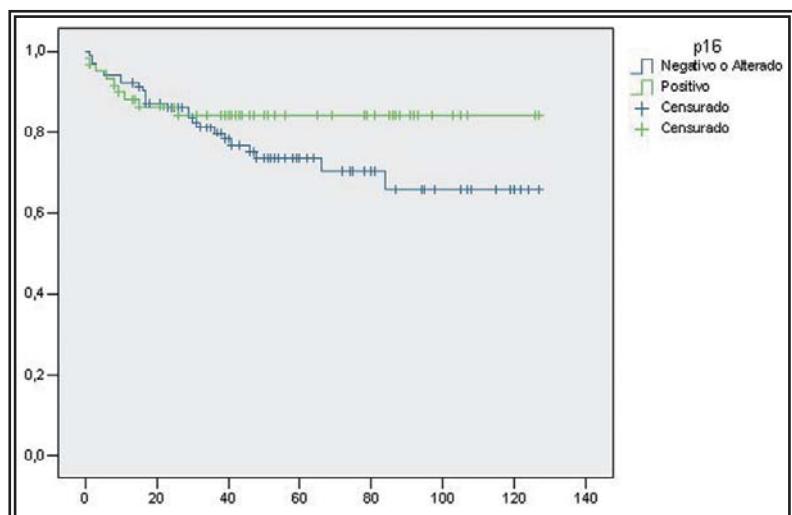


FIGURA 3b. p16: Tiempo libre de progresión (en meses).

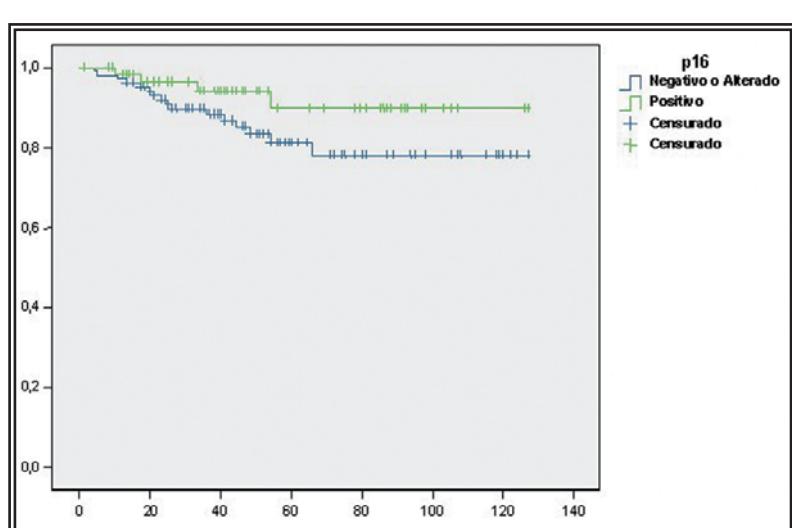


FIGURA 3c. p16: Tiempo de supervivencia (en meses).

En función de cual sea el umbral que se establezca para considerar como positiva la expresión inmunohistoquímica de un antígeno, existen diferencias muy dispares en la expresión según el grado y estadio. Es por ello, que existen trabajos en los que los autores ofrecen resultados cuyos análisis estadísticos muestran índices significativamente diferentes y en cambio en otros trabajos los autores no hallan diferencias.

Una pequeña muestra, a modo de ejemplo, de los distintos puntos de corte utilizados por algunos autores para considerar la expresión positiva o alterada de p53 son $\geq 10\%$ ^{2,8,15}, $>5\%$ ¹⁶ y 40%¹³. Para p21, se ha considerado inmunorreactividad nuclear negativa o estado alterado las expresiones \leq al 10%^{2,3,8,15}, $<5\%$ ¹⁶ y 20%¹³. Para p16, el punto de corte es $<10\%$ ^{7,11} o $\geq 50\%$ ^{5,8} y finalmente el punto de corte para inmunorreactividad positiva de ciclina D1 ha sido de $\geq 10\%$ ^{17,18}, $\geq 25\%$ ⁹ y $\geq 5\%$ ¹⁹ entre otros.

Como hemos comentado anteriormente existen también diferencias en la expresión según el grado y el estadio en los distintos estudios.

Shariat et al, concluyen que la expresión alterada de p53 se relaciona con el grado y estadio, mientras que la expresión de p21 alterada se asocia al grado, pero no tiene relación con el estadio tumoral⁸. Por el contrario, Chatterjee et al, concluyen que la expresión de p53 alterada está relacionada con el estadio, pero no con el grado tumoral y que la expresión de p21 se relaciona con el estadio tumoral pero no con el grado².

Stein et al, objetivaron la pérdida de tinción para p21 en tumores de vejiga de alto grado y estadio³.

Shariat et al, de nuevo, concluyen que p16 se asocia al estadio tumoral aunque no al grado⁸. Krüger et al, no encuentran en su estudio asociación ni con el grado, ni con el estadio tumoral¹¹.

