



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**Supervivencia, recidiva y progresión del carcinoma de
células transicionales de vejiga en estadios T1 y T2a.
Valor pronóstico de p53 y ki67.**

Tesis Doctoral

Andrés Rodríguez Alonso

A Coruña, 2001

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**Supervivencia, recidiva y progresión del carcinoma
de células transicionales de vejiga en estadios T1 y T2a.
Valor pronóstico de p53 y ki67.**

**Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugía por**

Andrés Rodríguez Alonso

A Coruña, 2001

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Don **José Luis Nogueira March**, profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad de Santiago de Compostela, y Don **Salvador Pita Fernández**, Catedrático E.U., Universidad de A Coruña, Área de conocimiento de Medicina Preventiva y Salud Pública, como Directores,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "**Supervivencia, recidiva y progresión del carcinoma de células transicionales de vejiga en estadios T1 y T2a. Valor pronóstico de p53 y ki67**", realizado por Don Andrés Rodríguez Alonso, ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección conjunta y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente en la Universidad de A Coruña, lo que firmamos para los efectos oportunos en A Coruña, a 11 de Febrero de 2001.



Dr. José Luis Nogueira March



Dr. Salvador Pita Fernández

A China, Piedad, Ignacio y Nacho.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterno agradecimiento al Dr. José Luis Nogueira March, por haber depositado su confianza en mí, dándome la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias también, por un sinfín de enseñanzas y consejos, que he recibido durante mi formación como urólogo.

Mi profundo agradecimiento al Dr. Salvador Pita Fernández, por todas las horas que pacientemente me ha dedicado, y porque sin su ayuda nunca habría podido dar forma a este trabajo. La calidez de su acogida y la calidad de sus enseñanzas, son las "variables independientes" en la consecución del mismo.

Mi agradecimiento al Dr. Joaquín González-Carreró, por su docencia en la técnica inmunohistoquímica, y su paciencia en la recogida de las muestras de los casos seleccionados y en la reevaluación anatomopatológica de los mismos.

Mi agradecimiento a la Dra. Ana González Piñeiro, por su colaboración absolutamente desinteresada, y su generosa disposición para resolver mis dudas sobre el "misterioso mundo de la célula".

Mi agradecimiento a todos los pacientes, porque ellos son la motivación última de este trabajo. Gracias también a sus familiares, por su ilusionada colaboración, y por la confianza con la que han aportado datos, en ocasiones dolorosos.

ABREVIATURAS:

AJCC: American Joint Cancer Committee.

BCG: Bacilo Calmette-Guérin.

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer.

CIS: Carcinoma in situ.

ÍNDICE M/V: Índice mitótico corregido por volumen.

ISUP: International Society of Urologic Pathology.

MRC: Medical Research Council.

PCNA: Antígeno nuclear de células proliferantes.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RR: Riesgo Relativo.

RTU: Resección transuretral.

SSCP: Single Strand Conformational Polimorfism.

UICC: Union Internationale Contre le Cancer.

UIV: Urografía intravenosa.

WHO: World Health Organization.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Factores pronósticos del carcinoma de células transicionales de vejiga.....	9
1.1.1. Factores pronósticos clínico-epidemiológicos.....	10
1.1.2. Factores pronósticos anatomopatológicos.....	13
1.1.3. Factores pronósticos biológicos.....	15
1.1.3.1. Factores citogenéticos. Ploidía del DNA.....	15
1.1.3.2. Antígenos de los grupos sanguíneos.....	16
1.1.3.3. Marcadores de la actividad proliferativa celular.....	17
1.1.3.4. Antígenos asociados al carcinoma de células transicionales.....	19
1.1.3.5. Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento....	20
1.1.3.6. Moléculas de adhesión celular y moléculas del citoesqueleto.....	21
1.1.3.7. Factores angiogénicos e inhibidores de la angiogénesis.....	24
1.1.3.8. Oncogenes.....	26
1.1.3.9. Genes supresores tumorales.....	30
1.2. Carcinoma in situ primario de vejiga.....	34
1.3. Tumor vesical en estadio T1.....	41
1.4. Tumor vesical en estadio T2a.....	46
1.5. Gen supresor <i>p53</i>	48
1.6. Proteína <i>ki67</i>	63
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	65
3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	69

4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	70
4.1. Ámbito y período de estudio.....	70
4.2. Tipo de estudio.....	70
4.3. Criterios de inclusión y de exclusión.....	70
4.4. Justificación del tamaño muestral y del período de estudio.....	70
4.5. Variables estudiadas.....	72
4.6. Evaluación clínica y seguimiento de los pacientes.....	75
4.7. Tratamiento llevado a cabo en los pacientes del estudio.....	76
4.8. Fuente de información.....	78
4.9. Evaluación anatomopatológica y análisis inmunohistoquímico.....	81
4.10. Análisis estadístico.....	84
5. RESULTADOS.....	86
5.1. Características generales de los pacientes incluidos en el estudio.....	86
5.1.1. Características sociodemográficas y hábito tabáquico.....	86
5.1.2. Características clínico-diagnósticas.....	86
5.1.3. Características morfológicas del tumor vesical.....	88
5.1.4. Características topográficas del tumor vesical.....	90
5.1.5. Estudio inmunohistoquímico de p53 y ki67 en los tumores de la muestra.....	90
5.1.6. Estadificación de los tumores vesicales.....	92
5.1.7. Tratamiento efectuado en los tumores primarios.....	92
5.1.8. Características descriptivas de los eventos: muerte, recidiva y progresión.....	94
5.1.8.1. Distribución de la causa de muerte por grupos etiológicos.....	94
5.1.8.2. Recidiva tumoral.....	95
5.1.8.3. Progresión de las categorías T y M, en función del estadio clínico del tumor.....	96
5.2. Estudio de supervivencia.....	98
5.2.1. Análisis univariado.....	98

5.2.1.1.	Supervivencia cáncer-relacionada.....	99
5.2.1.2.	Supervivencia general.....	105
5.2.2.	Análisis multivariado.....	107
5.2.2.1.	Supervivencia cáncer-relacionada.....	107
5.2.2.2.	Supervivencia general.....	111
5.2.3.	Curvas ROC de supervivencia cáncer-relacionada.....	113
5.3.	Estudio de recidiva.....	116
5.3.1.	Análisis univariado.....	116
5.3.2.	Análisis multivariado.....	123
5.3.3.	Curvas ROC de recidiva.....	127
5.4.	Estudio de progresión.....	129
5.4.1.	Análisis univariado.....	129
5.4.1.1.	Progresión general.....	129
5.4.1.2.	Progresión de la categoría M: desarrollo de metástasis.....	133
5.4.2.	Análisis multivariado.....	137
5.4.3.	Curvas ROC de progresión.....	142
6.	DISCUSIÓN.....	145
6.1.	Supervivencia.....	146
6.2.	Recidiva.....	158
6.3.	Progresión.....	171
6.4.	Limitaciones del estudio.....	190
7.	CONCLUSIONES.....	192
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	193

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Factores pronósticos del carcinoma de células transicionales de vejiga:

Son numerosos los factores que a lo largo del tiempo, se han relacionado con el pronóstico del carcinoma de células transicionales de vejiga. A los factores pronósticos clásicos, relacionados con variables clínicas e histopatológicas, se unen en la actualidad otros nuevos, basados fundamentalmente en características citométricas y moleculares del tumor, que proporcionan una información complementaria, pero que en ningún caso han permitido a los urólogos prescindir de los primeros.

La ploidía del DNA, el índice mitótico, antígenos asociados al tumor, antígenos de proliferación celular, oncogenes y genes supresores tumorales, involucrados en el control del ciclo celular y la apoptosis, factores de crecimiento celular, activadores e inhibidores de la angiogénesis tumoral, son las variables más frecuentemente analizadas en los estudios pronósticos del cáncer de vejiga, efectuados durante los últimos años (1, 2).

La razón fundamental que ha llevado a la búsqueda de nuevos factores pronósticos en la biología molecular, ha sido el intento estratificar a los pacientes con cáncer de vejiga en distintos grupos, en función del pronóstico, y de individualizar la terapéutica, para proporcionar al paciente un tratamiento óptimo, en el momento oportuno. Este propósito se ha conseguido en cierta medida, ya que son muchos los centros que utilizan estos nuevos marcadores, en combinación con los ya existentes, para la toma de decisiones terapéuticas.

Son muchas las variables, especialmente las relacionadas con características clínico-patológicas, que han sido evaluadas, en un intento de establecer factores pronósticos en el cáncer vesical: el estadio infiltrativo, el grado histológico, la existencia de adenopatías o metástasis a distancia, el tamaño del tumor, el número de tumores vesicales, la presencia de carcinoma in situ o displasia asociada al tumor, la morfología macro y microscópica de la neoplasia, entre otras (3, 4, 5, 6, 7). Cada una de estas variables, ha mostrado una influencia estadísticamente significativa en el pronóstico de la enfermedad, en uno u otro

estudio; sin embargo su capacidad pronóstica no es siempre la misma, ya que depende de diversos factores, como las características cuantitativas y cualitativas de la muestra, el tipo y número de variables analizadas, y el análisis estadístico efectuado (uni o multivariado).

1.1.1. Factores pronósticos clínico-epidemiológicos:

La localización intravesical del tumor, se ha manifestado en algunos estudios como una variable con importancia pronóstica. Los pacientes con tumores localizados en el trigono y en el cuello vesical muestran, según algunos trabajos, un peor pronóstico que aquellos con tumores en otras localizaciones, observándose una supervivencia del 40% a los 5 años, en los tumores con compromiso del cuello vesical, frente a un 50-60%, en los casos sin afectación cervical (8, 9). El motivo de estas diferencias pronósticas es desconocido; es posible que el drenaje linfático específico del área cérvico-trigonal, diferente al del resto de la vejiga, sea una de las causas de tales diferencias (10). Por otra parte, los tumores localizados en el cuello, cúpula y cara anterior, tienden a presentar un mayor grado histológico, y por lo tanto un peor pronóstico, según comunican algunos autores (3, 8, 9).

El tamaño tumoral es uno de los factores clásicamente analizados en los estudios pronósticos del cáncer de vejiga. Los resultados observados, cuando se realiza un análisis multivariado, son dispares a la hora de definir el papel de dicha variable. Existen trabajos que encuentran que el tamaño tumoral es un factor pronóstico independiente (5, 11). Uno de estos estudios, efectuado sobre un total de 252 pacientes de características clínico-patológicas heterogéneas (Tumores Ta-T4, grados 1-3), observa una probabilidad de supervivencia del 81% a los 10 años, en tumores con diámetro inferior a 3 cm, y del 43% en los mayores de 3 cm; comportándose el tamaño tumoral como una variable independiente en la predicción de la supervivencia de este grupo de pacientes. Otro estudio retrospectivo, efectuado sobre 1529 pacientes con tumores vesicales superficiales primarios, encuentra que el tamaño tumoral es un factor pronóstico independiente, en la predicción de recidiva y progresión, pero no en la supervivencia cáncer-relacionada (12). Otros estudios, por el contrario, no demuestran tal independencia pronóstica (6, 10).

La mayoría de los estudios que evalúan la influencia pronóstica del tamaño tumoral, dividen los tumores en dos grupos, según se encuentren por encima o por debajo de un tamaño “crítico”, que suele ser de 3 centímetros (3). Este tamaño crítico es elegido, bien de un modo arbitrario, o bien siguiendo algún criterio estadístico, como es la mediana del tamaño de los tumores de la muestra analizada. En los casos de tumores vesicales múltiples, la mayoría de los autores utilizan para el análisis, el diámetro de la neoformación más grande. Las diferencias observadas en los resultados de los distintos trabajos son debidas, en parte, al tamaño crítico elegido para confeccionar los grupos sometidos a comparación.

El número de neoformaciones vesicales es otro de los factores pronósticos clínicos, clásicamente descritos en los estudios pronósticos del cáncer de vejiga. Los resultados obtenidos por los distintos autores en el estudio de supervivencia son heterogéneos. Existen trabajos que demuestran que la multifocalidad tumoral, es una variable pronóstica independiente en el cáncer de vejiga (5, 13). Otros autores encuentran que el número de tumores vesicales influye significativamente en la progresión y recidiva tumorales, pero no en la supervivencia cáncer-relacionada, en el análisis multivariado (12). Algunos incluso observan, que el número de tumores es la variable pronóstica con mayor influencia en la recidiva tumoral (3). Sin embargo, otros estudios multivariados muestran que el número de tumores vesicales, es una variable sin capacidad para predecir el pronóstico de la enfermedad, en términos de supervivencia, recidiva y progresión (6, 10, 11). Es posible que el valor pronóstico del número de neoformaciones vesicales, sea mayor en los tumores más superficiales (categoría Ta), disminuyendo dicho valor en las categorías T1 y T2, según demuestra un estudio efectuado sobre 583 pacientes no seleccionados, en el que se observa que el número de tumores vesicales tiene capacidad predictiva de supervivencia en Ta, en el análisis univariado, perdiendo dicha capacidad en T1 y T2 (14).

Las diferencias encontradas en los resultados, en el caso de la variable número de tumores, pueden atribuirse en parte, a la diferente categorización de los grupos efectuada por los distintos autores, ya que aunque lo más habitual, es dividir la variable en dos grupos: tumores únicos y tumores múltiples, es posible observar categorizaciones muy diversas.

El intervalo libre de recidiva, tras el tratamiento del tumor vesical primario, se ha mostrado como un factor pronóstico importante, que influye de manera decisiva en el curso posterior de la enfermedad, impactando de manera significativa en las tasas de recidiva y progresión (3). La respuesta obtenida tras la administración profiláctica de diversos agentes quimio e inmunoterápicos, también ha sido estudiada como un posible factor predictor de progresión tumoral, en lesiones superficiales. Algunos autores encuentran que el hallazgo de una recidiva T1, en un período no superior a 3 meses, tras la aplicación de instilaciones con BCG, es un factor pronóstico independiente en la predicción de progresión tumoral, observando dicha progresión en el 82% de los pacientes con recidiva T1, y tan solo en el 25% de los pacientes con recidiva Ta, o sin recidiva, durante ese período de tiempo (3).

La realización de instilaciones intravesicales con agentes citostáticos o inmunomoduladores se ha mostrado en algunos estudios multivariados, como un factor pronóstico independiente en la predicción de recidiva y progresión, siendo la BCG el agente que parece modificar favorablemente la progresión tumoral y la recidiva (12, 13).

La hidronefrosis inducida por la infiltración tumoral del uréter intramural, ha sido considerada en algunos estudios como un factor pronóstico de supervivencia en el cáncer de vejiga. En un estudio efectuado sobre 415 pacientes, sometidos a cistectomía radical y derivación urinaria, por cáncer de vejiga, se observó que cuando se dividía a los pacientes en tres grupos: 1) no hidronefrosis, 2) hidronefrosis unilateral, y 3) hidronefrosis bilateral; se encontraba una diferencia estadísticamente significativa en la probabilidad de supervivencia de los distintos grupos, a los 5 años de seguimiento. El 62,6% de los pacientes sin hidronefrosis permanecían vivos a los 5 años, mientras que sólo el 30,7% estaban vivos cuando existía una hidronefrosis bilateral (15).

Otros factores pronósticos frecuentemente evaluados en los estudios de supervivencia, y que podríamos clasificar como epidemiológicos, son la edad, el sexo y el tabaquismo. La edad se muestra como una variable independiente de supervivencia en un gran número de trabajos de oncología. En el cáncer de vejiga, la asociación entre la edad y la supervivencia, se analiza en pocos trabajos, con resultados dispares. El sexo y el tabaquismo se muestran, de manera casi unánime, como variables sin capacidad pronóstica en el cáncer de vejiga (3, 4, 5, 10, 16).

1.1.2. Factores pronósticos anatomopatológicos:

Los parámetros anatomopatológicos son probablemente los indicadores pronósticos más utilizados, para la estimación de la probabilidad de supervivencia, recidiva y progresión, especialmente en el cáncer de vejiga de tipo superficial.

La categoría T del tumor primario es uno de los factores pronósticos más importantes en el cáncer vesical, según se demuestra en múltiples estudios (2, 3, 10, 13, 17, 18). Según muestra un estudio, los tumores superficiales presentan una supervivencia cáncer-relacionada del 75-90% a los 10 años, lo cual contrasta con el 30-45% de supervivencia observado en el caso de los tumores músculo-infiltrantes (14). Otro estudio efectuado sobre 195 pacientes, demuestra que la categoría T constituye el factor pronóstico con mayor capacidad de predicción de supervivencia, en el análisis multivariado (19). Dentro de los tumores superficiales, un 25% de los tumores de la categoría T1 desarrollarán invasión muscular en un período de 2 años. Dicha progresión es tan solo del 5%, en la categoría Ta (3, 10). Existen estudios multivariados, efectuados con una amplia muestra de tumores superficiales, que encuentran que la categoría T no es una variable independiente en la predicción de recidiva, progresión y supervivencia cáncer-relacionada, en este subgrupo de tumores (12).

El grado histológico de malignidad, habitualmente dividido en tres categorías, según la clasificación de la WHO (20), se muestra como un factor pronóstico de enorme importancia, encontrando muchos estudios diferencias estadísticamente significativas entre los tumores de bajo grado (grados 1 y 2), y los tumores de alto grado (grado 3), en cuanto a la probabilidad de supervivencia, recidiva y progresión (3, 5, 6, 7, 10, 12, 14). Algunos trabajos encuentran una probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada que no supera el 30% a los 10 años, en los tumores de alto grado histológico, mientras que en el caso de los tumores de bajo grado, esta probabilidad es de aproximadamente el 80% (8, 11). El grado de malignidad histológica, y el incremento de dicho grado histológico, durante la evolución de un tumor vesical superficial, se han mostrado para algunos autores, como los factores pronósticos más importantes a la hora de predecir la supervivencia y progresión tumoral (6, 7). El problema del grado histológico es que se trata de un parámetro subjetivo, que está sujeto a una enorme variabilidad (en torno

al 50%) entre los distintos observadores, e incluso en un mismo observador, cuando es evaluado en distintas ocasiones (3).

El aspecto macroscópico y la morfología microscópica de la lesión, han sido analizados en un número relativamente corto de estudios pronósticos del cáncer de vejiga, en comparación con otros factores clínico-patológicos, como el grado histológico, el tamaño tumoral o el número de neoformaciones. Por otra parte, algunos trabajos no especifican de manera clara, si la variable que analizan, hace referencia a la morfología macroscópica o a la microscópica del tumor. Aquellos trabajos que definen la variable con claridad, suelen referirse a la morfología microscópica de la lesión (18, 21). La morfología microscópica del tumor fue identificada como un factor independiente en la predicción de supervivencia, en un estudio realizado con 265 pacientes diagnosticados de cáncer vesical primario en estadios Ta-T4 (18). Los autores de este estudio encuentran que la morfología microscópica del tumor es una variable independiente en la predicción de supervivencia, cuando se analizan de manera multivariada: a) todos los tumores del estudio, b) los tumores en estadio Ta-T2, con grados 1-2, y c) todos los tumores de los estadios Ta-T1; siendo en este último grupo, la única variable con influencia significativa en la supervivencia. En el análisis multivariado de progresión, encuentran que la morfología microscópica del tumor, tiene capacidad para predecir progresión tumoral en los tumores en estadio T1-T2, con grados 1-2.

Un análisis multivariado de supervivencia, recidiva y progresión, efectuado sobre 273 pacientes con tumores superficiales primarios de vejiga, encuentra que la morfología microscópica del tumor es una variable relacionada de manera estadísticamente significativa con la supervivencia y con la progresión, tanto en el análisis univariado como en el multivariado. Dicha variable, sin embargo, no modifica significativamente la probabilidad de recidiva tumoral, en este estudio (21). Otros estudios, que no definen de manera precisa la variable morfología tumoral, observan una influencia pronóstica de dicha variable en el análisis univariado, que se pierde en el multivariado (6, 7, 10).

Se ha planteado en muchos trabajos la importancia pronóstica de la existencia de CIS o displasia severa, en la biopsia randomizada de la mucosa vesical, especialmente en relación con la probabilidad de recidiva y progresión. Aunque algunos autores encuentran que esta variable predice de manera significativa la recidiva, la

progresión y la mortalidad cáncer-relacionada (12, 13), en la mayoría de los estudios, se observa que cuando se realiza un análisis multivariado, dicha variable no presenta influencia pronóstica (3, 5, 6, 7). La interpretación global de esta variable plantea bastante dificultad, ya que muchos estudios utilizan el término “existencia de CIS en un área distante al tumor”, sin especificar el número de tomas de biopsia efectuadas, o si las biopsias fueron tomadas de áreas ópticamente sanas o no. En ocasiones se ordenan en un mismo grupo, pacientes con displasia y CIS, cuando sólo la displasia severa se considera equiparable al CIS.

La existencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales, se considera como el peor factor pronóstico en el carcinoma vesical músculo-infiltrante, observándose una supervivencia de tan solo el 5% a los 5 años de seguimiento, en aquellos pacientes con afectación ganglionar metastásica. Sin embargo, aquellos pacientes con afectación microscópica de los ganglios linfáticos, detectada en una biopsia peroperatoria, presentan un mejor pronóstico, con una supervivencia que para algunos es del 35%, a los 5 años de la cistectomía radical (16).

1.1.3. Factores pronósticos biológicos:

1.1.3.1. Factores citogenéticos. Ploidía del DNA.

El análisis de la ploidía del DNA, realizado mediante técnicas de citometría de flujo o hibridación in situ, se ha relacionado en múltiples trabajos con el pronóstico del cáncer de vejiga. Según algunos estudios, la existencia de líneas celulares con alteraciones cuantitativas del material genético, confiere al tumor un peor pronóstico de supervivencia, así como una mayor probabilidad de progresión y de recidiva, tanto en los tumores superficiales como en los músculo-infiltrantes. El peor pronóstico se asocia, en general, a los tumores con histograma aneuploide, que muestran una mayor tendencia a la progresión local y a distancia. Los tumores con líneas tetraploides representan un estadio de

malignidad intermedia entre aquellos y los diploides, y se asocian fundamentalmente, a una mayor probabilidad de recidiva tumoral (3).

La aneuploidía se encuentra con frecuencia asociada a otros factores pronósticos anatomopatológicos del cáncer de vejiga, especialmente la morfología tumoral sólida, la infiltración de la capa muscular y el grado histológico 3. Aproximadamente el 60-80% de los tumores considerados de grado 3, muestran un histograma aneuploide, mientras que el 50% de los tumores de grado 2 y el 70-80% de los de grado 1, son diploides (2).

1.1.3.2. Antígenos de los grupos sanguíneos.

Muchos autores encuentran una relación entre la delección de los antígenos ABH del grupo sanguíneo, de la superficie de las células del tumor urotelial, y la probabilidad de progresión y recidiva tumorales (1, 22). Según las observaciones de algunos autores, el 88% de los tumores superficiales que progresan hacia la infiltración muscular, muestran una pérdida de la expresión antigénica ABH, en el tumor primario, mientras que el 90% de los tumores que recidivan superficialmente, expresan los antígenos ABH en el tumor primario (1).

Por otra parte, algunos estudios demuestran que esta pérdida antigénica es más frecuente entre los pacientes con grupo sanguíneo O, e incluso, que los pacientes de este grupo sanguíneo tienen una probabilidad significativamente mayor de progresar hacia carcinoma músculo-infiltrante. Esta tendencia hacia el comportamiento agresivo, se mantiene entre los pacientes con carcinomas de bajo grado de malignidad histológica (23). Se ha observado también, que entre los pacientes con CIS existe un porcentaje de pacientes del grupo sanguíneo O, muy superior a lo esperado, según la distribución de los grupos sanguíneos en la población normal (23).

1.1.3.3. Marcadores de la actividad proliferativa celular.

La fracción de fase S, es un marcador de la actividad proliferativa celular, que cuantifica el porcentaje de células de un tumor, que en un momento dado, se encuentran en la fase de síntesis de DNA, del ciclo celular (fase S). La fracción de fase S se ha relacionado directamente con el grado de malignidad histológica, con la morfología tumoral (papilar / no papilar) y con el estadio infiltrativo del tumor. Al igual que otros marcadores de proliferación, su relación con el pronóstico del cáncer de vejiga no está perfectamente establecida, y depende del estudio que analicemos. Algunos estudios muestran que la supervivencia a los 10 años, en los pacientes con una fracción de fase S < 10%, es del 70%, descendiendo al 30% cuando dicha fracción es > 10% (2, 24). Del mismo modo, existen otros trabajos que muestran que la fracción de fase S, tiene relación con la probabilidad de recidiva y progresión tumoral, local y a distancia (2, 24).

Otros marcadores de la actividad proliferativa celular son los índices mitóticos, los cuales han sido relacionados en diversos estudios, con distintos parámetros histopatológicos tumorales, así como con el pronóstico del cáncer de vejiga. El índice tradicional de actividad mitótica, mide el número de mitosis por campo de gran aumento (40X), en 10 campos microscópicos consecutivos. El índice mitótico corregido por volumen (índice M/V) fue definido por Haapasalo en 1989, y mide el número de mitosis por mm² (25).

Ambos índices, como ocurre con otros marcadores proliferativos, se relacionan estrechamente con el grado histológico del tumor. Así en el grado 1, es habitual observar menos de 5 mitosis/ mm²; en el grado 2 el número de mitosis suele oscilar entre 5-15/ mm²; mientras que la mayoría de los tumores de grado 3 presentan más de 15 figuras mitóticas/ mm² (2).

El índice M/V se ha relacionado con la probabilidad de progresión del cáncer de vejiga, encontrándose que aquellos tumores con menos de 10 figuras mitóticas/ mm², tenían una probabilidad de progresión del 10-20%, mientras que aquellos con más de 10 mitosis/ mm², progresaban en el 40% de las ocasiones (2, 18). El índice M/V también se relaciona con la probabilidad de recidiva tumoral, con el intervalo libre de recidiva y con la

supervivencia, encontrándose que la presencia de más de 10 mitosis/ mm², se asocia a un elevado riesgo de muerte (2, 18).

Otro indicador de actividad proliferativa celular, es el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA). La metodología habitual para estudiar el PCNA es la determinación de su expresión inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales anti-PCNA, en tejidos fijados en parafina (2, 26). Ha sido estudiado en múltiples ocasiones, con el objeto de evaluar su relación con el pronóstico del cáncer de vejiga, pero en líneas generales, no se considera un buen marcador pronóstico de esta enfermedad, ni el mejor de los índices de actividad proliferativa celular (26). Sin embargo, algunos estudios multivariados encuentran que PCNA es una variable independiente, en la predicción de mortalidad por cáncer de vejiga (2). Como los demás indicadores de proliferación, el PCNA se relaciona estrechamente con el grado histológico, el estadio infiltrativo del tumor y con algunos genes supresores, como *p53*, relacionados con el pronóstico de la enfermedad (1, 2, 26, 27).

El antígeno ki67 se expresa durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular, de aquellas células que se replican activamente (28, 29, 30). La determinación de la expresión inmunohistoquímica de ki67, constituye un buen marcador de la actividad proliferativa celular y del crecimiento tumoral. Inicialmente, la expresión de este antígeno sólo podía ser estudiada en secciones en fresco de los tejidos, pero tras el desarrollo del anticuerpo monoclonal MIB-1, es posible llevar a cabo un estudio inmunohistoquímico de ki67, en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (31).

Para algunos autores la expresión de ki67 es el parámetro más fiable, para predecir enfermedad vesical músculo-infiltrante, cuando se compara con otros marcadores de la actividad proliferativa celular, como el área nuclear media, el índice M/V y el PCNA (21, 26). La expresión de ki67 se relaciona con diversos factores pronósticos anatomopatológicos del cáncer de vejiga, especialmente el grado, el estadio infiltrativo y la morfología macro/microscópica del tumor (28, 30, 32, 33). En uno de los estudios citados anteriormente, se observa que la expresión nuclear de ki67 es mucho más elevada en los tumores primarios que desarrollan progresión, que en aquellos que no lo hacen, y en el análisis multivariado se comprueba que la expresión de ki67, representa una variable independiente en la predicción de progresión tumoral y mortalidad cáncer-relacionada (21).

En otro estudio reciente, realizado sobre una muestra de 381 casos, se encontró que la expresión nuclear de ki67 sólo se relacionaba de manera significativa, en el análisis multivariado, con la probabilidad de recidiva de los tumores primarios mayores de 3 cm., pero no se encontró relación con la supervivencia, ni con la progresión tumoral (34).

La mayoría de los estudios sobre ki67, encuentran una relación significativa con la supervivencia, recidiva o progresión, cuando consideramos los datos del análisis univariado (21, 28, 30, 34), sin embargo, la implicación pronóstica de ki67 no se establece de manera homogénea, en aquellos estudios en los que se realiza análisis multivariado (21, 28, 34).

1.1.3.4. Antígenos asociados al carcinoma de células transicionales.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales ha permitido identificar, de manera relativamente sencilla, una serie de antígenos asociados al tumor de vejiga, como M344, 19A211, T138, así como ciertas proteínas de la matriz nuclear, como NMP22, aunque esta última se utiliza con más frecuencia para la detección del tumor vesical, que como indicador pronóstico del mismo (35, 36). Estos antígenos se expresan con una frecuencia variable en las células tumorales del cáncer de vejiga, en función de ciertas características histopatológicas del tumor, como el estadio infiltrativo y el grado histológico; por el contrario, las células uroteliales normales no expresan estos antígenos (1, 35). Un estudio prospectivo de 140 pacientes con tumores superficiales de vejiga, encontró que los tumores que expresaban M344 y 19A211, tenían una tasa de recidiva del 75%, frente al 20% encontrado en aquellos tumores que no expresaban los citados antígenos.

Con respecto a T138, existen estudios que muestran una relación entre la expresión de este antígeno y la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada y progresión. En un estudio realizado sobre 68 pacientes con cáncer de vejiga, en el que se consideraron tres grupos pronósticos: a) tumores diploides que expresaban T138, b) tumores diploides que no expresaban T138, y c) tumores aneuploides que expresaban T138; se observó que la supervivencia cáncer-relacionada en cada uno de los grupos, era del 65%, 100% y 35%, respectivamente. En este mismo estudio se observó, que los tumores de los

estadios Ta y T1, que expresaban T138, desarrollaban progresión en el 80% de los casos (1).

El antígeno 486P3/12, está presente en el 90% de los carcinomas de células transicionales, independientemente del grado del tumor (37). Algunos autores consideran a este antígeno como un buen marcador de recidiva tumoral, cuando se determinan sus niveles en orina, observando que el 42% de los pacientes con inmunotinción positiva, presentan recidiva tumoral, frente al 9%, en el grupo de tumores con inmunotinción negativa (37). Otros antígenos asociados al carcinoma de células transicionales, cuya relación con el pronóstico de la enfermedad ha sido estudiada, son AN43, BB639, el antígeno de membrana epitelial y el antígeno polipeptídico tisular (37). Son necesarios estudios más profundos y con muestras más amplias de pacientes, para poder extraer conclusiones acertadas, y establecer el papel de estos antígenos en el pronóstico del cáncer de vejiga.

1.1.3.5. Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son sustancias paracrinas que actúan como mediadoras de las interacciones celulares. Estos factores están involucrados en el crecimiento, diferenciación y muerte celulares, por lo que ciertas alteraciones en su síntesis o expresión, pueden ocasionar un crecimiento celular descontrolado y una transformación maligna de los tejidos. Los factores de crecimiento más estudiados en relación con el cáncer de vejiga, han sido el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y los factores de crecimiento transformadores α y β (TGF- α y β) (1, 37). La mayoría de estos factores de crecimiento no han mostrado una relación clara y uniforme, con otros marcadores del cáncer de vejiga, ni con el pronóstico de la enfermedad. Algún estudio ha mostrado una importante asociación, entre la expresión de TGF- α y la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada (1), aunque estos hallazgos deberán ser confirmados por otros estudios.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) ha sido objeto de numerosos estudios, para determinar su papel en el cáncer de vejiga. El EGF-R se activa mediante la unión de EGF o TGF- α , a su dominio externo, dando lugar a un proceso de proliferación celular, transformación y división. Los niveles de EGF-R pueden ser determinados por técnicas inmunohistoquímicas o mediante PCR de muestras de orina procedente de lavado vesical, aunque en este caso la inmunohistoquímica parece proporcionar una mayor sensibilidad.

La expresión inmunohistoquímica de EGF-R ha mostrado en varios estudios, una importante correlación con el grado histológico, el estadio infiltrativo y la ploidía del DNA del tumor (1). Del mismo modo en estos estudios, se ha observado que la sobreexpresión de EGF-R, predice de manera significativa la mortalidad cáncer-relacionada, la recidiva y la progresión, en los tumores vesicales superficiales, pero no modifica el pronóstico de los músculo-infiltrantes (1). Otros autores, por el contrario, sólo encuentran una relación significativa en el análisis univariado, que se pierde en el multivariado (21).

1.1.3.6. Moléculas de adhesión celular y moléculas del citoesqueleto.

Las moléculas de adhesión celular son unos elementos esenciales en las interacciones de una célula, con las células de su entorno y con el medio extracelular que la rodea. El funcionamiento incorrecto o la expresión inadecuada de este tipo de moléculas, parece esencial en el proceso de crecimiento tumoral y en el desarrollo de metástasis a distancia, procesos en los que se pierden los mecanismos normales de adhesión intercelular. De entre todas estas moléculas, es especialmente importante la familia de las caderinas, por su papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de las conexiones intercelulares, en el control de la polaridad celular y en la preservación de la morfología tisular (1).

La E-caderina (Caderina de células epiteliales) es expresada, tanto por las células uroteliales normales, como por las tumorales, por lo que su determinación no es útil en la detección precoz del cáncer de vejiga. La expresión de E-caderina puede ser estudiada

por métodos inmunohistoquímicos o mediante análisis genético, con RT-PCR (1, 37, 38). El análisis inmunohistoquímico permite observar focos de tinción en las áreas de unión intercelular, que se corresponden con la ubicación de las E-caderinas (37). Parece existir una clara relación entre la expresión de E-caderina, y el grado y estadio tumorales, y son varios los estudios que encuentran una relación significativa entre la expresión inmunohistoquímica de E-caderina y el pronóstico de la enfermedad, por lo que esta molécula podría ser un marcador pronóstico útil, en los pacientes con cáncer de vejiga.

Aquellos tumores con expresiones más bajas de E-caderina tendrían un peor pronóstico, con una menor supervivencia y una tasa de progresión y recidiva más elevadas (1, 37, 38). Por otra parte, se ha observado que la transfección de líneas celulares de tumores epiteliales invasivos, con DNA celular portador del gen de la E-caderina, ocasiona una pérdida de la capacidad invasiva del tumor (37). Según se desprende de los resultados de estos trabajos, la E-caderina funcionaría como una molécula supresora de la capacidad de invasión tumoral, y según sugieren algunos trabajos de investigación, el descenso de la expresión de E-caderina es probablemente uno de los eventos críticos en el inicio de la progresión tumoral (1, 38). De forma complementaria, se ha descrito que la sobreexpresión de E-caderina, y de otras moléculas de adhesión celular, reduce la invasividad de las células tumorales (39).

Las cateninas α y β son otro tipo de moléculas de adhesión celular, implicadas en el pronóstico del cáncer de vejiga, que parecen jugar un papel similar al de la E-caderina (1).

Otra familia de moléculas de adhesión celular, las integrinas, ha sido relacionada con la progresión tumoral y con el desarrollo de metástasis, al igual que las caderinas. Las integrinas actúan como receptores extracelulares, y su expresión celular se puede estudiar, bien mediante técnicas inmunohistoquímicas, o bien mediante técnicas de análisis genético, basadas en la PCR. La relación entre la expresión de integrinas y el cáncer de vejiga es variable, ya que el incremento de la agresividad biológica del tumor, se acompaña de una disminución de la expresión de algunas clases de integrinas y del aumento de la expresión de otras. Una disminución de la expresión de la integrina $\alpha 2$, se ha asociado con una mayor capacidad de infiltración tumoral, mientras que aquellos tumores

con una sobreexpresión de la integrina $\alpha 6\beta 4$, parecen tener un mayor potencial metastásico (1, 37, 38).

Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP), son un grupo de enzimas que ocasionan una degradación de la matriz extracelular y de los componentes de la membrana basal de los tejidos. Estas moléculas son las efectoras de la segunda fase del proceso de invasividad tumoral, que es la degradación del medio extracelular, basada en el aumento de la actividad proteolítica (39). La MMP tipo 2, también llamada Gelatinasa A o Colagenasa A, induce la lisis del colágeno IV, que es el componente estructural más importante de las membranas basales, dando lugar a una desestructuración de las mismas y a una pérdida de su "impermeabilidad". Esta alteración de la membrana basal es un hecho crucial en el proceso de infiltración local y en el desarrollo de metástasis a distancia (40, 41).

La Gelatinasa A se sintetiza como un zimógeno inactivo (pro-Gelatinasa A), que es activado por las MMP *membrane-type* 1, 2 y 3 (MT1, 2, 3-MMP), es por ello que la expresión de las MT-MMP, podría jugar un importante papel en la capacidad invasora de un tumor. Algunos estudios han observado una elevada expresión de los genes de MT1-MMP y MT2-MMP en los carcinomas de células transicionales, y una correlación significativa en el análisis univariado, entre la expresión de estos genes y la existencia de multifocalidad tumoral (40, 41).

Las citoqueratinas son unas moléculas proteicas, que forman parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto. Existen 20 tipos diferentes de citoqueratinas, que se clasifican en función de su peso molecular y de su punto isoeléctrico, en un gel de electroforesis bidimensional. Los fragmentos de las citoqueratinas son solubles en el suero, y por lo tanto son detectables y cuantificables en ese medio, con la ayuda de anticuerpos monoclonales. Los niveles séricos del fragmento soluble de la citoqueratina-19 (CYFRA 21-1) han mostrado una relación estadísticamente significativa con ciertos marcadores pronósticos del cáncer de vejiga, como el volumen tumoral, el estadio clínico, y el grado histológico. Se ha observado también que los niveles séricos de CYFRA 21-1, predicen de manera significativa la supervivencia, en el análisis univariado (42).

1.1.3.7. Factores angiogénicos e inhibidores de la angiogénesis.

Se denomina angiogénesis a la formación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de los vasos preexistentes. La angiogénesis es un evento imprescindible para el proceso de crecimiento, invasión y desarrollo de metástasis tumorales; de modo que un tumor que alcance un tamaño mayor de 5-10 mm, necesita la cercanía de algún vaso sanguíneo, que aporte los nutrientes necesarios para mantener la fisiología celular (1, 39, 43). El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es un proceso regulado por factores estimulantes de la angiogénesis, y contrarregulado por inhibidores de la angiogénesis. El desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas ha permitido estudiar y cuantificar la densidad de los microvasos del tumor, así como diversos factores angiogénicos y antiangiogénicos. El estudio inmunohistoquímico de la densidad de los microvasos es posible con la utilización de anticuerpos monoclonales, dirigidos contra diversos elementos de las células endoteliales, como el factor VIII y el CD34 (1).

La angiogénesis tumoral, determinada en función de la densidad de microvasos del tumor, ha demostrado en diversos estudios, capacidad para predecir de manera significativa la supervivencia, la recidiva y la progresión del cáncer vesical músculo-infiltrante, en el análisis univariado. En el análisis multivariado, la densidad de microvasos, se comporta como un factor pronóstico independiente en la supervivencia, en la progresión y en la recidiva de los pacientes con tumores vesicales músculo-infiltrantes, de modo que los pacientes con elevados niveles inmunohistoquímicos de densidad de microvasos, presentan un peor pronóstico que aquellos con niveles bajos (1, 43).

La importancia pronóstica de esta variable, en los tumores vesicales superficiales, no se ha establecido con claridad en los estudios realizados al respecto, debido a que la morfología papilar, que presentan la mayoría de los tumores de este tipo, dificulta la identificación de áreas de máxima vascularización (1, 43). De hecho, algunos autores no observan ninguna relación entre la determinación inmunohistoquímica de la densidad de microvasos en el tejido tumoral, y el pronóstico de la enfermedad en estadio T1 (44).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF), es un factor angiogénico específico, que

desempeña un papel crucial en el proceso de neovascularización tumoral. Este factor aumenta la permeabilidad del endotelio vascular, favoreciendo la entrada de células tumorales en los vasos, y el potencial desarrollo de metástasis hematógenas. Otra de las funciones del VEGF, es inducir la síntesis del activador del plasminógeno y la de su inhibidor, así como del receptor de la uroquinasa (39). El papel del VEGF en el pronóstico del cáncer vesical, tanto superficial, como músculo-infiltrante, ha sido evaluado por algunos autores, mediante técnicas inmunohistoquímicas y ELISA, sin obtener resultados concluyentes (43).

En la regulación de la angiogénesis, existen factores que inhiben el crecimiento de las células del endotelio vascular, que son conocidos como factores antiangiogénicos. Son muchos los factores antiangiogénicos conocidos (1, 39), destacando el TGF- β , los IFN- α , - β y - γ , el TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteasas), la vitamina D₃, el PF-4 (factor plaquetario-4), las interleukinas 1 y 12, la angiostatina y la TSP-1 (trombospondina-1). En el estudio de los factores pronósticos del cáncer de vejiga, el único factor antiangiogénico analizado ha sido la trombospondina-1.

La TSP-1 es una proteína de la matriz extracelular, que presenta una mayor expresión en las células normales, que en las tumorales. La expresión de la TSP-1, cuantificada mediante técnicas inmunohistoquímicas, presenta una relación estadísticamente significativa con la supervivencia y la recidiva del tumor vesical músculo-infiltrante. Se ha observado una mayor tasa de mortalidad y recidiva, en aquellos tumores con una expresión más baja de TSP-1, y se ha demostrado por otra parte, una fuerte correlación entre la baja expresión de TSP-1 y la sobreexpresión de p53. En el análisis multivariado, la TSP-1 se muestra como una variable independiente, en la predicción de supervivencia y recidiva, en un estudio realizado sobre 163 pacientes con enfermedad músculo-infiltrante (1, 45). Este y otros trabajos describen como la proteína p53 nativa, inhibe la angiogénesis de células de cáncer de mama humano y fibroblastos, mediante la inducción de TSP-1 (1, 39, 45).

1.1.3.8. Oncogenes.

Los oncogenes humanos son formas mutadas de genes normales o proto-oncogenes. Las mutaciones originan cambios en la secuencia del proto-oncogén, o bien una ausencia de regulación de la expresión del gen. Los tipos de mutaciones que pueden activar un proto-oncogén son múltiples, y no son específicas de cada uno de ellos, de modo que un mismo proto-oncogén puede verse afectado por diferentes tipos de mutaciones. En ocasiones el cambio de un solo aminoácido es suficiente para activar un proto-oncogén; también se puede producir la delección de un fragmento genético, que dé lugar a una proteína truncada de función alterada. Otras posibilidades son, que se produzca una amplificación o aumento del número de copias de un gen, que se traduzca en una sobreexpresión de la proteína que codifica, o que se produzca una translocación cromosómica, de modo que la nueva localización del proto-oncogén, ocasiona la síntesis de una proteína anómala, truncada, o fusionada (39).

Son varios los oncogenes, cuya relación con el carcinoma de células transicionales de vejiga ha sido estudiada, obteniéndose resultados variables en cuanto a su potencial implicación pronóstica, y su relación con otros factores de riesgo ya establecidos.

Los genes de la familia *ras*, tienen un papel clave en el control del crecimiento celular y en la aparición de cánceres, habiéndose identificado una mutación de alguno de los genes de esta familia, en un 30% de los tumores humanos. Existen tres tipos de oncogenes de la familia *c-ras* (*c-H-ras*, *c-K-ras* y *c-N-ras*), y todos ellos pueden sufrir mutaciones en el cáncer de vejiga, pero es el oncogén *c-H-ras*, el más habitualmente alterado en este tipo de tumor, encontrándose mutaciones de este gen en más del 20% de los casos. Las mutaciones de *c-H-ras* observadas en el tumor vesical, suelen ser mutaciones puntuales, afectando en la mayoría de los casos al codón 12 (G →A). Con respecto a la utilidad de este gen, en la determinación del pronóstico del cáncer de vejiga, algunos autores han observado que la sobreexpresión inmunohistoquímica de la proteína que codifica, se asocia a una probabilidad significativamente elevada de recidiva, en los pacientes con tumores superficiales (1).

El proto-oncogén *c-myc* forma parte de una familia, que se completa con los proto-oncogenes *N-myc* y *L-myc*. Todos ellos se encuentran sobreexpresados en una gran variedad de tumores humanos. La importancia de este oncogén en el cáncer de vejiga y su papel pronóstico en el mismo, ha sido analizada en diversos estudios. La sobreexpresión de la proteína codificada por *c-myc*, se asocia a un incremento de la actividad proliferativa celular, y a los tumores de elevado grado histológico y estadio infiltrativo. Su importancia pronóstica en el cáncer de vejiga no se conoce con exactitud (1).

El oncogén *mdm2* se localiza en 12q14.3-15, y codifica la proteína *mdm2*, la cual inhibe el feedback regulador de *p53* y *Rb*, favoreciendo además la pérdida del punto de restricción *R*, y en consecuencia, la progresión del ciclo celular. La proteína *mdm2* se une a la *p53* nativa y estimula su degradación. El 20-30% de los tumores de vejiga sobreexpresan la proteína *mdm2*. Esta sobreexpresión produce una inactivación de *p53*, quedando bloqueado el principal regulador negativo del ciclo celular, aunque no esté genéticamente alterado. La proteína *p53*, por el contrario, regula positivamente la expresión de *mdm2*.

Algunos autores han encontrado una relación entre la expresión inmunohistoquímica de *mdm2*, y el grado histológico del tumor, observando al mismo tiempo, que la oncoproteína *mdm2* por sí sola, no tiene capacidad para predecir el pronóstico del cáncer de vejiga, aunque parece reforzar la capacidad de predicción pronóstica encontrada para *p53* (41, 46). Este “refuerzo” puede tener gran importancia clínica, ya que la sobreexpresión de *mdm2*, produce una modulación positiva del crecimiento celular, similar a la producida por la mutación de *p53*. Este hecho debe ser tenido en cuenta, a la hora de valorar el papel de la sobreexpresión de *p53*, en la agresividad biológica del carcinoma vesical (39, 41).

El oncogén *c-erbB-2*, codifica la oncoproteína *c-erbB-2*, también conocida como *HER-2/neu*, que es funcional y estructuralmente similar al *EGF-R*, y posee capacidad para estimular el crecimiento celular. El oncogén *c-erbB-2* se encuentra amplificado y/o sobreexpresado en algunos cánceres de vejiga, según se demuestra en algunos estudios (39). La expresión inmunohistoquímica de *c-erbB-2*, se relaciona de manera estadísticamente significativa con el número de tumores vesicales, la ploidía del DNA, el grado histológico y el estadio infiltrativo del tumor, según indican algunos estudios. Sin embargo, cuando se analiza la implicación pronóstica de esta oncoproteína, los resultados son contradictorios,

ya que mientras algunos trabajos concluyen que c-erbB-2 es una variable independiente, en la predicción de supervivencia, recidiva y progresión de las categorías T y M, otros no encuentran ninguna relación con el pronóstico (1, 47, 48). Algunos de los motivos de esta discordancia, pueden estar en relación con diferencias en el anticuerpo monoclonal utilizado, diferencias en los criterios utilizados para la selección de los casos, y diferencias en los criterios de lectura e interpretación de la inmunohistoquímica, entre otros.

El proto-oncogén *c-jun* codifica la mayor parte del factor de transcripción AP-1 (Activating Protein-1). La función básica de la proteína AP-1 es, por lo tanto, efectuar la regulación (activación o inhibición) de la expresión de diversos oncogenes, como *c-fos* y el propio *c-jun*, genes supresores tumorales, genes de proteasas implicados en la invasividad y en la respuesta inflamatoria, y genes de factores angiogénicos (VEGF). Todo ello hace que AP-1 sea un factor transcripcional clave en la aparición y progresión de los tumores. Algunos estudios inmunohistoquímicos realizados con la oncoproteína c-jun, sugieren que su sobreexpresión es un hallazgo frecuente en el cáncer de vejiga, y que además, existe una correlación altamente significativa entre la expresión celular de c-jun y el estadio infiltrativo, el grado histológico y la expresión nuclear de p53. En el análisis multivariado, no se ha observado que c-jun tenga capacidad para predecir el pronóstico del tumor vesical (27).

El oncogén *bcl-2* induce una inhibición de la apoptosis, aunque su actividad no permite inhibir todas las formas de apoptosis conocidas. El *bcl-2* no ejerce una acción oncogénica directa, sino que actúa permitiendo la perpetuación de células portadoras de oncogenes activados, o genes supresores tumorales inhibidos. Este oncogén parece tener un papel más importante en la apoptosis de las células hematopoyéticas, tanto normales como neoplásicas, que en los tumores sólidos (39). Los estudios que analizan el papel de *bcl-2* en el carcinoma de células transicionales de vejiga, comprueban que la sobreexpresión inmunohistoquímica de la proteína bcl-2, es un hecho poco frecuente en este tipo de tumor. Algunos estudios muestran una correspondencia entre la expresión inmunohistoquímica de bcl-2, y ciertas variables pronósticas clínico-patológicas, como el estadio clínico o el grado tumoral, pero los resultados al respecto son bastante heterogéneos (31, 49, 50, 51). Según concluyen la mayoría de los autores, la expresión de bcl-2 no se muestra como una variable con capacidad para predecir supervivencia, recidiva o progresión, en los análisis

multivariados (31, 50). Algunos estudios encuentran en el análisis univariado, que la coexpresión de p53 y bcl-2, permite predecir la supervivencia de forma significativa, de modo que entre los tumores con negatividad para bcl-2, tendrán mayor probabilidad de supervivencia, aquellos en los que p53 también sea negativo (31).

El oncogén *bcl-X_L*, que es idéntico a *bcl-2* en un 47% de su estructura molecular, induce un efecto anti-apoptótico similar al de *bcl-2*. Al contrario de lo que sucede con *bcl-2*, la sobreexpresión inmunohistoquímica de *bcl-X_L*, es un hallazgo muy frecuente en el carcinoma de células transicionales de vejiga, lo cual parece un hecho predecible, porque en las células uroteliales normales ya se detecta una expresión moderada de *bcl-X_L* (50). Las conclusiones de los estudios que evalúan el papel de la expresión inmunohistoquímica de *bcl-X_L* en el cáncer de vejiga son, como en el caso de *bcl-2*, bastante discordantes, tanto en la relación de esta oncoproteína con otras variables clínico-patológicas, como en lo que respecta a su capacidad pronóstica (50).

El oncogén *bax* es un gen estimulador de la apoptosis, regulado positivamente por la proteína p53, contrariamente a *bcl-2*, que es inhibido por p53. Cuando se produce una mutación de *p53*, disminuye la expresión de *bax*, y aumenta la expresión de *bcl-2*, dando lugar a una inactivación de la apoptosis, que origina un crecimiento celular descontrolado (39). Como en el caso de *bcl-X_L*, se detectan señales de la proteína *bax* en las células uroteliales sanas, y no sólo en las tumorales (49). El papel pronóstico de esta oncoproteína ha sido analizado en pocos estudios, con resultados no concluyentes (49, 52).

La ciclina D1 está codificada por el gen *PRAD1* o *bcl-1*, y forma parte de las ciclinas de la fase G1 del ciclo celular. Esta ciclina puede considerarse como un oncogén, ya que su expresión está alterada en diversos cánceres humanos. El mecanismo oncogénico de la ciclina D1, está probablemente en relación con su acción fosforiladora de la proteína Rb, que origina una pérdida del control que la proteína Rb posee, sobre la transición entre las fases G1 y S, aunque también parece estar relacionado con el control de ciclo celular ejercido por p53 (39, 53).

Los estudios inmunohistoquímicos de la ciclina D1 en cáncer de vejiga, llevados a cabo por diversos autores, algunos con amplias muestras de pacientes, muestran que la expresión porcentual de la ciclina D1, se relaciona inversamente con algunos parámetros pronósticos clínico-patológicos, como grado histológico, estadio infiltrativo,

morfología microscópica del tumor, con p53, y con marcadores de la actividad proliferativa celular, como PCNA; aunque los resultados obtenidos por los diferentes autores no son completamente homogéneos (53, 54). La utilidad de la ciclina D1 en la evaluación del pronóstico de los pacientes con cáncer de vejiga, parece ser baja, a la vista de los resultados de los estudios efectuados al respecto (54).

1.1.3.9. Genes supresores tumorales.

Los genes supresores de tumores, son genes que en condiciones fisiológicas regulan la actividad proliferativa celular, actuando como freno, y evitando un crecimiento celular excesivo, mediante su actuación sobre diversos puntos del ciclo celular. En las células cancerosas, estos genes pierden su funcionalidad, dando lugar a una pérdida de la capacidad de regulación del ciclo celular, a una inhibición del proceso de apoptosis, y a una incapacidad de la célula para reparar su propio genoma, tras la agresión de algún agente externo (39, 55).

El gen supresor *Rb* de susceptibilidad al retinoblastoma, fue el primer gen supresor tumoral identificado. Su localización cromosómica es 13q14. La proteína Rb, en su estado habitual de hipofosforilación, inhibe la progresión del ciclo celular, bloqueándolo en la fase G1. Sólo cuando la proteína Rb es fosforilada por los complejos ciclina-CDK, permite que la célula inicie la fase de síntesis del DNA (fase S) del ciclo celular, mediante la activación de una serie de genes específicos. La alteración funcional del gen *Rb*, de etiología mutágena o no, da lugar a una activación permanente de genes implicados en la proliferación celular (39, 55).

La mutación del gen *Rb* es una de las mutaciones más frecuentes, encontrándose en casi el 50% de los cánceres que afectan a adultos. Esta mutación fue inicialmente descubierta en pacientes con retinoblastoma, pero posteriormente se han ido identificando mutaciones de este gen, en una gran variedad de tumores, entre ellos el carcinoma de células transicionales de vejiga. El estado del gen *Rb* ha sido evaluado, tanto mediante análisis genético, como de manera indirecta, estudiando la proteína Rb por métodos inmunohistoquímicos. Las mutaciones del gen *Rb* se manifiestan usualmente,

como una expresión reducida de la proteína en el análisis inmunohistoquímico, aunque algunos autores han comunicado que la sobreexpresión inmunohistoquímica de Rb, se relaciona con la progresión tumoral, en pacientes con cáncer de vejiga avanzado (56). Esta diferente manifestación inmunohistoquímica de la mutación del gen *Rb*, da lugar a una cierta confusión a la hora de interpretar y comparar los resultados obtenidos por los distintos, autores; a esto hay que añadir la heterogeneidad inherente, que se produce al considerar como Rb-negativo, diferentes porcentajes de expresión de la proteína. Otro factor limitante en la evaluación de Rb en el cáncer de vejiga, es el escaso número de estudios que analizan la proteína Rb en los tumores superficiales.

El análisis de los diferentes estudios, que evalúan el papel de la alteración del gen *Rb* en el cáncer de vejiga, nos permite observar en primer lugar, que la expresión de un *Rb* alterado es característico de los tumores músculo-infiltrantes, de los cuales se suele considerar un factor pronóstico, ocurriendo con menos frecuencia en los superficiales; y en segundo lugar, que parece existir una cierta unanimidad al concluir que la expresión inmunohistoquímica de la proteína Rb, se relaciona de manera significativa, en el análisis univariado, con la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada, y con la probabilidad de progresión tumoral (1, 56, 57, 58), aunque algunos autores no encuentran dicha relación (59).

Existen estudios que incluyen en la categoría de “expresión anormal de Rb”, tanto a los tumores que no expresan la proteína Rb, como a los que sobreexpresan Rb. Dicha categoría en conjunto, muestra una relación significativa con la supervivencia cáncer-relacionada en el estadio T1, en el análisis univariado (56). Son muchos los trabajos que estudian conjuntamente los genes supresores tumorales *Rb* y *p53*, concluyendo en la mayoría de los casos, que la alteración simultánea de ambos genes, conduce a un pronóstico peor, que cuando sólo uno de ellos ha perdido su funcionalidad (56).

El gen *p21*, también conocido como *waf1* o *cip1*, parece ser un gen supresor tumoral, cuya transcripción es estimulada por la proteína p53. La función principal de este gen, es bloquear el ciclo celular en la transición entre las fases G1 y S. La proteína p21 ejerce su acción supresora por un doble mecanismo (1, 39): inhibición de los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina E-CDK2 en la fase G1, e inhibición del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Los niveles de *p21* están disminuidos en las células

cancerosas, y son varios los estudios que han encontrado una relación inversamente proporcional, entre la expresión inmunohistoquímica de la proteína p21 y diversos marcadores pronósticos del cáncer de vejiga, como el grado histológico, el estadio infiltrativo, la expresión de p53 y ki67, y la existencia de adenopatías regionales (1, 52). En el análisis multivariado de un estudio realizado con 101 pacientes sometidos a cistectomía radical por cáncer de vejiga, todos ellos con sobreexpresión de p53, se observó que la expresión inmunohistoquímica de p21, se mostraba como una variable pronóstica independiente, de modo que aquellos tumores que no expresaban p21, tenían una mayor probabilidad de recidiva, y una menor probabilidad de supervivencia, tanto en tumores órgano-confinados, como localmente avanzados (1). Otros estudios, por el contrario, concluyen que la determinación inmunohistoquímica de p21, no se relaciona de manera estadísticamente significativa con el pronóstico de los pacientes con cáncer de vejiga, tanto en el análisis univariado, como en el multivariado (60).

Parece desprenderse de los estudios existentes, que la mutación de *p21* tiene implicaciones pronósticas en el cáncer de vejiga, en aquellos tumores en los que existe una mutación simultánea de *p53*, y según se demuestra en un trabajo de investigación, la delección aislada del gen *p21* en ratones, no provoca un aumento en la aparición de cánceres. Probablemente la mutación de *p21* adquiere importancia pronóstica, sólo cuando tiene lugar en tumores, en los que *p53* también se encuentra mutado. Una posible explicación para este fenómeno, es que frente a un daño en el DNA, las células con un *p21* no funcional presentan una mayor actividad proliferativa, porque no son capaces de detener el ciclo en el punto de restricción R de la fase G1, sin embargo no pierden su capacidad apoptótica, y el punto de control M funciona con normalidad (39).

El gen *p53* es un gen supresor de tumores localizado en 17p13.1, que se encuentra mutado o inactivado en más del 50% de los cánceres humanos. Las mutaciones se localizan mayoritariamente entre los exones 5 y 8 de la molécula, sin embargo en el cáncer de vejiga, más de una cuarta parte de estas mutaciones tienen lugar en exones distintos a los anteriormente citados. El cometido básico del *p53* nativo, como gen supresor de tumores, es detener la progresión del ciclo celular en la fase G1, cuando se produce un daño en el DNA, ocasionado por un agente endógeno o exógeno, evitando de este modo que la célula realice la síntesis de un material genético portador de mutaciones. Una vez

detenido el ciclo celular, y mediante la activación de diversos genes específicos, *p53* actúa promoviendo la reparación del DNA alterado, o bien induciendo una apoptosis, lo cual depende la cuantía del daño en el material genético.

La expresión elevada de la proteína *p53* en el análisis inmunohistoquímico, se ha relacionado en numerosos trabajos con diversos factores de mal pronóstico como: elevado estadio infiltrativo tumoral, elevado grado histológico, multifocalidad tumoral o existencia de metástasis (1, 18, 57, 61, 62). La mayor parte de los estudios en los que se realiza un análisis univariado, encuentran una relación importante entre la expresión inmunohistoquímica de *p53* y/o la secuenciación de *p53*, y el pronóstico del carcinoma de células transicionales de vejiga, tanto en la supervivencia general (1, 18, 56, 63, 64, 65), como en la progresión (1, 18, 56), y en la recidiva tumoral (1, 65). El problema es que en la mayoría de los estudios no se realiza análisis multivariado, con lo cual las conclusiones emitidas con respecto al pronóstico de la enfermedad, tienen un valor limitado. Los resultados obtenidos por aquellos autores que realizan un estudio multivariado de supervivencia, son heterogéneos, ya que mientras en algunos casos la expresión inmunohistoquímica de *p53*, se muestra como una variable con capacidad pronóstica independiente (61, 1, 18), en otros no se demuestra que *p53* tenga tal capacidad (21, 59, 64, 66, 67, 68)

El estudio inmunohistoquímico de la expresión de *p53*, como factor pronóstico del cáncer de vejiga, ha sido llevado a cabo en diversos trabajos en los últimos años, con una gran variedad de resultados, que en ocasiones llegan a ser contradictorios. La interpretación de los resultados, así como la comparación entre los diferentes estudios, resulta en ocasiones difícil. Esta dificultad se produce fundamentalmente por una falta de homogeneidad a la hora de definir la positividad de *p53*, y por la existencia de diferencias en el tipo de análisis efectuado (univariado vs. multivariado). Por otra parte, aunque la mayoría de los autores estudian la expresión inmunohistoquímica de la proteína *p53*, existen trabajos en los cuales se efectúa un estudio de secuenciación del gen *p53*. La comparación de los resultados obtenidos por los dos tipos de estudios, es en ocasiones muy dificultoso.

1.2. Carcinoma in situ primario de vejiga:

El carcinoma in situ (CIS) primario de vejiga es una neoplasia intraepitelial plana, de alto grado de malignidad histológica (TaG3 plano). La nueva clasificación de la World Health Organization y la International Society of Urologic Pathology (WHO/ISUP), de 1998, propone la subdivisión de las lesiones intraepiteliales planas en cuatro categorías: atipia reactiva, atipia de significado desconocido, displasia y carcinoma in situ. Es posible que las dos últimas categorías sean estadios diferentes de un mismo proceso, en el cual se acumulan alteraciones bioquímicas y genéticas de manera gradual, hasta desarrollar un carcinoma in situ, que se considera una lesión preinvasora. Aproximadamente un 10-20% de las lesiones categorizadas como displasia, evolucionan hacia un cáncer anatomopatológicamente confirmado (CIS ó cáncer músculo-infiltrante). El término displasia urotelial severa o de alto grado, se considera sinónimo de CIS (69, 70).

Desde el punto de vista clínico, el CIS se caracteriza por: 1) una historia natural impredecible; 2) un diagnóstico sencillo por medio de citología de orina ordinaria; y 3) una elevada susceptibilidad al tratamiento intravesical con Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (71).

El carcinoma in situ presenta un comportamiento muy variable, y puede manifestarse como una enfermedad relativamente indolente (20-30% de los casos), evolucionando como un tumor superficial o desapareciendo tras un ciclo de BCG, o bien como un tumor de elevado potencial de progresión, con una gran tendencia a la infiltración de la capa muscular de la vejiga (50-60% de los casos), y al desarrollo de metástasis (aproximadamente un 10-20% de los pacientes).

El CIS vesical puede encontrarse de manera aislada (10% de los casos), o bien asociado a un tumor vesical papilar o sólido (90% de los casos), denominándose CIS primario y secundario, respectivamente. Las diferencias no son sólo conceptuales, sino también pronósticas, ya que el CIS primario tiene una probabilidad de progresión local o a distancia del 40%, mientras que esta probabilidad aumenta hasta el 70-80% en el caso del CIS secundario. El CIS vesical también puede dividirse en focal o difuso, atendiendo a criterios topográficos. Esta división también presenta importantes implicaciones

pronósticas, ya que el riesgo de infiltración muscular en los pacientes con CIS focal es del 8%, frente al 78% en los que presentan un CIS difuso (71, 72, 73).

Desde el punto de vista clínico, el CIS se presenta en la mayoría de los casos con síntomas del tracto urinario inferior, de carácter irritativo: disuria, polaquiuria diurna y nocturna, urgencia miccional, acompañados o no de dolor suprapúbico o en el flanco. Aproximadamente un 25% de los pacientes se muestran asintomáticos, siendo la mayoría de ellos pacientes con lesiones de CIS focal (71, 72). La microhematuria es un hallazgo analítico casi constante.

La citología de orina es el test diagnóstico más valioso en el CIS vesical primario, presentando una sensibilidad superior al 90% en la mayoría de las series. La cistoscopia puede ser absolutamente normal, o bien presentar los llamados “yellow spots” (granos amarillos), o las típicas lesiones eritematosas, planas, de superficie aterciopelada, que por otra parte son absolutamente inespecíficas (71, 72, 73).

El estudio radiológico del aparato urinario, mediante UIV o ecografía, aporta un bajo rendimiento diagnóstico en el caso del CIS vesical primario. El cistograma puede revelar la existencia de una vejiga de baja capacidad (71).

Todos aquellos pacientes con un análisis citológico de la orina positivo para carcinoma de células transicionales, deben ser sometidos a una exploración cistoscópica bajo anestesia, con el fin de evaluar las características ópticas de la vejiga y, mediante una pinza fría, realizar una toma aleatoria de biopsias de la mucosa vesical, así como de aquellas áreas ópticamente sospechosas. Del mismo modo, es conveniente conocer el estado de la uretra prostática, tomando muestras de la misma con el asa del resectoscopio (71, 73).

El estado del tracto urinario superior puede ser evaluado mediante la realización de citología de lavado de ambos uréteres, obtenida por cateterización retrógrada de los mismos. Esta última prueba diagnóstica es de especial importancia, en caso de biopsia vesical aleatoria negativa y positividad persistente de la citología de orina, en pacientes que han recibido un tratamiento adecuado.

La extensión es el factor pronóstico clínico más importante del CIS primario de vejiga, hallándose una tasa de progresión significativamente más elevada en los CIS difusos que en los focales, considerándose CIS difuso aquel con más de 2 ó 3 biopsias

vesicales positivas, según los autores (71, 73). La respuesta a la administración intravesical de BCG es un factor pronóstico importante, ya que los pacientes que no alcanzan una respuesta completa tras la administración de BCG, tienen una probabilidad del 70-80% de presentar progresión clínica (73).

Entre los factores pronósticos moleculares destaca la ploidía del DNA, y la anormal expresión de diversos marcadores genético-moleculares, como *erb-B2*, *H-ras*, *Rb* y *p53*.

Existen diversas mutaciones cromosómicas, asociadas a una mayor probabilidad de progresión del cáncer vesical. Las deleciones de 9q, típicas de los tumores superficiales papilares, son poco comunes en el CIS; mientras que la deleción de 17p, característica de los carcinomas músculo-invasores, se observa con una elevada frecuencia. La mutación del gen *p53*, determinada mediante análisis genético, o indirectamente, por métodos inmunohistoquímicos, presenta una clara relación con la probabilidad de progresión tumoral en el CIS, manifestándose como una variable independiente en la predicción de progresión y supervivencia, en la mayoría de los trabajos. En dichos trabajos, se observa una diferencia estadísticamente significativa en las cifras de progresión y supervivencia, al comparar pacientes situados a uno u otro lado de un dintel de *p53*, previamente establecido por el investigador (72, 73).

En cuanto a la ploidía del DNA, medida por citometría de flujo, es importante resaltar que la mayoría de los CIS, muestran múltiples líneas celulares aneuploides en el histograma, como ocurre en la mayor parte de los casos de cáncer vesical músculo-infiltrante. La aneuploidía, observada en el momento del diagnóstico, o durante la evolución de la enfermedad, se ha relacionado en muchos trabajos con elevadas tasas de progresión tumoral (71, 72, 73). Algunos autores han desarrollado una clasificación del CIS basada en el histograma del DNA: 1) CIS con una línea celular aneuploide al diagnóstico, que se mantiene estable durante toda su evolución; 2) CIS con una sola línea aneuploide al diagnóstico, con posterior aparición de varias líneas aneuploides; y 3) CIS con múltiples líneas celulares aneuploides en el momento del diagnóstico. Se observó que los pacientes pertenecientes al tercer grupo, presentaban una probabilidad de desarrollar infiltración muscular y/o metástasis del 76%, frente al 19% observado en el primer grupo (72, 74).

Como se puede observar, desde el punto de vista genético-molecular, existen muchas similitudes entre el CIS y el carcinoma infiltrante, lo que para muchos es una prueba definitiva, de que el CIS es una verdadera lesión precursora del cáncer músculo-infiltrante (72).

El tratamiento del CIS puede enfocarse desde un punto de vista conservador o radical. Las opciones terapéuticas conservadoras son utilizadas como medida inicial, en la mayoría de los casos, dejando el tratamiento radical para aquellos pacientes que progresan, o que no responden a la primera línea terapéutica.

La resección transuretral o la electrocoagulación de las lesiones vesicales, se puede efectuar en los casos de CIS focal, aunque es una medida con escaso valor terapéutico. Por otra parte, hay que tener en cuenta que en muchos casos de CIS no se observan lesiones vesicales endoscópicamente identificables, y cuando se observan suelen tener unos límites mal definidos. La resección transuretral aislada no es un tratamiento adecuado para el CIS, y según comunican algunos autores, la tasa de progresión alcanza el 80% en los pacientes tratados únicamente con RTU; además hasta un 65% de pacientes necesitarán una cistectomía radical para controlar la enfermedad, cuando son tratados de este modo (71, 72).

La administración de instilaciones intravesicales de fármacos quimioterápicos, como Thiotepa, Doxorrubicina o Mitomicina C, se asocia a una tasa de respuestas completas que oscila entre el 40-60%. En la actualidad la administración de estos fármacos debe realizarse sólo en caso de contraindicación, efectos adversos severos o fallo terapéutico de la inmunoterapia intravesical (71, 72).

La utilización de los agentes modificadores de la respuesta biológica, en especial BCG, ha revolucionado por completo el tratamiento del CIS. Otros agentes inmunoterápicos, como Interferón- α 2b, KLH (Hemocianina Keyhole Limpet), Interleukina 2 y Bropirimina oral, también han sido utilizados en el tratamiento del CIS.

El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) es el agente intravesical más efectivo, para el tratamiento del CIS vesical primario. La BCG se asocia a una tasa de respuesta citológica y biopsica completa, de aproximadamente el 70% a los 5 años, con una prolongación significativa del intervalo libre de recidiva, en comparación con los agentes

quimioterápicos (71, 75). Es absolutamente necesario que la BCG establezca contacto con las células tumorales, para producir una reacción inflamatoria aguda, y la inducción de una respuesta inmune específica e inespecífica, que dará lugar a la síntesis de diversas citokinas y a la activación de células efectoras de la respuesta inmunitaria celular, todo ello con el fin último de destruir la célula tumoral (71).

Algunos autores sugieren que la administración de BCG puede inducir la activación de la forma nativa de p53, en el urotelio no neoplásico, donde la presencia de esta proteína es habitualmente baja. Este efecto de la BCG sobre la p53 de las células uroteliales puede explicar, en parte, el mecanismo de acción antitumoral desarrollado por la BCG, para lo cual sería necesario que el estado funcional de la p53 fuese correcto, en un número suficiente de células uroteliales de la vejiga (76).

Se ha encontrado también una relación entre el estado del gen *p53*, determinado por secuenciación de DNA, y la respuesta a la quimioprofilaxis intravesical con Mitomicina C, observando una mayor probabilidad de fallo terapéutico, y por lo tanto de recidiva precoz, en aquellos tumores con *p53* mutado (49).

Se han ensayado clínicamente diversas cepas de BCG: Pasteur, Armand-Frappier, Tice, Connaught, Glaxo, Tokyo, Dutch (RIVM) y Moreau. Todas ellas son variantes de la cepa del Instituto Pasteur, y se considera que su efectividad terapéutica es similar (75).

El régimen terapéutico óptimo de BCG no está del todo claro, ya que es necesario establecer un balance entre la efectividad terapéutica y la probabilidad de efectos secundarios. La dosis adecuada para el tratamiento del CIS parece ser de $5 \cdot 10^8$ a $5 \cdot 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC) (71), aunque se han utilizado pautas con dosis más bajas, en un intento de reducir los efectos secundarios. Es necesario esperar los resultados de estudios randomizados prospectivos, que comprueben la eficacia terapéutica de dichas pautas.

La pauta de administración más extendida, se lleva a cabo mediante un primer ciclo de inducción, consistente en una dosis semanal, durante 6 semanas, seguido de un período de descanso de 3-4 semanas, y por último un segundo ciclo de "reinducción", en el que se administran 6 dosis más, con una periodicidad quincenal. Es probable que la mayoría de los pacientes presenten una respuesta óptima, en algún punto entre las 6 y las 12

instilaciones. Después de la última instilación, y tras un descanso de unas 2-3 semanas, se debe realizar una reevaluación endoscópica, con toma de biopsias aleatorias y citología de orina. Algunos grupos son partidarios de realizar pautas de BCG de mantenimiento durante 1-2 años, incluso tras la negativización de las biopsias vesicales y de la citología de orina (75).

Aquellos pacientes que presentan una citología de orina positiva de manera persistente, con biopsias vesicales negativas, deben ser sometidos a estudio, para identificar la posible existencia de un CIS extravesical, efectuando una reevaluación de uretra prostática, biopsia-RTU de próstata, y una citología de lavado del tracto urinario superior, tras la cateterización selectiva de cada uno de los uréteres. Pueden pasar varios años antes de que la localización del tumor sea identificable. Algunos de los pacientes de este último grupo, pueden presentar una conversión espontánea de los hallazgos citológicos, en el plazo de unos meses, sin demostrarse nunca enfermedad urotelial extravesical (75).

Los efectos secundarios más frecuentes de la BCG se producen a nivel local, con hematuria y síntomas de cistitis, que suelen controlarse mediante AINEs y anticolinérgicos. La clínica sistémica se observa en una minoría de pacientes, pero puede revestir gravedad. Los efectos adversos sistémicos más comunes son fiebre, manifestaciones alérgicas cutáneas, y la más grave de todas, la BCGitis sistémica, con $T^a > 38,5^{\circ}\text{C}$, secundaria a inoculación masiva de BCG en el torrente circulatorio, habitualmente tras una cateterización traumática. La BCGitis requiere en ocasiones un ingreso hospitalario urgente, con administración de antipiréticos, antibióticos de amplio espectro y fármacos antituberculosos (71).

La persistencia de efectos secundarios locales, que no son bien controlados con el tratamiento habitual, puede manejarse reduciendo a la mitad la dosis de BCG, o bien espaciando más las instilaciones. Si esto no es suficiente, debemos plantearnos la posibilidad de suprimir la BCG, en cuyo caso podemos sustituirla por un fármaco quimioterápico, preferiblemente Mitomicina C, que consigue una tasa de respuesta completa cercana al 50% (71, 75).

En la mayor parte de los pacientes con CIS vesical, el fracaso terapéutico, que se produce en el 30% de los casos, se manifiesta por la persistencia del CIS vesical, o

bien por la aparición de un tumor papilar de alto grado (G3) o superficialmente invasor (T1) (77).

Aquellos pacientes en los que persiste el CIS vesical, tras un tratamiento mediante dos ciclos (12 instilaciones) de BCG, tienen una probabilidad del 70-95% de desarrollar una enfermedad vesical músculo-infiltrante o una afectación prostática, por lo que la cistectomía radical es la opción terapéutica recomendada por la mayoría de los autores, para este tipo de pacientes. La tasa de supervivencia a largo plazo es mayor cuando se realiza una cistectomía inmediata, tras el fracaso de la BCG, que cuando se realiza una cistectomía diferida, en presencia de enfermedad músculo-infiltrante (72, 77). La cistectomía radical es una indicación obligada en aquellos pacientes cuya biopsia-RTU de próstata, muestra una infiltración del estroma o una afectación difusa de los ductus prostáticos (71, 78).

La progresión del CIS hacia la invasión de la lámina propia, con desarrollo de tumores de la categoría T1G3, es para la mayoría, una indicación de cirugía radical inmediata, ya que estos tumores tienen una probabilidad de progresión de aproximadamente el 80% (77). La supervivencia alcanzada mediante la cirugía radical en este grupo de pacientes, es sustancialmente mayor que con la pauta de RTU y seguimiento estrecho, llevada a cabo por algunos urólogos. Las recidivas de bajo grado y estadio Ta, pueden manejarse mediante RTU y terapia adyuvante con BCG, e igualmente, una monitorización exhaustiva (71, 72).

La terapia fotodinámica constituye otro posible abordaje terapéutico del CIS. Esta terapia consiste en la administración intravenosa de una sustancia fotosensibilizadora, habitualmente un derivado de la hematoporfirina (Photofrin), que es posteriormente activada por un haz de luz externo, con una longitud de onda de 630 nm (luz roja). Los tejidos sanos eliminan rápidamente la sustancia, mientras que esta se acumula en las células tumorales, que son destruidas tras la aplicación del haz de luz. Este tipo de tratamiento se ha mostrado eficaz frente a los tumores superficiales de pequeño tamaño y el CIS, con un índice de respuestas completas del 57 al 100%. El principal inconveniente de esta terapia es la elevada tasa de complicaciones que presenta: reflujo vésico-ureteral y fibrosis vesical, hasta en el 80% de los pacientes. Por otra parte, el paciente debe evitar el contacto con la luz solar durante aproximadamente seis semanas, debido a la fotosensibilización cutánea

generalizada (71, 79). En líneas generales, la terapia fotodinámica debe considerarse un tratamiento en fase experimental (17, 80).

1.3. Tumor vesical en estadio T1:

El carcinoma de células transicionales en estadio T1, es un tumor vesical que invade la lámina propia, sin sobrepasarla. La lámina propia constituye para algunos autores, el límite entre el buen y el mal pronóstico, y la afectación de la misma presenta importantes implicaciones terapéuticas (81, 82).

Los tumores de la categoría T1 representan aproximadamente el 30% de los tumores superficiales de vejiga. A su vez, un tercio de los tumores T1, son de alto grado (G3) (83).

Aunque los tumores de la categoría T1 se consideran como superficiales, su pronóstico es claramente peor que los tumores de la categoría Ta, ya que mientras en la categoría Ta, la supervivencia cáncer-relacionada es del 95% a los 5 años, esta desciende hasta el 72%, en los tumores T1 (83). En un estudio dirigido por Heney en 1983 (84), sólo se observó progresión en el 4% de los tumores Ta, frente a un 30% de progresión en la categoría T1, tras 39 meses de seguimiento.

Comparando tumores de un mismo grado histológico se observa, que los pacientes con tumores grado 2 e invasión de la lámina propia, muestran una supervivencia del 83% a los 5 años, en comparación con el 98% de los pacientes con tumor de grado 2 sin invasión de la lámina propia. Los pacientes con tumores grado 3 e invasión de la lámina propia tienen una supervivencia del 63% y 56%, a los 5 y 10 años respectivamente (85).

Mostofi estableció en 1975 que básicamente existen dos categorías de tumores vesicales: grado 1 y grado 3. La categoría intermedia (grado 2), puede ser dividida en dos grupos, atendiendo a criterios clínicos y citohistológicos: el grado 2a, relacionado con el grado 1, y el grado 2b, que reproduce al grado 3 (85, 86).

El tumor T1G3 no es una lesión infrecuente. En las distintas revisiones, la incidencia varía entre el 6-23% de todos los tumores superficiales de vejiga, dependiendo de la distinta interpretación histológica, y la clasificación utilizada en los diferentes centros. Estos tumores pueden ser únicos o múltiples, papilares o sólidos, si bien la apariencia sólida o polipoide por endoscopia, es más sugestiva de una lesión histológica G3 (85, 86).

Pocos estudios centran el problema de las recidivas subsiguientes a la resección transuretral de los tumores T1G3. Algunos de estos estudios cifran el índice de recidiva en el 60% a los 5 años y 22% a los 2 años. Hay que sospechar la posibilidad de que persista epitelio generador de tumor, contiguo a la zona de resección. En caso de duda, es aconsejable practicar una segunda resección tiempo después, alrededor de un mes. La mayoría de los tumores invasivos recidivados coinciden en pacientes con tumores T1G3.

Un análisis retrospectivo (87) de tumores Ta y T1, destaca el hecho de que la progresión se asocia principalmente a los grados 2 y 3, y a la frecuente aparición de nuevos tumores. Sin embargo, es difícil individualizar el grupo de "alto riesgo", en la primera presentación o en la primera recidiva. Repetidos intentos se han hecho para intentar definir el "perfil de riesgo", basado en los hallazgos clínicos e histológicos. Este perfil sería útil para identificar pacientes con tumores Ta y T1, que tuviesen tendencia a recidivar con incremento del estadio (85, 86).

Algunos autores (84) han demostrado que los tumores T1, múltiples (más de 4), mayores de 5 cm, con grado 2-3, y acompañados de displasia severa, tienen un intervalo libre de enfermedad muy corto. Por otra parte, se ha observado también que el incremento en el índice de progresión está en relación con el grado y el estadio. Los tumores T1G3, progresan hacia la invasión de la muscular en el 48% de los casos, frente a los tumores T1G2 cuyo índice de progresión disminuye al 21%.

Otros autores (88) han confirmado que los pacientes con tumores T1G3, tienen un mayor índice global de recidiva y de recidivas en la misma localización, una menor supervivencia a los 5 y 10 años, y un intervalo libre de enfermedad más corto, que otros grupos de pacientes con tumores de menor grado. El índice de progresión se aproxima al 50%, dentro de los 40 primeros meses (84).

Existe una frecuente asociación entre el carcinoma in situ y los tumores superficiales de alto grado. Puesto que el índice de progresión en pacientes con carcinoma

in situ asociado, es tan elevado, parece razonable suponer que la mayoría de los tumores invasivos, en esos casos, se originarían a partir del epitelio displásico, sin embargo esta teoría no ha sido aún confirmada. De ser así, el control del carcinoma in situ, podría servir para prevenir nuevas ocurrencias.

En el momento actual, está aceptado por todos los autores, que la inspección visual es insuficiente e inadecuada para detectar la presencia de carcinoma in situ vesical, pues las lesiones de CIS pueden ofrecer un aspecto endoscópico normal. La biopsia vesical randomizada es imprescindible y ha de complementarse con la obtención de una muestra de uretra prostática, ya que el 16% de los pacientes con cáncer vesical superficial de alto grado, presentan CIS uretral concomitante (89), y el 40% de las piezas de cistectomía practicadas por cáncer vesical infiltrante, muestran lesiones de carcinoma in situ en los ductus prostáticos.

Algunos autores (90) consideran, que dado que los pacientes con tumores T1G3 progresan invadiendo la capa muscular en el 50% de los casos, en un período de 40 meses, han de ser considerados como un grupo de alto riesgo, y en consecuencia han de ser sometidos a una segunda resección transuretral en el plazo de 6 semanas, con el fin de intentar reducir el número de recidivas.

La experiencia del Servicio de Urología del Hospital Xeral-Cíes de Vigo, publicada en 1991 (85, 86, 91) en relación con los tumores vesicales T1G3, es la siguiente. De un total de 448 casos de tumores superficiales revisados, la incidencia de lesiones G3 fue del 13%, correspondiente a 57 pacientes. De ellos, 13 pacientes presentaban CIS asociado, lo que representa el 23%, mientras que el 12% presentaba otro tipo de displasia.

La incidencia de recidivas después de la RTU fue del 69%, para los que presentaban CIS asociado, y 52% para los que no presentaban lesiones de CIS o displasia severa, con un seguimiento medio de 29 meses.

La tasa de supervivencia a los 36, 60 y 94 meses, establece claramente las diferencias de evolución en relación con la presencia o ausencia de CIS, pues mientras a los 94 meses sobrevivieron el 41% de los pacientes que no tenían CIS asociado, en el mismo período de tiempo fallecieron todos los que presentaban CIS asociado.

Los tumores de la categoría T1G3 tienen una probabilidad de supervivencia inferior al 20% a los 5 años, y una probabilidad de progresión en torno al 50% a los 5 años, si son tratados exclusivamente mediante resección transuretral.

La realización de profilaxis intravesical con agentes quimioterápicos, en los tumores superficiales de alto grado, tiene como objetivo remoto fundamental, prevenir la infiltración de la capa muscular. Ningún ensayo, hasta el momento, ha demostrado la eficacia de la quimioprofilaxis en la prevención de la progresión (85, 86).

Un estudio realizado con 60 pacientes, portadores de tumores Ta/T1 G3, tratados indistintamente con Mitomicina C, Methotrexate y Epodyl, muestra un índice de progresión del 40%, similar al reflejado en otras series, en las que la RTU fue el único tratamiento efectuado (85, 86).

En los tumores T1G3, con o sin CIS asociado, la inmunoprofilaxis intravesical con BCG, es considerada como una medida de elección, dado que la BCG, es el único agente intravesical que ha demostrado un descenso de la tasa de nuevas ocurrencias vesicales, una reducción de la tasa de progresión tumoral y un aumento de la supervivencia cáncer vesical-relacionada (92, 93). Habitualmente se administran dos ciclos de BCG, de 6 semanas de duración cada uno de ellos, aunque algunos autores son partidarios de realizar una terapia de mantenimiento prolongada. La eficacia de la inmunoterapia con BCG se mantiene a lo largo del tiempo, al contrario de lo que ocurre con la quimioprofilaxis (94).

Los pacientes con tumores de la categoría T1G3 pueden ser controlados de manera segura y curados, mediante RTU y BCG intravesical, sin comprometer la progresión tumoral precoz y la supervivencia, si son seguidos estrechamente, especialmente durante los 5 primeros años tras el diagnóstico, para detectar precozmente el desarrollo de una enfermedad músculo-infiltrante, aunque el control debería durar toda la vida (95).

La papel de la radioterapia radical en el cáncer superficial de vejiga sigue siendo motivo de debate. Algunos autores han demostrado una eficacia superior de la radioterapia en el control local del tumor T1G3, en comparación a los tumores G1. En el 55% de los pacientes con tumores G3, persistía el control local a los 5 años, sin haber recibido otro tratamiento complementario. Por otra parte, ningún paciente con tumor grado 3 presentó recidiva local ni desarrolló metástasis a distancia, entre los 5 y 10 años

siguientes a la radioterapia, sugiriendo que tan largo seguimiento puede considerarse curación.

Parece claro que la radioterapia ofrece pocas perspectivas en el control de los carcinomas grado 1 y 2. Sin embargo, las probabilidades de éxito aumentan en el tratamiento de tumores grado 3. La radioterapia reduce el riesgo de metástasis, mediante el control local de la enfermedad, mejorando el pronóstico (85, 86).

El momento y la indicación oportuna de la cistectomía radical en los tumores T1, es una fuente constante de controversia entre los urólogos. Un estudio realizado en 1987, muestra que los pacientes con cáncer vesical en estadio T1 tratados mediante cistectomía inmediata, tenían un índice de supervivencia el 90% a los 5 años de seguimiento, frente a un 62% de aquellos que fueron tratados mediante dos o más RTU previas a la cistectomía (78). Estudios realizados en tumores de la categoría T1G3 tratados mediante cistectomía radical, muestran una tasa de supervivencia del 76% a los 5 años de seguimiento (96). Por el contrario otros estudios han demostrado que los tumores T1G3, pueden ser adecuadamente controlados mediante tratamiento conservador, si reciben un seguimiento apropiado (95).

Parece adecuado indicar una cistectomía radical en aquellos pacientes con enfermedad T1G3, cuyas recidivas no pueden ser satisfactoriamente controladas, mediante una dosis y una pauta óptimas de BCG intravesical (30%); en pacientes con CIS persistente; en pacientes con CIS secundario que presentan invasión del estroma prostático, o afectación ductal extensa; en aquellos pacientes con persistencia de tumor, en una vejiga no funcional; y obviamente, en aquellos pacientes en los que se detecta una progresión local de la enfermedad. En casos excepcionales, la cistectomía puede estar indicada por los efectos adversos producidos por la terapia intravesical (retracción vesical, síndrome miccional o hematuria incontrolables) (78).

Los tumores de la categoría T1G3 se encuentran en el límite entre el tratamiento conservador y la cirugía radical, y en muchas ocasiones surgen dilemas terapéuticos, a pesar de la existencia de una serie de factores pronósticos clínico-patológicos perfectamente establecidos. El advenimiento de nuevos marcadores genético-moleculares como la ploidía del DNA, y en especial la expresión nuclear de p53,

proporciona una información pronóstica adicional de gran importancia, que en ciertas ocasiones facilita la planificación terapéutica (97, 98).

1.4. Tumor vesical en estadio T2a:

El estadio T2a del carcinoma de células transicionales de vejiga, define aquellos tumores cuya invasión alcanza, sin sobrepasar, la capa muscular propia superficial (mitad interna) de la pared vesical (99). Las estrategias terapéuticas utilizadas para intentar lograr el control local de la enfermedad músculo-infiltrante, pueden dividirse en dos: 1) las basadas en la preservación vesical, y 2) las basadas en la cirugía radical de la vejiga y derivación urinaria (17). Ambas modalidades terapéuticas pueden llevarse a cabo solas, o en combinación con diversas pautas de radioterapia y/o quimioterapia sistémica.

La resección transuretral constituye una de las posibilidades terapéuticas en los tumores pertenecientes al estadio T2a. Aunque clásicamente la RTU aislada fue considerada como un tratamiento inadecuado en los tumores infiltrantes, esta modalidad terapéutica puede ser altamente efectiva si nos restringimos a los tumores T2a (17, 100). Es evidente que cuando el tumor se halla limitado exclusivamente a la vejiga en el momento de la RTU radical (algo imposible de determinar con certeza en la actualidad), esta técnica terapéutica puede ser tan efectiva para la curación del tumor, como otros tratamientos más agresivos, y sin las consecuencias irreparables de estos (100). Los estudios retrospectivos en los que se evalúa el tratamiento con RTU como monoterapia, en los tumores vesicales infiltrantes, muestran una supervivencia a los 5 años entre el 31-82%; por ello, con una adecuada selección de los pacientes, este tratamiento puede ser adecuado. Los criterios que debe reunir el carcinoma vesical músculo-infiltrante, para utilizar la RTU como monoterapia, de un modo seguro, son: realización de una RTU completa desde el punto de vista óptico, biopsias del lecho de resección libres de tumor, biopsias frías de la grasa perivesical libres de tumor y por último, desaparición de las áreas vesicales induradas al tacto rectal, si las hubiera previamente.