Liukkonen et al, observaron que la expresión de ciclina D1 se asociaba de forma inversa con el estadio pT¹¹. Sin embargo, Sgambato et al, concluyen en su estudio que la expresión de ciclina D1 no se asocia ni al grado ni al estadio tumoral⁹ y los resultados de Tut et al, indican que la expresión de ciclina D1 es significativamente mayor en pacientes con estadios bajos y en tumores bien diferenciados²⁰.

En nuestro estudio sólo la ciclina D1 se ha asociado al grado tumoral, y ninguna de las moléculas estudiadas se ha asociado al estadio.

Debemos mencionar que inicialmente se seleccionaron tumores grado 2 y 3 de la clasificación OMS de 1973. De ellos sólo 22 eran de bajo grado tras revisión y estadificación según criterios de la OMS del 2004. En este sentido, nuestra serie presenta una proporción relativamente menor de lo habitual en el número de tumores superficiales de bajo grado o de bajo potencial de malignidad. El objetivo fundamental de nuestro estudio, no obstante, se centraba en la relación entre la expresión de moléculas relacionadas con el ciclo celular (p53, p21, p16 y ciclina D1) y la recurrencia, la progresión tumoral y la supervivencia.

Pfister et al, utilizando la expresión de p53 y p21 junto a otros marcadores como factores predictivos de recurrencia del tumor vesical superficial, no encontraron asociación entre la presencia de p21 negativa y mayor recurrencia¹⁶.

Queipo et al, observaron que los pacientes que presentaban expresión de p53 positiva tuvieron un tiempo libre de progresión significativamente menor que aquellos con p53 negativa, sin apreciar diferencias en el tiempo libre de recidiva ni en el tiempo de supervivencia. Por otra parte, para p21 no obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los análisis¹³.

Malats et al, en un reciente metanálisis en que se realizan una revisión de 168 publicaciones correspondientes a 117 estudios, concluyen que no existe suficiente evidencia para afirmar que la expresión de p53 se relacione con la recurrencia, la progresión tumoral ni la supervivencia²¹.

En cuanto a la expresión de p16 y ciclina D1, los resultados y métodos utilizados por otros autores también son muy dispares. Hitchings et al, utilizaron bloques de parafina de 78 casos de CU pTa y pT1 y estudiaron los marcadores p53, p16 y pRb objetivando mayor riesgo de progresión cuando éstos estaban alterados⁷.

Krüger et al, concluyeron que existe una correlación estadísticamente significativa entre la pérdida de expresión de p16 y progresión tumoral en el CU estadio pT1¹¹.

En cambio hay otros estudios que no encuentran asociación entre la expresión de p16 y la progresión tumoral²²⁻²⁴.

Liukkonen et al, en un estudio realizado con pacientes afectos de cáncer de vejiga superficial, observaron que la expresión de ciclina D1 no tenía significación pronóstica¹⁸. En cambio Sgambato et al, concluyen en su estudio que la expresión elevada de ciclina D1 supone de manera significativa un mayor tiempo libre de progresión tumoral⁹ y a la misma conclusión llegan López-Beltrán et al, en un estudio realizado con tumores G3T1¹⁰. También Tut et al, indican que la expresión de ciclina D1 es un factor pronóstico independiente en la supervivencia de estos pacientes²⁰. Otros estudios tienen resultados dispares en cuanto a supervivencia en tumores uroteliales pTa y pT1^{10,25}.

En nuestro estudio sólo la expresión de p21 muestra relación con la recurrencia, progresión tumoral y supervivencia enfermedad-específica. Una expresión negativa o reducida implica un peor pronóstico. También hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de p16, la recurrencia tumoral y la supervivencia, pero no con la progresión tumoral. En cuanto a la expresión de p53 y ciclina D1, tampoco nosotros hemos observado relación estadísticamente significativa con la recurrencia, la progresión tumoral ni la supervivencia.

Una característica especial de nuestro estudio es que se ha llevado a cabo no en secciones completas de todo el tumor, sino en varias pequeñas muestras de cada tumor, obtenidas con un cierto margen de azar (selección en el bloque de parafina a partir de marcas de las áreas representativas sobre la preparación microscópica correspondiente) y que representan una proporción baja del volumen total del tumor. Este diseño, que podría suponer que las muestras fueran menos valorables, obvia este inconveniente incluyendo varias muestras de cada caso y, por otro lado, permitiendo estudiar con máxima rapidez y eficacia un gran número de tumores. Cuando hay que hacer una valoración semicuantitativa de positividades, el empleo de micromatrizes tisulares, en las que se tiñen todas las muestras por igual, supone una mayor homogeneidad en los resultados de la inmunohistoquímica. Por otro lado, con un diseño basado en micromatrizes tisulares, se está analizando también la aplicabilidad de las moléculas estudiadas a biopsias de muy pequeño tamaño, de las que el TMA puede considerarse en cierto modo una simulación.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, utilizando micromatrizes tisulares preparadas a partir de biopsias por resección transuretral de carcinomas superficiales de vejiga, sólo los marcadores p21 y p16 contribuyen a identificar a pacientes con alto riesgo y pueden ser de utilidad en el manejo de los tumores vesicales superficiales, ya que ayudan a predecir la supervivencia en pacientes con estadios Ta y T1.