Una modalidad terapéutica empleada en muchas ocasiones es la llamada “RTU de re-estadificación”, cuya función es establecer una estadificación tumoral más exacta, seleccionar a los pacientes que pueden ser controlados mediante RTU, frente a aquellos en los que sería aconsejable una cirugía radical, y evaluar el estado de la uretra prostática y el cuello vesical, de cara a una eventual derivación urinaria ortotópica. Un 10% de las cistectomías radicales, muestran un estadio local pT0, en el estudio anatomopatológico de la pieza. Mediante la RTU de re-estadificación se podría identificar también a este grupo de pacientes en los que potencialmente se ha conseguido erradicar la enfermedad local, en los cuales cabe la posibilidad de realizar tratamiento de preservación vesical (101, 102).

La cistectomía radical con linfadenectomía pelviana bilateral, y algún tipo de derivación urinaria, constituye la técnica quirúrgica estándar para el tratamiento del cáncer vesical músculo-infiltrante, los motivos son básicamente tres: las lesiones de alto grado suelen evolucionar hacia la progresión; el carcinoma de células transicionales es radiorresistente; y la supervivencia observada con quimioterapia + cistectomía parcial o RTU, es menor que la obtenida con cistectomía radical sola (17, 101, 103). La mortalidad quirúrgica, que hace algunos años era del 20%, y suponía una gran limitación a la hora de realizar este tipo de cirugía, se sitúa en la actualidad en torno al 2%, siendo en algunas series < 0,5% (17, 104).

La supervivencia comunicada por los distintos autores, para el tumor vesical músculo-infiltrante en estadio T2a, tratado quirúrgicamente mediante cistectomía radical, después de 1980, oscila entre el 50 y el 83% (105, 106). Estos datos pronósticos son mejores que los observados con cualquier otro tipo de terapéutica, por lo que la cistectomía radical se puede considerar como el tratamiento ideal para los tumores T2a (105, 106).

La expresión nuclear de p53, determinada por métodos inmunohistoquímicos, se ha mostrado como un factor independiente en la predicción de muerte y recidiva, de los pacientes sometidos a cistectomía radical (61, 104). De hecho, el valor de p53, determinado en la pieza de cistectomía, puede ser utilizado para seleccionar aquellos pacientes que se beneficiarán de un tratamiento quimioterápico adyuvante, como muestra un estudio realizado con 243 pacientes tratados mediante cistectomía radical, en el cual se observó que los pacientes del estadio T2a, tenían una tasa de recidiva del 12% y una

tasa de supervivencia del 73%, cuando p53 era negativo ($p53 < 10\%$); mientras que, cuando p53 era positivo ($p53 \geq 10\%$), las tasas de recidiva y supervivencia eran del 56% y 30%, respectivamente. En dicho estudio se considera que los pacientes p53 positivos son subsidiarios de quimioterapia sistémica adyuvante, mientras que los tumores p53 negativo, no la necesitarían (61).

La expresión nuclear de p53 también puede ser útil a la hora de decidir el tratamiento más adecuado, para los pacientes con cáncer de vejiga en estadio T2a, y el momento óptimo para llevarlo a cabo, siendo los tumores T2a-p53 positivos, candidatos a una cistectomía radical precoz, mientras que los T2a-p53 negativos, serían tumores potencialmente controlables mediante técnicas conservadoras de la vejiga (97).

1.5. Gen supresor *p53*:

El gen *p53* es un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 17p13.1 (brazo corto del cromosoma 17, banda 13, locus 1); su mutación representa la mutación somática aislada más frecuente en los cánceres humanos, ya que más del 50% de ellos expresan un gen *p53* mutado. A modo de ejemplo, se observan mutaciones esporádicas de *p53* en el 70% de los cánceres de colon; en el 30-50% de los cánceres de mama; en el 50% de los cánceres de pulmón; en el 100% de los cánceres de células pequeñas de pulmón; y en el 10-80% de los carcinomas de células transicionales de vejiga, dependiendo fundamentalmente del grado histológico y del estadio infiltrativo del tumor (107, 108, 109, 110).

p53 es un gen autosómico que posee 20 kilobases, y presenta 11 exones, de los cuales el primero es no codificante (111, 112). La transcripción de este gen, entre los exones 2 y 11, origina una fosfoproteína tetramérica de 53 kD y 393 aminoácidos, que posee cuatro dominios funcionales, llamada proteína p53:

- 1) En el extremo aminoterminal (aminoácidos 1-43), se localiza un dominio de activación transcripcional, que se une a regiones no codificantes de ciertos genes, cuya tasa de

transcripción es estimulada por la acción de p53; este dominio es también el dominio de unión específica al oncogén *mdm2*, que se une a la proteína p53, estimulando su degradación por la vía de la ubiquitina. Por otra parte, este dominio parece ser el responsable de la corta vida media de la proteína p53 (15-20 minutos), ya que la delección de los 42 aminoácidos del extremo aminoterminal, produce un gran incremento de la estabilidad de la proteína, prolongando su vida media de 4 a 20 veces. Muchos de los anticuerpos monoclonales utilizados frente a p53, se unen a epitopos localizados en el extremo N-terminal de la molécula, entre ellos el anticuerpo DO-7 (112, 113, 114).

- 2) En la región central de la molécula (aminoácidos 100-300), se encuentra un dominio de unión específica al DNA, y es el sitio de unión del oncogén T grande del virus SV40. La secuencia de aminoácidos de este dominio central, a diferencia del dominio N-terminal, muestra una gran similitud entre mamíferos, aves, peces y anfibios, lo cual parece sugerir que esta región es esencial para la función de la proteína (39, 112).
- 3) El tercer dominio de la molécula de p53, se encuentra entre los aminoácidos 320 y 360. Se considera como el dominio responsable de la oligomerización de p53, ya que en esta región se produce el ensamblaje de cuatro moléculas de p53, para formar tetrámeros estables. La oligomerización de la proteína da lugar a una inactivación de la transcripción y de la capacidad de unión al DNA, por parte de la proteína p53 nativa (wild type). En este dominio también se localiza la secuencia que utiliza p53 para su transporte al núcleo celular. Este dominio puede tener también, una actividad oncogénica complementaria al oncogén *ras* activado, en la transformación de fibroblastos en cultivo (39, 112, 115).
- 4) El cuarto dominio presenta una secuencia de aminoácidos solapada al tercero (aminoácidos 330-393). Este dominio posee capacidad de modulación de la actividad transcripcional, y una región inespecífica de unión al DNA y al RNA (112).

La proteína nuclear p53 fue descubierta en 1979, en extractos de células transformadas, que reaccionaban con antisueros de animales con tumores inducidos por el virus de simio 40 (SV40), observándose que la p53 se unía al producto del oncogén T grande de las células transformadas por SV40 (39, 111, 116).

El gen *p53* fue inicialmente considerado como un oncogén, al encontrarse mayores niveles de proteína p53 en las células cancerosas que en las normales, además de cooperar con el oncogén *ras* en la transformación de fibroblastos en cultivo. Esta idea cambió, cuando se descubrió que las proteínas con las que se estaba trabajando eran producto de genes mutados (39, 107, 111).

El gen *p53* no desempeña una función esencial para la vida de la célula, sino que se comporta como un verdadero gen supresor de tumores. La introducción de proteína p53 nativa, mediante técnicas de transferencia de DNA in vitro, en células tumorales que no expresan p53, o que poseen formas mutadas de esta proteína, produce una detención en el crecimiento celular, y una muerte por apoptosis de dichas células tumorales (112, 117, 118, 119). Por otra parte se observa, que los niveles de la p53 en células fisiológicamente normales, es muy bajo, pero cuando se produce una lesión del DNA, de cualquier etiología, se observa un enorme incremento de dichos niveles (39, 117, 120). Estas dos importantes observaciones, sugieren que p53 actúa manteniendo la integridad del genoma, ante la eventual agresión de agentes externos o factores endógenos, que dañen el DNA (119).

Esta noción fue confirmada por algunos investigadores, cuando crearon una línea de ratones con alteración genética de ambas copias del gen *p53*. Estos ratones tenían un aspecto totalmente normal, pero al cabo de varias semanas de exposición a agentes lesivos del DNA, como las radiaciones ionizantes, los ratones comenzaron a desarrollar tumores, y al cabo de 6 meses, todos ellos presentaban algún tumor, o habían muerto. No se produjo apoptosis en las células dañadas por la radiación ionizante, debido a la ausencia de p53, con el consiguiente desarrollo de tumores en todos los ratones (107, 112, 121).

La proteína p53 interviene en el control del ciclo celular, así como en el control de la replicación y reparación del DNA, mantiene la estabilidad genómica, activa la apoptosis y participa en la respuesta celular a agentes externos nocivos (39, 119). Actúa como “el guardián del genoma”, detectando lesiones o daños potenciales en el DNA, y promoviendo una respuesta frente a los mismos, ya sea deteniendo el ciclo celular, para intentar realizar la reparación del daño genético producido en el DNA, o bien, induciendo la apoptosis (muerte celular programada) de la célula dañada. (107, 112, 122, 123).

Las lesiones en el DNA pueden ser inducidas por diversos agentes externos, como fármacos quimioterápicos, radiaciones ionizantes, o virus. Otros factores que

podríamos llamar endógenos, como hipoxia tisular, stress oxidativo, o fallos mitóticos resultantes de trastornos en el ciclo celular, también pueden producir daño en la molécula de DNA. Cuando esta lesión tiene lugar, se produce una estimulación de la síntesis de proteína p53, cuyos niveles nucleares aumentan drásticamente. Esta proteína p53 se une a la molécula de DNA dañada, para intentar efectuar una reparación de la misma (39, 119).

La proteína p53 nativa actúa como un factor de transcripción específico, que promueve la estimulación o la inhibición de diversos genes celulares (tablas 1 y 2), ocasionando como resultado final, una parada del ciclo celular y/o una apoptosis (39, 110, 112, 124).

La importancia cuantitativa de la lesión del DNA celular, determina el mecanismo de acción que la p53 utilizará para subsanar dicha lesión. Cuando el daño producido en la molécula de DNA es de carácter leve o moderado, la proteína p53 induce la expresión de las proteínas p21/waf1 y gadd45 (producto de la transcripción del gen *gadd45*: growth arrest and DNA damage-45), produciéndose una detención del ciclo celular en la fase G1, hasta que el DNA está totalmente reparado (39, 112, 119). La proteína p21, producto del gen *p21* (también llamado *cip1* o *waf1*), inhibe la actividad de los complejos ciclina-CDK durante la fase G1 del ciclo celular, e inhibe también la acción de la PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), una subunidad de la DNA polimerasa δ . La proteína gadd45 bloquea el ciclo celular en G1, uniéndose a PCNA, y participa en la reparación del DNA, mediante la estimulación de la escinucleasa (39, 124).

Si la lesión del DNA es excesiva, y no es posible efectuar una reparación de la misma, la proteína p53 induce una activación del gen *bax*, y una inhibición paralela del oncogén *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma-2), ocasionando finalmente un proceso de apoptosis. El gen *bax* es un gen proapoptótico, mientras que *bcl-2*, es el más importante de los genes inhibidores de la apoptosis. La proteína 53bp2 y el gen *fas/APO-1*, también podrían jugar un papel importante en la apoptosis p53-dependiente. (124).

Además del daño en la molécula de DNA, la síntesis de p53 nativa también puede ser activada por la hipoxia celular y la depleción de ribonucleótidos. Este es otro mecanismo por el cual p53 ejerce una acción supresora tumoral, ya que cuando el tumor adquiere un tamaño determinado, que da lugar a un compromiso del aporte sanguíneo de

algunos grupos de células tumorales, la hipoxia resultante puede inducir una apoptosis p53-dependiente, siempre que la p53 esté intacta. Si la p53 está mutada, las células hipóxicas no entrarán en apoptosis, por lo que se favorecerá la supervivencia y selección de células con p53 mutada, en un lecho tumoral hipóxico (39, 55, 124). La estimulación por parte de p53, de la síntesis de factores antiangiogénicos, como la trombospondina, puede reducir en mayor medida el aporte sanguíneo del tumor.

La capacidad de p53 para inducir apoptosis ante la detección de algún tipo de daño en la molécula de DNA, tiene importantísimas implicaciones terapéuticas y pronósticas. La quimioterapia y la radioterapia, que son dos de las principales modalidades terapéuticas utilizadas en el tratamiento del cáncer, basan su mecanismo de acción en una lesión de la molécula de DNA de las células con actividad proliferativa, que dará lugar a una posterior apoptosis de las mismas. Dado que cierto tipo de apoptosis es p53-dependiente (existen otras vías de apoptosis en las que no participa p53), aquellas células que conservan un gen *p53* con ambos alelos intactos, mostrarán teóricamente una mejor respuesta a este tipo de terapéutica. Por el contrario, aquellos tumores que expresan un *p53* mutante, presentarán una baja o nula respuesta, y tendrán por lo tanto un peor pronóstico, al ser resistentes al tratamiento (1, 39, 55).

Dado que la citotoxicidad de muchos agentes quimioterápicos se produce por un mecanismo de acción muy parecido, la lesión de las vías utilizadas por la célula para entrar en apoptosis (causada por una mutación de *p53*, o de cualquier otro gen que participe en la apoptosis), puede dar lugar a fenómenos de resistencias cruzadas a estos fármacos anticancerosos (125).

Recientemente se ha publicado, que numerosos genes, que codifican la síntesis de proteínas reguladoras de los niveles de oxígeno reactivo dentro de las células, son inducidos por p53, antes del comienzo de la apoptosis. Esto ha llevado a la creación de un modelo teórico de apoptosis p53-dependiente: 1) inducción de la transcripción de los genes relacionados con el p53; 2) formación de especies de oxígeno reactivas; y 3) degradación oxidativa de los componentes celulares, dando lugar a la muerte celular (39, 55).

Ante una lesión del DNA, la proteína p53, mediante los dos mecanismos de acción anteriormente citados, evita que la célula progrese hacia la fase S de su ciclo con

una mutación en el DNA, previniendo de este modo, la transmisión de mutaciones a las células hijas.

Existen una serie de proteínas celulares y virales capaces de unirse a p53 e inactivar su función. La más importante de estas proteínas es mdm2, producto de la transcripción del oncogén *mdm2* (murine double minute 2). La proteína mdm2 tiene una gran importancia en la regulación negativa de p53, “protegiendo” a la célula normal de la sobreactividad de p53. La mdm2 se fija al extremo N-terminal de la molécula de p53, formando el complejo p53-mdm2, y posteriormente estimula la degradación de p53 a través de la vía de la ubiquitina (péptido que rodea al complejo p53-mdm2); de modo que si no se sintetiza mdm2, esta proteína no se puede unir a la p53 para inducir su degradación, con lo cual se produciría una estabilización y acumulación intracelular de p53 (39, 126).

La proteína atm, es el producto del gen *atm*, cuya mutación origina la ataxia telangiectasia. En los pacientes con esta enfermedad, no se produce una acumulación de p53, ni una activación de los genes *p21* y *gadd45* nativos, en respuesta al daño de la molécula de DNA; esto indica que el gen *atm* debe estar actuando jerárquicamente por encima de *p53*, en el proceso de respuesta al daño inducido en el DNA. Otra conexión entre ambos genes, proviene del hecho de que el punto de control G2-M del ciclo celular, posiblemente dependiente de p53, es también defectuoso en los pacientes con ataxia telangiectasia. En presencia de un gen *atm* mutado, no se produce un aumento suficiente de p53, por lo que se acumulan muchas mutaciones, que se transmiten a la progeñe; esto explica la elevada probabilidad de desarrollo de diversos cánceres, que estos pacientes presentan (39, 126).

La proteína p53 también puede regular el crecimiento y la proliferación celular, por una vía independiente de la transcripción génica, interaccionando directamente con los componentes del factor TFIID del complejo basal de transcripción, o uniéndose al factor RPA (Replication Protein A) de replicación del DNA, con lo cual impide la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular. Otro posible mecanismo de acción de la p53, independiente de su actividad transcripcional, es su capacidad de inhibición de las helicasas XDP y XBP, unos enzimas esenciales para el mantenimiento de la estabilidad del genoma, que participan en la reparación del DNA realizada por la vía de la escinucleasa. Estos dos enzimas están mutados en individuos con xeroderma pigmentosum. Por todo lo señalado

con anterioridad, parece posible que exista una activación de la apoptosis p53-dependiente, sin una activación de la transcripción génica (39, 112).

La mayoría de las mutaciones de *p53* (87%) se localizan entre los exones 5 y 8 de la molécula; el exón 4 se encuentra mutado aproximadamente en el 8% de los tumores, y el exón 10 en el 4%. Las mutaciones en el resto de los exones se observan con muy poca frecuencia. La distribución de las mutaciones entre los 11 exones del gen *p53*, varía en función del tipo de cáncer, y es precisamente el cáncer de vejiga el que más mutaciones presenta fuera de los exones 5, 6, 7 y 8 (28%). Por ello, cuando se efectúa un análisis genético del *p53* en el cáncer de vejiga, estudiando solamente los exones 5, 6, 7 y 8, como ocurre en muchos estudios, podemos pasar por alto hasta un tercio de las mutaciones (111, 115, 127).

La mayoría de las mutaciones de la molécula de p53, se localizan en el dominio central de unión específica al DNA, especialmente en cuatro regiones de la proteína: residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286. Dichas regiones genéticas se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, y presentan una gran similitud entre las diferentes especies de animales y el hombre; por ello, es muy probable que se trate de regiones con gran importancia funcional dentro de la proteína (111, 112, 115, 127). De manera específica, las mutaciones más frecuentes se localizan en los residuos 175, 248, 249, 273 y 282; que son conocidos como “puntos calientes” (hot spots).

Las mutaciones de *p53* confieren una mayor susceptibilidad al desarrollo de un cáncer por varias razones; en primer lugar, las células que no se encuentran bajo el control de una p53 normal, tienen una mayor capacidad de proliferación; en segundo lugar, la capacidad de una célula para entrar en apoptosis cuando existe una alteración en su material genético, disminuye o se pierde por completo. Por otra parte, en presencia de una proteína p53 mutada, se desarrolla una mayor inestabilidad genética, una estimulación de los factores angiogénicos y una inhibición de los factores antiangiogénicos (39, 55).

La inactivación de *p53* se produce en la mayoría de los tumores humanos (90%), por mutaciones puntuales “de diferente sentido” (missense mutations), en las que se produce un cambio en un solo aminoácido, dando lugar a una proteína totalmente diferente desde el punto de vista estructural y/o funcional, y a una acumulación de dicha proteína en el núcleo celular. En los demás genes supresores tumorales conocidos, las mutaciones más

frecuentemente observadas son mutaciones “sin sentido” (non sense mutations), que dan lugar a la síntesis de proteínas truncadas anormales. Todas las mutaciones que afectan a la molécula de p53, sean cuales sean sus tipos, tienen como denominador común, una pérdida de expresión y una inactivación funcional de la proteína (126, 128).

La mayoría de las mutaciones de p53 tienen lugar en el dominio central de la proteína, aquel mediante el cual se efectúa la unión de la misma al DNA. En la mayoría de los tumores, las dos copias de *p53* están inactivadas. Habitualmente uno de los alelos del gen muestra una delección completa, mientras que el otro alelo suele estar conservado, pero con alguna mutación puntual, que impide o disminuye su función normal (111, 112).

La elevada frecuencia de mutaciones de *p53* en el cáncer humano, puede tener su origen en el hecho de que las mutaciones “de diferente sentido” pueden producir, tanto una pérdida de la función supresora tumoral, como una ganancia en la función oncogénica, por la alteración en el grupo de genes controlados por la proteína p53 (39).

Como consecuencia de la mutación de p53, se sintetizan proteínas incapaces de actuar como factores de transcripción. Esta pérdida de la actividad transcripcional de la proteína p53 puede ser debida a dos posibles mecanismos: 1) las mutaciones en el dominio central de la molécula, ocasionan una reducción o una pérdida total de la capacidad de unión al DNA, bien por una pérdida o alteración de los residuos encargados de dicha unión, o bien porque la mutación produce una alteración estructural del dominio central; 2) el dominio central de unión al DNA, parece ejercer un cierto control sobre la actividad del dominio de activación transcripcional, localizado en el extremo aminoterminal de la proteína, por ello, es posible que se bloquee la actividad transcripcional de p53, aunque el dominio de activación transcripcional esté intacto, siempre que exista una mutación en el dominio central de la molécula (112, 127).

Otra de las características que confieren capacidad carcinogénica a la proteína p53 mutante, es su posibilidad de colaboración con otros oncogenes, especialmente con los oncogenes de la familia *ras*. Esta capacidad oncogénica de p53 desaparece cuando se produce una delección del extremo carboxiterminal de la molécula, observándose que si se realiza un aislamiento del extremo C-terminal de la molécula, este fragmento puede actuar como un oncogén. La proteína p53 nativa no posee esta capacidad oncogénica (39, 112).

La localización de la mutación en *p53* puede permitir identificar el tipo de carcinógeno que causó el tumor, ya que los agentes mutágenos, tanto exógenos como endógenos, dan lugar a mutaciones características dentro de la molécula de *p53*. Por otra parte, la localización de la mutación dentro de la secuencia de bases de *p53*, puede ayudar a definir las funciones de los distintos dominios de la proteína *p53* (111, 127).

El espectro de mutaciones de *p53* es bastante específico para cada tipo de cáncer, tanto en la localización de la mutación (hot spots) dentro de la molécula de *p53*, como en el tipo de mutación (transición, transversión, inserción, delección, etc.). En los carcinomas se observan fundamentalmente delecciones totales o parciales, mientras que en los sarcomas lo más frecuente son las mutaciones puntuales, que afectan a uno o a pocos aminoácidos. A modo de ejemplo, en el carcinoma de células transicionales de vejiga, se identifica una transversión G:C → C:G, en el 21% de los casos, mientras que en el resto de los tumores sólo se produce en el 7% de los casos. Otra mutación característica de este tipo de carcinoma es la transición G:C → A:T (115, 127, 128).

A diferencia de los otros genes supresores tumorales, en *p53* no es necesaria la mutación de ambos alelos, para que la célula se transforme en cancerosa. Por lo tanto no es necesario que la célula pierda su heterocigosidad para el gen mutante, para que se desarrolle un cáncer; sin embargo en la mayoría de los tumores existe una delección de uno de los alelos de *p53*, acompañada de una inactivación o una mutación puntual (de diferente sentido) en el otro alelo. En líneas generales, las mutaciones del gen *p53* dan lugar a alelos recesivos, que originarán tumores sólo cuando el alelo nativo intacto sufre una inactivación. La dominancia reside en algunas ocasiones en el alelo nativo, y en otras en el mutante, por ello es posible que los niveles relativos de expresión de la proteína nativa y de la mutante, sean decisivos para determinar la función del gen (39, 108, 112).

Las mutaciones en la línea germinal son poco frecuentes en el caso de *p53*. Los individuos con síndrome de Li-Fraumeni heredan un alelo mutado de *p53* de forma autosómica dominante. Estos individuos portan un alelo mutante de *p53* de manera heterocigota, y son muy susceptibles a un gran número de cánceres, observándose una probabilidad del 50% de padecer algún tipo de cáncer antes de los 30 años. Esta

probabilidad se incrementa hasta casi el 90% a los 65 años de edad. También se han descrito mutaciones germinales de *p53* sin aparente historia familiar (110, 112, 129).

Las mutaciones de *p53* observadas en los individuos con síndrome de Li Fraumeni, tienen lugar en el mismo grupo de aminoácidos, que las mutaciones que se producen en los tumores esporádicos. El espectro de cánceres desarrollados por estos individuos es muy variado, siendo los más frecuentes: sarcomas, cáncer de mama, leucemia, astrocitoma, y carcinoma de corteza suprarrenal (126, 129).

Una mutación de *p53* en la línea germinal, puede ser heredada de un progenitor que no presenta evidencia clínica de cáncer, en el momento en que la enfermedad neoplásica es diagnosticada en el niño. Esta situación define el estado de portador asintomático de *p53* mutante, y muestra que para que se desarrolle un clon celular maligno, es habitualmente necesario que tras la primera mutación heredada, se produzca un cambio genético adicional. Los miembros de las familias con síndrome de Li Fraumeni, que son portadores asintomáticos de un alelo mutante de *p53*, a pesar de no desarrollar tumores a edades tempranas, tienen mayor riesgo que la población normal de desarrollar cáncer en algún momento de su vida (39, 112, 129).

El análisis de los tumores desarrollados por personas con este síndrome, demuestra que el alelo mutante no es completamente dominante, y que el alelo nativo es funcionante, ya que en la mayoría de los casos es preciso que se desarrolle una mutación en el alelo nativo intacto, para que se produzca un cáncer. Aquellos pacientes que desarrollan tumores, sin que se produzca una mutación en el alelo nativo, probablemente presentaron un gran stress genético por lesión en el DNA, que dio lugar a la síntesis de una cantidad lo suficientemente elevada de proteína mutante, como para inactivar el producto del alelo nativo (39, 112).

La proteína *p53* nativa tiene una vida media muy corta (5 a 20 minutos), por ello sus niveles se encuentran por debajo del umbral de detección, que exhiben los métodos inmunohistoquímicos disponibles en la actualidad. La mutación del gen *p53*, además de dar lugar a una disminución o abolición de la actividad supresora tumoral de la proteína *p53*, produce una estabilización de la misma, que origina un incremento de su vida media (que pasa a ser de varias horas). De este modo, *p53* se convierte en una proteína fácilmente

detectable por inmunohistoquímica convencional, utilizando anticuerpos monoclonales frente a p53 (113, 130).

TABLA 1: GENES CUYA TRANSCRIPCIÓN RESULTA ACTIVADA POR p53.

GEN	FUNCIÓN
<i>p21/waf1/cip1</i> <i>mdm2</i>	Inhibición de los complejos ciclina-CDK durante la fase G1; inhibición de la PCNA. Inhibición del feedback regulador de p53 y de Rb; favorecedor de la pérdida del punto de restricción R.
<i>tsp1</i> <i>bax</i>	Inhibición de la angiogénesis; modulación de la aparición de metástasis. Inducción de la apoptosis; miembro de la familia bcl2.
<i>fas/apo1</i> Ciclina G	Inducción de la apoptosis; receptor de la superficie celular. Induce el bloqueo del ciclo celular en G1.
<i>gadd45</i>	Bloqueo del ciclo celular en G1 tras unirse a la PCNA; reparación del DNA mediante estimulación de la escintileasa.
GD-AIF <i>hic1</i>	Factor inhibidor de la angiogénesis. Hipermetilado en el gen del cáncer; región LOH del cromosoma 17p; posible gen supresor tumoral.
IGF-BP3	IGF unido a la proteína 3; factor de crecimiento que actúa como la insulina; inhibición de la proliferación celular y posible inducción de la apoptosis.
MCK	Creatinín-kinasa muscular.

mdm2: Murine double minute 2.

tsp1: Trombospondina 1.

gadd45: Growth arrest and DNA damage 45.

hic1: Hypermethylated in cancer 1.

IGF-BP3: Insulin like Growth Factor-Binding Protein 3.

TABLA 2: GENES CUYA TRANSCRIPCIÓN RESULTA INHIBIDA POR p53.

GEN	FUNCIÓN
<i>bcl2</i> <i>c-myc</i> FGF <i>c-fos</i>	Principal inhibidor de la apoptosis. Oncoproteína celular; acelera el ciclo celular acortando la fase G1. Familia de los factores de crecimiento de fibroblastos; actúan como proto-oncogenes. Oncogén celular y factor de transcripción de respuesta temprana; forma junto a c-jun el factor transcripcional AP-1.
HSP70 IL-6 <i>mdr1</i>	Proteína de 70kDa sometida a shock térmico. Interleukina 6; promotora de la diferenciación de células B. Inducción de resistencia celular a múltiples fármacos antineoplásicos; codifica la glucoproteína P.
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes; subunidad de la DNA-polimerasa δ .

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen.

bcl2: B cell leukemia/lymphoma 2.

FGF: Fibroblasts Growth Factor.

Glucoproteína P: Proteína que actúa como transportador de membrana, su sobreproducción se asocia al desarrollo de resistencias cruzadas a fármacos antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción.

API: Activating Protein 1.

mdr1: MultiDrug Resistance 1.

El resultado final es el hallazgo de un nivel aumentado de p53 en el núcleo celular, que tiene lugar por estabilización metabólica, pero no por sobreexpresión de la proteína p53 (112, 113, 130).

La inmunohistoquímica se utiliza por tanto, como un indicador indirecto e inespecífico de la mutación subyacente de *p53*. Esta técnica permite identificar de manera indirecta aquellas células cuyo *p53* ha sufrido una mutación de diferente sentido (missense), que es aquella mutación en la que se produce la sustitución de un aminoácido por otro distinto, aumentando la estabilidad y la vida media de la proteína p53 resultante (112, 113, 127, 130).

Las mutaciones sin sentido (non sense), que introducen codones de parada prematura (codones stop) del gen *p53*, originando proteínas p53 truncadas, y las mutaciones frameshift o de fase de lectura, que alteran la secuencia de codones, dando lugar a deleciones; no pueden ser detectadas por inmunohistoquímica, ya que esta técnica no puede detectar la pérdida completa de la proteína p53 (112, 127, 131).

Las mutaciones sin sentido y las mutaciones de fase de lectura (frameshift), no tienen traducción inmunohistoquímica, lo cual significa que aquellas células cuyo DNA presente una mutación de este tipo, no se podrán distinguir de una célula normal, desde el punto de vista inmunohistoquímico. No obstante, hay que tener en cuenta que esta variedad de mutaciones, supone menos del 10% de las mutaciones observadas en los carcinomas (115, 131).

Los falsos negativos de la inmunohistoquímica se producen por: 1) artefactos técnicos ocurridos durante cualquier fase del estudio inmunohistoquímico, especialmente en la fase de fijación de la muestra; 2) presencia de una mutación que no sea de diferente sentido, ya que las grandes deleciones inhiben la síntesis de p53, dando lugar a una mutación indetectable; y 3) presencia de una mutación puntual que no estabilice la proteína lo suficiente, como para alcanzar un nivel que la haga detectable por inmunohistoquímica (127, 131, 132).

Los falsos positivos se pueden producir por: 1) una estabilización no mutagénica de la proteína p53, producida por una alteración del ciclo de degradación normal de la misma; o bien, 2) existencia de falsos positivos desde un punto de vista "funcional", producidos por una estabilización proteica de cualquier etiología, que daría

lugar a una abolición de la función de p53, y le proporcionaría una actividad prooncogénica similar a la de la proteína p53 verdaderamente mutada (127, 131).

Es importante tener en cuenta, que el análisis inmunohistoquímico de p53 puede ser útil desde un punto de vista clínico, independientemente de sus falsos positivos y negativos, siempre y cuando se observe una buena correlación entre la expresión inmunohistoquímica de la proteína y el comportamiento del tumor (131). Está por determinar el papel que juega la intensidad de tinción nuclear con p53, en el pronóstico de la enfermedad.

Los resultados de sensibilidad y especificidad hallados para las técnicas de inmunohistoquímica, desarrolladas para el estudio del gen p53, son muy variables; así la sensibilidad media de los diferentes estudios se sitúa en torno al 75%, aunque la mayoría de estos trabajos muestran una sensibilidad superior al 90%. El valor predictivo positivo muestra un valor medio algo más bajo, situándose en torno al 65% (127, 131).

La confirmación genética de la existencia de una mutación detectada mediante inmunohistoquímica, se suele hacer utilizando técnicas basadas en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), confirmando finalmente el producto de la PCR mediante secuenciación de DNA.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de análisis del DNA, que consiste en la síntesis enzimática y la amplificación de secuencias de DNA específicas *in vitro*. Esta técnica está basada en la hibridación y extensión de dos oligonucleótidos que actúan como “primers” o cebadores de la DNA-polimerasa, que a su vez cataliza la síntesis. Mediante la PCR es posible producir 100.000 millones de copias de una molécula de DNA en pocas horas (133, 134). Existen numerosas técnicas de amplificación de DNA basadas en la PCR, algunas de las cuales son: RT-PCR (Transcripción inversa-PCR); Multiplex-PCR (Amplificación múltiple); Nested PCR (PCR anidado); PCR-SSCP (Reacción en cadena de la polimerasa aplicada al estudio del polimorfismo conformacional del DNA); AP-PCR (PCR utilizando primers arbitrarios); PCR-RFLP (PCR utilizada para el estudio del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción); Identificación de polimorfismos en el DNA por electroforesis en geles con gradientes desnaturizantes; y el protocolo TRAP (Protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas) (134).

Las polimerasas usadas en la PCR, para amplificar secuencias génicas específicas, están sujetas a una tasa de error que oscila desde 1/10000, hasta más de 1/500 pares de bases, dependiendo de las condiciones de la reacción. La técnica de la PCR puede presentar falsos positivos y falsos negativos, en los resultados de secuenciación. Los falsos positivos suelen ser consecuencia de una contaminación aérea accidental de la reacción, por ello es imprescindible que todas las mutaciones observadas mediante secuenciación directa del producto de la PCR, sean comprobadas mediante la secuenciación de DNA de un segundo producto de la PCR, independiente del primero. Esta comprobación no es llevada cabo por todos los investigadores, lo que da lugar a la existencia de falsos positivos. Los falsos negativos vienen determinados fundamentalmente por la realización de un análisis poco extenso del gen, que da lugar a una infraestimación de la prevalencia de una determinada mutación. La prevalencia absoluta de una determinada mutación es, por lo tanto, muy difícil de establecer, debido a la heterogeneidad del análisis realizado en los distintos trabajos (133, 134).

La mayoría de las mutaciones del gen *p53* (87%) se localizan entre los exones 5 y 8 (codones 126-306), por ello la mayor parte de trabajos sólo consideran dichos exones en el análisis de *p53*. Muchos tumores presentan mutaciones en otros lugares; esto es particularmente frecuente en el carcinoma de células transicionales de vejiga, en el que se observan un 28% de mutaciones localizadas fuera de los exones 5, 6, 7 y 8. Por lo tanto, es posible prever una gran cantidad de falsos negativos, si sólo se estudian los exones 5-8 de *p53*. Este hecho es especialmente importante, si tenemos en cuenta que el 70% de estas mutaciones darán lugar a codones stop o mutaciones de fase de lectura, que tampoco pueden ser detectadas por las técnicas inmunohistoquímicas (111, 112, 127, 130). Otra fuente potencial de la infraestimación de la prevalencia de las mutaciones de *p53*, puede ser la presencia de mutaciones en secuencias de DNA no evaluadas, como los dos promotores de la molécula, o sus 10 intrones (127).

Existen múltiples trabajos que encuentran una clara relación, entre la mutación del gen *p53* y el pronóstico del carcinoma de células transicionales de vejiga, en términos de supervivencia, recidiva y progresión. Esta relación se observa tanto si se identifica dicha mutación, de manera indirecta por inmunohistoquímica (27, 28, 46, 62), como de manera directa, por secuenciación del DNA de *p53* (135).

Un posible abordaje terapéutico futuro, en el caso de la *p53*, sería restablecer la función de *p53* en las células tumorales, bien por terapia génica, o bien por la acción de pequeñas moléculas, que activarían la actividad transcripcional latente de algunos puntos de la proteína *p53* mutante. Otra posibilidad es encontrar agentes, que liberen a *p53* de ciertas proteínas inactivadoras a las que se liga, como es el caso de MDM2 (39, 112, 126, 134, 136).

Se han aislado y caracterizado un gran número de genes involucrados en la génesis y desarrollo del cáncer, merced al progreso de la biología molecular y la ingeniería genética. El conocimiento estructural y funcional, cada día más profundo de dichos genes, ha permitido desarrollar diversas técnicas de terapia génica. En humanos, se entiende por terapia génica la transferencia de un ácido nucleico (DNA o RNA) a un determinado paciente, con fines curativos (112, 134, 136).

Las técnicas de terapia génica del cáncer basadas en el gen *p53*, son fundamentalmente dos, y se hallan en fase experimental. La primera de ellas consiste en la entrega de una copia de *p53* nativo, a las células tumorales que tienen un *p53* mutado, utilizando para ello un vector viral, que se administra mediante una inyección intratumoral. Se han llevado a cabo varios estudios, fundamentalmente en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, mediante la inyección intratumoral de diversos tipos de virus (retrovirus, adenovirus, etc.) portadores de un gen *p53* funcional, observándose respuesta, con disminución de la masa tumoral o estabilización del proceso, en aproximadamente la mitad de los casos, sin toxicidad clínica apreciable. En todos los estudios se puede constatar la existencia de una apoptosis, probablemente *p53*-dependiente, y la expresión en algunos casos de una proteína *p53* normal. El factor limitante más destacado de este tipo de terapia basada en *p53*, es la incapacidad de los vectores virales para infectar todas las células del tumor (39, 112, 126, 134, 136).

El segundo modelo de terapia génica, se basa en la inyección de adenovirus con una delección del gen *e1b*, a tumores deficientes en *p53*. La proteína *e1b* del adenovirus tiene la capacidad de inactivar a la *p53* de la célula tumoral, por lo que aquellos virus que carezcan de la proteína *e1b* podrán infectar y lisar las células tumorales, cuyo *p53* esté dañado o sea hipofuncionante, pero no destruirán las células no neoplásicas, que expresen una *p53* nativa. Los trabajos efectuados en animales, utilizando este tipo de terapia génica,

muestran una importante disminución del tamaño del tumor, y una desaparición del mismo en el 60% de los casos (39, 125, 136).

1.6. Proteína ki67:

Ki67 es un anticuerpo monoclonal murino, descrito inicialmente por J. Gerdes et al en 1983 (34, 137); que se acumula frente a la fracción nuclear cruda de la línea celular L428 derivada del linfoma de Hodgkin. Dicho anticuerpo reconoce específicamente a una proteína nuclear, denominada proteína ki67, que se expresa durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular, de aquellas células que se replican activamente (28, 29, 30). La proteína ki67 no se detecta en las células que se encuentran en la fase G0. El verdadero carácter de la proteína ki67 no ha sido definido con claridad; tampoco se ha caracterizado hasta la fecha el locus genético de ki67, aunque ha sido asignado al cromosoma 10 (28, 137).

La fase G0 del ciclo celular es una fase de quiescencia, en la que entran algunas células, deteniendo su progresión hacia la división celular. Las células pueden permanecer en esta fase durante días, meses o años, sin experimentar un aumento en su masa celular (39, 110).

El antígeno (proteína) ki67 es un marcador de la actividad proliferativa celular, ampliamente reconocido, que puede ser fácilmente determinado por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Ki67 se ha mostrado en muchos estudios como un buen marcador de la tasa de proliferación celular y crecimiento, de diversos tumores, entre los cuales se encuentra el carcinoma de células transicionales de vejiga (29, 30).

El anticuerpo monoclonal ki67, que fue inicialmente empleado para el estudio inmunohistoquímico, tenía el inconveniente de que sólo podía utilizarse con secciones tisulares frescas congeladas, ya que el epitopo del antígeno al que se unía, sufría una degeneración cuando las muestras tisulares eran fijadas, parafinadas y embebidas. Esto suponía un problema importante a la hora de efectuar estudios, especialmente

retrospectivos, ya que la mayoría de las muestras biópsicas se fijan en formol y se incluyen en parafina, para su almacenamiento y estudio (28, 29, 30).

La reciente caracterización de la proteína reconocida por el anticuerpo ki67, ha permitido el desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales, entre los cuales, el más destacado es MIB-1 (31). La introducción del anticuerpo monoclonal MIB-1, ha permitido solucionar el problema, ya que este anticuerpo reconoce un epitopo del antígeno ki67, que es formalín-resistente, manteniendo su estructura y funcionalidad tras la fijación, con lo cual el estudio inmunohistoquímico se puede realizar sobre muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (28, 29, 34).

La estrecha relación existente entre la proporción de células marcadas con ki67 (índice de ki67) y la actividad proliferativa celular, permite utilizar este marcador como un medidor de la fracción de crecimiento del tumor, y por lo tanto, de la agresividad biológica del mismo (32, 34, 57). La determinación de la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), la medición del índice mitótico y del índice M/V, y la fracción de células en fase S, son otros métodos de evaluación de la actividad proliferativa tumoral (2, 25, 33, 34).

La expresión nuclear de ki67, determinada por métodos inmunohistoquímicos, parece relacionarse con determinados parámetros clínico-patológicos, como el grado tumoral, el estadio infiltrativo y la expresión nuclear de p53. Por otra parte, múltiples trabajos atribuyen a ki67 una significación pronóstica en el carcinoma de células transicionales de vejiga y del tracto urinario superior, con influencia en la progresión, en la recidiva y en la supervivencia de los pacientes (29, 31, 32, 138).

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

El carcinoma de células transicionales, representa el 5% de las neoplasias malignas humanas en Europa, según las estadísticas de la OMS; y aproximadamente el 90% de los mismos, se localizan de forma primaria en la vejiga. La vejiga constituye la cuarta localización más frecuente del cáncer en el sexo masculino, después de los cánceres de pulmón, próstata y colon. En la mujer ocupa el octavo o noveno lugar, según los autores. Dentro del aparato urinario, el cáncer de vejiga constituye el 2º en frecuencia (3, 4, 101, 139, 140).

La incidencia del cáncer de vejiga en España, en el año 1986, fue de 19,46 casos / 100.000 habitantes / año, según los datos de la Comisión para la Planificación Oncológica. Durante el quinquenio 1987-1991, la incidencia fue de 16,20 casos / 100.000 habitantes / año. España se encuentra situada en el tercio superior de los registros mundiales de cáncer de vejiga, en cuanto a su incidencia, observándose al mismo tiempo, que la tasa de incidencia española es una de las más elevadas de Europa (139, 141, 142).

Aproximadamente un 20-30% de los pacientes con cáncer de vejiga, morirán a consecuencia de su tumor. Se estima que la sobrevida de los pacientes con cáncer de vejiga, en fase músculo-infiltrante es del 50%, a los 5 años de seguimiento. La tasa de mortalidad observada para el cáncer de vejiga en España, durante el período 1975-1979, fue de 5,3 muertes / 100.000 habitantes / año. En los últimos años la incidencia se ha ido incrementando paulatinamente, sin embargo no se ha registrado un aumento paralelo del número de muertes, ya que esta elevación de la incidencia, se ha producido fundamentalmente a expensas de un incremento en los tumores superficiales (101, 103, 139, 142).

Debido al carácter multirrecidivante de esta enfermedad, y a la sobrevida prolongada de un gran porcentaje de los pacientes, se estima que el cáncer de vejiga es uno de los tumores más frecuentemente diagnosticados, en el sexo masculino (143).

La historia natural y el pronóstico del cáncer de vejiga presentan grandes diferencias interindividuales. Los tumores vesicales superficiales representan el 70-75% del total, y muestran una elevada tasa de recidiva, alcanzando en algunas series el 85%. Los

tumores músculo-infiltrantes suelen ser consecuencia de la progresión de un tumor primario superficial, aunque en el 10-20% de las ocasiones, son infiltrantes desde el inicio (5, 101, 144, 145).

El pronóstico del tumor vesical superficial es generalmente bueno, aunque el 10-20% de las recidivas desarrollan una infiltración de la capa muscular propia de la vejiga. Esta transformación en cáncer músculo-infiltrante puede alcanzar el 80%, según algunos autores, en los tumores de alto grado, con carcinoma in situ asociado (101, 146, 147).

La categoría T del tumor y el grado de malignidad histológica, son los parámetros clásicamente utilizados por los urólogos para la toma de decisiones terapéuticas y el establecimiento de implicaciones pronósticas, en los tumores superficiales. Sin embargo estos parámetros clínico-patológicos son frecuentemente insuficientes, dada la gran variabilidad existente en el comportamiento biológico de los tumores. Por otra parte, la determinación del grado histológico está sujeta a una gran carga de subjetividad, que origina una variabilidad interobservador de aproximadamente el 50% (3, 148).

Del mismo modo, la determinación de la categoría T es en muchas ocasiones dificultosa, no sólo por problemas de subjetividad, sino también por la posible existencia de tumor residual, tras la resección transuretral. El elevado porcentaje de supraestadificación patológica, que supera el 25% en la mayoría de las series de cistectomía radical, resta mucho valor a la categoría T, como factor pronóstico en el cáncer superficial de vejiga (67, 149, 150). La actitud por parte de los urólogos ante los tumores de la categoría T1 es muy variable, y depende de un gran número de condicionantes como el número de factores de mal pronóstico que posea el paciente, la etapa histórica que se analice, e incluso las convicciones personales, con respecto a la efectividad de uno u otro tipo de tratamiento.

Los tumores de la categoría T2a son susceptibles de tratamiento conservador o radical. Sería por lo tanto muy importante disponer de un marcador pronóstico que nos indicase la agresividad biológica de cada caso. Pero la realidad es otra, ya que en esta categoría contamos con menos indicadores pronósticos que en los tumores superficiales, y los que existen son menos precisos, por lo que la decisión terapéutica en la categoría T2a es si cabe, más difícil.

El cáncer de vejiga no posee un indicador pronóstico ideal, en presencia del cual, el clínico pueda determinar con certeza, cual va a ser el pronóstico de un determinado

paciente. Probablemente el mejor indicador pronóstico en el cáncer de vejiga, sería aquel que nos indicara cual iba a ser la evolución de un paciente concreto, para de este modo optimizar el tratamiento, y realizar el mínimo número de cistectomías innecesarias, y evitar el máximo número de muertes innecesarias.

La mayoría de los estudios pronósticos del cáncer de vejiga se han realizado de manera univariada, lo que supone una importante limitación, ya que se estudia la importancia pronóstica de una determinada variable, sin ajustar por el posible efecto confusor ejercido por otras covariables. Analizando los escasos estudios multivariados que han sido publicados sobre este tema, se observa, que algunos de ellos utilizan un número muy reducido de variables, omitiendo otras variables que pueden tener gran importancia, como en ocasiones demuestran los trabajos de otros autores. Los estudios existentes no muestran unos resultados homogéneos, y no existen en ellos factores pronósticos, que de manera unánime se relacionen con la supervivencia, la recidiva o la progresión.

En los últimos años se ha prestado especial atención, a la identificación de factores pronósticos relacionados con las características biológicas moleculares del tumor primario, con el propósito de tener un mayor conocimiento de cada tumor en particular, y poder de este modo, elegir la opción terapéutica idónea para cada caso. Se han realizado estudios para intentar determinar cual es el papel pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de ki67, y sobre todo de p53, en el cáncer de vejiga. Los resultados obtenidos por los distintos investigadores, no sólo no son concluyentes, sino que en ocasiones son incomparables, debido a las enormes diferencias metodológicas encontradas.

La macrohematuria asintomática es un signo bastante específico del cáncer de vejiga, que se manifiesta habitualmente desde fases precoces de la evolución del mismo. La existencia de un signo tan específico, facilita enormemente el diagnóstico temprano de la enfermedad. Mediante un diagnóstico precoz y la caracterización de un marcador de elevada precisión pronóstica, podríamos adecuar el tratamiento a cada caso, permitiendo así la curación de un mayor número de pacientes.

El cáncer de vejiga ocasiona un gasto sanitario muy elevado, debido fundamentalmente a su carácter típicamente multirrecidivante, que condiciona numerosos ingresos, a muchos de los pacientes que lo padecen. Estos ingresos pueden ser programados, para realización de cirugía de las recidivas, o urgentes, por hematurias anemizantes,

retenciones urinarias por coágulos e infecciones asociadas al catéter uretral. Son también motivo de ingreso urgente, determinadas complicaciones de los tumores avanzados, como hematuria incoercible, que precisa transfusiones de hemoderivados, y en ocasiones tratamientos paliativos, como radioterapia o instilación de agentes hemostáticos intravesicales; uropatía obstructiva bilateral, que obliga a la realización de una derivación urinaria, habitualmente mediante nefrostomía percutánea, así como tratamiento de la insuficiencia renal secundaria; y finalmente complicaciones propias de la enfermedad en fase terminal, que son comunes a otros tipos de cáncer.

Por último, creemos que los resultados esperables del estudio compensan sobradamente los recursos económicos utilizados, ya que el precio de cada procedimiento inmunohistoquímico es de aproximadamente 3000 pesetas.

3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

- a) Determinar como la expresión inmunohistoquímica de los marcadores p53 y ki67, cuantificada en el momento del diagnóstico del carcinoma de células transicionales de vejiga (estadios Tis, T1 y T2a), afecta o determina el pronóstico de la enfermedad, en términos de:
- Supervivencia del paciente.
 - Recidiva del tumor.
 - Progresión del tumor (local y/o a distancia).
- b) Determinar la existencia de factores clínico-patológicos asociados al pronóstico de la enfermedad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. Ámbito y período de estudio:

Pacientes diagnosticados de carcinoma de células transicionales de vejiga, en el Servicio de Urología del Complejo Hospitalario Xeral-Cies de Vigo, desde Enero de 1976 hasta Diciembre de 1998.

4.2. Tipo de estudio:

Estudio observacional de cohorte retrospectivo y prospectivo.

4.3. Criterios de inclusión y de exclusión:

El criterio de inclusión utilizado para entrar en el estudio, fue presentar un carcinoma de células transicionales primario de vejiga, en estadio Tis, T1 ó T2a N0 M0 de la clasificación de la AJCC/UICC de 1997, descartándose aquellos tumores N+ o M+, y aquellas formas de tumor vesical de estirpe no urotelial, o mixta.

4.4. Justificación del tamaño muestral y del período de estudio:

Durante el período de tiempo señalado con anterioridad, se diagnosticaron un total de 1013 casos de carcinoma de células transicionales primario de vejiga, anatomopatológicamente confirmado. La distribución de los pacientes por estadios clínicos se puede observar en la Tabla 3 (tabla de períodos de 5 años).

De la totalidad de casos diagnosticados, se estudiaron 219 pacientes. De los 219 casos, 210 correspondían a los tumores incidentes primarios, en estadio T1 y T2a, diagnosticados entre 1987 y 1992. Los 9 pacientes restantes correspondían a tumores de la categoría Carcinoma *in situ*, diagnosticados en cualquier momento entre 1976 y 1998.

TABLA 3: DISTRIBUCIÓN POR PERÍODOS DE 5 AÑOS, DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA, DIAGNOSTICADOS DURANTE EL PERÍODO 1976-1998.

PERÍODO	CATEGORÍA TUMORAL							TOTAL
	Ta (%)	T1G1 (%)	T1G2 (%)	T1G3 (%)	T2aG2 (%)	T2aG3 (%)	T3/T4 (%)	
1976-80	10 (7,41)	27 (20)	58 (42,96)	6 (4,44)	10 (7,41)	14 (10,37)	10 (7,41)	135
1981-85	17 (9,09)	12 (6,41)	86 (45,98)	18 (9,62)	14 (7,48)	21 (11,22)	19 (10,16)	187
1986-90	32 (12,85)	18 (7,23)	111 (44,57)	29 (11,64)	8 (3,21)	22 (8,83)	29 (11,65)	249
1991-95	55 (22,27)	20 (8,09)	81 (32,79)	33 (13,36)	3 (1,21)	23 (9,31)	32 (12,95)	247
1996-98*	40 (21,50)	15 (8,06)	70 (37,63)	27 (14,51)	1 (0,53)	14 (7,52)	19 (10,21)	186
1976-98	154 (15,34)	92 (9,16)	406 (40,44)	113 (12,25)	36 (3,58)	94 (9,36)	109 (10,86)	1004**

(*): Período de sólo 3 años.

(**): A esta cifra hay que añadirle 9 pacientes con CIS, para hacer un total de 1013 pacientes.

Los motivos por los cuales se eligió esta muestra de pacientes para el estudio, se explican a continuación. Se efectuó un análisis de la distribución de los pacientes por estadios clínicos desde 1976 hasta 1998, para comprobar que el porcentaje de pacientes perteneciente a cada estadio clínico, se mantenía de manera homogénea a lo largo del tiempo. Se calculó que para estimar las características generales de los pacientes con una precisión del 6,6%, para una $p=0,5$ y una $q=0,5$, con una seguridad del 95% ($\alpha = 0,05$), el tamaño muestral debía ser por lo menos de 210 pacientes.

Se decidió utilizar para el estudio aquellos casos incidentes diagnosticados entre 1987 y 1992 (ambos años incluidos), ya que cumplían la condición de que el tamaño muestral fuese de 210 casos. Por otra parte, este intervalo de tiempo elegido, permitía un seguimiento prolongado de los pacientes del estudio (hasta 12 años en algunos casos), necesario para identificar variables con significación pronóstica, en relación con la supervivencia, recidiva y progresión. En el caso de los tumores de la categoría Carcinoma *in situ*, se estudió la serie completa, debido al reducido número de casos existente.

4.5. Variables estudiadas:

Las variables analizadas en el presente estudio pueden clasificarse en:

a) *Variables sociodemográficas y de exposición al tabaco*: nombre y apellidos del paciente, número de historia clínica, número de teléfono, sexo, edad, hábito tabáquico, número de cigarrillos/día, dosis tabáquica acumulada (nº cigarrillos/día × duración en días del hábito tabáquico) y fecha de abandono del hábito tabáquico.

b) *Variables relacionadas con el tumor primario*:

b.1) *variables clínico-diagnósticas*: manifestaciones clínicas iniciales, tiempo de evolución de los síntomas específicos de tumor vesical, urografía intravenosa (cistograma y afectación de tracto urinario superior), citología de orina, cultivo de orina y fecha de diagnóstico del tumor (se consideró la fecha de la resección transuretral).

b.2) *variables topográficas* (referidas al tumor primario): localización intravesical del tumor (se consideraron localizaciones posibles: cuello, trigono, cara posterior, cara anterior, cara lateral izquierda, cara lateral derecha y cúpula), biopsia aleatoria de la mucosa vesical (CIS vs. no CIS, en 4 muestras tomadas del trigono, cara posterior y ambas caras laterales) y estado de la uretra prostática (CIS vs. no CIS).

b.3) *variables anatomopatológicas* (referidas al tumor primario): grado histológico (G1, G2, G3), estadio infiltrativo (Tis, T1, T2a), categoría TG (T1G1, T1G2, T1G3, T2aG2, T2aG3 y Carcinoma *in situ*), existencia de afectación de ganglios linfáticos regionales, existencia de metástasis a distancia, número de formaciones tumorales vesicales, tamaño de la formación tumoral (en el caso de que hubiese más de una, se consideró la formación de mayor tamaño), aspecto macroscópico del tumor (las categorías consideradas fueron: papilar, sólido, plano, papilar y sólido, y papilar y plano), morfología microscópica del tumor (categorías: papilar, sólido y sólido-papilar), correspondencia macro-microscópica, número de biopsia y tamaño del núcleo celular a 40X (categorías: pequeño, mediano y grande).

b.4) *variables terapéuticas* (referidas al tumor primario): tratamiento realizado en el tumor primario (Resección transuretral en todos los casos), realización de

quimioprofilaxis (Mitomicina C, Tiotepa, Cisplatino, Adriamicina, Epirubicina, Metotrexate, Mitoxantrone), realización de inmunoprofilaxis (BCG, Interferón α -2b), realización de quimioterapia sistémica adyuvante y realización de radioterapia adyuvante.

b.5) *variables inmunohistoquímicas*: porcentaje de expresión nuclear de p53, intensidad de tinción nuclear con p53 (categorías: no tinción, tinción débil, tinción intermedia y tinción máxima), porcentaje de expresión nuclear de ki67 e intensidad de tinción nuclear con ki67 (categorías: no tinción, tinción débil, tinción intermedia y tinción máxima).

- c) *Variables de seguimiento*: existencia de recidiva tumoral, número de recidivas, existencia de progresión tumoral, fecha de la progresión tumoral, existencia de progresión de la categoría T, fecha de progresión de la categoría T, existencia de progresión de la categoría N, existencia de progresión de la categoría M, fecha de progresión de la categoría M, existencia de progresión del grado histológico, muerte del paciente, fecha de la muerte, muerte relacionada con el tumor vesical, causa de la muerte, existencia de otra neoplasia maligna distinta a la vesical, y fecha del último contacto con el paciente.
- d) *Variables relacionadas con la primera recidiva tumoral*: fecha de la primera recidiva, localización intravesical de la primera recidiva (igual o distinta a la localización del tumor primario), categoría T, categoría N, categoría M, grado histológico, tratamiento efectuado (resección transuretral, cistectomía parcial, cistectomía radical, BCG sin RTU), realización de quimioprofilaxis, realización de inmunoprofilaxis, quimioterapia sistémica adyuvante y radioterapia adyuvante.
- e) *Variables relacionadas con la segunda recidiva tumoral*: fecha de la segunda recidiva, localización intravesical de la segunda recidiva, categoría T, categoría N, categoría M, grado histológico, tratamiento efectuado (ningún tratamiento, resección transuretral, BCG sin RTU, cistectomía parcial, cistectomía radical, nefroureterectomía), realización de quimioprofilaxis, realización de inmunoprofilaxis, quimioterapia sistémica adyuvante y radioterapia adyuvante.

- f) **Variables relacionadas con la tercera recidiva tumoral:** fecha de la tercera recidiva, localización intravesical de la tercera recidiva, categoría T, categoría N, categoría M, grado histológico, tratamiento efectuado (ningún tratamiento, resección transuretral, BCG sin RTU, cistectomía parcial, cistectomía radical), realización de quimioprofilaxis, realización de inmunoprofilaxis, quimioterapia sistémica adyuvante y radioterapia adyuvante.
- g) **Variables relacionadas con la cuarta recidiva tumoral:** fecha de la cuarta recidiva, localización intravesical de la cuarta recidiva, categoría T, categoría N, categoría M, grado histológico, tratamiento efectuado (ningún tratamiento, resección transuretral, BCG sin RTU, cistectomía parcial, cistectomía radical), realización de quimioprofilaxis, realización de inmunoprofilaxis, quimioterapia sistémica adyuvante y radioterapia adyuvante.
- h) **Variables relacionadas con la quinta recidiva tumoral:** fecha de la quinta recidiva, localización intravesical de la quinta recidiva, categoría T, categoría N, categoría M, grado histológico, tratamiento efectuado (ningún tratamiento, resección transuretral, cistectomía radical), realización de quimioprofilaxis, realización de inmunoprofilaxis, quimioterapia sistémica adyuvante y radioterapia adyuvante.
- i) **Variables relacionadas con la sexta recidiva tumoral:** fecha de la sexta recidiva, localización intravesical de la sexta recidiva, categoría T, categoría N, categoría M, grado histológico, tratamiento efectuado (ningún tratamiento, resección transuretral, nefroureterectomía, cistectomía radical), realización de quimioprofilaxis, quimioterapia sistémica adyuvante y radioterapia adyuvante.
- j) **Variables relacionadas con la séptima recidiva tumoral:** fecha de la séptima recidiva, localización intravesical de la séptima recidiva, categoría T, categoría N, categoría M, grado histológico, tratamiento efectuado (ningún tratamiento, resección transuretral) y quimioterapia sistémica adyuvante.

4.6. Evaluación clínica y seguimiento de los pacientes:

La evaluación clínica inicial llevada a cabo en los pacientes del estudio consistió en: historia clínica completa, exploración física urológica, y una serie de pruebas complementarias de laboratorio y radiológicas: hemograma, coagulación, bioquímica sanguínea completa, incluyendo cifras de urea y creatinina, sedimento de orina, urocultivo, radiografía de tórax, citología de orina, cistoscopia y urografía intravenosa, salvo en aquellos pacientes con alergia conocida al contraste i.v., en los cuales se efectuó ecografía renovesical. El seguimiento de los pacientes tras la realización de la primera resección transuretral se llevó a cabo del siguiente modo: 1) Cistoscopia trimestral durante el primer año post-RTU, cistoscopia semestral el segundo año, y cistoscopia anual a partir del tercer año. En aquellos pacientes con intolerancia a la cistoscopia, el seguimiento se realizó mediante ecografía vesical, siguiendo la misma pauta de revisión; 2) Citología de orina y estudio de la función renal mediante cifras sanguíneas de urea y creatinina, cada seis meses durante los dos primeros años, y posteriormente cada año; 3) Sedimento de orina semestral durante los primeros dos años, y anual a partir del tercer año; 4) Urografía intravenosa anual, los dos primeros años tras la resección transuretral, posteriormente la urografía intravenosa se realizó con una periodicidad bianual. Otras exploraciones complementarias como TAC, RM, gammagrafía ósea, pielografía retrógrada, pielografía anterógrada por catéter de nefrostomía, entre otras, fueron realizadas cuando se consideraron pertinentes, en función de las manifestaciones clínicas y de los hallazgos de otras pruebas radiológicas o de laboratorio.

El seguimiento de los pacientes se consideró finalizado en la fecha de su última visita a la consulta externa u Hospital, o en su defecto, en la fecha en la que tuvo lugar el contacto telefónico. En caso de muerte, cáncer-relacionada o de otra causa, el seguimiento se consideró finalizado en la fecha de la muerte.

Se definió recidiva como la aparición de un nuevo tumor de estirpe urotelial, en cualquier parte del tracto urinario. La variable progresión se definió como el incremento de la categoría T, N ó M, en cualquiera de las recidivas, o bien, la muerte cáncer-relacionada del paciente.

El intervalo libre de recidiva de cada paciente, fue definido como el tiempo transcurrido entre la resección transuretral del tumor vesical primario, y el diagnóstico de la primera recidiva tumoral. El intervalo libre de progresión fue definido, como el tiempo transcurrido entre la resección transuretral del tumor vesical primario y el momento en el que se observó una progresión local, regional o a distancia (T, N ó M), o la muerte cáncer-relacionada del paciente.

4.7. Tratamiento llevado a cabo en los pacientes del estudio:

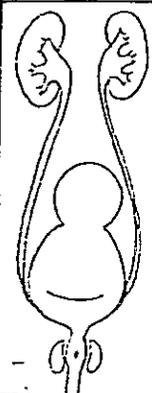
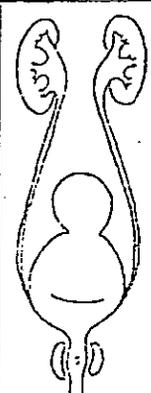
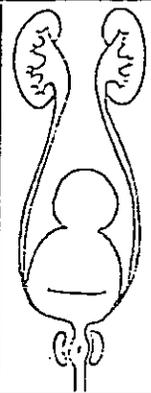
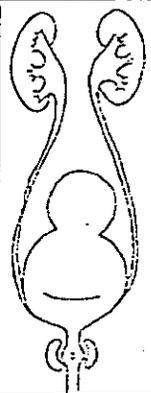
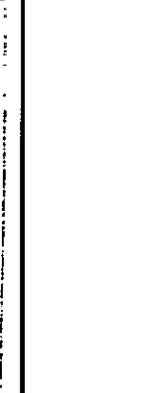
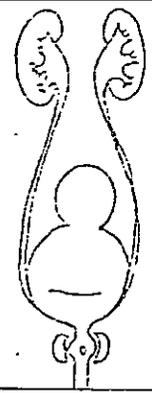
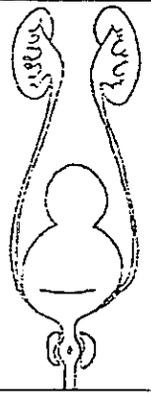
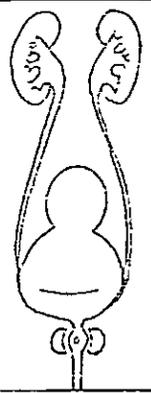
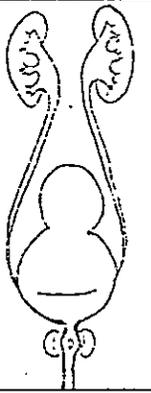
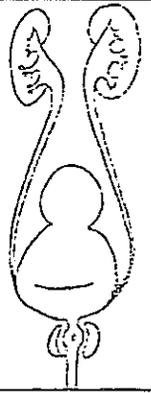
a) Todos los tumores primarios fueron tratados mediante resección transuretral, excepto un caso de CIS, en el que se aplicó BCG sin RTU previa. En todos los casos, se realizó resección hasta pericisto, con biopsia del lecho tumoral. Ningún paciente fue sometido a tratamiento previo a la RTU del tumor primario.

b) Quimioprofilaxis e inmunoprofilaxis intravesical: La quimio y la inmunoprofilaxis fueron iniciadas 3-4 semanas después de la RTU. La quimioprofilaxis se realizó con Mitomicina C, Tiotepa, Cisplatino, Adriamicina, Epirubicina o Mitoxantrone, todos ellos aplicados en forma de instilaciones intravesicales; también se utilizó quimioprofilaxis oral con Metotrexate. La inmunoprofilaxis se efectuó con Interferón- α 2b, o con BCG. Las dosis y pautas de aplicación de los distintos agentes, fueron muy variables, y no se describen en este apartado, ya que el análisis de la efectividad terapéutica no forma parte de los objetivos del estudio.

c) Quimioterapia y radioterapia sistémicas adyuvantes: Aquellos pacientes que recibieron quimioterapia sistémica adyuvante, fueron tratados siguiendo el protocolo M-VAC, consistente en Metotrexate, Vimblastina, Doxorubicina (Adriamicina) y Cisplatino, aplicados en seis ciclos. El tratamiento radioterápico postoperatorio se efectuó mediante telecobaltoterapia; este fue empleado en muy pocos casos, y las dosis y ciclos fueron muy variables.

d) Otros tratamientos: Durante el período de seguimiento de los pacientes del estudio, algunos de ellos fueron sometidos a intervenciones quirúrgicas, como

cistectomía parcial, cistectomía radical, nefroureterectomía, ureterectomía distal, etc., atendiendo a las particularidades clínico-evolutivas de cada paciente, y siguiendo el criterio de los miembros del Servicio de Urología.

NOMBRE:						PROFESION:					
EDAD:						N.º HISTORIA:					
Fecha													
													
Intervención													
Clasificación													
Tratamiento													
Rev. cistoscópica													
Fecha													
													
Intervención													
Clasificación													
Tratamiento													
Rev. cistoscópica													

Modelo original del Servicio de Urología del Hospital Xeral de Vigo (Dr. Nequesira March).

FIGURA 1: FICHA DE RECOGIDA DE DATOS SOBRE PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA. MODELO ORIGINAL DEL HOSPITAL XERAL-CIES DE VIGO.

4.8. Fuente de información:

En el Servicio de Urología del Complejo Hospitalario Xeral-Cíes, los datos de todos los tumores vesicales se recogen en una ficha, cuyo diseño es original de dicho Servicio, y que facilita el control, la clasificación y el rápido acceso a los datos básicos del seguimiento de dichos tumores (Figura 1). La recopilación de los datos necesarios para el estudio, fue efectuada mediante la revisión de las historias clínicas guardadas en el Archivo General del Complejo Hospitalario Xeral-Cíes. Se revisaron historias clínicas en los Archivos de otros Hospitales de la provincia de Pontevedra, para obtener los datos relativos a aquellos pacientes, cuyo seguimiento fue realizado en algún momento fuera del C.H. Xeral-Cíes. En aquellos casos en los que produjo una pérdida de seguimiento, se intentó establecer un contacto telefónico, con el paciente o con alguno de sus familiares, para obtener los datos necesarios sobre los eventos ocurridos desde el último contacto, y para conocer el estado del paciente.

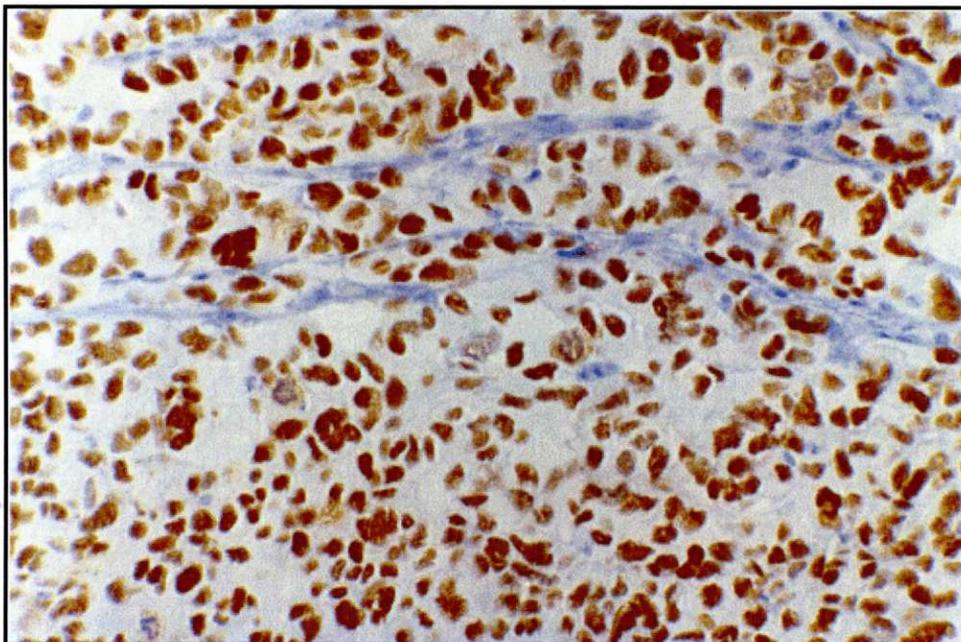


FIGURA 2: FOTOGRAFÍA A 40X DE UN TUMOR TIG3, CON UNA EXPRESIÓN DE p53 DEL 100%, Y UNA INTENSIDAD DE TINCIÓN ELEVADA.

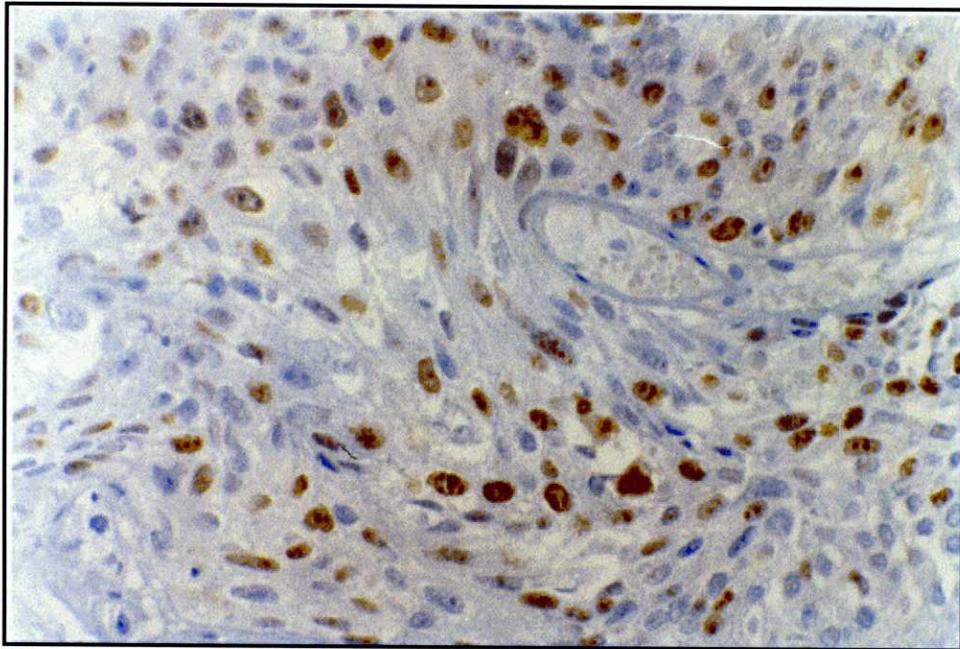


FIGURA 3: FOTOGRAFÍA A 40X DE UN TUMOR TIG3, CON UNA EXPRESIÓN DE Ki67 DEL 40%, Y UNA INTENSIDAD DE TINCIÓN INTERMEDIA.

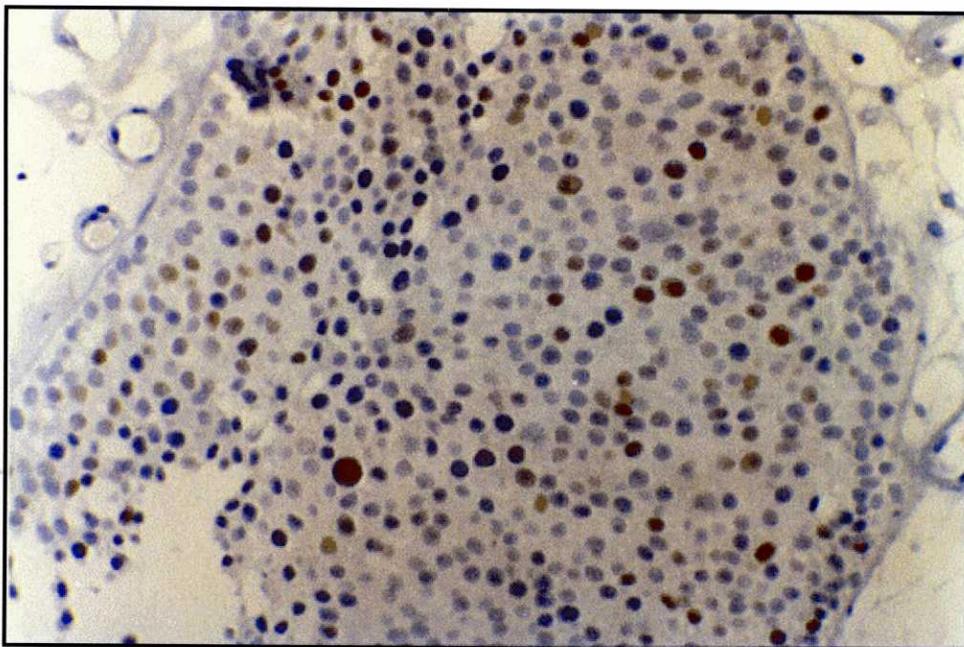


FIGURA 4: FOTOGRAFÍA A 40X DE UN TUMOR TIG1, CON UNA EXPRESIÓN DE p53 DEL 16%, Y UNA INTENSIDAD DE TINCIÓN INTERMEDIA.

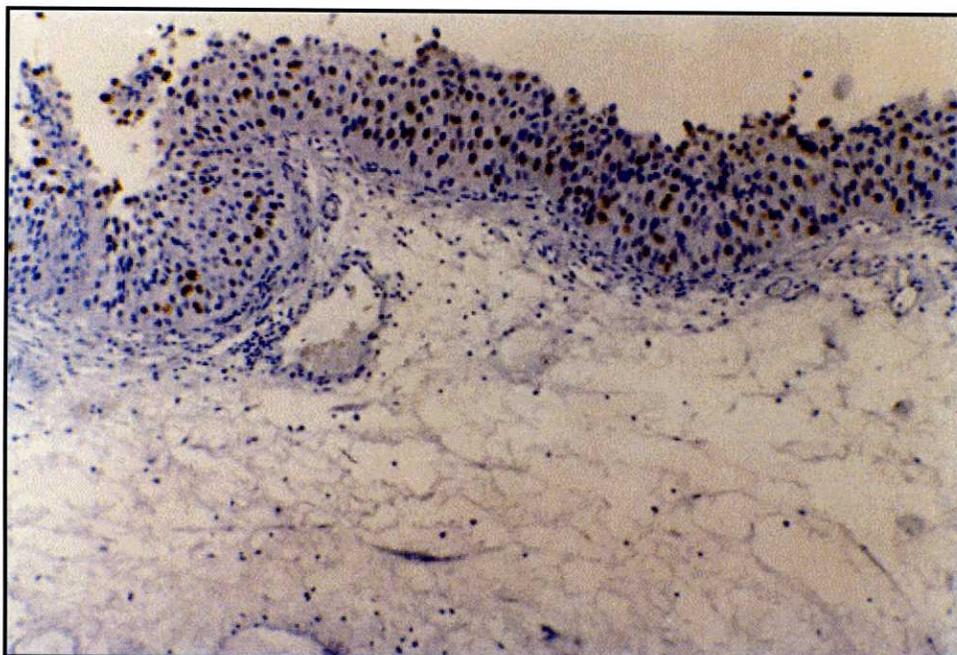


FIGURA 5: FOTOGRAFÍA A 20X DE UN CARCINOMA IN SITU, CON UNA EXPRESIÓN DE p53 DEL 20%, Y UNA INTENSIDAD DE TINCIÓN ELEVADA.

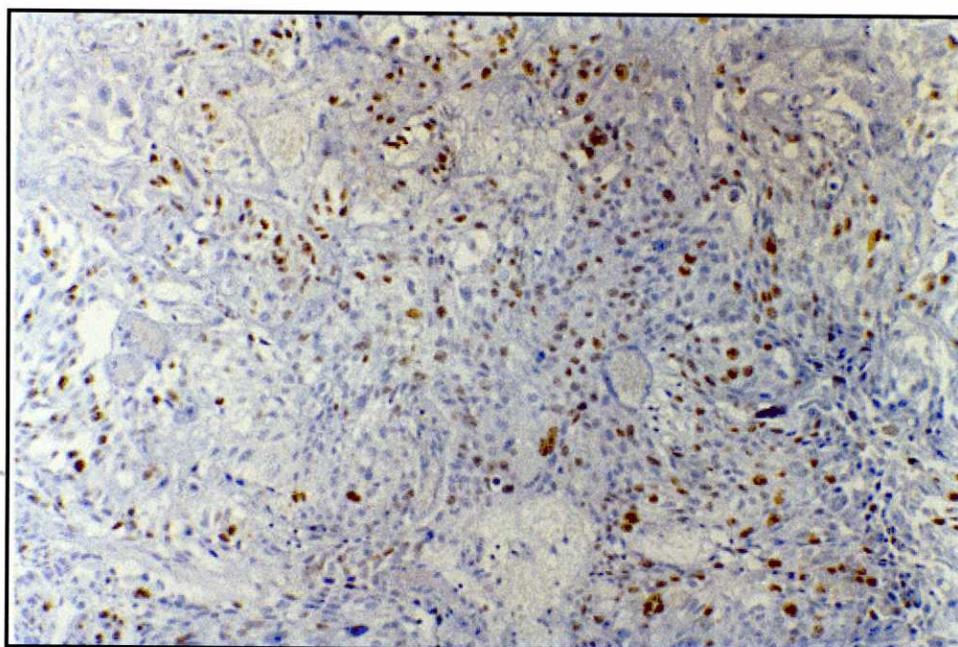


FIGURA 6: FOTOGRAFÍA A 20X DE UN TUMOR T1G3, CON UNA EXPRESIÓN DE Ki67 DEL 31%, Y UNA INTENSIDAD DE TINCIÓN INTERMEDIA.

4.9. Evaluación anatomopatológica y análisis inmunohistoquímico:

Las preparaciones histológicas de todos los tumores vesicales seleccionados, conservadas permanentemente en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Xeral-Cíes, fueron recuperadas para su reevaluación. Todos los tumores, papilares o sólidos, se graduaron originalmente en una escala de cuatro grados histológicos siguiendo la propuesta de Ash publicada en 1940 (151), que parte de la concepción de que incluso los tumores papilares mejor diferenciados deben ser considerados como carcinomas por su tendencia a recurrir localmente y elimina, por consiguiente, la categoría de papiloma. Brevemente, los cuatro grados pueden definirse de la siguiente forma (152):

Grado I: Tumor constituido enteramente por papilas regulares y frondosas, con ejes fibrovasculares cubiertos por unas pocas capas de células transicionales uniformes idénticas a las de la vejiga normal. Las mitosis son infrecuentes o inexistentes. No hay necrosis.

Grado II: La configuración papilar persiste, pero se aprecia un mayor número de capas y desorden celular. Los núcleos están ligeramente aumentados de tamaño con hiper cromasia, y hay algunas figuras de mitosis.

Grado III: Puede haber áreas papilares, pero están distribuidas irregularmente en un tumor mayoritariamente sólido. El aumento de la relación núcleo-citoplasma es más evidente y las mitosis se detectan con facilidad.

Grado IV: Las áreas papilares son escasas o ausentes. La atipia y el pleomorfismo celulares son tan marcados que es difícil reconocer la naturaleza transicional de la neoplasia. Las mitosis son muy frecuentes y a menudo atípicas. Casi siempre, estos tumores son ampliamente invasores.

En el estudio y la codificación de los casos, se utilizó la graduación histológica de la World Health Organization (WHO) (20), que divide los carcinomas uroteliales de vejiga en tres grados, para lo cual, los grados III y IV de Ash se unificaron en el grado III de la clasificación de la WHO. El propósito de dicha recodificación, fue el de formar grupos de tumores con el mayor número posible de casos, para facilitar el análisis estadístico posterior.

La estadificación patológica de los carcinomas se efectuó de acuerdo con los criterios de la American Joint Cancer Committee / Union Internationale Contre le Cancer (AJCC/UICC), vigentes en el momento del diagnóstico del tumor. Posteriormente todos los tumores fueron reclasificados, de acuerdo con la clasificación de la AJCC/UICC publicada en 1997 (153), dada la posibilidad de convertir automáticamente las categorías T, N y M de las clasificaciones de 1987 (154) y 1992 (155), en la TNM de la última clasificación, de 1997.

El reducido número de Carcinomas uroteliales “in situ” puros (primarios) recuperados, fueron etiquetados como tales siguiendo los criterios morfológicos tradicionales (156), es decir, la sustitución total del urotelio original por células que muestran los rasgos morfológicos del carcinoma, pero en una lesión en la que no se observan más alteraciones arquitecturales que un posible incremento en el número de capas celulares (Figura 5). Debe subrayarse que el Carcinoma “in situ” (pTis) es diferente del Carcinoma papilar que no invade el estroma (pTa) desde el punto de vista morfológico, de su historia natural y, probablemente, también en lo que atañe a la oncogénesis molecular.

Tras examinar microscópicamente todas las preparaciones originales teñidas con Hematoxilina-Eosina, seleccionamos una de ellas de cada caso para efectuar el posterior estudio inmunohistoquímico. La selección se hizo exclusivamente atendiendo a la cantidad de tumor presente y a la aparente viabilidad morfológica de las células tumorales, evitando en la medida de lo posible el artefacto térmico asociado a la resección transuretral.

El procedimiento seguido para la inmunotinción es el que se refiere a continuación. Del bloque de parafina seleccionado, se obtienen secciones de 4 micras de espesor con un microtomo. Dichas secciones son desparafinadas comenzando con su incubación en estufa a 60°C durante 12 horas, seguida de pases a través de xilol y etanol a concentraciones decrecientes hasta su completa rehidratación llegando a agua destilada. A continuación efectuamos sistemáticamente una recuperación o desenmascaramiento de antígenos, particularmente necesario cuando se emplean tejidos que han permanecido almacenados durante largos períodos de tiempo, como sucede en el presente estudio, y para ello calentamos en olla a presión las preparaciones sumergidas en buffer Citrato 10 mM (pH 6) o buffer EDTA 1mM (pH 8) durante 2-3 minutos a plena presión. Para la tinción inmunohistoquímica propiamente dicha se utilizó un sistema automatizado comercial

denominado Ventana NexES (Ventana Medical Systems, Inc. Arizona, EEUU). Este sistema, tras un paso de desactivación de la peroxidasa endógena, dosifica el anticuerpo primario. Nosotros utilizamos dos anticuerpos monoclonales en este estudio:

1.- Proteína p53, clon DO-7, suministrado por Novocastra Laboratories, Newcastle, Reino Unido (referencia NCL-p53-DO7). La dilución de trabajo es de 1:25.

2.- Antígeno ki67, clon MIB-1, suministrado por Immunotech, Marsella, Francia (referencia PN IM0505). La dilución de trabajo es de 1:100.

El tiempo de incubación con estos anticuerpos primarios es de 30 minutos a una temperatura de 40°C. Posteriormente, el sistema revela la reacción inmunológica en el tejido, mediante la técnica Avidina-Biotina-Peroxidasa, utilizando como cromógeno la Diaminobencina (DAB), que precipita en el tejido dando lugar a un pigmento parduzco estable e insoluble en disolventes orgánicos. Las preparaciones son contrateñidas con Hematoxilina y finalmente son montadas por el procedimiento habitual.

La evaluación cuantitativa y cualitativa del estudio inmunohistoquímico, se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico Olympus BX40, con objetivos de 4X, 10X, 20X y 40X.

Las variables microscópicas utilizadas en el estudio fueron: porcentaje de núcleos celulares teñidos con los marcadores p53 y ki67; intensidad de tinción nuclear con los marcadores p53 y ki67; y por último, tamaño del núcleo de las células tumorales.

El estudio inmunohistoquímico fue llevado a cabo por un solo observador, con entrenamiento previo. Inicialmente se determinó en número de núcleos celulares existente en un campo microscópico de gran aumento (40X), utilizando preparaciones de carcinoma de células transicionales de vejiga; para ello se escogieron de manera arbitraria 10 preparaciones pertenecientes a distintos casos, y en cada una de ellas se eligió al azar un campo microscópico que contuviera exclusivamente células tumorales. La media aritmética obtenida fue de 850 núcleos, siendo esta cifra utilizada en todos los cálculos efectuados en el estudio microscópico.

Se estudió cada una de las preparaciones teñidas con p53 y ki67, localizando en primer lugar las áreas más profusamente teñidas, con las lentes de pequeño aumento (4X y 10X), y contando posteriormente el número de núcleos teñidos, independientemente de la intensidad de tinción de los mismos, en seis campos microscópicos de gran aumento

(Figuras 2, 3, 4, 5 y 6). Finalmente, los cuatro campos con mayor número de núcleos celulares teñidos, fueron utilizados para determinar el porcentaje medio de tinción, de cada uno de los marcadores. En caso de existir una gran desproporción en el porcentaje de núcleos teñidos, entre unos campos y otros, se consideraron para el cálculo de la media, aquellos campos con mayor porcentaje. En aquellos casos en los que no se identificó un número suficiente de grupos de núcleos celulares, para estudiar seis campos de gran aumento, se estudiaron aquellos campos existentes y con ellos se determinó el porcentaje medio de tinción.

La valoración de la intensidad de tinción nuclear con p53 y ki67 se efectuó mediante la asignación semicuantitativa de cada caso, a cuatro niveles arbitrariamente designados como: 0, 1, 2 y 3, tras la observación de las preparaciones con la lente de gran aumento (40X); representando el "0", la no tinción; el "1", la tinción mínima; el "2", la tinción intermedia; y el "3", la tinción máxima (Figuras 2, 3, 4, 5 y 6). El tamaño nuclear se estratificó de manera subjetiva, en tres categorías: categoría 1: núcleo de pequeño tamaño; categoría 2: núcleo de tamaño intermedio; y categoría 3: núcleo de tamaño grande. La valoración del tamaño nuclear fue realizada utilizando la lente 40X.

4.10. Análisis estadístico:

Se realizó un estudio descriptivo de todas las variables incluidas en el estudio, con su 95% intervalo de confianza. Las variables cuantitativas se expresan con sus medidas de centralización y dispersión, utilizando en alguno de los casos la categorización de las mismas en función de su mediana o cuartiles. Las medias se presentan como media \pm desviación típica. Para determinar el efecto de diferentes variables sobre el pronóstico de la enfermedad, realizamos un análisis de supervivencia con la metodología Kaplan-Meier. Las variables dependientes de interés han sido la supervivencia general y cáncer-relacionada tras el diagnóstico, la presencia de recidiva del tumor, y la progresión de la enfermedad. Para comparar las probabilidades de supervivencia acumulada, según diferentes estratos de las variables, se utilizó el test de log-rank. Se consideró estadísticamente significativo un

valor de $p < 0,05$. Para determinar como la supervivencia, recidiva y progresión se ven afectadas por otras covariables, y para controlar por el efecto confusor de las mismas, se realizó un análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Dichos riesgos se estimaron con su 95% intervalo de confianza. Se estimó a su vez el área bajo la curva ROC, para predecir la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada, recidiva y progresión, respecto a los valores de p53 y ki67, estratificando por los diferentes estadios clínicos. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 9.0 para Windows.

5. RESULTADOS:

5.1. Características generales de los pacientes incluidos en el estudio:

5.1.1. Características sociodemográficas y hábito tabáquico:

Un total de 219 pacientes fueron diagnosticados de tumor vesical primario, en estadios Tis, T1 y T2a, de los cuales, 183 (83,56%) eran hombres y 36 (16,43%) mujeres, con una proporción hombre/mujer del 5,08/1. La edad media de presentación fue de 67,03 años, con una desviación típica de 11,69 y una amplitud de 23 – 92 años. La edad media de presentación fue de $66,05 \pm 11,64$ años en los hombres, y de $72 \pm 10,80$ años en las mujeres.

El seguimiento medio de los pacientes del estudio fue 79,95 meses (amplitud: 0,26 – 151,34), que es equivalente a 6,7 años.

En cuanto al hábito tabáquico, 157 pacientes (71,68%) eran fumadores en el momento del diagnóstico, siendo este hábito mucho más frecuente en hombres (85,24%), que en mujeres (2,77%).

5.1.2. Características clínico-diagnósticas:

Las manifestaciones clínicas relacionadas con el tumor vesical, más frecuentemente observadas en el momento del diagnóstico fueron: hematuria macroscópica asintomática en 165 pacientes (75,34%); macrohematuria acompañada de síndrome miccional en 30 pacientes (13,69%), y síndrome miccional irritativo aislado, en 15 pacientes (6,85%).