Trabajo financiado por el FIS, proyecto PI: 02/0468.

REFERENCIAS

1. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am.* 1996;275(3):62-70.
2. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, et al. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(6):1007-1013.
3. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esring E, Dickinson MG, et al. Effect of p21 WAF1/CIP1 expression on tumor in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1072-1079.
4. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1995;92(12): 5545-5549.
5. Benedict WF, Lerner SP, Zhou J, Shen X, Tokunaga H, Czerniak B. Level of retinoblastoma protein expression correlates with p16 (MTS-1/INK4A/CDKN2) status in bladder cancer. *Oncogene* 1999;18(5):1197-1203.
6. Rocco JW, Sidransky D. P16 (MTS-1/ CDKN2/ INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001;264:42-55.
7. Hitchings AW, Kumar M, Jordan S, Nargund V, Martin J, Berney DM, et al. Prediction of progression in pTa and pT1 bladder carcinomas with p53, p16 and pRb. *Br J Cancer* 2004;91(3):552-557.
8. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou JH, Kim JH, Ayala GE, Benedict WF, et al. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(6):1014-1023.
9. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, De Aloysio G, Ferrari P, Ardito R, et al. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 2002;97(5):671-678.
10. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Requena MJ, et al. Prognostic factors in survival of patients with stage Ta and T1 bladder urothelial tumors: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27Kip1, cyclin D1, and cyclin D3), proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(3):444-452.
11. Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC. P16 inimmuno-reactivity is an independent predictor of tumour progression in minimally invasive urothelial bladder carcinoma. *Eur Urol.* 2005;47(4):463-467.

12. Helpap B, Schmitz-Drager BJ, Hamilton PW, Muzzonigro G, Galosi AB, Kurth KH, et al. Molecular pathology of non-invasive urothelial carcinomas (part I). *Virchows Arch.* 2003;442(4):309-316.
13. Queipo J.A, Ruiz J.L, Palmero L, Rubio LA, Vera F, Jiménez JF. Valor pronóstico de progresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular en tumores vesicales T1G3. *Actas Urol Esp.* 2005;29(3):261-268.
14. Gardiner RA, Walsh MD, Allen V, Rahman S, Samaratunga ML, Seymour GJ, et al. Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. *Br J Urol.* 1994;73(5):526-532.
15. Shariat SF, Weizer AZ, Green A, Laucirica R, Frolov A, Wheeler TM, et al. Prognostic value of P53 nuclear accumulation and histopathologic features in T1 transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology.* 2000;56(5):735-740.
16. Pfister C, Moore L, Allard P, Larue H, Lacombe L, Tétu B, et al. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):4079-4084.
17. Del Rey J, Prat E, Camps J, Caballer M.R, Gelabert-Mas A, Miró R. Tissue microarray analysis of cyclin D1 gene amplification and overexpression in urothelial carcinomas. P-45, Congres Genet. and Cytogenet. Brno, September 2004.
18. Liukkonen T, Lipponen P, Raitanen M, Kaasinen E, Ala-Opas M, Rajala P, et al. Evaluation of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. *Finbladder Group Urol Res.* 2000;28(5):285-292.
19. Khan AA, Abel PD, Chaudhary KS, Gulzar Z, Stamp GWH, Lalani E-N. Inverse correlation between high level expression of cyclin E and proliferation index in transitional cell carcinoma of the bladder. *Mol Pathol.* 2003;56(6):353-361.
20. Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, Neal DE, Lunec J, Mellon JK, et al. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *Br J Cancer.* 2001;84(2):270-275.
21. Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol.* 2005;6(9):678-686.
22. Niehans GA, Kratzke RA, Froberg MK, Aeppli DM, Nguyen PL, Geradts J. G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Br J Cancer.* 1999;80(8):1175-1184.
23. Friedrich MG, Blind C, Milde- Langosch K, Erbersdobler A, Conrad S, Loning T, et al. Frequent p16/MTS1 inactivation in early stages of urothelial carcinoma of the bladder is not associated with tumor recurrence. *Eur Urol.* 2001;40(5):518-524.
24. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, Lameiras CR, Lopes P, Bento MJ, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29(1):74-80.
25. Ito M, Habuchi T, Watanabe J, Higashi S, Nishiyama H, Wang L, et al. Polymorphism within the cyclin D1 gene is associated with an increased risk of carcinoma in situ in patients with superficial bladder cancer. *Urology.* 2004;64(1):74-78.

Dr. F.R. Vallmanya Llena
Pla de Monsó nº 6
25110, Alpicat (Lleida)
E-mail: fvallmanya@imas.imim.es

(Trabajo recibido el 6 de febrero de 2006)