Se realizó citología de orina preoperatoria (miccional y/o de lavado) en 25 pacientes (11,41%). Esta prueba puso de manifiesto la existencia de células características

de carcinoma de células transicionales en 19 pacientes (8,67%); y fue negativa para malignidad en 5 pacientes (2,74%).

Se efectuó cultivo de orina en 172 pacientes (78,53%), siendo este negativo en 162 casos (73,97%), mientras que en 10 pacientes (4,56%) se aisló algún microorganismo.

TABLA 4: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EXPLORATORIAS. CAUSAS DE MUERTE DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO.

VARIABLE		FREC. (%)	95% I.C.
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	• Macrohematuria asintomática	165 (75,34)	69,31 – 80,71
	• Macrohematuria + Sd. miccional	30 (13,69)	9,61 – 18,74
	• Síndrome miccional	15 (6,85)	4,03 – 10,80
	• Otras	9 (4,11)	2,02 – 7,40
CITOLOGÍA ORINA	• Positiva	19 (8,67)	5,46 – 12,97
	• Negativa	6 (2,74)	1,11 – 5,61
	• No realizada	194 (88,58)	83,84 – 92,30
UROGRAFÍA I.V.	• Diagnóstica de Tm. vesical	184 (84,01)	78,71 – 88,43
	• No diagnóstica de Tm. vesical	26 (11,87)	8,07 – 16,67
	• No efectuada	9 (4,11)	2,02 – 7,40
CISTOSCOPIA	• Diagnóstica de Tm. vesical	219 (100,00)	98,64 – 100
	• No diagnóstica de Tm. vesical	0 (0,00)	0,00 – 1,36
TRACTO URINARIO SUPERIOR	• Normal	210 (95,89)	92,59 – 97,97
	• Uropatía obstructiva unilateral	8 (3,65)	1,71 – 6,81
	• Uropatía obstructiva bilateral	1 (0,45)	0,02 – 2,23
CAUSA DE MUERTE	• TUMOR VESICAL	45 (44,11%)	34,71 – 53,85
	• OTROS TUMORES	-----	-----
	- NO UROLÓGICOS	17 (16,66%)	10,35 – 24,84
	- UROLÓGICOS	2 (1,96%)	0,33 – 6,32
	• CARDIOVASCULAR	13 (12,74%)	7,27 – 20,30
	• NEUROLÓGICA	11 (10,78%)	5,80 – 17,97
	• RESPIRATORIA	7 (6,86%)	3,05 – 13,10
	• INFECCIOSA	3 (2,94%)	0,75 – 7,79
	• TRAUMÁTICA	1 (0,98%)	0,05 – 4,74
• DESCONOCIDA	3 (2,94%)	0,75 – 7,79	

La urografía intravenosa fue la técnica radiológica más habitualmente utilizada para el diagnóstico. Esta prueba fue diagnóstica de tumor vesical en 184 casos (84,01%), mientras que en 26 pacientes (11,87%) no fue útil para este propósito.

El estado del tracto urinario superior, evaluado mediante una prueba radiológica, bien urografía, o bien ecografía, era normal en 210 pacientes (95,89%), mientras que en 8 (3,65%), se observaba uropatía obstructiva unilateral, y en uno, uropatía obstructiva bilateral.

La cistoscopia fue realizada en 219 pacientes (100%), y fue diagnóstica de tumor vesical en todos los casos.

En la Tabla 4 se pueden observar los datos clínico-diagnósticos, entre otros, de la población del estudio.

5.1.3. Características morfológicas del tumor vesical:

A. Tamaño tumoral:

Se encontraron 106 pacientes (48,40%) con tumores \leq 3 centímetros de diámetro máximo; 103 pacientes (47,03%) con tumores $>$ 3 centímetros; y por último, en 10 pacientes (4,56%), el tamaño tumoral no fue descrito por el urólogo que efectuó la resección transuretral.

B. Número de tumores:

En lo que respecta al número de neoformaciones vesicales, en 141 casos (64,38%) se observaron lesiones únicas; en 69 casos (31,50%) se trataba de lesiones múltiples; y en 9 pacientes (4,11%) no se observaba ningún tumor, ya que se trataba de lesiones eritematosas planas, típicas de carcinoma in situ.

C. Aspecto macroscópico del tumor:

Las lesiones de tipo papilar fueron las más frecuentemente observadas en los pacientes del estudio, hallándose estas en 173 pacientes (78,99%), las lesiones sólidas, observadas en 24 pacientes (10,96%), le siguen en frecuencia. Se encontraron lesiones mixtas, de tipo sólido-papilar, en 12 casos (5,48%); lesiones planas en 9 casos (4,11%); y por último, una combinación de lesiones papilares y planas, en 1 paciente (0,45%).

D. Morfología microscópica del tumor:

El estudio anatomopatológico identificó tumores papilares en 183 pacientes (86,30%); tumores de morfología sólida en 18 casos (8,20%) y tumores mixtos, sólido-papilares en 11 casos (5,00%).

TABLA 5: DISTRIBUCIÓN DE LOS TUMORES SEGÚN DIVERSOS CRITERIOS ANATÓMICOS, TOPOGRÁFICOS, Y DE ESTADIFICACIÓN CLÍNICA.

VARIABLE		PREC. (%)	95% I.C.
ASPECTO MACROSCÓPICO	• Papilar	173 (78,99)	73,22 – 84,00
	• Sólido	24 (10,96)	7,31 – 15,63
	• Papilar y sólido	12 (5,48)	3,00 – 9,13
	• Plano	9 (4,11)	2,02 – 7,40
	• Papilar y plano	1 (0,45)	0,02 – 2,23
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	• Papilar	183 (86,30)	78,20 – 88,03
	• Papilar y sólido	18 (8,20)	5,10 – 12,44
	• Sólido	11 (5,00)	2,67 – 8,56
	• Desconocida	7 (3,20)	1,41 – 6,22
CORRESPONDENCIA MACRO-MICROSCÓP.	• Sí correspondencia	191 (87,21)	82,29 – 91,16
	• No correspondencia	28 (12,78)	8,84 – 17,71
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	• Cara lateral izquierda	91 (41,55)	35,15 – 48,17
	• Trígono	88 (40,18)	33,84 – 46,78
	• Cara lateral derecha	83 (37,90)	31,65 – 44,46
	• Cara posterior	63 (28,76)	23,06 – 35,03
	• Cara anterior	48 (21,92)	16,81 – 27,76
	• Cuello	39 (17,80)	13,16 – 23,30
	• Fondo - cúpula	14 (6,39)	3,68 – 10,25
BIOPSIA VESICAL ALEATORIA	• Positiva (CIS)	10 (4,56)	2,34 – 7,98
	• Negativa (No CIS)	185 (84,47)	79,22 – 88,82
	• No realizada	24 (10,96)	7,31 – 15,63
ESTADO DE URETRA PROSTÁTICA	• Presencia de CIS *	4 (2,18)	0,69 – 5,18
	• Ausencia de CIS *	103 (56,28)	49,02 – 63,34
	• Desconocido	76 (41,53)	34,55 – 48,77
TAMAÑO TUMORAL	• ≤ 3 centímetros	106 (48,40)	41,82 – 55,02
	• > 3 centímetros	103 (47,03)	40,48 – 53,66
	• No conocido	10 (4,56)	2,34 – 7,98
Nº TUMORES	• Únicos	141 (64,38)	57,87 – 70,52
	• Múltiples	69 (31,50)	25,61 – 37,88
	• Ninguno (Lesión plana)	9 (4,11)	2,02 – 7,40
ESTADIO INFILTRATIVO	• Tis	9 (4,11)	2,02 – 7,40
	• T1	175 (79,90)	74,21 – 84,82
	• T2a	35 (15,98)	11,57 – 21,28
GRADO HISTOLÓGICO	• G1	20 (9,13)	5,82 – 13,51
	• G2	129 (58,90)	52,29 – 65,28
	• G3	70 (31,96)	26,04 – 38,36
DISTRIBUCIÓN POR CATEGORÍAS TG	• CIS	9 (4,11)	2,02 – 7,40
	• T1G1	20 (9,13)	5,82 – 13,51
	• T1G2	121 (55,25)	48,61 – 61,74
	• T1G3	34 (15,52)	11,17 – 20,78
	• T2aG2	8 (3,65)	1,71 – 6,81
	• T2aG3	27 (12,33)	8,45 – 17,19

E. Correspondencia macro-microscópica:

Se encontró correspondencia morfológica macro-microscópica en 191 tumores (87,21%), mientras que en 28 tumores (12,78%), las características morfológicas microscópicas no se correspondían con aquellas observadas por endoscopia.

5.1.4. Características topográficas del tumor vesical:

Las características topográficas tumorales más destacadas, se recogen de forma resumida en la Tabla 5.

A. Localización intravesical del tumor:

La cara lateral izquierda de la vejiga fue el lugar de asentamiento más frecuente de los tumores, hallándose esta comprometida en 91 ocasiones (41,55%); le siguen en frecuencia el trigono, afectado en 88 casos (40,18%), y la cara lateral derecha en 83 (37,90%). La ubicación menos frecuente de los tumores vesicales fue el área de fondo-cúpula, en la que se observó tumor en sólo 14 ocasiones (6,39%).

B. Biopsia aleatoria de mucosa vesical:

La biopsia en mapa de la mucosa vesical, permitió identificar un carcinoma in situ secundario en 10 ocasiones (4,56%); mientras que esta fue negativa en 185 casos (84,47%). En 24 pacientes la biopsia vesical aleatoria no fue efectuada.

C. Estado de la uretra prostática:

En los pacientes varones, se observó carcinoma in situ secundario de uretra prostática tan solo en 4 biopsias (2,18%); mientras que en 103 casos (56,28%) no se halló carcinoma in situ concomitante en dicha localización. En 72 pacientes, el estado de la uretra prostática era desconocido, ya que no se realizó biopsia-resección de la misma.

5.1.5. Estudio inmunohistoquímico de p53 y ki67 en los tumores de la muestra:

Se observó inmunotinción positiva para p53 ($p53 > 0\%$), en el 75,34% de los tumores de la muestra (165/219). Dividiendo la muestra por categorías T, se identificó una expresión de $p53 > 0\%$ en el 77,78% (7/9) de los pacientes de la categoría Tis; en la

categoría T1 p53 era >0% en el 73,71% (129/175); y por último, en la categoría T2a, la inmunotinción de p53 era >0% en el 82,86% de los casos (29/35).

TABLA 6: MEDIDAS DE CENTRALIZACIÓN Y DISPERSIÓN DE LOS VALORES DE p53 Y ki67 EN LOS DISTINTOS ESTADIOS CLÍNICOS DEL CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA.

CATEGORÍA TG	p53				ki67			
	MEDIA	MEDIANA	DESVIACIÓN TÍPICA	AMPLITUD	MEDIA	MEDIANA	DESVIACIÓN TÍPICA	AMPLITUD
CATEGORÍA T1G1	9,01	0,66	3,43	0,00 – 12,70	7,46	4,82	8,75	0,23 – 34,54
CATEGORÍA T1G2	20,11	1,29	21,11	0,00 – 95,96	14,96	11,09	15,01	0,00 – 67,52
CATEGORÍA T1G3	36,42	16,31	36,18	0,00 – 100	24,07	21,84	17,11	0,58 – 65,36
CATEGORÍA T2aG2	13,00	3,03	26,03	0,00 – 76,58	25,89	18,82	24,72	6,54 – 82,90
CATEGORÍA T2aG3	50,47	62,35	39,58	0,00 – 99,09	38,77	38,43	24,43	6,90 – 89,25
CATEGORÍA CIS	15,68	2,00	25,56	0,00 – 61,72	24,43	11,88	27,06	0,00 – 81,29
ESTADIO T1	13,55	1,56	26,24	0,00 – 100	15,87	11,17	15,53	0,00 – 67,52
ESTADIO T2a	41,90	30,24	39,90	0,00 – 99,09	35,82	26,39	24,74	6,54 – 89,25
TODOS	18,17	2,00	30,49	0,00 – 100	19,41	11,88	19,21	0,00 – 89,25
Diferencias de p53 inter-grupos: $p = 0,0000$					Diferencias de ki67 inter-grupos: $p = 0,0000$			

En el caso de ki67, un 98,63% de los tumores (216/219) presentaban inmunotinción positiva (ki67>0%). Examinando cada una de las categorías tumorales de manera aislada, hemos observado que en la categoría Tis, ki67 era >0% en el 88,89% (8/9); en la categoría T1, un 98,86% (173/175) de los casos presentaba una tinción de ki67>0%; y finalmente, en la categoría T2a, ki67 era >0% en el 100% de los tumores (35/35).

En la Tabla 6 se puede observar, de manera sintética, el porcentaje de expresión de los marcadores tumorales p53 y ki67, en cada uno de las categorías tumorales evaluadas en el estudio, así como en la totalidad de la muestra. De cada categoría se estudió la media, la mediana, la desviación típica, la amplitud del intervalo en el que se encontraban los valores, y la significación estadística de las diferencias existentes entre las distintas categorías tumorales.

5.1.6. Estadificación de los tumores vesicales:

A. Distribución de los tumores vesicales primarios en función de su estadio infiltrativo y su grado histológico:

Siguiendo la clasificación TNM para el cáncer de vejiga, la distribución de los tumores estudiados, según su estadio infiltrativo (categoría T), fue la siguiente: 9 pacientes (4,11%) presentaban un tumor en estadio Tis; en 175 pacientes (79,90%) el tumor se hallaba en estadio T1; por último, en 35 pacientes (15,98%), el estadio era T2a.

Para determinar el grado de malignidad histológica, se utilizaron los criterios de la WHO, encontrándose 20 pacientes (9,13%) con tumores G1; 129 pacientes (58,90%) con tumores G2; y 70 pacientes (31,96%) con tumores pertenecientes a la categoría G3.

B. Distribución de los tumores vesicales en función de la categoría TG:

La distribución de los pacientes del estudio, en función de la estadificación tumoral de los mismos se puede observar en la Tabla 5.

5.1.7. Tratamiento efectuado en los tumores primarios:

A. Características generales del tratamiento:

Todos los pacientes fueron inicialmente sometidos a resección transuretral del tumor primario, excepto uno, que fue tratado mediante BCG intravesical, sin cirugía previa. En 186 pacientes (84,93%), la resección transuretral se acompañó de algún tratamiento adyuvante con inmunoterapia o quimioterapia, tanto intravesical como sistémica. En los 32 pacientes restantes (14,61%), se realizó solamente resección transuretral.

Se realizó quimioterapia sistémica según el protocolo M-VAC, en 3 pacientes (1,37%) con tumores de la categoría T2a, mientras que 53 pacientes (24,19%), fueron sometidos a inmunoterapia intravesical adyuvante; 30 de ellos (13,69%) con BCG, y los otros 23 (10,50%) con Interferón- α 2b. Todos los demás pacientes fueron tratados de manera adyuvante con instilaciones intravesicales de diversos fármacos quimioterápicos.

En la Tabla 7 se puede observar de manera detallada, la distribución de los pacientes en función del tratamiento efectuado. También se refleja en esta misma tabla, el tratamiento llevado a cabo en los diferentes estadios clínicos.

TABLA 7: TRATAMIENTO EFECTUADO EN LOS TUMORES PRIMARIOS, SEGÚN EL ESTADIO CLÍNICO.

CATEGORÍA TUMORAL	TRATAMIENTO	FREC. (%)	95% I.C.
CATEGORÍA T1G1	1. RTU + MITOMICINA C	13 (65,00%)	42,69 – 83,22
	2. RTU + IFN- α 2b	4 (20,00%)	6,69 – 41,48
	3. RTU + EPIRRUBICINA	1 (5,00%)	0,25 – 22,28
	4. OTROS	2 (10,00%)	1,71 – 29,28
CATEGORÍA T1G2	1. RTU + MITOMICINA C	79 (65,28%)	56,48 – 73,36
	2. RTU + BCG	14 (11,57%)	6,74 – 18,22
	3. RTU + IFN- α 2b	11 (9,09%)	4,87 – 15,25
	4. RTU + ADRIAMICINA	8 (6,61%)	3,11 – 12,16
	5. OTROS	9 (7,43%)	3,69 – 13,21
CATEGORÍA T1G3	1. RTU + MITOMICINA C	14 (41,17%)	25,68 – 58,11
	2. RTU + BCG	12 (35,29%)	20,72 – 52,27
	3. RTU + IFN- α 2b	5 (14,70%)	5,59 – 29,63
	4. OTROS	3 (8,81%)	2,29 – 22,16
CATEGORÍA T2aG2	1. RTU AISLADA	4 (50,00%)	18,40 – 81,59
	2. RTU + MITOMICINA C	3 (37,50%)	10,56 – 72,20
	3. RTU + QUIMIOTERAPIA SIST.	1 (12,50%)	0,62 – 48,02
CATEGORÍA T2aG3	1. RTU AISLADA	23 (85,18%)	68,02 – 95,11
	2. RTU + QUIMIOTERAPIA SIST.	1 (3,70%)	0,18 – 16,94
	3. OTROS	3 (11,10%)	2,90 – 27,33
CARCINOMA IN SITU	1. RTU + BCG	3 (33,33%)	9,27 – 66,76
	2. RTU + MITOMICINA C	2 (22,22%)	3,91 – 56,20
	3. RTU + IFN- α 2b	2 (22,22%)	3,91 – 56,20
	4. OTROS	2 (22,22%)	3,91 – 56,20
TODOS LOS TUMORES	1. RTU AISLADA	32 (14,61%)	10,39 – 19,76
	2. RTU + MITOMICINA C	112 (51,14%)	44,52 – 57,72
	3. RTU + BCG	30 (13,69%)	9,61 – 18,74
	4. RTU + IFN- α 2b	23 (10,50%)	6,94 – 15,10
	5. RTU + ADRIAMICINA	9 (4,11%)	2,02 – 7,40
	6. RTU + EPIRRUBICINA	4 (1,82%)	0,58 – 4,34
	7. RTU + MITOXANTRONE	4 (1,82%)	0,58 – 4,34
	8. RTU + METOTREXATE	1 (0,45%)	0,02 – 2,23
	9. RTU + QUIMIOTERAPIA SIST. (M-VAC)	3 (1,37%)	0,35 – 3,68
	10. BCG SIN RTU	1 (0,45%)	0,02 – 2,23

B. Modalidades terapéuticas utilizadas en las diferentes categorías TG:

En la categoría T1G1, la resección transuretral seguida de profilaxis intravesical con Mitomicina C, fue realizada en 13 pacientes (65%), y constituye el tratamiento más frecuentemente utilizado en este tipo de tumores. Le sigue en frecuencia la resección transuretral asociada a inmunoprofilaxis con Interferón- α 2b, utilizada en 4 pacientes (20%).

En la categoría T1G2, 79 pacientes (65,28%) fueron tratados mediante resección transuretral y quimioprofilaxis con Mitomicina C intravesical, constituyendo con

mucho, la modalidad terapéutica más habitual. La resección transuretral seguida de instilaciones con BCG, representa la segunda variante terapéutica en frecuencia, con 14 pacientes (11,57%); siendo la tercera, con 11 pacientes (9,09%), la asociación de resección transuretral e Interferón- α 2b.

En la categoría T1G3, la resección transuretral asociada a quimioprofilaxis con Mitomicina C, realizada en 14 pacientes (41,17%), representa el tratamiento más frecuente. La resección transuretral e inmunoprofilaxis con BCG, ocupa el segundo lugar con 12 pacientes (35,29%).

En los tumores T2aG2, se realizó resección transuretral aislada en 4 pacientes (50%), y fue el tratamiento más habitual en este grupo de tumores.

En los tumores de la categoría T2aG3, al igual que en el grupo anterior, la resección transuretral aislada constituye el tratamiento más frecuente, y fue efectuado en 23 pacientes (85,18%).

5.1.8. Características descriptivas de los eventos: muerte, recidiva y progresión:

5.1.8.1. Distribución de la causa de muerte por grupos etiológicos:

En el momento de la finalización del estudio, 102 pacientes (46,57%) habían fallecido. El tumor vesical fue la causa de la muerte en 45 pacientes (44,11%), y constituyó la causa de muerte más habitual.

La patología oncológica no vesical, tanto urológica como extraurológica, representó la segunda causa de muerte en frecuencia, observándose en 19 pacientes (18,62%); mientras que 13 pacientes (12,74%) fallecieron a consecuencia de enfermedades cardiovasculares.

En la Tabla 4 se muestran las distintas causas de muerte de los pacientes del estudio y sus respectivas frecuencias y 95% IC.

5.1.8.2. *Recidiva:*A. *Probabilidad de recidiva tumoral en los distintos estadios clínicos y categorías tumorales:*

El carcinoma in situ y los tumores en estadio T2a, fueron los grupos que recidivaron con más frecuencia. En la otra vertiente se encuentran los tumores T1, con una probabilidad de recidiva mucho menor que los anteriores. Las distintas categorías de tumores T1 (T1G1, T1G2 y T1G3), mostraron una probabilidad de recidiva similar entre sí.

TABLA 8: CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA RECIDIVA TUMORAL EN LOS PACIENTES DEL ESTUDIO.

VARIABLE		FREC. (%)	95% I.C.	
EXISTENCIA DE RECIDIVA	• SÍ	112 (51,14)	44,52 – 57,72	
	• NO	102 (46,57)	40,03 – 53,20	
	• NO CONOCIDA	5 (2,28)	0,84 – 4,98	
Nº RECIDIVAS	• UNA	47 (41,96)	33,08 – 51,25	
	• DOS	31 (27,67)	19,99 – 36,50	
	• TRES	14 (12,50)	7,29 – 19,62	
	• CUATRO	10 (8,93)	4,62 – 15,33	
	• CINCO	2 (1,78)	0,30 – 5,77	
	• SEIS	4 (3,57)	1,14 – 8,39	
	• SIETE	2 (1,78)	0,30 – 5,77	
	• DESCONOCIDO	2 (1,78)	0,30 – 5,77	
LOCALIZACIÓN DE LA 1ª RECIDIVA	• MISMO LUGAR	70 (62,50)	53,26 – 71,09	
	• DIFERENTE LUGAR	21 (18,75)	12,32 – 26,77	
	• DESCONOCIDO	21 (18,75)	12,32 – 26,77	
RECIDIVA SEGÚN CATEGORÍA TG	• CIS	7 (77,78)	43,79 – 96,09	
	• T1G1	10 (50,00)	28,86 – 71,13	
	• T1G2	55 (45,45)	36,74 – 54,38	
	• T1G3	15 (44,12)	28,25 – 60,95	
	• T2aG2	6 (75,00)	38,83 – 95,57	
	• T2aG3	19 (70,37)	51,38 – 85,18	
	• TOTAL	112 (51,14)	44,52 – 57,72	
RECIDIVA SEGÚN CATEGORÍA TG Y Nº TUMORES	T1G1	ÚNICO	8 (50,00)	26,58 – 73,41
		MÚLTIPLE	2 (66,66)	13,20 – 98,33
	T1G2	ÚNICO	22 (30,55)	20,76 – 41,88
		MÚLTIPLE	33 (71,74)	57,52 – 83,29
	T1G3	ÚNICO	6 (40,00)	18,09 – 65,46
		MÚLTIPLE	7 (43,75)	21,54 – 68,05
	T2aG2	ÚNICO	6 (75,00)	38,83 – 95,57
		MÚLTIPLE	-----	-----
	T2aG3	ÚNICO	17 (70,83)	50,63 – 86,25
		MÚLTIPLE	2 (66,66)	13,20 – 98,33
	TOTAL	ÚNICO	60 (43,79)	35,66 – 52,19
		MÚLTIPLE	45 (65,22)	53,45 – 75,73

Se detectó recidiva tumoral en 7 pacientes con carcinoma in situ, lo cual representa un 77,78%, así como en 19 pacientes (70,37%) encuadrados en la categoría T2aG3. Estas cifras contrastan con la recidiva observada en el estadio T1, que se produjo en 55 casos de la categoría T1G2, afectando al 45,45% de los pacientes de esta categoría.

B. Características clínicas y anatómicas de las recidivas tumorales:

La cifra total de pacientes que presentaron recidiva tumoral fue de 112 (51,14%). En 47 pacientes (41,96%) se diagnosticó sólo una recidiva durante el tiempo de seguimiento; 31 pacientes (27,67%) presentaron dos recidivas; y 14 pacientes (12,50%) presentaron tres recidivas. El número de pacientes fue disminuyendo progresivamente con cada recidiva, siendo siete el número máximo de recidivas detectadas en los pacientes del estudio.

En 102 pacientes (46,57%) no se diagnosticó ninguna recidiva, durante todo el período de seguimiento; en los 5 pacientes restantes (2,28%) se desconoce, por diversos motivos, si tuvo lugar alguna recidiva.

Un total de 70 pacientes (62,50%) presentaron un primer episodio de recidiva tumoral, en la misma región vesical donde se diagnosticó el tumor primario, mientras que 21 pacientes (18,75%), desarrollaron su primera recidiva en un área de la vejiga diferente a la del tumor primario. En los 21 pacientes restantes (18,75%), que presentaron al menos una recidiva tumoral, no se pudo determinar la localización exacta de este primer episodio recidivante.

En la Tabla 8 se pueden observar, de manera resumida, algunos aspectos relacionados con la recidiva, clasificados según su frecuencia y su 95% I.C..

5.1.8.3. Progresión de las categorías T y M, en función del estadio clínico del tumor:

Los tumores en estadio T2a y el carcinoma in situ, son los que mostraron una probabilidad más elevada de desarrollar progresión tumoral, a expensas de un incremento en la categoría T, en la M, o en ambas.

TABLA 9: PROGRESIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA, EN FUNCIÓN DEL ESTADIO CLÍNICO DEL TUMOR.

PROGRESIÓN CLÍNICA								
	CATEGORÍA T		CATEGORÍA M		CATEGORÍAS T + M		TOTAL PROGRESIÓN	
	FREC. (%)	95% I.C.	FREC. (%)	95% I.C.	FREC. (%)	95% I.C.	FREC. (%)	95% I.C.
CIS *	4 (44,44%)	16,04 – 75,95	1 (11,11%)	0,55 – 43,86	1 (11,11%)	0,55 – 43,86	4 (44,44%)	16,04 – 75,95
T1G1	3 (15,00%)	3,96 – 35,61	1 (5,00%)	0,25 – 22,28	1 (5,00%)	0,25 – 22,28	3 (15,00%)	3,96 – 35,61
T1G2	22 (18,18%)	12,06 – 25,81	12 (9,91%)	5,48 – 16,25	12 (9,91%)	5,48 – 16,25	24 (19,83%)	13,45 – 27,65
T1G3	9 (26,47%)	13,75 – 43,05	4 (11,76%)	3,85 – 25,98	4 (11,76%)	3,85 – 25,98	10 (29,41%)	16,01 – 46,19
T2aG2	2 (25,00%)	4,42 – 61,16	1 (12,50%)	0,62 – 48,02	0 (0,00%)	0,00 – 31,23	3 (37,50%)	10,56 – 72,20
T2aG3	13 (48,14%)	29,98 – 66,69	7 (25,92%)	12,10 – 44,67	6 (22,22%)	9,53 – 40,60	15 (55,55%)	36,73 – 73,24

* (Carcinoma in situ)

En el grupo de tumores T2aG3, 15 pacientes (55,55%) desarrollaron progresión tumoral; 13 de ellos (48,14%) presentaron progresión de la categoría T; 7 (25,92%) presentaron progresión en la categoría M; y por último, 6 pacientes (22,22%) desarrollaron una progresión en ambas categorías.

Entre los pacientes con carcinoma in situ, se detectó progresión tumoral en 4 de ellos (44,44%). En las 4 ocasiones (44,44%), esta progresión se produjo en la categoría T; siendo 1 de ellas (11,11%) una progresión de la categoría T y de la M.

Entre los tumores clasificados dentro del estadio T1, fueron los T1G3 los que presentaron una mayor frecuencia de progresión (29,41%).

En la Tabla 9 se puede observar de manera detallada, la frecuencia con la que los distintos grupos de tumores, desarrollan progresión de las categorías T y M.

5.2. Estudio de supervivencia:

En este estudio se consideraron dos tipos diferentes de supervivencia, tanto en el análisis univariado como en el multivariado:

- Supervivencia general: Aquella supervivencia en la que el evento muerte, describe todas las muertes acontecidas durante el seguimiento de los pacientes, se hallen relacionadas o no con el cáncer de vejiga.
- Supervivencia cáncer-relacionada: Para estudiar este tipo de supervivencia, sólo se consideran aquellas muertes ocasionadas por el cáncer de vejiga.

En el análisis de supervivencia, tanto en su forma univariada, como multivariada, se han considerado solamente los tumores pertenecientes a las categorías T1 y T2a. Los pacientes con carcinoma in situ se han analizado independientemente.

5.2.1. Análisis univariado:

La supervivencia general del carcinoma de células transicionales de vejiga, en estadios T1 y T2a, tras un período de seguimiento de 5 años (60 meses), fue del 68,48%. La supervivencia observada a los 12 años (144 meses) de seguimiento fue del 46,62%.

Si consideramos como muerte, solamente aquellas atribuibles al cáncer vesical, la supervivencia cáncer-relacionada a los 5 años (60 meses) de seguimiento, fue del 82,96%, mientras que la supervivencia cáncer-relacionada encontrada a los 12 años de seguimiento fue del 74,78%. Es importante señalar que a partir de los 9 años de seguimiento no se produjo ninguna muerte atribuible al cáncer de vejiga.

En la Tabla 10 se puede observar la probabilidad de supervivencia general y cáncer-relacionada, al final del seguimiento, así como las cifras de supervivencia intermedias.

Teniendo en cuenta solamente los tumores de la categoría T1, la supervivencia general observada a los 5 años fue del 75,60%, y a los 12 años, del 53,14%.

La supervivencia cáncer-relacionada a los 5 años fue del 89,51%, y a los 12 años de seguimiento, del 80,68%.

TABLA 10: PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA GENERAL Y CÁNCER-RELACIONADA DEL CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA (T1 Y T2a).

MESES DE SEGUIMIENTO	PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA	
	GENERAL	CÁNCER-RELACIONADA
12	92,86%	96,11%
24	86,19%	91,65%
36	79,49%	88,03%
48	71,83%	84,67%
60	68,48%	82,96%
72	65,61%	81,80%
84	59,67%	79,36%
96	55,83%	78,57%
108	51,81%	74,78%
120	48,04%	
132	46,62%	
144	46,62%	74,78%

5.2.1.1. Supervivencia cáncer-relacionada:

El análisis univariado realizado mediante la metodología Kaplan-Meier, utilizando variables epidemiológicas, clínicas y topográficas, mostró unas cifras de supervivencia cáncer-relacionada al cabo de uno, 5 y 12 años, que se observan reflejadas en la Tabla 11.

Si consideramos solamente aquellos tumores pertenecientes a la categoría T1, la variable número de neoformaciones vesicales, muestra una relación estadísticamente significativa con la supervivencia (Test Log rank = 4,62; $p = 0,0316$), mientras que la categoría TG pierde su significación estadística (Test Log rank = 4,47; $p = 0,1069$). Del mismo modo, pierden su significación las variables tamaño tumoral (Test Log rank = 3,27; $p = 0,0704$), y clínica de presentación (Test Log rank = 1,93; $p = 0,1648$). La localización tumoral (cara anterior vs. otra localización) (Test Log rank = 0,00; $p = 0,9970$), la localización de la primera recidiva (Test Log rank = 2,33; $p = 0,1265$), el sexo (Test Log

rank = 0,75; $p = 0,3876$), el hábito tabáquico (Test Log rank = 3,72; $p = 0,0536$), y la duración de los síntomas (Test Log rank = 0,12; $p = 0,7267$), que no mostraron relación con la supervivencia en el estudio de todos los tumores, tampoco lo hicieron al considerar el estadio T1 aisladamente.

Sexo, hábito tabáquico, categoría TG (T2aG2 vs. T2aG3), tamaño tumoral y número de tumores, fueron las variables clínico-epidemiológicas estudiadas en los tumores del estadio T2a. Ninguna de estas variables mostró una relación estadísticamente significativa con la supervivencia cáncer-relacionada, en los tumores de esta categoría.

TABLA 11: PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS Y DE SEGUIMIENTO (T1 Y T2a).

VARIABLE		PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
SEXO	HOMBRES	96,53%	84,13%	75,56%	• Log rank = 1,24 • p = 0,2651
	MUJERES	93,84%	76,62%	68,55%	
TABACO	FUMADOR	96,03%	86,24%	77,22%	• Log rank = 2,60 • p = 0,1071
	NO FUMADOR	95,96%	74,85%	67,10%	
ESTADIO CLÍNICO	T1G1	100%	100%	91,67%	• Log rank = 49,16 • p = 0,0000
	T1G2	97,38%	89,67%	82,76%	
	T1G3	100%	82,89%	63,75%	
	T2aG2	100%	62,50%	62,50% (*)	
	T2aG3	79,23%	38,74%	38,74% (**)	
NÚMERO DE TUMORES	UNO	94,65%	83,45%	78,72%	• Log rank = 0,62 • p = 0,4297
	MÁS DE UNO	98,48%	81,93%	66,36%	
TAMAÑO TUMORAL	≤ 3 CM.	98,05%	91,73%	83,75%	• Log rank = 10,21 • p = 0,0014
	> 3 CM.	93,55%	72,85%	63,99%	
CLÍNICA DE PRESENTACIÓN	MACROHEMATURIA ASINTOMÁTICA	96,07%	85,43%	78,67%	• Log rank = 4,53 • p = 0,0334
	SÍNDROME MICCIONAL	95,45%	75,79%	59,94%	
DURACIÓN DE LOS SÍNTOMAS	≤ 6 MESES	96,77%	84,53%	76,41%	• Log rank = 0,90 • p = 0,3441
	> 6 MESES	90,89%	77,83%	68,91%	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	CARA ANTERIOR	90,41%	74,86%	63,35% (**)	• Log rank = 2,46 • p = 0,1170
	OTRA LOCALIZ.	97,46%	85,30%	77,55%	
LOCALIZACIÓN DE LA RECIDIVA (*)	MISMO LUGAR	94,09%	74,38%	61,64%	• Log rank = 1,08 • p = 0,2979
	DISTINTO LUGAR	94,74%	63,16%	50,53% (**)	

(*) Supervivencia a los 10 años.

(**) Supervivencia a los 11 años.

(*) Con respecto al tumor primario.

Los resultados de supervivencia cáncer-relacionada obtenidos, utilizando variables anatomopatológicas, e inmunohistoquímicas, relacionadas con p53 y ki67, se exponen en la tabla 12.

TABLA 12: PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS (T1 Y T2a).

VARIABLE		PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA			◦TEST LOG RANK ◦VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
ASPECTO MACROSCÓPICO	PAPILAR	99,38%	87,42%	79,73%	• Log rank = 19,92 • p = 0,0000
	SÓLIDO	71,48%	51,06%	51,06% (*)	
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	PAPILAR	99,42%	88,68%	80,25%	• Log rank = 36,50 • p = 0,0000
	SÓLIDO	73,78%	46,00%	39,43%	
CATEGORÍA T	CATEGORÍA T1	98,17%	89,51%	80,68%	• Log rank = 37,13 • p = 0,0000
	CATEGORÍA T2a	84,43%	44,59%	44,59% (**)	
GRADO HISTOLÓGICO	GRADO 1	100%	100%	92,37%	• Log rank = 17,48 • p = 0,0002
	GRADO 2	97,55%	87,81%	68,65%	
	GRADO 3	92,37%	68,65%	55,27%	
TAMAÑO NUCLEAR	PEQUEÑO	98,18%	86,32%	84,22%	• Log rank = 18,57 • p = 0,0001
	INTERMEDIO	95,32%	85,33%	76,52%	
	GRANDE	95,24%	58,73%	30,45% (*)	
EXPRESIÓN DE p53	≤ 2%	97,11%	92,98%	89,52%	• Log rank = 20,16 • p = 0,0000
	> 2%	95,08%	72,90%	59,77%	
EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES	≤ 0,2%	98,00%	95,91%	95,91%	• Log rank = 30,46 • p = 0,0000
	0,2 – 2%	96,26%	90,17%	83,81%	
	2 – 14%	100%	80,90%	70,38% (**)	
	> 14%	90,30%	65,09%	47,38%	
INTENSIDAD DE TINCIÓN CON p53	DÉBIL	98,31%	90,96%	75,56% (**)	• Log rank = 8,88 • p = 0,0118
	INTERMEDIA	91,88%	78,98%	78,98%	
	MÁXIMA	95,08%	67,05%	56,07%	
EXPRESIÓN DE ki67	≤ 12%	98,08%	92,92%	89,22%	• Log rank = 12,74 • p = 0,0004
	> 12%	94,09%	72,39%	64,81%	
EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES	≤ 5%	98,11%	96,11%	91,29%	• Log rank = 20,71 • p = 0,0001
	5 – 12%	98,08%	89,54%	76,97%	
	12 – 27%	94,03%	78,88%	76,56%	
	> 27%	94,15%	65,85%	57,95%	
INTENSIDAD DE TINCIÓN CON ki67	DÉBIL	100%	100%	100% (**)	• Log rank = 3,64 • p = 0,1619
	INTERMEDIA	100%	95,00%	89,06%	
	MÁXIMA	96,00%	81,28%	72,46%	

(*) Supervivencia a los 9 años.

(**) Supervivencia a los 11 años.

Cuando realizamos el estudio considerando solamente los tumores en estadio T1, se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia, para la variable tamaño del núcleo celular (Test Log rank = 17,72; $p = 0,0001$), y morfología microscópica (Test Log rank = 6,74; $p = 0,0094$), mientras que las variables grado de malignidad histológica (Test Log rank = 4,47; $p = 0,1069$) y aspecto macroscópico del tumor (Test Log rank = 0,00; $p = 0,9686$), pierden su significación estadística.

El aspecto macroscópico de la lesión tumoral, muestra una relación estadísticamente significativa (Test Log rank = 4,08; $p = 0,0433$) con la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada, en el estadio T2a. Para las variables grado histológico (Test Log rank = 1,73; $p = 0,1878$), morfología microscópica (Test Log rank = 1,08; $p = 0,2990$) y tamaño nuclear (Test Log rank = 0,36; $p = 0,8337$), no se observa una relación significativa con la supervivencia, en dicho estadio clínico.

TABLA 13: PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA EN EL ESTADIO T1, AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS.

VARIABLE		PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
EXPRESIÓN DE p53	≤ 2%	98,90%	96,52%	94,70%	• Log rank = 20,71 • p = 0,0000
	> 2%	97,24%	80,92%	62,92%	
EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES	≤ 0,2%	97,83%	97,83%	97,83%	• Log rank = 28,41 • p = 0,0000
	0,2 – 2%	100%	95,22%	91,82%	
	2 – 14%	100%	84,95%	72,85% (*)	
	> 14%	93,44%	75,30%	41,42%	
EXPRESIÓN DE ki67	≤ 12%	98,90%	95,28%	87,54%	• Log rank = 6,89 • p = 0,0087
	> 12%	97,26%	82,24%	71,92%	
EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES	≤ 5%	98,04%	95,95%	91,09%	• Log rank = 13,56 • p = 0,0036
	5 – 12%	100%	94,20%	82,65%	
	12 – 27%	95,06%	86,91%	84,11%	
	> 27%	100%	76,14%	55,47%	

(*) Supervivencia a los 11 años.

Si tenemos en cuenta sólo los tumores vesicales clasificados como T1, observamos que tanto la expresión de la proteína p53 en cuartiles (Test Log rank = 28,41; $p = 0,0000$), como la expresión de ki67 en cuartiles (Test Log rank = 13,56; $p = 0,0036$),

siguen manteniendo una relación estadísticamente significativa con la supervivencia cáncer-relacionada. Los resultados de las variables inmunohistoquímicas en el estadio T1, se exponen en la Tabla 13.

Considerando aisladamente los tumores de la categoría T2a, comprobamos que, no sólo no existe una relación estadísticamente significativa, entre porcentaje de expresión nuclear de p53 (Test Log rank = 2,90; $p = 0,4069$) y ki67 (Test Log rank = 0,80; $p = 0,6715$) y la supervivencia cáncer-relacionada del paciente, sino que los distintos intervalos, conformados por los cuartiles de ambos marcadores, se entrecruzan entre sí en la representación gráfica de Kaplan-Meier y se distribuyen de manera anárquica, sin sentido clínico.

El resto de las variables inmunohistoquímicas analizadas para la categoría T2a: expresión de p53 (\leq ó $> 2\%$), expresión de ki67 (\leq ó $> 12\%$), intensidad de tinción con p53, e intensidad de tinción con ki67, no mostraron relación alguna con la supervivencia cáncer-relacionada, en el estadio T2a.

El análisis de supervivencia cáncer-relacionada de los pacientes con carcinoma in situ, no permite medir diferencias entre grupos, debido al reducido número de pacientes.

Merece la pena destacar, por la elevada significación estadística alcanzada en el estudio univariado de supervivencia cáncer-relacionada, y su gran importancia clínica, algunas variables como, el estadio clínico del tumor, la expresión de p53 en cuartiles y la expresión de ki67 en cuartiles. A continuación se muestra la representación gráfica de dichas variables, pudiéndose observar en todas ellas un efecto “dosis-respuesta” muy llamativo (Figuras 7, 8 y 9).

FIGURA 7: PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA EN FUNCIÓN DE LA CATEGORÍA TG

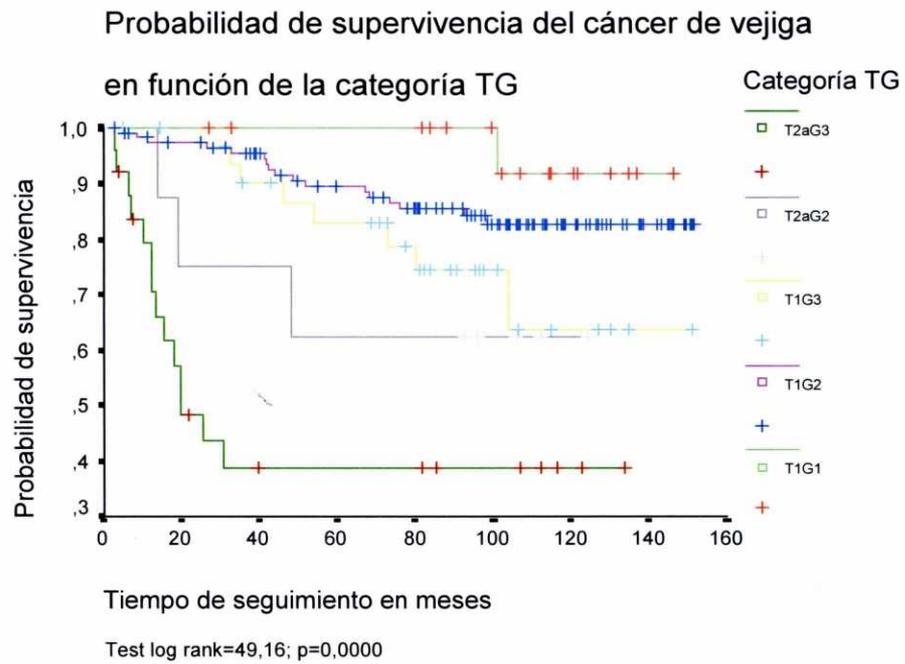


FIGURA 8: PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES.

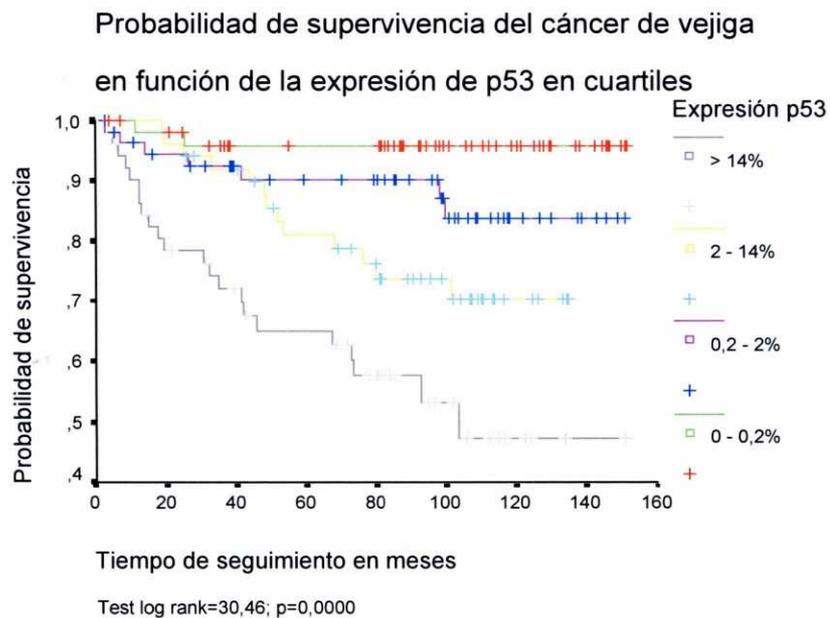
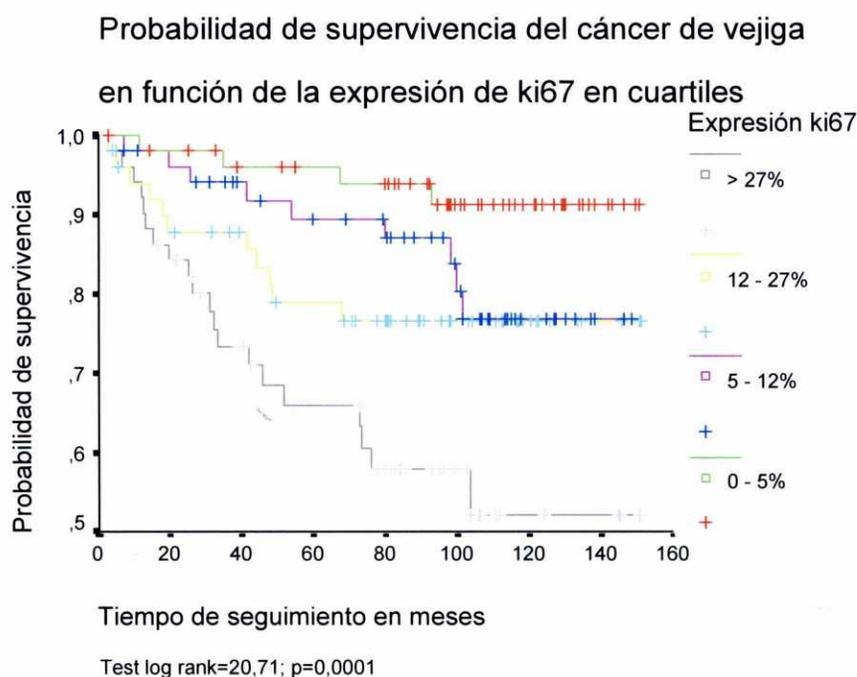


FIGURA 9: PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES.



5.2.1.2. Supervivencia general:

Para el estudio de este tipo de supervivencia, se realizó un análisis univariado mediante la metodología de Kaplan-Meier.

En la Tabla 14 se expone un listado de aquellas variables que mostraron una influencia estadísticamente significativa, en la supervivencia general de los pacientes con cáncer de vejiga.

Si para el estudio univariado, consideramos solamente los tumores pertenecientes al estadio T1, observamos que las variables que modifican de manera significativa la supervivencia general de los pacientes son: número de tumores vesicales (Test Log rank = 5,64; p = 0,0175); tamaño del núcleo celular (Test Log rank = 12,76; p = 0,0017); expresión de p53 (\leq ó $>$ 2%) (Test Log rank = 12,13; p = 0,0005); expresión de p53 en cuartiles (Test Log rank = 18,22; p = 0,0004); expresión de ki67 (\leq ó $>$ 12%) (Test Log rank = 9,08; p = 0,0026); y por último, expresión de ki67 en cuartiles (Test Log rank = 12,07; p = 0,0072).

En el análisis univariado de supervivencia general, efectuado con los tumores del estadio T2a, ninguna de las variables analizadas, modificaba la supervivencia de manera estadísticamente significativa.

TABLA 14: VARIABLES QUE MUESTRAN UNA RELACIÓN ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA CON LA PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA GENERAL (T1 Y T2a).

VARIABLE		PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA GENERAL			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
TAMAÑO TUMORAL	≤ 3 CM.	96,15%	77,88%	61,34%	• Log rank = 11,42 • p = 0,0007
	> 3 CM.	88,54%	60,42%	32,70%	
ESTADIO CLÍNICO	T1G1	100%	88,89%	76,05%	• Log rank = 39,74 • p = 0,0000
	T1G2	94,02%	75,21%	53,07%	
	T1G3	96,97%	69,70%	40,48%	
	T2aG2	100%	57,14%	42,86% (*)	
	T2aG3	73,08%	30,77%	17,58% (**)	
ASPECTO MACROSCÓPICO	PAPILAR	96,97%	73,94%	52,76%	• Log rank = 18,98 • p = 0,0000
	SÓLIDO	60,87%	39,13%	18,55% (*)	
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	PAPILAR	96,57%	74,29%	51,98%	• Log rank = 18,00 • p = 0,0000
	SÓLIDO	67,86%	39,29%	23,95%	
CATEGORÍA T	CATEGORÍA T1	95,24%	75,60%	53,14%	• Log rank = 22,70 • p = 0,0000
	CATEGORÍA T2a	78,79%	36,36%	22,31% (**)	
GRADO HISTOLÓGICO	GRADO 1	100%	88,89%	76,05%	• Log rank = 21,64 • p = 0,0000
	GRADO 2	94,40%	74,40%	52,59%	
	GRADO 3	88,06%	51,87%	25,62%	
TAMAÑO NUCLEAR	PEQUEÑO	94,74%	71,93%	56,23%	• Log rank = 14,26 • p = 0,0008
	INTERMEDIO	93,08%	70,77%	48,17%	
	GRANDE	86,96%	46,20%	0% (*)	
EXPRESIÓN DE p53	≤ 2%	92,52%	73,83%	62,05%	• Log rank = 12,83 • p = 0,0003
	> 2%	93,20%	62,88%	27,96%	
EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES	≤ 0,2%	94,23%	76,92%	68,98%	• Log rank = 21,42 • p = 0,0001
	0,2 – 2%	90,91%	70,91%	55,92%	
	2 – 14%	98,00%	73,57%	32,98% (*)	
	> 14%	86,79%	52,83%	24,15%	
EXPRESIÓN DE ki67	≤ 12%	95,28%	78,30%	56,77%	• Log rank = 14,00 • p = 0,0002
	> 12%	90,38%	58,41%	36,37%	
EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES	≤ 5%	96,30%	83,33%	71,62%	• Log rank = 20,32 • p = 0,0001
	5 – 12%	94,23%	73,08%	41,42%	
	12 – 27%	88,46%	65,38%	43,80%	
	> 27%	92,31%	51,32%	28,50%	

(*) Supervivencia a los 10 años.

(**) Supervivencia a los 11 años.

5.2.2. Análisis multivariado:

5.2.2.1. Supervivencia cáncer-relacionada:

Se realizó un estudio multivariado de supervivencia, mediante análisis de regresión de Cox, de manera escalonada, para determinar que variables predecían la mortalidad cáncer-relacionada.

Efectuando una análisis de regresión de Cox, para predecir mortalidad, ajustando por sexo, edad, expresión de p53 en cuartiles, y expresión de ki67 en cuartiles, se observó que la edad (RR = 1,06; p = 0,0013), la expresión de p53 (p = 0,0128), la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 5,18; p = 0,0371), y la expresión de p53 > 14% (RR = 9,77; p = 0,0036), predecían de manera significativa la mortalidad cáncer-relacionada, de los pacientes con carcinoma de células transicionales de vejiga. La expresión de ki67 > 27% presenta un RR de 2,92, pero no muestra significación estadística, aunque se halla muy próxima a la misma (p = 0,0725).

Si añadimos la variable categórica, estadio clínico (categoría TG), al análisis de regresión de Cox; las covariables que muestran capacidad para predecir mortalidad cáncer-relacionada, son la edad (RR = 1,06; p = 0,0034), la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 5,14; p = 0,0400), y la expresión de p53 > 14% (RR = 6,49; p = 0,0248). La expresión de ki67 > 27% muestra un RR de 2,12, pero no presenta significación estadística (p = 0,2359). Dentro de la variable categoría TG, es importante hacer mención de la categoría tumoral T2aG3, que aunque no presenta influencia estadísticamente significativa en la supervivencia (p = 0,2639), presenta un riesgo relativo (RR) de 3,59.

Posteriormente hemos efectuado un análisis de regresión de Cox, considerando todas aquellas variables, que de manera clásica han sido involucradas en el pronóstico de supervivencia del carcinoma de células transicionales de vejiga: edad, sexo, estadio clínico, tamaño tumoral (>3 cm vs. ≤3 cm), número de tumores vesicales, aspecto macroscópico de la lesión y morfología microscópica del tumor; y hemos añadido al estudio, dos variables inmunohistoquímicas: expresión nuclear de p53 en cuartiles y expresión nuclear de ki67 en cuartiles.

Como resultado hemos observado, que la edad (RR = 1,05; p = 0,0130), la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 6,66; p = 0,0194), y la expresión de p53 > 14% (RR = 7,71; p = 0,0197), son las variables que predicen de modo significativo la mortalidad cáncer-relacionada. Destaca, por otra parte, la multifocalidad tumoral, que se encuentra muy próxima a la significación estadística (RR = 2,49; p = 0,0585), y la morfología microscópica sólida, que aunque no alcanza significación (p = 0,0941), presenta un RR de 3,80. Los resultados generales, obtenidos por este conjunto de variables quedan reflejados en la Tabla 15.

TABLA 15: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX PARA PREDECIR MORTALIDAD CÁNCER-RELACIONADA EN LOS ESTADIOS T1 Y T2a, CONTROLANDO POR EDAD, SEXO, CATEGORÍA TG, TAMAÑO TUMORAL, NÚMERO DE TUMORES, ASPECTO MACROSCÓPICO, MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES Y EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES.

VARIABLE	RR	95% IC	p
SEXO (♀ / ♂)	1,84	0,72 – 4,70	0,2037
EDAD	1,05	1,01 – 1,10	0,0130
CATEGORÍA TG	---	---	0,9053
T1G1	1	---	---
T1G2	0,73	0,08 – 6,42	0,7836
T1G3	1,12	0,10 – 6,99	0,7617
T2aG2	1,20	0,12 – 14,88	0,8857
T2aG3	1,50	0,16 – 21,57	0,7654
Nº TUMORES (más de uno / uno)	2,49	0,97 – 6,41	0,0585
TAMAÑO TUMORAL (>3 / ≤3 cm)	1,81	0,74 – 4,40	0,1898
ASPECTO MACROSCÓPICO (sólido / papilar)	1,34	0,47 – 3,85	0,5833
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (sólido / papilar)	3,80	0,79 – 18,14	0,0941
EXPRESIÓN DE p53	---	---	0,0946
0 – 0,2%	1	---	---
0,2 – 2%	3,89	0,72 – 20,95	0,1131
2 – 14%	6,66	1,36 – 32,72	0,0194
> 14%	7,71	1,38 – 42,96	0,0197
EXPRESIÓN DE Ki67	---	---	0,8686
0 – 5%	1	---	---
5 – 12%	0,79	0,20 – 3,01	0,7307
12 – 27%	1,17	0,33 – 4,10	0,8034
> 27%	1,17	0,31 – 4,42	0,8115

Se realizó un análisis de regresión de Cox, prescindiendo de la variable categoría TG, y utilizando en su lugar las variables categoría T (T1 vs. T2a) y grado histológico (G1, G2, G3). Se ajustó por sexo, edad, categoría T, grado histológico, tamaño tumoral (>3 cm vs. ≤3 cm), número de tumores (más de uno / uno), aspecto macroscópico, morfología microscópica, expresión de p53 en cuartiles, y expresión de ki67 en cuartiles. Según este análisis, las variables que predicen de manera independiente la supervivencia cáncer-relacionada son: edad (RR = 1,05; p = 0,0114); expresión de p53 entre 2-14% (RR = 6,74; p = 0,0186); y expresión de p53 >14% (RR = 8,06; p = 0,0157). El grado histológico (p = 0,9545) y la categoría T (p = 0,3446), no muestran relación significativa con la supervivencia cáncer-relacionada, como ocurría antes de dividir categoría TG en dos variables. Si recodificamos la variable grado en dos grupos (grupo 1: G1 y G2; grupo 2: G3), y posteriormente realizamos un análisis de regresión de Cox, ajustando por las mismas variables, la categoría T y el grado histológico, siguen sin mostrar influencia significativa en la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada.

Se efectuó un análisis de regresión de Cox, considerando solamente aquellos tumores pertenecientes a la categoría T1, para determinar qué variables podían ser utilizadas para predecir mortalidad cáncer-relacionada, en esta categoría tumoral. Se realizó el análisis controlando por un número progresivo de variables, que se pensó, podrían estar en relación con la mortalidad cáncer-relacionada de los pacientes encuadrados en el estadio T1.

Uno de los análisis de regresión de Cox, realizados en el estadio T1, se llevó a cabo controlando por las variables: edad, sexo, categoría TG (sólo las diversas categorías de T1), número de tumores vesicales (más de uno / uno), tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles. Las variables que mostraron capacidad para predecir mortalidad cáncer-relacionada en T1 fueron: edad (RR = 1,07; p = 0,0263), tamaño tumoral >3 cm (RR = 3,37; p = 0,0180), morfología microscópica sólida (RR = 40,99; p = 0,0009), expresión de p53 (p = 0,0053), expresión de p53 entre 2-14% (RR = 21,66; p = 0,0092) y expresión de p53 > 14% (RR = 41,84; p = 0,0022). Merece la pena reseñar la variable sexo, que aunque no alcanza el nivel de la significación estadística,

presenta un RR de 2,27 (mujer-hombre), el más elevado de todos los hallados en el estudio, para esta variable. Las demás variables analizadas no exhibieron capacidad para predecir la mortalidad cáncer-relacionada, de manera estadísticamente significativa. Estos resultados se pueden ver recogidos en la Tabla 16.

TABLA 16: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX PARA PREDECIR MORTALIDAD CÁNCER-RELACIONADA EN EL ESTADIO T1, CONTROLANDO POR EDAD, SEXO, CATEGORÍA TG, TAMAÑO TUMORAL, NÚMERO DE TUMORES, ASPECTO MACROSCÓPICO, MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES Y EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES.

VARIABLE	RR	95% IC	p
SEXO (♀ / ♂)	2,27	0,68 – 7,57	0,1818
EDAD	1,07	1,01 – 1,14	0,0263
CATEGORÍA TG	---	---	0,8137
T1G1	1	---	---
T1G2	0,63	0,09 – 5,20	0,5874
T1G3	1,07	0,10 – 5,28	0,4231
Nº TUMORES (más de uno / uno)	2,49	0,89 – 6,96	0,0808
TAMAÑO TUMORAL (>3 / ≤3 cm)	3,37	1,23 – 9,25	0,0180
ASPECTO MACROSCÓPICO (sólido / papilar)	0,33	0,02 – 4,30	0,4009
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (sólido / papilar)	40,99	4,58 – 366,67	0,0009
EXPRESIÓN DE p53	---	---	0,0053
0 – 0,2%	1	---	---
0,2 – 2%	4,82	0,45 – 52,02	0,1945
2 – 14%	21,66	2,14 – 218,90	0,0092
> 14%	41,84	3,84 – 455,26	0,0022
EXPRESIÓN DE Ki67	---	---	0,5326
0 – 5%	1	---	---
5 – 12%	0,63	0,15 – 2,68	0,5351
12 – 27%	0,49	0,11 – 2,17	0,3504
> 27%	1,17	0,30 – 4,53	0,8143

Cuando se efectuó un análisis de regresión de Cox en los tumores del estadio T2a, controlando por las variables: edad, sexo, categoría TG (T2aG2 vs. T2aG3), tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles; se observó que la edad (RR = 1,07; p = 0,0432), y la categoría T2aG3 (RR = 10,91; p =

0,0182), eran las únicas variables con capacidad para pronosticar la mortalidad cáncer-relacionada de manera estadísticamente significativa, en el estadio T2a.

5.2.1.2. Supervivencia general:

Para estudiar la supervivencia general del cáncer de vejiga, hemos efectuado un análisis de regresión de Cox, considerando las variables: edad, sexo, estadio clínico, tamaño tumoral (>3 cm vs. ≤3 cm), número de tumores vesicales (más de uno / uno), aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, expresión nuclear de p53 en cuartiles y expresión nuclear de ki67 en cuartiles.

Como resultado hemos observado, que solamente la edad muestra una relación estadísticamente significativa con la supervivencia ($p = 0,0000$). Destacan, por otra parte, la categoría tumoral T2aG3, que aunque tiene un valor de $p = 0,3377$, presenta un RR de 1,87; la expresión nuclear de ki67 > 27%, con un RR de 2,05 y una $p = 0,0708$; y por último, el tamaño tumoral >3 cm, que se halla cercano a la significación estadística ($p = 0,0543$; RR = 1,63) . Los resultados generales, obtenidos por este conjunto de variables quedan reflejados en la Tabla 17.

Posteriormente se efectuó un análisis de regresión de Cox, considerando solamente aquellos tumores pertenecientes al estadio T1, para determinar qué variables pueden ser utilizadas en la predicción de mortalidad, en esta categoría tumoral. Se realizó el análisis controlando por un número progresivo de variables, que se pensó, podrían estar en relación con la mortalidad general de los pacientes encuadrados en el estadio T1.

Uno de los análisis de regresión de Cox, realizados en el estadio T1, se llevó a cabo controlando por las variables: edad, sexo, estadio clínico (sólo las diversas categorías de T1), número de tumores vesicales (más de uno / uno), tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles. En este análisis la expresión de p53 > 14% probó su capacidad para predecir la mortalidad, de manera estadísticamente significativa (RR = 3,44; $p = 0,0093$); dicha capacidad también fue observada en la variable edad (RR = 1,08; $p = 0,0000$), y en la variable tamaño tumoral >3 cm (RR = 1,88; $p =$

0,0260). Las demás variables analizadas no exhibieron capacidad para predecir la mortalidad, de manera estadísticamente significativa; aunque la expresión de p53 considerada globalmente ($p = 0,0654$), se encontró al borde de dicha significación.

TABLA 17: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX PARA PREDECIR MORTALIDAD GENERAL EN LOS ESTADIOS T1 Y T2a, CONTROLANDO POR SEXO, EDAD, CATEGORÍA TG, TAMAÑO TUMORAL, NÚMERO DE TUMORES VESICALES, MORFOLOGÍA MACRO Y MICROSCÓPICA, Y EXPRESIÓN DE p53 Y ki67 EN CUARTILES.

VARIABLE	RR	95% IC	P
SEXO (♀ / ♂)	0,98	0,53 – 1,81	0,9486
EDAD	1,06	1,04 – 1,09	0,0000
CATEGORÍA TG	---	---	0,3041
T1G1	1	---	---
T1G2	1,02	0,35 – 2,99	0,9609
T1G3	0,86	0,26 – 2,86	0,8132
T2aG2	0,72	0,16 – 3,25	0,6716
T2aG3	1,87	0,52 – 6,77	0,3377
TAMAÑO TUMORAL (>3 / ≤3 cm)	1,63	0,99 – 2,69	0,0543
Nº TUMORES (más de uno / uno)	1,07	0,66 – 1,74	0,7811
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (sólido / papilar)	1,43	0,48 – 4,27	0,5163
ASPECTO MACROSCÓPICO (sólido / papilar)	1,65	0,80 – 3,43	0,1740
EXPRESIÓN DE p53	---	---	0,6526
0 – 0,2%	1	---	---
0,2 – 2%	1,29	0,62 – 2,66	0,4887
2 – 14%	1,20	0,59 – 2,42	0,6111
> 14%	1,66	0,73 – 3,77	0,2201
EXPRESIÓN DE Ki67	---	---	0,3139
0 – 5%	1	---	---
5 – 12%	1,59	0,77 – 3,32	0,2094
12 – 27%	1,41	0,68 – 2,91	0,3489
> 27%	2,05	0,94 – 4,46	0,0708

Se realizó un estudio de supervivencia, considerando solamente los tumores pertenecientes al estadio T2a, para determinar que variables podían ser útiles para predecir la mortalidad en este estadio clínico. Para ello se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox, incluyendo un número progresivo de variables en el estudio.

Cuando se efectuó un análisis de regresión de Cox en los tumores del estadio T2a, controlando por las variables: edad, sexo, categoría TG (T2aG2 vs. T2aG3), tamaño

tumoral ($>3 / \leq 3$ cm), expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles; se observó que la categoría T2aG3 (RR = 8,47; $p = 0,0057$) era la única variable con capacidad para pronosticar la mortalidad, de manera estadísticamente significativa, en el estadio T2a.

En la Tabla 17A podemos observar todas las variables que muestran una asociación independiente con la supervivencia cáncer-relacionada y la supervivencia general, en cada uno de los grupos analizados.

TABLA 17A: VARIABLES INDEPENDIENTES DE SUPERVIVENCIA.

	VARIABLES INDEPENDIENTES	RR	95% IC	p
SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA				
ESTADIOS T1 y T2a	EDAD	1,05	1,01 – 1,10	0,0130
	EXPRESIÓN p53 2-14%	6,66	1,36 – 32,72	0,0194
	EXPRESIÓN p53 >14%	7,71	1,38 – 42,96	0,0197
ESTADIO T1	EDAD	1,07	1,01 – 1,14	0,0263
	TAMAÑO TUMORAL > 3 cm	3,37	1,23 – 9,25	0,0180
	MORFOL. MICROSC. SÓLIDA	40,99	4,58 – 366,67	0,0009
	EXPRESIÓN p53	---	---	0,0053
	EXPRESIÓN p53 2-14%	21,66	2,14 – 218,90	0,0092
	EXPRESIÓN p53 >14%	41,84	3,84 – 455,26	0,0022
ESTADIO T2a	EDAD	1,07	1,00 – 1,15	0,0432
	GRADO HISTOLÓGICO 3	10,91	1,50 – 79,40	0,0182
SUPERVIVENCIA GENERAL				
ESTADIOS T1 y T2a	EDAD	1,06	1,04 – 1,09	0,0000
ESTADIO T1	EDAD	1,08	1,04 – 1,12	0,0000
	TAMAÑO TUMORAL > 3 cm	1,88	1,08 – 3,29	0,0260
	EXPRESIÓN p53 >14%	3,44	1,35 – 8,72	0,0093
ESTADIO T2a	GRADO HISTOLÓGICO 3	8,47	1,86 – 38,63	0,0057

5.2.3. Curvas ROC de supervivencia cáncer-relacionada:

Se realizaron curvas ROC para predecir supervivencia cáncer-relacionada en los diferentes estadios clínicos del tumor, en función de los valores de p53 y ki67. Asimismo, se calculó el área existente bajo cada una de las curvas ROC, para conocer la capacidad de p53 y ki67 a la hora de predecir mortalidad cáncer-relacionada.

- El área observada bajo la curva de p53 en los diferentes estadios clínicos, fue la siguiente: tumores pertenecientes al estadio T1: área = 0,799;

categoría T1G1: 0,899; categoría T1G2: 0,818; categoría T1G3: 0,575; categoría T2aG2: 0,600; categoría T2aG3: 0,675; categoría CIS: 0,375.

- En el caso de ki67, se encontraron las siguientes áreas, bajo las curvas obtenidas en cada uno de los estadios: tumores pertenecientes al estadio T1: 0,704; categoría T1G1: 0,611; categoría T1G2: 0,713; categoría T1G3: 0,635; categoría T2aG2: 0,467; categoría T2aG3: 0,604; categoría CIS: 0,250.

En las Figuras 10 y 11 se pueden observar las curvas ROC de p53 y ki67 para predecir supervivencia cáncer-relacionada en el estadio T1 y en la categoría T1G2. Ambas variables se representan conjuntamente, con el propósito de facilitar la comparación entre las mismas.

FIGURA 10: CURVA ROC DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA EN EL ESTADIO T1.

Curva ROC de p53 y ki67 para predecir supervivencia cáncer-relacionada en el estadio T1

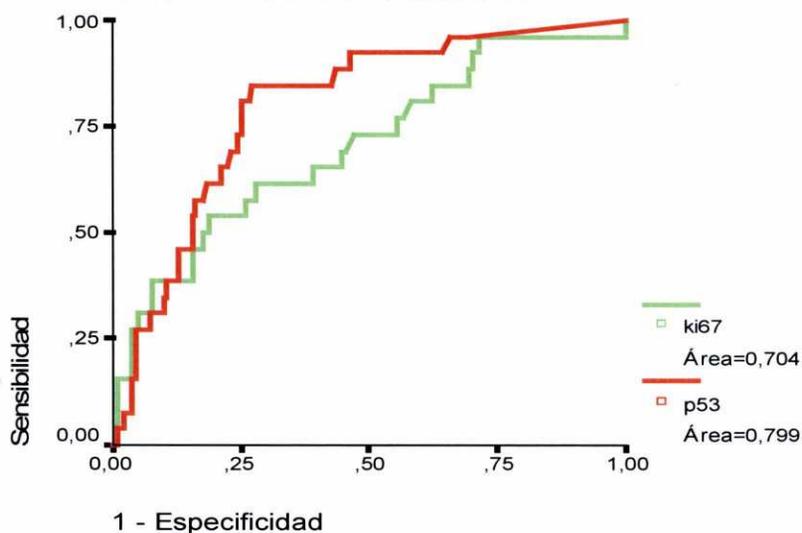
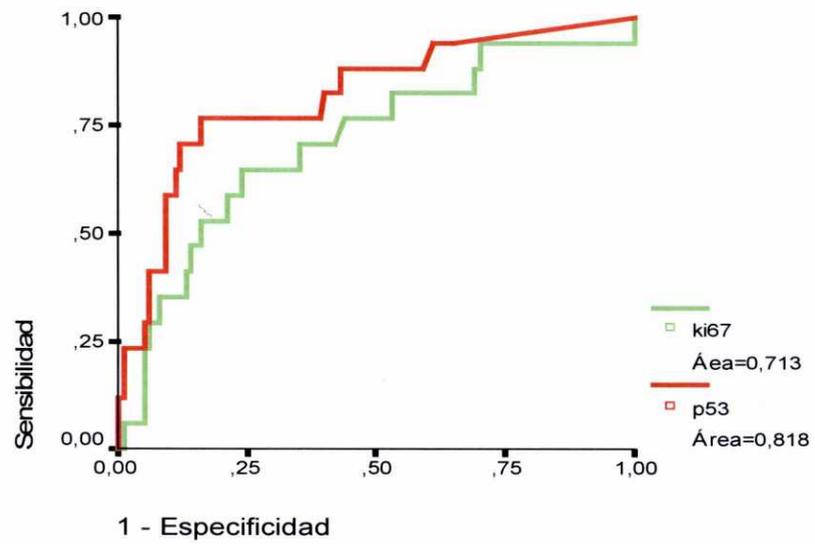


FIGURA 11: CURVA ROC DE SUPERVIVENCIA CÁNCER-RELACIONADA EN LA CATEGORÍA T1G2.

Curva ROC de p53 y ki67 para predecir supervivencia cáncer-relacionada en la categoría T1G2



5.3. Estudio de recidiva:

El estudio de recidiva se realizó, tanto en su forma univariada, como multivariada, considerando los estadios T1 y T2a de forma conjunta. Los casos de carcinoma in situ fueron analizados de manera independiente.

5.3.1. Análisis univariado:

La probabilidad de ausencia de recidiva de los pacientes con tumores T1 y T2a, al cabo de 5 años (60 meses) de seguimiento fue del 51,80%, y tras 12 años (144 meses), del 42,71%. Considerando solamente los pacientes en estadio T1, el porcentaje de pacientes que no presentaron recidiva al cabo de 12 años, fue de 48,47%.

A partir de los 9 años de seguimiento, no se desarrolla recidiva en ningún paciente, tanto si consideramos los tumores del estadio T1, como si consideramos los estadios T1 y T2a conjuntamente.

Se realizó el estudio univariado de recidiva, utilizando la metodología de Kaplan-Meier. Para este estudio, se emplearon una serie de variables clínico-patológicas e inmunohistoquímicas, y se determinó como influía cada una de ellas por separado, en la probabilidad de ausencia de recidiva.

Las variables clínico-patológicas analizadas se reflejan en la Tabla 18, con sus correspondientes datos de seguimiento al cabo de uno, 5 y 12 años, el test de Log rank y el valor de la "p". Se pueden observar en dicha tabla, todas las variables clínico-patológicas analizadas de manera univariada, demostrándose en la mayoría de ellas una influencia estadísticamente significativa en la probabilidad de ausencia de recidiva.

Merece la pena hacer una especial mención de la probabilidad de ausencia de recidiva, calculada en función del estadio clínico del tumor (Test Log rank = 22,65; $p = 0,0001$), pues se observó que durante los tres primeros años de seguimiento, la probabilidad de recidiva siguió un curso paralelo a la categoría tumoral, siendo esta más baja en la categoría T1G1 y más elevada en T2aG3. A partir del tercer año de seguimiento, esta tendencia sufrió una variación, y aunque los tumores infiltrantes presentaron recidiva en

más ocasiones que los superficiales, entre estos últimos no se produjo una relación lineal, entre el grado histológico y la probabilidad de recidiva, de modo que entre los tumores del estadio clínico T1, fueron los tumores T1G1, los que mayor probabilidad de recidiva mostraron al cabo de 12 años.

TABLA 18: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE RECIDIVA AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS (ESTADIOS T1 Y T2a).

VARIABLE		AUSENCIA DE RECIDIVA			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
ESTADIO CLÍNICO	T1G1	100%	66,80%	42,51%	• Log rank = 22,65 • p = 0,0001
	T1G2	83,59%	55,13%	48,73%	
	T1G3	77,59%	64,66%	52,84%	
	T2aG2	50,00%	50,00%	18,75% (**)	
	T2aG3	56,68%	20,35%	20,35% (****)	
TAMAÑO TUMORAL	≤ 3 CM.	88,29%	61,38%	51,88%	• Log rank = 9,21 • p = 0,0024
	> 3 CM.	70,82%	44,31%	34,77%	
NÚMERO DE TUMORES	UNO	79,69%	61,47%	51,91%	• Log rank = 7,61 • p = 0,0058
	MÁS DE UNO	80,74%	37,89%	28,15%	
ASPECTO MACROSCÓPICO	PAPILAR	83,59%	56,77%	46,78%	• Log rank = 10,45 • p = 0,0012
	SÓLIDO	52,94%	31,76%	26,74% (***)	
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	PAPILAR	83,33%	56,72%	46,50%	• Log rank = 12,73 • p = 0,0004
	SÓLIDO	56,15%	31,58%	27,07%	
CATEGORÍA T	CATEGORÍA T1	83,83%	57,98%	48,47%	• Log rank = 20,31 • p = 0,0000
	CATEGORÍA T2a	54,68%	28,31%	19,81% (****)	
GRADO HISTOLÓGICO	GRADO 1	100%	66,80%	42,51%	• Log rank = 6,54 • p = 0,0380
	GRADO 2	81,41%	54,87%	46,56%	
	GRADO 3	69,62%	42,37%	36,72%	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	CARA ANTERIOR	67,34%	33,39%	21,25%	• Log rank = 13,15 • p = 0,0003
	OTRA LOCALIZ.	82,89%	58,33%	49,46%	
CLÍNICA DE PRESENTACIÓN	MACROHEMATURIA ASINTOMÁTICA	83,41%	57,77%	46,30%	• Log rank = 12,86 • p = 0,0003
	OTRA CLÍNICA	58,71%	27,45%	27,45%	
DURACIÓN DE LOS SÍNTOMAS	≤ 6 MESES	78,99%	54,45%	46,75%	• Log rank = 2,07 • p = 0,1502
	> 6 MESES	79,42%	43,92%	31,06%	
BIOPSIA ALEATORIA	CIS	56,25%	22,50%	00,00% (*)	• Log rank = 10,70 • p = 0,0011
	NO CIS	82,97%	56,40%	47,29%	

(*) Ausencia de recidiva a los 7 años.

(**) Ausencia de recidiva a los 9 años.

(***) Ausencia de recidiva a los 10 años.

(****) Ausencia de recidiva a los 11 años.

El grado histológico mostró una relación estadísticamente significativa con la probabilidad de ausencia de recidiva (Test Log rank = 6,54; $p = 0,0380$); y se observó que la probabilidad de permanecer libre de recidiva, es similar en los grados G1 y G2, tras 12 años de seguimiento (42,51% vs 46,56%).

En lo que respecta a las variables inmunohistoquímicas, tanto la expresión de p53 (\leq ó $> 2\%$), como la expresión de p53 en cuartiles, y la expresión de ki67 en cuartiles, presentaron una influencia estadísticamente significativa, en la probabilidad de ausencia de recidiva del carcinoma de células transicionales de vejiga, tal y como se observa en la Tabla 19.

La expresión de p53 (\leq ó $> 2\%$) mostró una influencia estadísticamente significativa en la probabilidad de ausencia de recidiva (Test Log rank = 8,16; $p = 0,0043$); de modo que en los tumores con una expresión de p53 $\leq 2\%$, se observó una probabilidad no recidivar del 51,02%, al cabo de 12 años, mientras que aquellos tumores con una expresión de p53 $> 2\%$, permanecieron libres de recidiva sólo en el 34,10% de los casos, tras 11 años de seguimiento.

TABLA 19: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE RECIDIVA AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS (ESTADIOS T1 Y T2a).

VARIABLE		AUSENCIA DE RECIDIVA			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
EXPRESIÓN DE p53	$\leq 2\%$	84,43%	60,54%	51,05%	<ul style="list-style-type: none"> • Log rank = 8,16 • p = 0,0043
	$> 2\%$	74,14%	42,53%	34,10% (*)	
EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES	$\leq 0,2\%$	85,30%	67,80%	58,44%	<ul style="list-style-type: none"> • Log rank = 11,96 • p = 0,0075
	0,2 – 2%	81,72%	53,53%	43,74%	
	2 – 14%	83,67%	48,74%	37,93% (*)	
	$> 14\%$	66,46%	37,38%	32,35% (*)	
EXPRESIÓN DE ki67	$\leq 12\%$	85,02%	55,58%	48,12%	<ul style="list-style-type: none"> • Log rank = 3,15 • p = 0,0760
	$> 12\%$	72,67%	47,87%	36,14%	
EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES	$\leq 5\%$	90,60%	69,21%	59,08%	<ul style="list-style-type: none"> • Log rank = 13,88 • p = 0,0031
	5 – 12%	79,47%	41,67%	37,01%	
	12 – 27%	76,87%	57,86%	43,28%	
	$> 27\%$	72,06%	39,01%	31,70%	

(*) Ausencia de recidiva a los 11 años.

La expresión de p53 en cuartiles también mostró diferencias significativas, entre los distintos intervalos de p53 considerados para el análisis (Test Log rank = 11,96; $p = 0,0075$); de modo que aquellos tumores con una expresión nuclear de $p53 \leq 0,2\%$, no recidivaron en el 58,44% de los casos, al cabo de 12 años; sin embargo, los tumores con expresión de $p53 > 14\%$, solamente permanecieron libres de recidiva en el 32,35% de las ocasiones, después de 11 años de seguimiento.

La expresión nuclear de ki67 en cuartiles, se mostró como una variable con una relación estadísticamente significativa con la recidiva tumoral (Test Log rank = 13,88; $p = 0,0031$), de modo que aquellos pacientes con tumores que expresaban ki67 en un porcentaje $\leq 5\%$, no desarrollaron recidiva en el 59,08% de los casos, a los 12 años, mientras que los que presentaban una expresión nuclear de $ki67 > 27\%$, tan solo se mantuvieron libres de recidiva a los 12 años, en el 31,70% de los casos.

La variable expresión de ki67 (calculada en función de la mediana de valores de ki67), es la única variable inmunohistoquímica analizada, que no mostró una influencia estadísticamente significativa en la probabilidad de ausencia de recidiva.

Si realizamos un análisis, considerando solamente los tumores del estadio T1, observamos que entre las variables clínico-patológicas sometidas a estudio, el número de tumores vesicales (uno vs. más de uno) presentó una elevada significación estadística, a la hora de predecir la ausencia de recidiva (Test Log rank = 17,34; $p = 0,0000$). Se obtuvo también una diferencia estadísticamente significativa, al analizar las variables, localización tumoral (cara anterior vs. otra localización) (Test Log rank = 5,32; $p = 0,0211$) existencia de CIS en biopsia vesical aleatoria (Test Log rank = 7,41; $p = 0,0065$), y clínica de presentación (hematuria asintomática vs. otra clínica) (Test Log rank = 5,74; $p = 0,0166$). En la Tabla 19A se puede observar la probabilidad de recidiva en función de las variables inmunohistoquímicas, en el estadio T1.

Por el contrario, no se demostró una influencia estadísticamente significativa en la recidiva, al estudiar las variables: estadio clínico (Test Log rank = 0,00; $p = 0,9921$); tamaño tumoral (Test Log rank = 2,38; $p = 0,1226$); aspecto macroscópico de la lesión (Test Log rank = 0,01; $p = 0,9276$); morfología microscópica del tumor (Test Log rank = 2,77; $p = 0,0959$); y duración de los síntomas (Test Log rank = 2,67; $p = 0,1026$).

En cuanto a las variables inmunohistoquímicas estudiadas en el estadio tumoral T1, la expresión nuclear de p53 en cuartiles, se mostró como un factor con una relación estadísticamente significativa con la recidiva tumoral, al cabo de 12 años de seguimiento (Test Log rank = 11,91; $p = 0,0077$), observándose que aquellos tumores con una expresión nuclear de p53 $\leq 0,2\%$, no desarrollaron recidiva en el 64,94% de las ocasiones; una cifra muy superior al 30,36% de tumores que se presentaron libres de recidiva a los 12 años, cuando la expresión de p53 era $> 14\%$. En cuanto a la expresión nuclear de ki67 en cuartiles, observamos una relación con la recidiva tumoral, que se encuentra al borde de la significación estadística (Test Log rank = 7,80; $p = 0,0503$).

TABLA 19A: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE RECIDIVA EN EL ESTADIO T1, AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS.

VARIABLE		AUSENCIA DE RECIDIVA			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
EXPRESIÓN DE p53	$\leq 2\%$	87,34%	65,64%	56,70%	• Log rank = 6,47 • p = 0,0109
	$> 2\%$	79,25%	48,18%	37,72% (**)	
EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES	$\leq 0,2\%$	87,23%	71,87%	64,94%	• Log rank = 11,91 • p = 0,0077
	0,2 – 2%	87,40%	59,48%	48,33%	
	2 – 14%	87,80%	55,80%	45,40% (**)	
	$> 14\%$	70,35%	39,36%	30,36% (*)	
EXPRESIÓN DE ki67	$\leq 12\%$	87,25%	59,47%	51,23%	• Log rank = 0,71 • p = 0,3990
	$> 12\%$	79,40%	56,06%	43,22%	
EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES	$\leq 5\%$	90,23%	69,94%	59,65%	• Log rank = 7,80 • p = 0,0503
	5 – 12%	83,72%	46,68%	40,79%	
	12 – 27%	83,00%	64,28%	49,58%	
	$> 27\%$	77,42%	47,42%	39,52%	

(*) Ausencia de recidiva a los 10 años.

(**) Ausencia de recidiva a los 11 años.

Se realizó un análisis limitado a la categoría T2a, y se observó que la expresión de p53 en cuartiles no guardaba una relación significativa con la recidiva (Test Log rank = 1,58; $p = 0,6632$); lo mismo sucedía con la expresión de ki67 en cuartiles (Test Log rank = 0,15; $p = 0,9275$).

La mayoría de las variables estudiadas en relación con el carcinoma in situ, no pudieron ser analizadas, por el reducido número de pacientes. Se observó que en los

pacientes con CIS, la probabilidad de recidiva se modificaba significativamente en función de la expresión de ki67 (Test Log rank = 3,90; $p = 0,0483$).

A continuación se muestra la representación gráfica, de algunas de las variables que mostraron una mayor influencia en la recidiva tumoral (Figuras 12, 13 y 14).

FIGURA 12: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE RECIDIVA EN FUNCIÓN DE LA BIOPSIA VESICAL ALEATORIA.

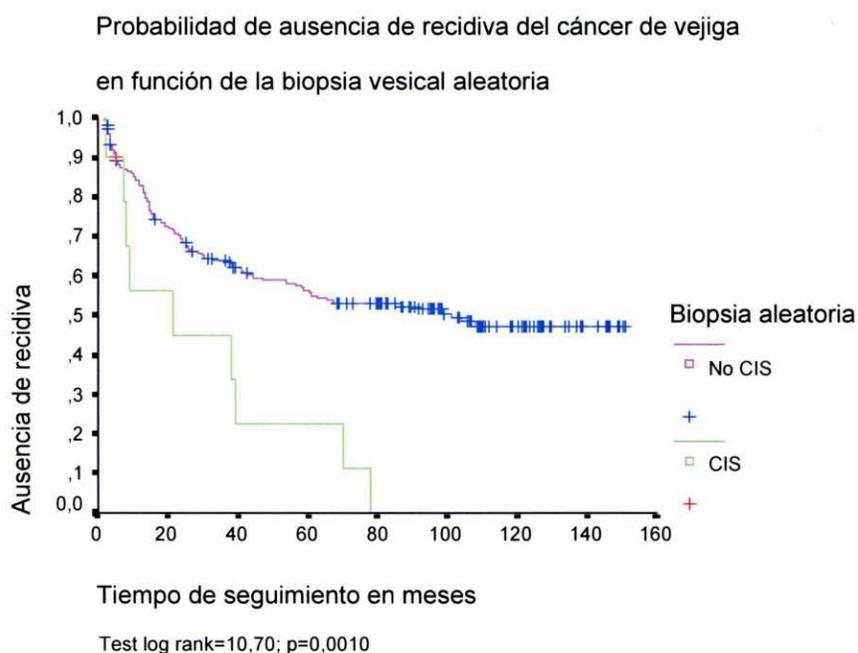


FIGURA 13: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE RECIDIVA EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES.

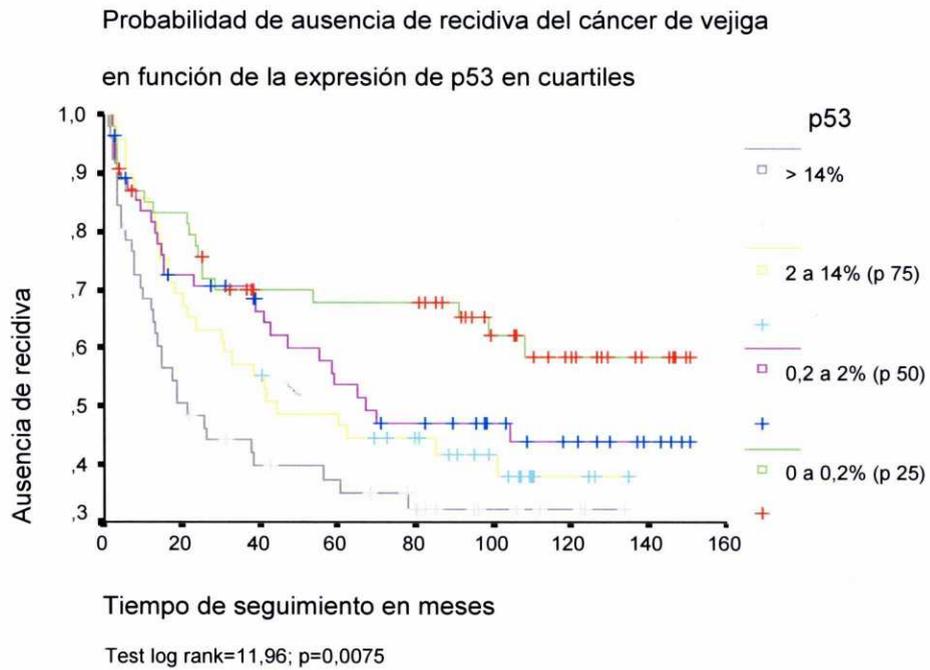
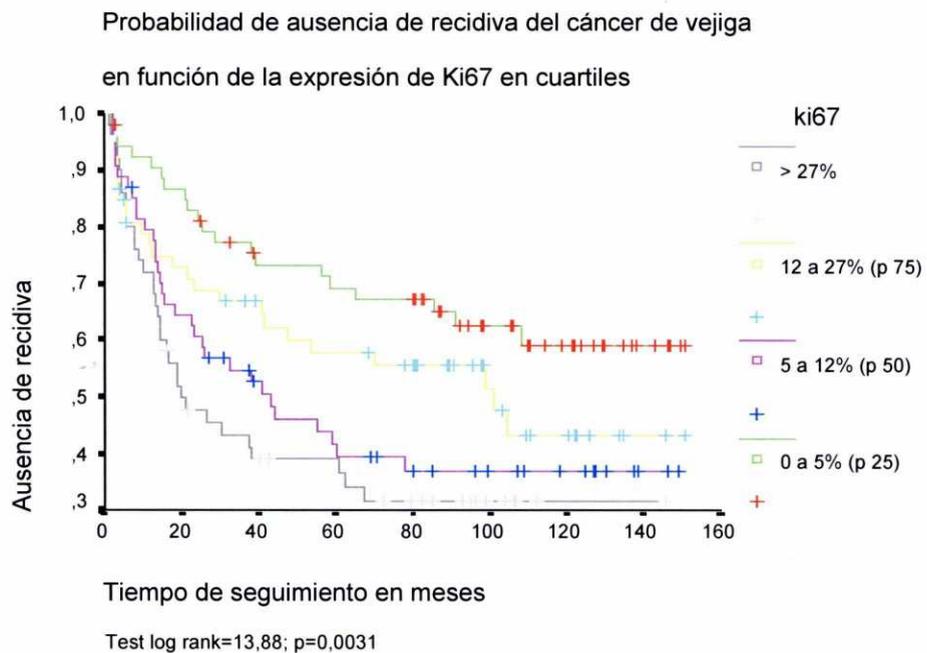


FIGURA 14: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE RECIDIVA EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Ki67 EN CUARTILES.



5.3.2. Análisis multivariado:

Se realizó un estudio multivariado de recidiva, mediante análisis de regresión de Cox, para determinar qué variables podían predecir la recidiva tumoral. El análisis de regresión se llevó a cabo de manera escalonada.

Se efectuó inicialmente un análisis de regresión de Cox, ajustando solamente por las variables inmunohistoquímicas: expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles. Se encontró que la expresión de p53 > 14%, predecía de manera estadísticamente significativa la recidiva tumoral (RR = 1,91; p = 0,0467); del mismo modo que la expresión de ki67 entre 5-12% (RR = 1,88; p = 0,0345), y la expresión de ki67 > 27% (RR = 1,98; p = 0,0359).

Se analizó posteriormente la recidiva tumoral, controlando por las variables: sexo, edad, estadio clínico, expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles. La edad se mostró como la única variable con capacidad para predecir la recidiva tumoral, de manera estadísticamente significativa (RR = 1,02; p = 0,0186). El resto de las variables estudiadas no presentaron en este análisis, capacidad de predicción de recidiva tumoral, aunque la expresión de p53 > 14% se encontró muy próxima a la significación estadística (RR = 1,97; p = 0,0586), así como la expresión de ki67 entre 5-12% (RR = 1,77; p = 0,0685).

Se efectuó un análisis de regresión del Cox, controlando por las variables: sexo, edad, estadio clínico, aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, número de formaciones tumorales vesicales (más de una / una), tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles.

La multifocalidad tumoral se mostró como una variable con capacidad para predecir la recidiva, de manera estadísticamente significativa (RR = 3,22; p = 0,0000). También la variable tamaño tumoral >3 cm (RR = 1,87; p = 0,0107), demostró una relación estadísticamente significativa con la recidiva tumoral. Las restantes variables incluidas en el análisis de regresión de Cox, no mostraron capacidad para predecir recidiva tumoral.

En lugar de la variable categoría TG, podemos utilizar las variables categoría T (T1 vs. T2a) y grado histológico (G1, G2, G3). Se realizó un análisis de regresión de Cox,

controlando por las variables: edad, sexo, categoría T, grado histológico, tamaño tumoral (>3 cm vs. ≤3 cm), número de tumores (más de uno / uno), aspecto macroscópico, morfología microscópica, expresión de p53 en cuartiles, y expresión de ki67 en cuartiles. Los resultados obtenidos en este análisis, muestran que las variables que pronostican de manera independiente la recidiva tumoral, son la categoría T2a (RR = 2,71; p = 0,0139); la multifocalidad tumoral (RR = 3,22; p = 0,0000); y el tamaño tumoral >3 cm (RR = 1,89; p = 0,0097). Si recodificamos la variable grado histológico en dos grupos (grupo 1: G1 y G2; grupo 2: G3), y posteriormente realizamos una análisis de regresión de Cox, ajustando por las mismas variables, encontramos que la categoría T2a es una variable independiente en la predicción de recidiva tumoral (RR = 2,56; p = 0,0181), mientras que el grado sigue sin mostrar una relación significativa con la recidiva.

TABLA 20: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX PARA PREDECIR RECIDIVA TUMORAL EN LOS ESTADIOS, T1 Y T2a, CONTROLANDO POR SEXO, EDAD, CATEGORÍA TG, NÚMERO DE TUMORES, TAMAÑO TUMORAL, ASPECTO MACROSCÓPICO, MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, EXISTENCIA DE CIS EN LA BIOPSIA ALEATORIA, EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES Y EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES.

VARIABLE	RR	95% IC	p
SEXO (♀ / ♂)	1,02	0,57 – 1,84	0,9360
EDAD	1,01	0,99 – 1,04	0,2135
CATEGORÍA TG	---	---	0,0148
T1G1	1	---	---
T1G2	0,82	0,52 – 1,44	0,1224
T1G3	0,61	0,30 – 1,26	0,1843
T2aG2	0,85	0,24 – 2,97	0,7964
T2aG3	1,43	0,51 – 3,99	0,4909
Nº TUMORES (más de uno / uno)	2,83	1,70 – 4,71	0,0001
TAMAÑO TUMORAL (>3 / ≤3 cm)	1,82	1,12 – 2,95	0,0150
BIOPSIA ALEATORIA (CIS / No CIS)	1,39	1,05 – 2,52	0,0044
EXPRESIÓN DE p53	---	---	0,5459
0 – 0,2%	1	---	---
0,2 – 2%	1,03	0,53 – 2,01	0,9281
2 – 14%	1,49	0,79 – 2,82	0,2171
> 14%	1,10	0,50 – 2,41	0,8042
EXPRESIÓN DE Ki67	---	---	0,0461
0 – 5%	1	---	---
5 – 12%	1,86	0,99 – 3,52	0,0544
12 – 27%	0,94	0,46 – 1,95	0,8775
> 27%	1,88	0,88 – 4,04	0,1045

Se llevó a cabo otro análisis de regresión de Cox, para predecir recidiva tumoral, controlando por las variables: sexo, edad, estadio clínico, número de tumores vesicales (más de uno / uno), tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), existencia de CIS en la biopsia vesical aleatoria, expresión nuclear de p53 en cuartiles y expresión nuclear de ki67 en cuartiles.

TABLA 21: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX PARA PREDECIR RECIDIVA TUMORAL EN EL ESTADIO T1, CONTROLANDO POR SEXO, EDAD, CATEGORÍA TG, TAMAÑO TUMORAL, NÚMERO DE TUMORES, ASPECTO MACROSCÓPICO, MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA, EXISTENCIA DE CIS EN LA BIOPSIA ALEATORIA, EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES Y EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES.

VARIABLE	RR	95% IC	p
SEXO (♀ / ♂)	1,13	0,58 – 2,22	0,7105
EDAD	1,00	0,98 – 1,03	0,6678
CATEGORÍA TG	---	---	0,0185
TIG1	1	---	---
TIG2	0,81	0,36 – 1,34	0,1134
TIG3	0,69	0,42 – 1,20	0,0833
Nº TUMORES (más de uno / uno)	3,65	2,03 – 6,57	0,0000
TAMAÑO TUMORAL (>3 / ≤3 cm)	1,88	1,12 – 3,16	0,0173
ASPECTO MACROSCÓPICO (sólido / papilar)	1,48	0,32 – 6,84	0,6113
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (sólido / papilar)	2,78	0,59 – 12,98	0,1925
BIOPSIA ALEATORIA (CIS / No CIS)	1,31	1,01 – 2,58	0,0165
EXPRESIÓN DE p53	---	---	0,3618
0 – 0,2%	1	---	---
0,2 – 2%	1,32	0,62 – 2,82	0,4698
2 – 14%	1,74	0,84 – 3,63	0,1368
> 14%	1,97	0,82 – 4,72	0,1287
EXPRESIÓN DE Ki67	---	---	0,0552
0 – 5%	1	---	---
5 – 12%	1,60	0,78 – 3,27	0,1942
12 – 27%	0,93	0,42 – 2,05	0,8678
> 27%	2,44	1,09 – 5,45	0,0297

El resultado de dicho análisis demostró, que las variables que tenían capacidad para predecir la recidiva tumoral eran: la categoría TG (p = 0,0148); la multifocalidad tumoral (RR = 2,83; p = 0,0001); el tamaño tumoral >3cm (RR = 1,82; p =

0,0150); la existencia de carcinoma in situ en la biopsia vesical aleatoria (RR = 1,39; p = 0,0044); y la expresión de ki67 en cuartiles (p = 0,0461). Estos resultados se pueden observar, en su conjunto, en la Tabla 20.

Se realizó un estudio de la recidiva mediante análisis de regresión de Cox escalonado, seleccionando sólo aquellos pacientes pertenecientes al estadio T1, para determinar qué variables podían predecir la recidiva tumoral. El análisis realizado con un número mayor de variables incluía: edad, sexo, estadio clínico, número de tumores vesicales (más de uno / uno), tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, existencia de CIS en la biopsia vesical aleatoria, expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles. Los resultados de este análisis de recidiva en T1 se pueden observar resumidos en la Tabla 21.

Controlando por las variables anteriormente citadas, la categoría TG en general (p = 0,0185); la multifocalidad tumoral (RR = 3,65; p = 0,0000); el tamaño tumoral >3 cm (RR = 1,88; p = 0,0173); la existencia de CIS en la biopsia vesical aleatoria (RR = 1,31; p = 0,0165); y la expresión de ki67 > 27% (RR = 2,44; p = 0,0297); se mostraron como variables con capacidad para pronosticar la recidiva tumoral, de forma estadísticamente significativa.

TABLA 21A: VARIABLES INDEPENDIENTES DE RECIDIVA.

	VARIABLES INDEPENDIENTES	RR	95% IC	p
ESTADIOS T1 y T2a	CATEGORÍA TG	---	---	0,0148
	MULTIFOCALIDAD TUMORAL	2,83	1,70 - 4,71	0,0001
	TAMAÑO TUMORAL > 3 cm	1,82	1,12 - 2,95	0,0150
	CIS EN BIOPSIA ALEATORIA	1,39	1,05 - 2,52	0,0044
	EXPRESIÓN DE ki67	---	---	0,0461
ESTADIO T1	GRADO HISTOLÓGICO	---	---	0,0185
	MULTIFOCALIDAD TUMORAL	3,65	2,03 - 6,57	0,0000
	TAMAÑO TUMORAL > 3 cm	1,88	1,12 - 3,16	0,0173
	CIS EN BIOPSIA ALEATORIA	1,31	1,01 - 2,58	0,0165
	EXPRESIÓN ki67 >27%	2,44	1,09 - 5,45	0,0297
ESTADIO T2a	NINGUNA			

Se estudió la recidiva, considerando solamente los tumores del estadio T2a, y se efectuó análisis de regresión de Cox, para evaluar si las variables del estudio tenían capacidad para predecir recidiva tumoral, en este estadio clínico. Se observó que cuando se realizaba el estudio de recidiva, controlando por las variables: edad, sexo, categoría TG

(T2aG2 vs. T2aG3), tamaño tumoral (>3 / ≤ 3 cm), expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles; ninguna de las variables mostraba una capacidad pronóstica independiente de recidiva tumoral, en los tumores pertenecientes al estadio T2a.

En la Tabla 21A podemos observar un listado de las variables, que muestran una asociación independiente con la recidiva tumoral, en cada uno de los grupos considerados en el estudio.

5.2.3. Curvas ROC de recidiva:

Se evaluó la capacidad de los marcadores p53 y ki67, para pronosticar recidiva tumoral en los diferentes estadios clínicos del tumor, para ello se realizaron curvas ROC y se determinó el área existente bajo cada una de las curvas.

- Las curvas ROC de p53 y recidiva mostraron los siguientes resultados: tumores pertenecientes al estadio T1: área = 0,635; categoría T1G1: 0,683; categoría T1G2: 0,684; categoría T1G3: 0,522; categoría T2aG2: 0,417; categoría T2aG3: 0,645; categoría CIS: 0,536.
- En el caso de ki67, las áreas observadas bajo cada curva fueron las siguientes: tumores del estadio T1: 0,586; categoría T1G1: 0,578; categoría T1G2: 0,640; categoría T1G3: 0,500; categoría T2aG2: 0,500; categoría T2aG3: 0,632; categoría CIS: 0,786.

Las curvas ROC de p53 y ki67 para predecir recidiva tumoral en el estadio T1 y en la categoría T1G2, se representan conjuntamente en las Figuras 15 y 16.

FIGURA 15: CURVA ROC DE RECIDIVA EN EL ESTADIO T1.

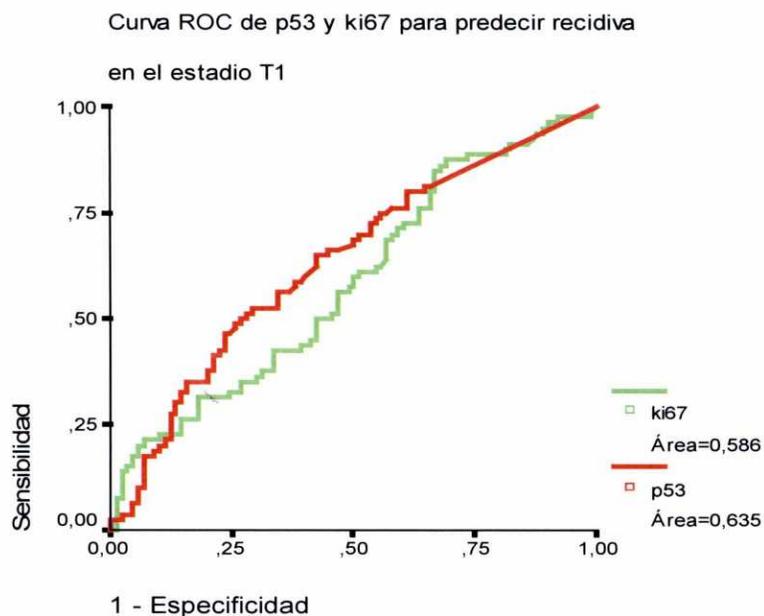
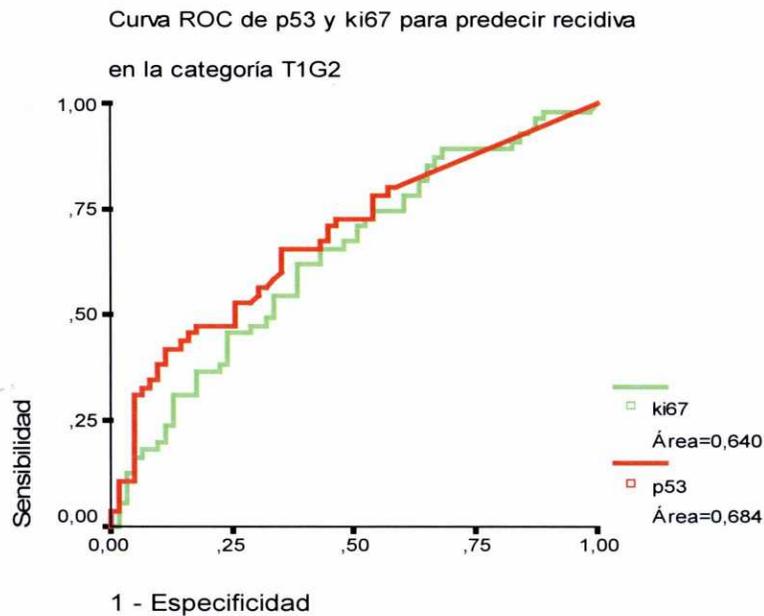


FIGURA 16: CURVA ROC DE RECIDIVA EN LA CATEGORÍA T1G2.



5.4. Estudio de progresión:

El análisis general de progresión, tanto en su forma univariada, como multivariada, fue llevado a cabo con los pacientes pertenecientes a las categorías T1 y T2a. Los pacientes con carcinoma in situ fueron analizados de manera independiente.

5.4.1. Análisis univariado:

5.4.1.2. Progresión general:

Consideramos como progresión general, un incremento en las categorías T, N ó M del tumor, de manera aislada o combinada.

La probabilidad de ausencia progresión de los tumores T1 y T2a, tras 5 años (60 meses) de seguimiento fue del 75,31%, y del 69,16% tras 12 años (144 meses). Considerando solamente los pacientes en estadio T1, el porcentaje de tumores que no presentaron progresión al cabo de 12 años, fue de 75,63%.

Es importante reseñar que a partir de los 96 meses (8 años) de seguimiento, no se desarrolla progresión en ningún tumor, tanto si analizamos los tumores de la categoría T1, como si analizamos los T1 y T2a conjuntamente.

Se estudiaron una serie de variables, que a priori podían tener relación con la progresión tumoral, y mediante la metodología de Kaplan-Meier, se determinó la probabilidad de ausencia de progresión en función de cada una de ellas, al cabo de uno, 5 y 12 años. Estas variables sometidas a estudio se pueden agrupar en: variables clínico-patológicas y variables inmunohistoquímicas. En la Tabla 22 se muestran las variables clínico-patológicas analizadas.

Si realizamos este mismo estudio de progresión, con los tumores pertenecientes al estadio T1, comprobamos que el número de tumores vesicales es una variable con una influencia significativa en la progresión tumoral (Test Log rank = 7,71; p = 0,0055), al contrario de lo que ocurría al evaluar los tumores T1 y T2a en conjunto. Por el

contrario, las variables tamaño tumoral, grado de malignidad histológica, y clínica de presentación, que presentaban significación estadística en el análisis realizado con T1 y T2a, pierden dicha significación cuando sólo se tiene en cuenta el estadio T1. La variable duración de los síntomas, no muestra una relación significativa con la progresión en el estadio T1.

TABLA 22: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE PROGRESIÓN AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES CLÍNICAS Y ANATOMO-PATOLÓGICAS (ESTADIOS T1 Y T2a).

VARIABLE		AUSENCIA DE PROGRESIÓN			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
ESTADIO CLÍNICO	T1G1	100%	87,50%	81,25%	• Log rank = 45,87 • p = 0,0000
	T1G2	96,53%	84,59%	77,29%	
	T1G3	92,86%	74,32%	64,41%	
	T2aG2	87,50%	62,50%	62,50% (**)	
	T2aG3	62,36%	29,70%	29,70% (***)	
TAMAÑO TUMORAL	≤ 3 CM.	94,02%	81,40%	76,45%	• Log rank = 3,98 • p = 0,0462
	> 3 CM.	89,94%	70,53%	62,65%	
NÚMERO DE TUMORES	UNO	90,49%	79,58%	74,52%	• Log rank = 1,94 • p = 0,1641
	MÁS DE UNO	95,41%	70,95%	61,62%	
ASPECTO MACROSCÓPICO	PAPILAR	96,24%	81,61%	75,62%	• Log rank = 28,10 • p = 0,0000
	SÓLIDO	56,72%	37,82%	37,82% (**)	
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	PAPILAR	97,01%	81,27%	74,83%	• Log rank = 34,36 • p = 0,0000
	SÓLIDO	59,16%	40,05%	35,04%	
CATEGORÍA T	CATEGORÍA T1	96,28%	83,12%	75,63%	• Log rank = 29,35 • p = 0,0000
	CATEGORÍA T2a	69,13%	39,18%	39,18% (***)	
GRADO HISTOLÓGICO	GRADO 1	100%	87,50%	81,25%	• Log rank = 19,68 • p = 0,0001
	GRADO 2	95,93%	83,06%	76,34%	
	GRADO 3	82,96%	54,66%	49,69%	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	CARA ANTERIOR	75,95%	50,37%	43,09% (***)	• Log rank = 21,55 • p = 0,0000
	OTRA LOCALIZ.	96,71%	82,95%	76,79%	
CLÍNICA DE PRESENTACIÓN	MACROHEMATURIA ASINTOMÁTICA	93,27%	78,91%	73,85%	• Log rank = 5,0 • p = 0,0245
	OTRA CLÍNICA	88,08%	62,30%	54,25%	
DURACIÓN DE LOS SÍNTOMAS	≤ 6 MESES	91,76%	74,31%	71,40%	• Log rank = 0,88 • p = 0,3488
	> 6 MESES	88,72%	76,08%	59,81%	
BIOPSIA ALEATORIA	CIS	77,78%	44,44%	14,81% (*)	• Log rank = 16,19 • p = 0,0001
	NO CIS	95,22%	80,23%	74,67%	

(*) Ausencia de progresión a los 6 años.

(**) Ausencia de progresión a los 10 años.

(***) Ausencia de progresión a los 11 años.

Las variables morfología microscópica del tumor (Test Log rank = 12,57; $p = 0,0004$), existencia de CIS en la biopsia vesical en mapa (Test Log rank = 11,62; $p = 0,0007$), y localización tumoral (cara anterior vs. otra localización) (Test Log rank = 9,44; $p = 0,0021$), también influyen significativamente en la probabilidad de progresión de los tumores del estadio T1; mientras que la variable aspecto macroscópico de la lesión, muestra significación estadística (Test Log rank = 4,08; $p = 0,0435$), aunque esta es mucho menor, que en el análisis de los tumores T1 y T2a.

Las variables inmunohistoquímicas constituyen el segundo grupo de variables analizado, en relación con la progresión tumoral. Los resultados obtenidos en el estudio de estas variables se muestran, de manera resumida en la Tabla 23.

TABLA 23: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE PROGRESIÓN AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS (ESTADIOS T1 Y T2a).

VARIABLE		AUSENCIA DE PROGRESIÓN			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
EXPRESIÓN DE p53	≤ 2%	96,23%	89,91%	85,89%	• Log rank = 27,63 • p = 0,0000
	> 2%	88,26%	59,35%	50,85% (*)	
EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES	≤ 0,2%	98,11%	94,07%	94,07%	• Log rank = 47,42 • p = 0,0000
	0,2 – 2%	94,37%	85,78%	77,78%	
	2 – 14%	100%	69,28%	66,97% (*)	
	> 14%	76,40%	49,27%	32,52% (*)	
EXPRESIÓN DE ki67	≤ 12%	98,07%	85,59%	80,30%	• Log rank = 14,75 • p = 0,0001
	> 12%	86,53%	64,22%	57,03%	
EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES	≤ 5%	98,15%	90,44%	87,99%	• Log rank = 33,63 • p = 0,0000
	5 – 12%	98,00%	80,04%	71,19%	
	12 – 27%	92,03%	76,72%	74,32%	
	> 27%	80,89%	51,15%	38,61%	

(*) Ausencia de progresión a los 11 años.

Todas las variables inmunohistoquímicas estudiadas han presentado una relación con la progresión tumoral, altamente significativa desde el punto de vista estadístico. La expresión nuclear de la proteína p53 en cuartiles (Test Log rank = 47,42; $p = 0,0000$), ha mostrado grandes diferencias en las cifras de progresión, según el porcentaje de dicha expresión, así se observó que un 94,07% de los tumores con p53 ≤ 0,2%, no desarrollaron progresión tumoral tras 12 años de seguimiento, mientras que entre aquellos

tumores con una expresión de p53 > 14%, sólo un 32,52% permanecían libres de progresión al cabo de 11 años.

Algo parecido sucede con la expresión nuclear de ki67, ya que los tumores con valor de ki67 ≤ 5%, no presentaron progresión en un 87,99% de las ocasiones tras 12 años de seguimiento; por el contrario si consideramos aquellos tumores con expresión de ki67 > 27%, encontramos que tan solo el 38,61% de los mismos, están libres de progresión a los 12 años.

TABLA 23A: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE PROGRESIÓN EN EL ESTADIO T1, AL CABO DE UNO, 5 Y 12 AÑOS, EN FUNCIÓN DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS.

VARIABLE		AUSENCIA DE PROGRESIÓN			TEST LOG RANK VALOR DE p
		1 AÑO	5 AÑOS	12 AÑOS	
EXPRESIÓN DE p53	≤ 2%	98,94%	96,60%	92,13%	• Log rank = 30,89 • p = 0,0000
	> 2%	92,69%	65,52%	53,94% (**)	
EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES	≤ 0,2%	97,83%	97,83%	97,83%	• Log rank = 53,04 • p = 0,0000
	0,2 – 2%	100%	95,27%	86,09%	
	2 – 14%	100%	73,77%	71,04% (**)	
	> 14%	82,96%	54,44%	25,85% (*)	
EXPRESIÓN DE ki67	≤ 12%	98,91%	90,67%	84,78%	• Log rank = 10,89 • p = 0,0010
	> 12%	92,83%	73,20%	63,48%	
EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES	≤ 5%	98,08%	92,02%	89,53%	• Log rank = 34,03 • p = 0,0000
	5 – 12%	100%	88,66%	77,73%	
	12 – 27%	97,50%	86,70%	83,71%	
	> 27%	87,10%	56,33%	38,36%	

(*) Ausencia de progresión a los 10 años.

(**) Ausencia de progresión a los 11 años.

Estudiando la progresión del estadio tumoral T1, de manera aislada, se obtienen unos resultados muy similares a los encontrados en los estadios T1 y T2a conjuntamente. La expresión de p53 (≤ ó > 2%) (Test Log rank = 30,89; p = 0,0000); la expresión de p53 en cuartiles (Test Log rank = 53,04; p = 0,0000); la expresión de ki67 (≤ ó > 12%) (Test Log rank = 10,89; p = 0,0010); y la expresión de ki67 en cuartiles (Test Log rank = 34,03; p = 0,0000), fueron las variables analizadas, y todas ellas muestran una influencia altamente significativa en la progresión de los tumores en estadio T1. En la Tabla 23A se puede observar la relación entre las variables inmunohistoquímicas y la progresión, en el estadio T1.

Dentro del estadio T1, encontramos que los tumores que presentan una expresión de p53 $\leq 0,2\%$, tienen una probabilidad del 97,83% de no desarrollar progresión tumoral a los 12 años, y esta probabilidad no se modificó a partir del primer año de seguimiento; por el contrario, los tumores T1 con una expresión nuclear de p53 $>14\%$, permanecieron libres de progresión sólo en el 25,85% de los casos, al cabo de 10 años de seguimiento.

Por lo que respecta a la expresión de ki67 en los tumores del estadio T1, esta también se halla asociada a grandes diferencias en los porcentajes de progresión tumoral. Un 89,53% de los tumores con expresión de ki67 $\leq 5\%$, no presentaron progresión tras 12 años, sin embargo solamente el 38,36% de los tumores con ki67 $> 27\%$, no desarrollaron progresión tumoral al cabo de 12 años de seguimiento.

Si realizamos un análisis limitado al estadio T2a, observamos que la expresión de p53 en cuartiles (Test Log rank = 2,65; p = 0,4480), y la expresión de ki67 en cuartiles (Test Log rank = 0,51; p = 0,7758), no se relacionan con la probabilidad de progresión de manera significativa.

El análisis perteneciente a los pacientes con carcinoma in situ, no ha permitido encontrar diferencias entre grupos, en la mayoría de los casos, debido al reducido número de pacientes. Se observó que el sexo modificaba significativamente la progresión en este grupo de pacientes (Test Log rank = 8,00; p = 0,0047), pero hay que tener en cuenta que sólo había una mujer entre los nueve casos.

5.4.1.2. Progresión de la categoría M: desarrollo de metástasis:

Las variables categoría TG (Test Log rank = 27,17; p = 0,0000) y grado de malignidad histológica (Test Log rank = 7,26; p = 0,0265), influyen de manera estadísticamente significativa en la probabilidad de desarrollo de metástasis, cuando analizamos los tumores T1 y T2a conjuntamente.

La expresión de p53 en cuartiles, también ha mostrado una relación estadísticamente significativa con la progresión de la categoría M (Test Log rank = 28,65; p = 0,0000). Observamos que los tumores con una expresión de p53 $\leq 0,2\%$, no desarrollan

metástasis en ningún caso (0%), tras un seguimiento de 12 años; sin embargo, los tumores que expresan p53 en un porcentaje superior al 14%, tienen una probabilidad de 58,57% de permanecer libres de metástasis, al cabo de 11 años. La expresión nuclear de ki67 en cuartiles, también ha mostrado una influencia estadísticamente significativa, en la probabilidad de desarrollo de metástasis (Test Log rank = 8,55; $p = 0,0359$), tras un seguimiento de 12 años, aunque las diferencias entre los distintos intervalos considerados, es menos llamativa que en el caso de la expresión de p53.

Utilizando para el análisis, solamente los tumores del estadio T1, encontramos que la expresión nuclear de p53 en cuartiles, constituye una variable con una influencia estadísticamente significativa en el desarrollo de metástasis (Test Log rank = 27,51; $p = 0,0000$), tras 12 años de seguimiento. La variable expresión de ki67 en cuartiles, por el contrario, no presentó una relación estadísticamente significativa (Test Log rank = 3,26; $p = 0,3525$) con la progresión de la categoría M, al cabo de 12 años.

Realizando un análisis limitado al estadio T2a, observamos que la expresión de p53 en cuartiles (Test Log rank = 1,46; $p = 0,6922$), al igual que la expresión de ki67 en cuartiles (Test Log rank = 1,28; $p = 0,5274$), no se relacionaban de manera significativa con la probabilidad de desarrollo de metástasis.

De todas las variables estudiadas en relación con la progresión tumoral, en el análisis univariado, merece la pena destacar, por su llamativa significación estadística: el estadio clínico, la expresión nuclear de p53 en cuartiles, la expresión nuclear de ki67 en cuartiles y la morfología microscópica del tumor. A continuación se muestra la representación gráfica de dichas variables (Figuras 17, 18, 19 y 20).

FIGURA 17: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE PROGRESIÓN EN FUNCIÓN DEL ESTADIO CLÍNICO.

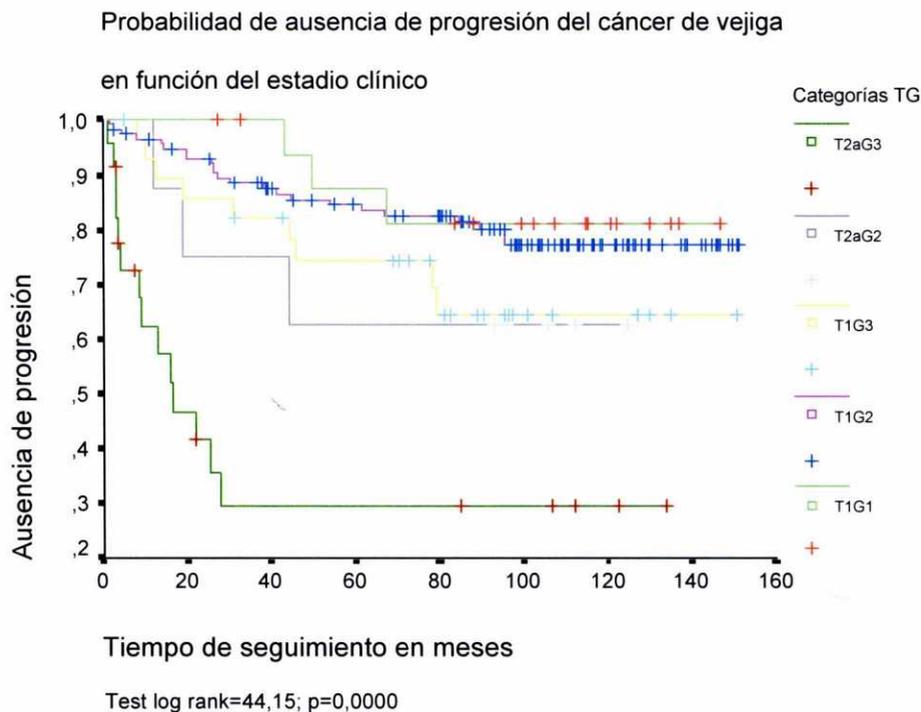


FIGURA 18: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE PROGRESIÓN EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES.

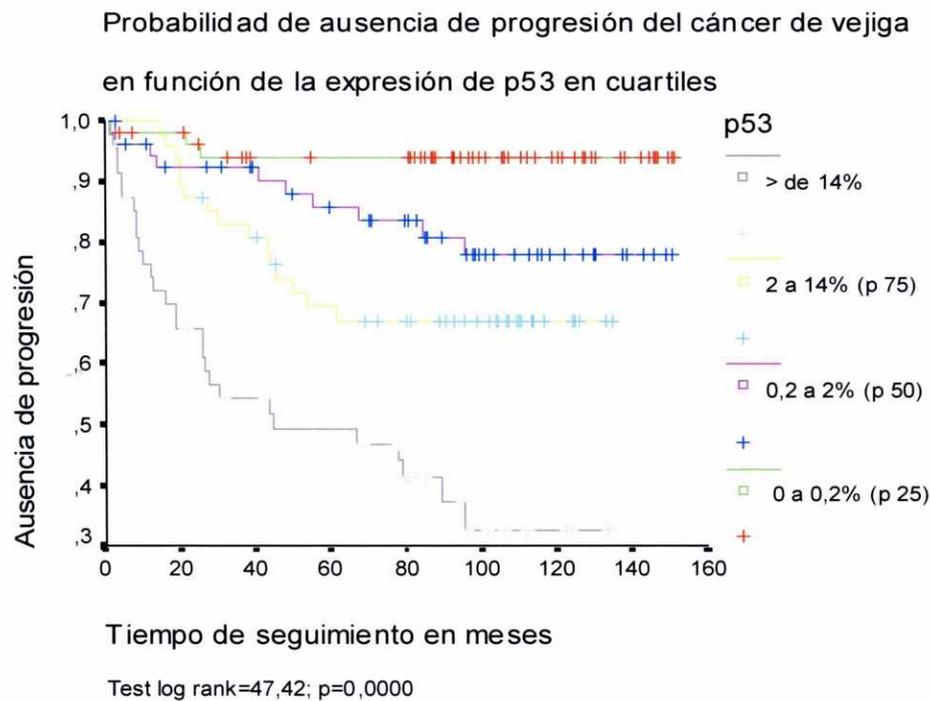


FIGURA 19: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE PROGRESIÓN EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES.

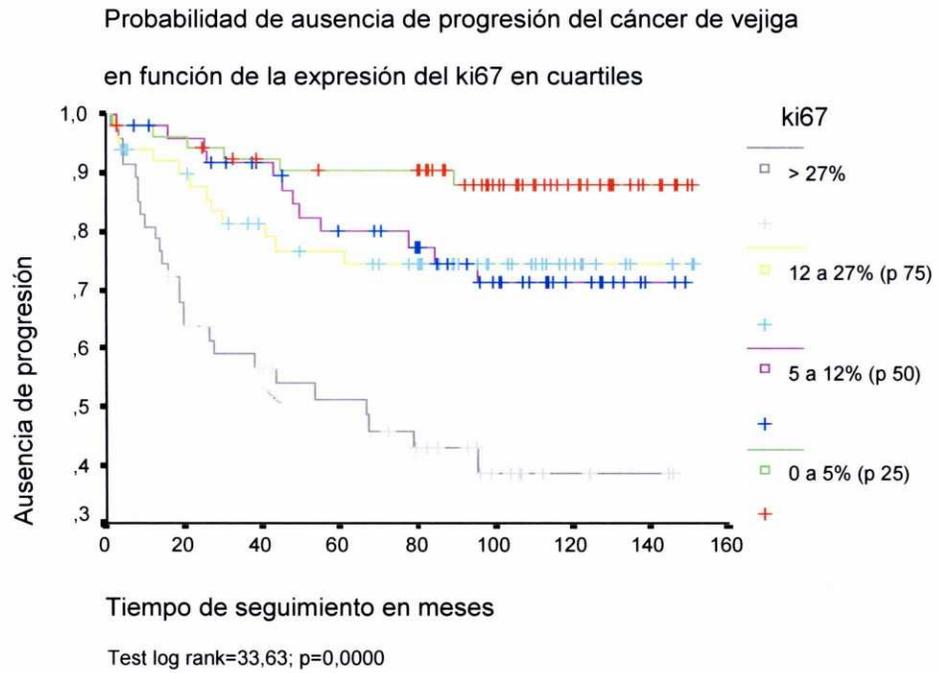
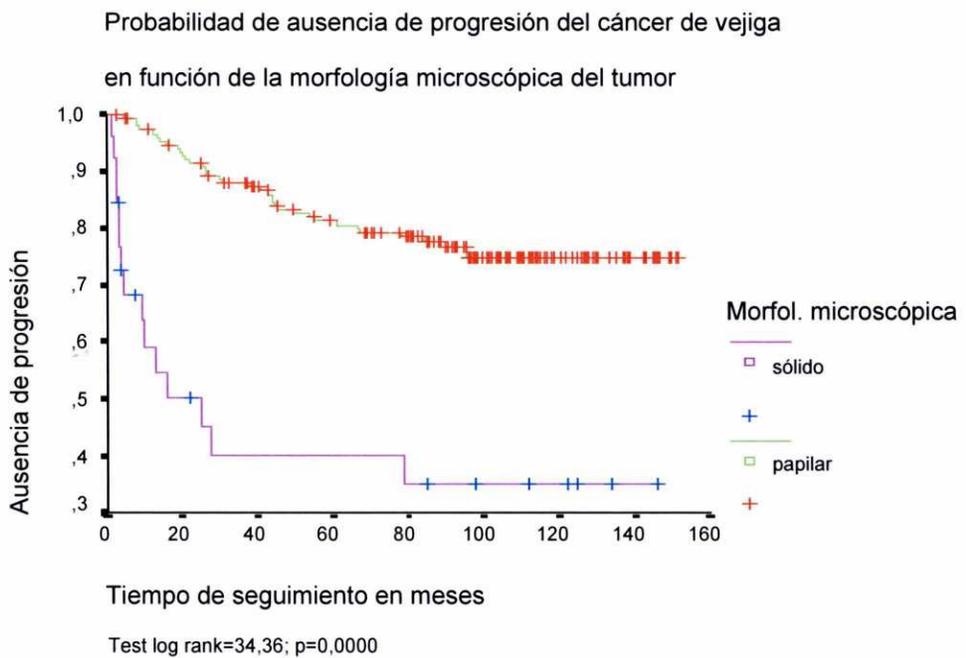


FIGURA 20: PROBABILIDAD DE AUSENCIA DE PROGRESIÓN EN FUNCIÓN DE LA MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DEL TUMOR.



5.4.2. Análisis multivariado:

El estudio multivariado de progresión, se efectuó de la misma manera que los de supervivencia y recidiva: mediante análisis de regresión de Cox, de modo escalonado, introduciendo en el mismo, un número progresivamente mayor de covariables.

Realizando un análisis de regresión de Cox, y controlando por las variables: edad, sexo, expresión nuclear de p53 en cuartiles y expresión nuclear de ki67 en cuartiles; se observó que la edad (RR = 1,04; p = 0,0210); la expresión de p53 (p = 0,0014); la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 4,16; p = 0,0308); la expresión de p53 > 14% (RR = 9,02; p = 0,0007); y la expresión de ki67 > 27% (RR = 3,00; p = 0,0274)), eran variables que influían de manera estadísticamente significativa en la probabilidad de progresión tumoral, del carcinoma de células transicionales de vejiga.

Si añadimos al análisis la variable categórica estadio clínico, comprobamos que la edad (RR = 1,04; p = 0,0243), la expresión de p53 en cuartiles (p = 0,0163), y la expresión de ki67 en percentiles (RR = 1,40; p = 0,0460), se relacionan de modo estadísticamente significativo con la probabilidad de progresión tumoral. Del mismo modo, la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 3,90; p = 0,0411) y la expresión de p53 > 14% (RR = 7,65; p = 0,0030), se relacionan con la progresión de manera estadísticamente significativa.

Posteriormente se efectuó análisis de regresión de Cox, para predecir la probabilidad de progresión tumoral, controlando por una serie de variables epidemiológicas, clínicas y anatomopatológicas, involucradas clásicamente en los estudios pronósticos del cáncer de vejiga: sexo, edad, categoría TG, tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), número de tumores vesicales (más de uno / uno), aspecto macroscópico de la lesión y morfología microscópica del tumor. Además de estas variables “clásicas” se utilizaron dos variables inmunohistoquímicas: expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles. Los resultados del análisis de regresión de Cox efectuado, ajustando por las variables anteriormente citadas, se observan reflejados en la Tabla 24.

A continuación, en lugar de la variable categoría TG, consideramos el grado histológico (G1, G2, G3) y la categoría T (T1 vs. T2a) de manera independiente, y

realizamos un análisis de regresión de Cox, controlando por edad, sexo, categoría T, grado histológico, tamaño tumoral (>3 cm vs. ≤3 cm), número de tumores (más de uno / uno), aspecto macroscópico, morfología microscópica, expresión de p53 en cuartiles, y expresión de ki67 en cuartiles. En este estudio se observó, que las variables con capacidad para predecir de manera independiente la progresión tumoral eran: edad (RR = 1,05; p = 0,0137); expresión de p53 (p = 0,0123); expresión de p53 entre 2-14% (RR = 3,97; p = 0,0456); y expresión de p53 >14% (RR = 9,74; p = 0,0021). Si recodificamos la variable grado en dos grupos (grupo 1: G1 y G2; grupo 2: G3), y posteriormente realizamos una análisis de regresión de Cox, ajustando por las mismas variables, observamos que tanto la categoría T, como el grado histológico, continúan sin modificar significativamente la probabilidad de progresión.

Se observa en el análisis efectuado, que la edad (RR = 1,05; p = 0,0177); la expresión de p53 en cuartiles (p = 0,0197); la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 4,08; p = 0,0397); y la expresión de p53 > 14% (RR = 9,98; p = 0,0029), se asocian de forma significativa a la probabilidad de progresión tumoral; mientras que las variables: multifocalidad tumoral (RR = 2,09; p = 0,0702) y expresión de ki67 > 27% (RR = 3,45; p = 0,0600), se encuentran al borde de la significación estadística.

Si efectuamos un análisis de regresión de Cox utilizando las variables: edad, sexo, categoría TG, tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), número de tumores vesicales (más de uno / uno), morfología macro y microscópica de la lesión, existencia de CIS en la biopsia vesical aleatoria, expresión de p53 (≤ ó > 2%) y expresión de ki67 (≤ ó > 12%); se observa que las covariables con capacidad para pronosticar progresión tumoral son: edad (RR = 1,04; p = 0,0434), multifocalidad tumoral (RR = 2,47; p = 0,0268), existencia de CIS en la biopsia aleatoria (RR = 1,22; p = 0,0109), expresión nuclear de p53 (≤ ó > 2%) (RR = 4,12; p = 0,0006) y expresión nuclear de ki67 (≤ ó > 12%) (RR = 2,43; p = 0,0349).

Se intentó averiguar que variables influían en la progresión de la categoría T, para lo cual se efectuó un análisis de regresión de Cox de manera escalonada, esto es, controlando por un número de variables progresivamente mayor. El análisis de regresión de Cox más representativo incluyó las variables: sexo, edad, categoría TG, aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, número de tumores

vesicales (más de uno / uno), tamaño tumoral ($>3 / \leq 3$ cm), expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles.

TABLA 24: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX PARA PREDECIR PROGRESIÓN TUMORAL EN LOS ESTADIOS T1 Y T2a, CONTROLANDO POR UNA SERIE DE COVARIABLES:

VARIABLE	RR	95% IC	p
SEXO (♀ / ♂)	1,25	0,44 – 3,58	0,6742
EDAD	1,05	1,01 – 1,09	0,0177
CATEGORÍA TG	---	---	0,1101
T1G1	1	---	---
T1G2	0,45	0,12 – 1,68	0,2349
T1G3	0,66	0,31 – 1,35	0,1153
T2aG2	0,52	0,20 – 3,20	0,4857
T2aG3	1,01	0,36 – 5,14	0,9839
TAMAÑO TUMORAL ($>3 / \leq 3$ cm)	1,12	0,52 – 2,41	0,7629
Nº TUMORES (más de uno / uno)	2,09	0,94 – 4,65	0,0702
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (sólido / papilar)	2,19	0,42 – 11,39	0,3508
ASPECTO MACROSCÓPICO (sólido / papilar)	2,52	0,88 – 7,22	0,0850
EXPRESIÓN DE p53	---	---	0,0197
0 – 0,2%	1	---	---
0,2 – 2%	3,19	0,77 – 13,15	0,1075
2 – 14%	4,08	1,07 – 15,60	0,0397
> 14%	8,98	2,12 – 38,06	0,0029
EXPRESIÓN DE Ki67	---	---	0,2629
0 – 5%	1	---	---
5 – 12%	1,82	0,51 – 6,47	0,3521
12 – 27%	2,69	0,78 – 9,26	0,1161
> 27%	3,45	0,95 – 12,57	0,0600

Se observó en este estudio, que las variables que influían de manera estadísticamente significativa en la probabilidad de progresión de la categoría T eran: la edad (RR = 1,05; p = 0,0185); la expresión de p53 en cuartiles (p = 0,0257); la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 4,13; p = 0,0393); y la expresión de p53 > 14% (RR = 8,79; p = 0,0036). La multifocalidad tumoral (RR = 2,13; p = 0,0712) y la expresión de ki67 > 27% (RR = 3,43; p = 0,0645), se encontraron al borde la significación estadística, en cuanto a su capacidad para predecir la progresión de la categoría T.

Si al análisis realizado previamente, le añadimos las variables: existencia de CIS en la biopsia vesical aleatoria y número de recidivas; encontramos que el número de recidivas tumorales, es un factor con influencia estadísticamente significativa (RR = 1,53; p = 0,0000) en la progresión de la categoría T; y que la expresión de ki67 > 27% adquiere una significación estadística (RR = 4,31; p = 0,0490), que no poseía en el análisis anterior.

TABLA 25: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX PARA PREDECIR PROGRESIÓN TUMORAL EN EL ESTADIO T1, CONTROLANDO POR SEXO, EDAD, CATEGORÍA TG, TAMAÑO TUMORAL, NÚMERO DE TUMORES, MORFOLOGÍA MACRO Y MICROSCÓPICA, EXPRESIÓN DE p53 EN CUARTILES Y EXPRESIÓN DE ki67 EN CUARTILES.

VARIABLE	RR	95% IC	p
SEXO (♀ / ♂)	1,56	0,42 – 5,86	0,5072
EDAD	1,06	1,00 – 1,12	0,0333
CATEGORÍA TG	---	---	0,0577
TIG1	1	---	---
TIG2	1,02	0,54 – 1,16	0,0877
TIG3	1,09	0,70 – 1,23	0,0642
Nº TUMORES (más de uno / uno)	3,10	1,25 – 7,67	0,0145
TAMAÑO TUMORAL (>3 / ≤3 cm)	1,92	0,87 – 4,23	0,1042
ASPECTO MACROSCÓPICO (sólido / papilar)	3,78	0,65 – 21,85	0,1368
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (sólido / papilar)	55,19	8,22 – 370,65	0,0000
EXPRESIÓN DE p53	---	---	0,0002
0 – 0,2%	1	---	---
0,2 – 2%	11,21	1,21 – 104,00	0,0334
2 – 14%	20,18	2,27 – 179,22	0,0070
> 14%	74,21	7,87 – 699,58	0,0002
EXPRESIÓN DE Ki67	---	---	0,0040
0 – 5%	1	---	---
5 – 12%	1,17	0,30 – 4,50	0,8180
12 – 27%	1,16	0,27 – 4,94	0,8350
> 27%	5,29	1,48 – 18,84	0,0102

Se realizó análisis de regresión del Cox para predecir progresión de la categoría M, o lo que es lo mismo, para predecir el desarrollo de metástasis a distancia; y se controlaron las variables: sexo, edad, categoría TG, aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, número de tumores vesicales (más de uno / uno), tamaño tumoral (>3 / ≤3 cm), expresión de p53 (≤ ó >2%) y expresión de ki67 (≤ ó > 12%).

Los resultados obtenidos mostraron que la multifocalidad tumoral (RR = 4,44; p = 0,0201) y la expresión de p53 (\leq ó $>$ 2%) (RR = 6,64; p = 0,0041), eran las dos únicas variables que influían de manera significativa, en la probabilidad de desarrollo de metástasis.

Se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox, de manera escalonada, y considerando aisladamente los tumores del estadio T1, para definir qué variables pronosticaban la progresión tumoral.

En uno de los análisis efectuados para el estadio T1, se controlaron las variables: edad, sexo, categoría TG (sólo las diferentes categorías de T1), número de tumores vesicales (más de uno / uno), tamaño tumoral (>3 / ≤ 3 cm), aspecto macroscópico de la lesión, morfología microscópica del tumor, expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles. Los resultados de dicho análisis pusieron de manifiesto que las variables que pronosticaban la progresión tumoral de manera estadísticamente significativa eran: la edad (RR = 1,06; p = 0,0333); la multifocalidad tumoral (RR = 3,10; p = 0,0145); la morfología microscópica sólida (RR = 55,19; p = 0,0000); la expresión de p53 (p = 0,0002); la expresión de p53 entre 0,2-2% (RR = 11,21; p = 0,0334); la expresión de p53 entre 2-14% (RR = 20,18; p = 0,0070); la expresión de p53 $>$ 14% (RR = 74,21; p = 0,0002); la expresión de ki67 (p = 0,0040); y finalmente, la expresión de ki67 $>$ 27% (RR = 5,29; p = 0,0102). Estos resultados se pueden ver reflejados en la Tabla 25.

Posteriormente, a las variables anteriormente analizadas, se añadió la variable: existencia de CIS en la biopsia vesical aleatoria, y se observó que dicha variable tenía capacidad para pronosticar la progresión tumoral, de manera estadísticamente significativa (RR = 1,26; p = 0,0112). Del mismo modo se observó que las variables, para las cuales se había encontrado significación estadística en el análisis anterior, seguían manteniendo en este, dicha significación.

Si para el estudio de progresión del estadio T1, utilizamos las mismas variables que en el caso anterior, pero la variable expresión de p53 la dividimos en dos categorías (\leq ó $>$ 2%), al igual que la variable expresión de ki67 (\leq ó $>$ 12%); observamos que tanto p53 (RR = 8,35; p = 0,0001), como ki67 (RR = 2,47; p = 0,0449), pronostican la progresión tumoral en T1, de modo estadísticamente significativo.

Se llevó a cabo un estudio de progresión mediante análisis de regresión del Cox, seleccionando exclusivamente aquellos tumores pertenecientes al estadio T2a, con el fin de definir la capacidad de las distintas variables, para predecir progresión tumoral en este estadio clínico.

Controlando por las variables: edad, sexo, grado histológico (T2aG2 vs. T2aG3), tamaño tumoral (>3 / ≤ 3 cm), expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles; se evidenció que el grado histológico (RR = 9,70; $p = 0,0125$), pronosticaba la progresión tumoral en T2a, de manera estadísticamente significativa. En el resto de las variables del análisis, no se encontró una relación significativa con la progresión.

En la Tabla 25A se puede observar un listado de las variables que muestran una asociación independiente con la progresión tumoral, en cada uno de los grupos analizados en el estudio.

TABLA 25A: VARIABLES INDEPENDIENTES DE PROGRESIÓN.

	VARIABLES INDEPENDIENTES	RR	95% IC	p
ESTADIOS T1 y T2a	EDAD	1,05	1,01 – 1,09	0,0177
	EXPRESIÓN p53	---	---	0,0197
	EXPRESIÓN p53 2-14%	4,08	1,07 – 15,60	0,0397
	EXPRESIÓN p53 >14%	8,98	2,12 – 38,06	0,0029
ESTADIO T1	EDAD	1,06	1,00 – 1,12	0,0333
	MULTIFOCALIDAD TUMORAL	3,10	1,25 – 7,67	0,0145
	MORFOL. MICROSC. SÓLIDA	55,19	8,22 – 370,65	0,0000
	EXPRESIÓN p53	---	---	0,0002
	EXPRESIÓN p53 0,2-2%	11,21	1,21 – 104,00	0,0334
	EXPRESIÓN p53 2-14%	20,18	2,27 – 179,22	0,0070
	EXPRESIÓN p53 >14%	74,21	7,87 – 699,58	0,0002
	EXPRESIÓN ki67	---	---	0,0040
EXPRESIÓN ki67 >27%	5,29	1,48 – 18,84	0,0102	
ESTADIO T2a	GRADO HISTOLÓGICO 3	9,70	1,63 – 57,64	0,0125

5.4.3. Curvas ROC de progresión:

Se efectuaron curvas ROC para conocer la capacidad de las variables p53 y ki67, para predecir progresión tumoral. Se estudiaron las áreas existentes bajo las curvas obtenidas en los diferentes estadios clínicos, y los resultados observados fueron los siguientes:

- Curvas ROC de p53: tumores pertenecientes al estadio T1: área = 0,831, categoría T1G1: 0,771; categoría T1G2: 0,859; categoría T1G3: 0,710; categoría T2aG2: 0,600; categoría T2aG3: 0,696; categoría CIS: 0,750.
- Curvas ROC de ki67: tumores pertenecientes al estadio T1: 0,738; categoría T1G1: 0,875; categoría T1G2: 0,774; categoría T1G3: 0,565; categoría T2aG2: 0,467; categoría T2aG3: 0,637; categoría CIS: 0,350.

En las Figuras 21 y 22 se puede observar una representación conjunta de las curvas ROC de p53 y ki67 para predecir progresión tumoral, en los tumores del estadio T1, y en la categoría T1G2 respectivamente.

FIGURA 21: CURVA ROC DE PROGRESIÓN EN EL ESTADIO T1.

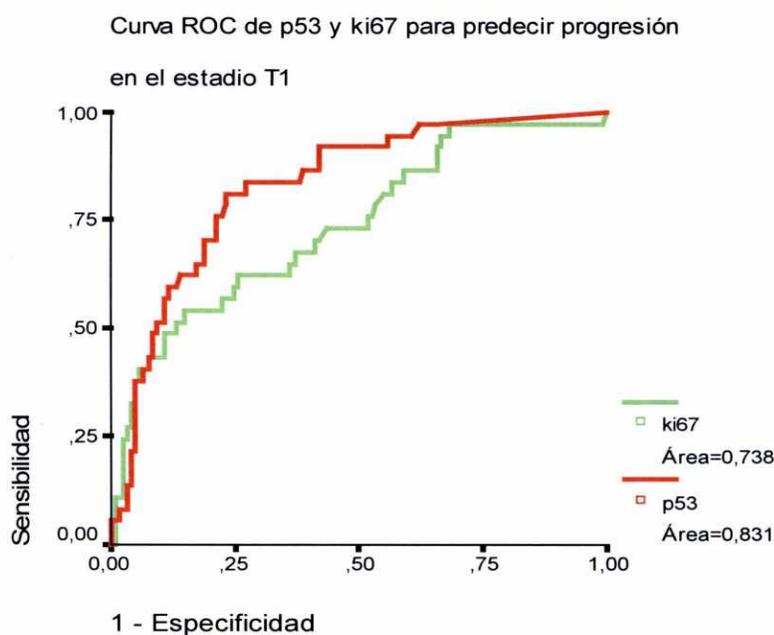
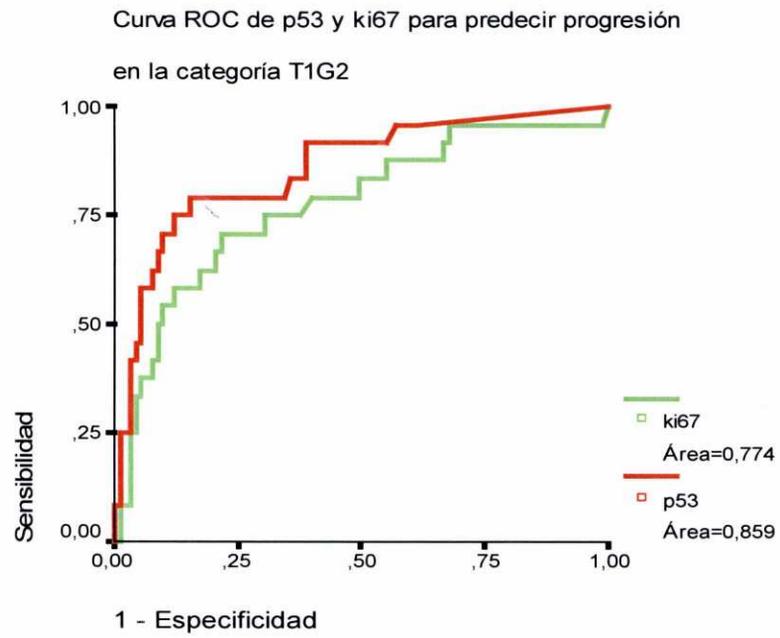


FIGURA 22: CURVA ROC DE PROGRESIÓN EN LA CATEGORÍA T1G2.



6. DISCUSIÓN:

Los estudios que analizan la importancia relativa de cada uno de los factores pronósticos en la supervivencia, la recidiva y la progresión, del carcinoma de células transicionales de vejiga, muestran una gran heterogeneidad, tanto en la metodología como en los resultados. Existe una gran variabilidad en los criterios de inclusión de los pacientes y en el tamaño muestral. El número y tipo de variables pronósticas estudiadas, constituye otra diferencia importante, y en algunos casos, se omiten de un estudio, variables que en otros han mostrado una gran importancia pronóstica.

El tipo de análisis efectuado puede dar lugar a importantes diferencias en los resultados. Una gran parte de los estudios pronósticos, realiza un análisis univariado de los resultados, pero este tipo de análisis tiene sus limitaciones, ya que no se realiza un control de otras variables, que pueden estar relacionadas, y que pueden ser las verdaderas responsables de la asociación encontrada, y por lo tanto no permite obviar el posible efecto confusor ejercido por estas variables. Por otra parte, existe una gran diversidad a la hora de definir los grupos que conforman cada una de las variables. Por todo ello, resulta difícil realizar una comparación efectiva de los resultados obtenidos por los distintos autores.

No existe en el carcinoma de células transicionales de vejiga un factor de riesgo ideal, asociado siempre a un mal pronóstico, y en presencia del cual sepamos en todo momento, que actitud terapéutica debemos tomar. Muchos de los autores, que han estudiado los factores que afectan al pronóstico del cáncer de vejiga, han intentado paliar la falta de precisión individual de los indicadores pronósticos clásicos, dividiendo a los pacientes de sus series en grupos de riesgo, en función de la coincidencia de determinados factores de riesgo. Estos grupos de riesgo se confeccionan, asignando en primer lugar una puntuación a cada variable de mal pronóstico, y contabilizando posteriormente el número de puntos que presenta cada caso, para poder encuadrarlo en su respectivo grupo de riesgo. En la literatura se puede observar con bastante frecuencia, esta estratificación de los pacientes en grupos de riesgo, para intentar predecir tanto la supervivencia (18, 157), como la recidiva (5, 13, 143, 158, 159), y la progresión (10, 13, 18, 160).

La búsqueda del indicador pronóstico ideal del cáncer de vejiga, ha llevado a los investigadores a introducirse en el campo de la biología molecular. Hasta la fecha, este indicador pronóstico ideal no se ha encontrado, sin embargo, la utilización de los nuevos marcadores biomoleculares, de manera complementaria a los parámetros clínico-patológicos clásicos, ha incrementado la precisión pronóstica de manera considerable (18). De todos estos marcadores biomoleculares, es quizás la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53, el más estudiado en los últimos tiempos, en relación con la supervivencia, la recidiva y la progresión, del cáncer de vejiga.

La proteína p53 nativa, debido a su corta vida media, no puede ser detectada por las técnicas inmunohistoquímicas convencionales. Sin embargo, cuando el gen *p53* sufre una mutación, transcribe una proteína con una gran estabilidad metabólica y una vida media prolongada. Estas características de la proteína p53 mutante, hacen posible una fácil detección y cuantificación inmunohistoquímica de la misma.

No todos los tipos de mutaciones del gen *p53* dan lugar a proteínas mutantes fácilmente detectables, de hecho, tan solo las mutaciones de diferente sentido, tienen una traducción inmunohistoquímica. Las mutaciones sin sentido, o las grandes deleciones ocasionadas por las mutaciones de fase de lectura, originan proteínas truncadas o muy alteradas, que son indetectables mediante esta técnica.

Ki67 es una proteína que se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto en la fase G0, de las células que se replican de manera activa. La expresión inmunohistoquímica de ki67 se utiliza para cuantificar la fracción de crecimiento tumoral, y es uno de los índices proliferativos tumorales más utilizados en la actualidad, sustituyendo a otros como el índice mitótico, el índice M/V, o la fracción de células en fase S.

6.1. Supervivencia:

Los estudios de supervivencia del cáncer de vejiga han sido confeccionados de dos maneras diferentes, según se comprueba al revisar la literatura existente sobre la

materia. Algunos trabajos consideran para el análisis la mortalidad cáncer-relacionada, es decir, aquella mortalidad atribuible al cáncer de vejiga, mientras que otros tienen en cuenta la mortalidad general, contabilizando todas las muertes acontecidas durante el seguimiento de los pacientes, estén o no relacionadas específicamente con el cáncer de vejiga.

En los pacientes de nuestra serie, observamos una supervivencia cáncer-relacionada del 74,78%, tras 12 años de seguimiento; sin embargo, si consideramos la supervivencia general, comprobamos que esta se reduce al 46,62%, durante el mismo período de seguimiento. Estos datos permiten constatar que la diferencia conceptual del evento muerte, reviste una extraordinaria importancia, cuando pretendemos realizar un estudio de supervivencia.

Por otra parte, la consideración de uno u otro tipo de muerte, puede dar lugar a grandes diferencias en el análisis de los resultados, tanto en el análisis univariado como en el multivariado. Puede suceder que variables sin capacidad para predecir supervivencia, se transformen en variables pronósticas independientes, cuando se considera la mortalidad cáncer-relacionada. Esto es lo que ha ocurrido en nuestro estudio al analizar de forma multivariada, la importancia pronóstica de la expresión de p53.

Raitanen et al (11), en un estudio retrospectivo efectuado sobre una muestra de 252 tumores vesicales primarios y recidivantes en estadio Ta-T4, con un seguimiento medio de 6,7 años, observan que los factores pronósticos con capacidad para predecir supervivencia cáncer-relacionada, en el análisis multivariado, son la categoría T, el tamaño tumoral (≤ 3 vs. > 3 cm) y el grado histológico de malignidad (G1-G2 vs. G3). Por el contrario, según este mismo estudio, el sexo del paciente, el número de tumores vesicales (≤ 3 vs. > 3), y la localización intravesical del tumor, no modifican significativamente la supervivencia cáncer-relacionada de los pacientes. El hábito tabáquico es considerado en este estudio como un factor con capacidad para predecir supervivencia, sin embargo dicha capacidad sólo se demuestra en el análisis univariado, perdiendo en el multivariado su significado pronóstico, aunque se puede observar que el riesgo relativo de los fumadores es 1,4 veces superior al de los no fumadores.

Los resultados obtenidos por Zieger et al (14), en un estudio multivariado, muestran que la invasión de la lámina propia es el factor pronóstico más importante en la

supervivencia cáncer-relacionada, de los pacientes con tumores superficiales de vejiga. Los autores analizan de forma retrospectiva una muestra de 584 tumores primarios de vejiga, pertenecientes a las categorías Ta-T4 (UICC 1978). El análisis multivariado se lleva a cabo de manera separada en tres de las categorías tumorales (Ta, T1 y T2), y de manera conjunta en los tumores superficiales (Ta y T1). En los tumores superficiales la categoría T (Ta vs. T1), el tamaño tumoral (<3 vs. >3 cm), y el grado histológico (G1, G2, G3 y G4), se muestran como variables independientes de supervivencia cáncer-relacionada. En el análisis efectuado con los tumores del estadio T1, se encuentra que el tamaño tumoral era la única variable pronóstica independiente.

En el año 2000, Millán-Rodríguez et al (12), realizan un estudio retrospectivo con una amplia muestra de 1529 pacientes, con diagnóstico de tumor vesical primario superficial (Ta, T1), cuyo seguimiento medio es de 4,2 años. En todos los casos se efectúa resección transuretral y biopsia vesical randomizada. Las variables consideradas en dicho estudio son: grado histológico (G1 vs. G2 vs. G3), categoría T (Ta vs. T1), existencia de carcinoma in situ asociado, número de tumores (único vs. múltiple), tamaño tumoral (≤ 3 vs. >3 cm), realización de instilaciones intravesicales con agentes quimio o inmunoterápicos (ninguna vs. BCG vs. alguna distinta a BCG). Los autores encuentran que, en el análisis multivariado, los pacientes con grado histológico 3, y aquellos con carcinoma in situ asociado, tienen una supervivencia cáncer-relacionada significativamente menor.

Pawinski et al (145) realizan en 1996 un ensayo clínico, cuyo único propósito es determinar la importancia pronóstica de la administración de agentes quimioterápicos intravesicales, después de la resección transuretral de tumores vesicales pertenecientes a las categorías Ta y T1. Se estudian de manera prospectiva y randomizada, un total de 2535 pacientes, con tumores vesicales primarios y recidivantes, pertenecientes a diferentes ensayos clínicos de la EORTC y MRC. El seguimiento medio de los pacientes es de 7,8 años. La conclusión de este ensayo clínico, en lo que a supervivencia se refiere, es que la realización de instilaciones intravesicales no modifica significativamente la supervivencia general, ni la supervivencia cáncer-relacionada, tanto si se tienen en cuenta todos los tumores, como si se analizan solamente los primarios.

Liukkonen et al (21) realizan un estudio prospectivo y randomizado muy completo, con una muestra de 207 tumores superficiales primarios de vejiga (Ta-T1). Los pacientes de este estudio son randomizados en tres grupos diferentes, en función del tratamiento recibido, y son seguidos durante un período medio de 4,9 años. Se realiza un análisis multivariado, observando que las únicas variables con capacidad para predecir de manera independiente la supervivencia cáncer-relacionada, son la expresión de ki67 y la morfología microscópica sólida del tumor. La expresión de p53, que también es analizada, no muestra una relación significativa con la supervivencia. El umbral de positividad considerado por los autores fue del 20% para p53, y del 15% para ki67. Se observa en este trabajo, que la existencia de un patrón papilar en el estudio microscópico del tumor, representa un factor protector, ya que los pacientes con tumores papilares tienen casi cinco veces menos posibilidades de morir a consecuencia del tumor vesical, que aquellos con tumores sólidos.

En 1998 Jahson et al (59) realizan un estudio retrospectivo, con una muestra de 173 pacientes sometidos a cistectomía radical por cáncer vesical localmente avanzado, que son seguidos durante un período mínimo de 5 años, o hasta la muerte del paciente. Los factores pronósticos analizados de forma univariada y multivariada son la edad, la categoría T, el grado histológico, la expresión de p53 y la expresión de pRb. Los resultados obtenidos por estos autores, muestran que la categoría T es el único factor pronóstico independiente en la predicción de supervivencia cáncer-relacionada, observándose que los tumores de la categoría T3 y T4 tienen un riesgo de morir a consecuencia del tumor vesical, 6,25 veces superior a los tumores de la categoría T1. En este estudio se utiliza como punto de corte, una expresión de p53 del 20%.

Otro estudio en el que se analiza el papel pronóstico de la expresión de p53, es el realizado por Lipponen et al en 1998 (60). Se trata de un estudio de carácter retrospectivo, constituido por 186 pacientes, con un seguimiento medio de 11,1 años. Las categorías tumorales consideradas son Ta-T4. En este trabajo se analizan, además de parámetros clínico-patológicos clásicos, un buen número de factores biológicos relacionados con la actividad proliferativa y supresora tumoral, así como algunos índices citométricos. En el caso de los factores biológicos, no todos son estudiados en relación con la supervivencia, sino que solamente se realiza un estudio descriptivo y comparativo de los

mismos. El análisis multivariado de los datos pone de manifiesto, que las variables con capacidad para pronosticar supervivencia cáncer-relacionada, son la categoría T, la morfología microscópica del tumor, el índice mitótico M/V, y la fracción de células en fase S; no observando relación con la supervivencia en el caso de variables como grado histológico, y ploidía del DNA.

En un intento de mejorar la precisión de los factores pronósticos clínico-patológicos utilizados habitualmente en el cáncer de vejiga, Lipponen et al en 1991 (18) efectúan un estudio en el que además de dichos factores, se analizan diversos parámetros morfocitométricos y citoproliferativos. El estudio es realizado de forma retrospectiva, con una muestra de 265 pacientes con tumores vesicales primarios, pertenecientes a las categorías Ta-T4, y el intervalo medio de seguimiento es de 10,2 años. Las variables analizadas son: categoría T, grado histológico, morfología microscópica, área nuclear, desviación típica del área nuclear, área nuclear de los 10 núcleos más grandes, índice de actividad mitótica e índice mitótico M/V. El análisis multivariado demuestra que las variables independientes de supervivencia cáncer-relacionada, son la categoría T, la morfología microscópica, el índice mitótico M/V, y el área nuclear de los 10 núcleos más grandes. Cuando se consideran solamente los tumores pertenecientes a la categoría T1, tan solo la morfología microscópica muestra capacidad para predecir supervivencia cáncer-relacionada.

Existen pocos estudios que evalúen los factores pronósticos del cáncer vesical músculo-infiltrante, de manera multivariada. Uno de estos estudios es el realizado por Angulo Cuesta et al en 1997 (161). La serie de estos autores consta de 50 pacientes con tumores T2-T3a (UICC 1992), tratados mediante cistectomía radical y linfadenectomía pélvica, siendo el seguimiento medio de 2,82 años. Las variables estudiadas son: categoría T (T2 vs. T3a), grado histológico (G1-2 vs. G3), patrón de crecimiento (papilar vs. sólido), tamaño tumoral (<5 cms vs. >5 cms), edad (<65 años vs. >65 años), y tratamiento efectuado (cistectomía aislada vs. cistectomía + quimioterapia sistémica neoadyuvante). En el análisis univariado, tan solo el grado muestra una relación significativa con la supervivencia, mientras que en el análisis multivariado no se detecta ninguna variable independiente de supervivencia cáncer-relacionada.

La utilidad pronóstica de la expresión nuclear de p53 en tumores músculo-infiltrantes es estudiada, junto con otros factores pronósticos, por Qureshi et al en 1999 (162). En este estudio, compuesto por 83 pacientes (T2-T4b), se intenta relacionar la efectividad terapéutica de la quimioterapia sistémica basada en el Cisplatino, con la expresión inmunohistoquímica de p53, teniendo en cuenta que desde un punto de vista teórico, aquellos tumores vesicales con mutación del gen *p53*, responderán peor a la quimioterapia, ya que sus células no poseerán capacidad apoptótica p53-dependiente. Los resultados del análisis multivariado, muestran que la existencia de respuesta completa al tratamiento quimioterápico, es la única variable independiente en la predicción de supervivencia cáncer-relacionada. La expresión de p53, por el contrario, no muestra capacidad para pronosticar supervivencia, ni para predecir respuesta a la quimioterapia, tanto en el análisis univariado como en el multivariado. El umbral de p53 utilizado en este estudio es del 20%.

Herr et al en 1999 (63) realizan un estudio para valorar si la expresión inmunohistoquímica de p53, presenta utilidad en la selección de candidatos a la preservación vesical, entre los pacientes con tumores vesicales músculo-infiltrantes. Su serie consta de 111 casos con tumores T2-T3 N0 M0, tratados con quimioterapia M-VAC neoadyuvante. El seguimiento medio de los pacientes es de 10 años, y el nivel de p53 utilizado como punto de corte es del 20%. Los autores estiman que la expresión de p53 influye de manera significativa en la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada, y que dicho marcador muestra una gran utilidad en la toma de decisiones terapéuticas, de los tumores vesicales músculo-infiltrantes, especialmente en el estadio T2a (cirugía de preservación vesical vs. cistectomía radical). La conclusión más importante de este estudio, es que los tumores vesicales en estadio T2a, con p53 (-), pueden conservar su vejiga durante un período de 10 años, si presentan una respuesta completa tras la administración de quimioterapia neoadyuvante, por el contrario aquellos tumores con positividad de p53, deben ser tratados con cistectomía precoz, por presentar un elevado riesgo de progresión local y a distancia.

Tsuji et al (28) realizan un estudio para intentar determinar de manera retrospectiva el valor pronóstico de p53 y ki67, en piezas de cistectomía radical. El estudio se efectúa sobre una muestra de 31 tumores en estadio pT1-pT4, con un seguimiento medio

de 2,71 años. Los autores concluyen que tanto la expresión de p53 (punto de corte: 20%), como la de ki67 (punto de corte: 32%), influyen de manera significativa en la supervivencia cáncer-relacionada de estos pacientes. Por otra parte, los pacientes con positividad en ambos marcadores, presentan una supervivencia significativamente más baja, que aquellos pacientes con un solo marcador positivo, o con ambos negativos.

Los estudios de Herr (63) y Tsuji (28), han sido realizados de manera univariada, por ello el valor de los resultados obtenidos por estos autores, es limitado, por las razones que ya hemos explicado con anterioridad.

En muchas ocasiones, los estudios que evalúan los factores pronósticos, relacionados con la supervivencia del carcinoma de células transicionales de vejiga, analizan las distintas variables en relación con la supervivencia general de los pacientes, sin tener en cuenta si la muerte se ha producido a consecuencia del cáncer de vejiga, o por el contrario, no guarda relación con el mismo.

Uno de los primeros estudios multivariados sobre los factores pronósticos del cáncer de vejiga, es el llevado a cabo por Narayama et al en 1983 (163), de manera retrospectiva, utilizando una población de 468 pacientes con tumores primarios y recidivantes. Las covariables controladas en el análisis son la edad, el sexo, la historia previa de tumor vesical, el número de tumores (1, 2, 3 ó ≥ 4), tamaño de la neoformación más grande (<1, 1-2, 3-4 ó ≥ 5 cm), el aspecto macroscópico del tumor (sólo papilar vs. otro aspecto), el compromiso del trigono, el grado histológico (G1, G2 ó G3), el estadio clínico de Jewett (0, A, B, C, ó D), y la estirpe celular del tumor (células transicionales vs. células escamosas o adenocarcinoma). El análisis multivariado de los resultados, considerando solamente los tumores primarios, pone de manifiesto que el tamaño, el grado histológico y el estadio clínico del tumor, se comportan como variables independientes en la predicción de supervivencia general.

Un estudio similar al anterior es llevado a cabo por Takashi et al en 1987 (157), encontrando que los factores relacionados con la supervivencia general, en el análisis de riesgos proporcionales de Cox son, por orden de significación: la categoría T, el tamaño tumoral, los síntomas iniciales, la edad y el grado histológico. En este estudio sólo se incluyen tumores primarios, de las categorías Ta-T4.

Uno de los primeros trabajos en los que se intenta determinar el papel de p53 en la supervivencia del cáncer de vejiga, fue publicado por Esrig et al en 1994 (61). Se estudian de manera retrospectiva 243 pacientes tratados mediante cistectomía radical, por cáncer de vejiga en estadio pTa-pT4. El umbral de sobreexpresión de p53 utilizado es el 10%. Los resultados obtenidos por los autores, demuestran que la expresión de p53 es una variable independiente en la predicción de supervivencia general, cuando se ajusta por grado histológico, categoría pT, categoría pN y expresión de p53.

Hermann et al en 1998 (67) realizan un estudio prospectivo, en el que analizan factores pronósticos predominantemente anatomopatológicos, además de p53. Dicho estudio consta de 143 pacientes con tumores primarios pertenecientes al estadio T1, y en él se efectúa un seguimiento medio de 4,7 años. El umbral de positividad de p53 es del 20%. Las variables consideradas para el análisis son: sexo, edad, grado histológico (G1, G2, G3, ó G4), profundidad de invasión de la lámina propia (T1a, T1b, ó T1c), tipo de invasión de la lámina propia (intramural en bloque vs. dispersa en nidos o bandas), permeación linfática o vascular, displasia en la biopsia vesical randomizada, tamaño tumoral, número de tumores, aspecto macroscópico (papilar vs. sólido y pediculado vs. sesil). Los autores encuentran que la única variable independiente de supervivencia general, es la profundidad de invasión de la lámina propia, mientras que la expresión de p53 se encuentra cerca del nivel de significación estadística, sin alcanzarlo.

El estudio de Nakopoulou et al (68), realiza un análisis retrospectivo e independiente de dos muestras de pacientes: una de 45 pacientes con tumores superficiales (Ta-T1), y otra de 42 pacientes con tumores músculo-infiltrantes (T2-T4). El seguimiento medio de los tumores superficiales e infiltrantes es de 3,85 años y 3,12 años, respectivamente. El porcentaje de expresión de p53 considerado como positivo es del 10%. En el análisis multivariado realizado por los autores, no se demuestra una relación significativa entre p53 y la probabilidad de supervivencia general.

El estudio de Cote et al (65) se realiza de manera retrospectiva con una cohorte de 185 pacientes sometidos a cistectomía radical, por cáncer de vejiga en diferentes estadios (no especificados). Con un seguimiento medio de 8,6 años, y un umbral de positividad de p53 del 10%, los autores realizan un análisis univariado, encontrando que la expresión de p53 se relaciona de manera significativa con la supervivencia general,

observándose además, una asociación mucho más estrecha cuando se consideran conjuntamente las expresiones de p53 y pRb.

Skopelitou et al (27), a diferencia de los anteriores, consideran como p53 (+), aquellos tumores con una expresión nuclear > 1%, y no encuentran relación significativa entre la positividad de p53 y la probabilidad de supervivencia general, tras un seguimiento de más de 7 años.

Los resultados del análisis de nuestra serie, muestran que las variables con capacidad pronóstica independiente de supervivencia cáncer-relacionada, cuando se consideran los tumores T1 y T2a, son la edad ($p = 0,0130$), la expresión de p53 entre 2-14% ($p = 0,0194$) y la expresión de p53 >14% ($p = 0,0197$).

Los tumores que muestran una expresión de p53 $\leq 0,2\%$, tienen una probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada del 95,91%, tras 12 años de seguimiento, mientras que cuando la expresión de p53 es >14%, dicha probabilidad es del 47,38% ($p = 0,0000$). Asimismo se puede observar, que el riesgo de que se produzca una muerte originada por el cáncer de vejiga es 7,71 veces superior en aquellos pacientes con una expresión de p53 superior al 14%, con respecto a los pacientes con una expresión de p53 entre 0-0,2%. En nuestra serie, los pacientes con más de una formación tumoral tienen un riesgo de morir que es 2,49 veces superior a aquellos con un solo tumor, y aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, se encuentra muy cerca de la significación ($p = 0,0585$).

La categoría T del tumor es considerada como un importante factor pronóstico de supervivencia en un gran número de estudios sobre cáncer de vejiga, tanto en el análisis univariado, como en el multivariado. En nuestro estudio, encontramos una fuerte asociación entre la categoría T y la supervivencia cáncer-relacionada (Log rank = 37,13; $p = 0,0000$), en el análisis univariado, sin embargo cuando se efectúa un análisis multivariado, ajustando por esta variable y por otras que pueden ejercer un efecto confusor, se observa que la categoría T no es una variable independiente de supervivencia (RR = 1,82; $p = 0,3446$). La mayoría de los trabajos en los que la categoría T se muestra como una variable independiente de supervivencia (11, 18, 59, 60), han sido efectuados sobre muestras conformadas por pacientes de todas las categorías tumorales (Ta-T4). Esta es

quizás la principal causa de tal divergencia, ya que en nuestro estudio, las categorías utilizadas para el análisis multivariado son solamente T1 y T2a.

Existen otros trabajos en los que se analicen exclusivamente tumores vesicales superficiales, es decir, categorías Ta y T1. Al analizar el papel de la categoría T en este subgrupo de tumores, los resultados son variables, ya que mientras algunos encuentran que la categoría T es una variable independiente (14), otros por el contrario, no observan tal independencia (12, 21). Resulta muy difícil efectuar una comparación acertada entre los resultados obtenidos por dichos autores y los del presente estudio, ya que nuestra serie no consta de tumores de la categoría Ta, los cuales tienen un pronóstico de supervivencia mucho mejor que los T1 y T2a.

Considerando de nuevo los pacientes de nuestra serie, los factores que predicen la supervivencia cáncer-relacionada en el estadio T1 son la edad, el tamaño tumoral >3 cm, la morfología microscópica sólida del tumor, la expresión de p53 en general, la expresión de p53 entre 2-14% y la expresión de p53 >14%. Los tumores con un patrón de crecimiento papilar tienen una probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada del 83,01%, a los 12 años de seguimiento, mientras que en los sólidos, dicha probabilidad desciende hasta el 33,33% ($p = 0,0094$). Es de destacar por otra parte, que aquellos tumores con una morfología microscópica sólida, tienen un riesgo de muerte cáncer-relacionada, casi 41 veces superior, a aquellos con morfología papilar.

Es también llamativo el riesgo de padecer una muerte cáncer-relacionada en T1, observado en los tumores con expresión de p53 >14%, que es casi 42 veces superior, al que presentan los tumores con expresión de p53 entre 0-0,2%. El riesgo de muerte observado en los pacientes con expresión de p53 entre 2-14%, es de 21,66, cuando se compara con aquellos cuya expresión se sitúa entre 0-0,2%, lo cual es también bastante destacable. En este estadio T1, la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada al cabo de 12 años, es del 97,83%, para aquellos tumores con una expresión de p53 $\leq 0,2\%$, y del 41,42% cuando la expresión de p53 es >14%.

El seguimiento medio realizado en los pacientes de nuestro estudio, fue de 6,7 años, observando que el 40% de las muertes relacionadas con el cáncer de vejiga, se producen a partir del cuarto año de seguimiento. Por otra parte, Ojea et al (164) demuestran

que el 34% de los pacientes presentan su primera recidiva, a partir del tercer año de seguimiento. Creemos por lo tanto, que un seguimiento medio de tan solo 3 ó 4 años, no permite realizar una evaluación correcta de los factores pronósticos, ni de la situación vital de los pacientes con cáncer de vejiga; y que la historia natural de esta enfermedad, hace necesario realizar un seguimiento prolongado de los pacientes.

La morfología o arquitectura microscópica del tumor parece constituir un factor pronóstico importante, especialmente en los tumores superficiales. Tanto el aspecto endoscópico de la tumoración vesical, como su morfología microscópica, han sido clásicamente asociados con los diferentes grados histológicos del tumor. Por ello, la importancia pronóstica del patrón de crecimiento tumoral, se podía considerar atribuible al grado histológico con el que se correspondía. Sin embargo son varios los estudios que demuestran que la arquitectura microscópica del tumor tiene un valor pronóstico independiente (2, 18, 21). Es más, según se desprende de los resultados obtenidos por algunos autores, el patrón de crecimiento tumoral microscópico, es un indicador pronóstico de supervivencia de mayor utilidad que el grado histológico, ya que además de mostrarse como un factor independiente, al contrario que el grado, su interpretación no está sometida a la carga de subjetividad de este último (18, 21).

El patrón de crecimiento tumoral microscópico, a diferencia de otros parámetros clínico-patológicos, es considerado en muy pocos de los estudios existentes en la literatura, especialmente multivariados. Sin embargo, se puede observar que, cuando se tiene en cuenta esta variable, suele manifestarse como un factor pronóstico de gran importancia (2, 21). En los pacientes del estadio T1 pertenecientes a nuestra serie, se observa que el riesgo de morir a consecuencia del cáncer de vejiga, es 41 veces mayor cuando el tumor presenta una morfología microscópica papilar, que cuando esta es sólida. Este enorme riesgo relativo observado para los tumores sólidos, es debido probablemente al reducido número de tumores de morfología sólida existentes en el estadio T1 (3,5%). Liukkonen et al (21) en una serie con un porcentaje de tumores sólidos un poco mayor que el de nuestra serie (6,5%), encuentran, coincidiendo con nuestros resultados, un efecto protector en aquellos tumores con patrón papilar (RR = 0,22). Lipponen et al (18) obtienen unos resultados similares, en un trabajo en el que no se refleja la proporción de tumores sólidos. Estos datos enfatizan en primer lugar, el destacado papel pronóstico de la

morfología microscópica en la supervivencia cáncer-relacionada de los tumores en estadio T1, y en segundo lugar, la necesidad de tener en cuenta esta variable cuando se realizan estudios de supervivencia en el cáncer de vejiga.

Los resultados del análisis efectuado en los tumores del estadio T2a, pertenecientes a nuestra serie, muestran que los únicos factores que predicen de manera independiente la supervivencia cáncer-relacionada, son la edad y el grado histológico. Los pacientes de la categoría T2aG3 presentan un riesgo de morir en relación con el cáncer de vejiga, casi 11 veces superior a los pacientes de la categoría T2aG2. La expresión de p53 no muestra relación con la supervivencia cáncer-relacionada en esta categoría tumoral. Por lo que respecta a ki67, se comprueba que aquellos tumores de la categoría T2a con una expresión de ki67 >27%, presentan un riesgo de morir 4,59 veces superior a aquellos con una expresión entre 0-5%, aunque esta relación no es estadísticamente significativa ($p = 0,0975$).

No hemos encontrado en la revisión de la literatura ningún trabajo que analice el papel pronóstico de la expresión de p53, limitándose a los tumores de la categoría T2a, o a la categoría T2. La mayor parte de las veces, los trabajos que analizan este grupo de tumores, utilizan unas muestras bastante heterogéneas, en las que se incluyen desde tumores superficiales, hasta tumores con afectación extravesical (64, 65). Por otra parte, muchos de los trabajos en los que se evalúa el papel de p53, en el pronóstico de los tumores infiltrantes, son estudios retrospectivos basados en series de cistectomía radical, por lo que a priori ya se ha seleccionado un grupo de tumores con una serie de factores clínicos y/o patológicos de mal pronóstico (61, 28, 59, 65, 165).

Entre los trabajos en los que se realiza un análisis selectivo de los tumores infiltrantes (T2a o mayor), encontrando una relación significativa entre la expresión de p53 y la supervivencia, figuran el de Kuczyk et al (165), Skopelitou et al (27) y Herr et al (63), aunque en estos dos últimos trabajos sólo se realiza análisis univariado. Jahnson et al (59), realizan análisis uni y multivariado, también con tumores de la categoría T2a o mayor, pero no observan relación significativa entre p53 y la supervivencia de los pacientes.

Se puede comprobar que los estudios en los que se analiza el papel de la expresión de p53 en los tumores infiltrantes, el umbral de positividad adoptado, para obtener dos poblaciones con riesgos significativamente diferentes, es considerablemente

más elevado que en los tumores superficiales, llegando hasta el 40% utilizado por Kuczyk et al (165), con la consiguiente pérdida de especificidad de la técnica inmunohistoquímica. Esta elevación en el nivel de positividad utilizado, sugiere una pérdida de capacidad pronóstica de la expresión de p53 en los tumores músculo-infiltrantes, con respecto a los superficiales. En nuestra serie de tumores T2a hemos podido comprobar, que a medida que incrementamos el umbral de positividad de p53, obtenemos mayores diferencias en la supervivencia, entre los dos grupos resultantes, y a partir de un umbral del 50% estas diferencias son estadísticamente significativas. Sin embargo, en el análisis multivariado se pierde dicha significación estadística.

La interpretación del papel de ki67 en los tumores de la categoría T2a es todavía más difícil, debido fundamentalmente al escaso número de trabajos que abordan el problema. Tsuji et al (28), comunican una relación significativa entre la expresión de ki67 (> ó < de 32%) y la supervivencia cáncer-relacionada, en el análisis univariado. Los autores no realizan análisis multivariado.

6.2. Recidiva:

El carcinoma de células transicionales de vejiga se caracteriza por su elevada tendencia a la recidiva, después del tratamiento inicial mediante resección transuretral completa. Aproximadamente un 50-80% de los tumores superficiales presentarán recidiva en algún momento de su evolución (5, 144, 145, 146). Aunque la mayoría de las recidivas (70-80%) se diagnostican durante los primeros 18 meses, tras la resección del tumor primario (5, 34, 159, 166), hasta un 34% de los pacientes presentan su primera recidiva a partir del tercer año de seguimiento, según observan Ojea et al (164). Por ello creemos que es necesario que en los estudios de recidiva se realice un seguimiento medio muy prolongado, para que los resultados se ajusten a la realidad de esta enfermedad. Debido al gran número de recidivas que sufren los pacientes con esta enfermedad, y según algunos

autores, el cáncer de vejiga es probablemente el tumor más frecuentemente diagnosticado en el sexo masculino (143).

Las recidivas de los tumores superficiales suelen ser del mismo grado y estadio que el tumor primario, aunque aproximadamente en un 25% de los casos, la recidiva se asocia a un incremento del grado histológico (17). Por otra parte, se estima que entre un 7% y un 20% de los tumores superficiales, desarrollarán una enfermedad músculo-infiltrante en alguna de las recidivas (5, 34, 145, 159).

La mayoría de las lesiones vesicales (en torno al 70%), que aparecen después de la resección del tumor primario son nuevas ocurrencias, y no recidivas verdaderas, ya que se localizan en un área de la vejiga distinta al tumor primario. La aparición de nuevas ocurrencias tumorales se debe al carácter multicéntrico de la enfermedad urotelial, fruto de la existencia de una inestabilidad genética del epitelio transicional, que recubre el tracto urinario. Es probable que el nuevo tumor se desarrolle sobre áreas de displasia urotelial preexistente, o bien que se produzca una implantación de células tumorales durante la RTU del tumor primario (17, 47, 144, 167, 168).

En el estudio realizado por Millán Rodríguez et al (12) en el año 2000, ya comentado con anterioridad, los autores observan que, en el análisis multivariado, las variables que predicen de manera independiente la recidiva tumoral, son la multifocalidad tumoral, el tamaño tumoral, la asociación de carcinoma in situ y la utilización de instilaciones intravesicales de forma adyuvante. El grado histológico y la categoría T, por el contrario, no parecen influir de manera significativa en la recidiva. En este estudio, a diferencia de la mayoría, la variable instilaciones intravesicales consta de tres grupos: BCG, otro tipo de agente, y no instilación. Se observa que el efecto protector frente a la recidiva es significativamente mayor ($p=0,0002$) con BCG ($RR=0,39$), que cuando se emplea otro tipo de sustancia ($RR=0,76$), considerando el $RR=1$, cuando no se utiliza ningún agente intravesical.

Kiemeney et al realizan dos trabajos en 1993 (13) y 1996 (169), en los que se evalúan de manera prospectiva los factores relacionados con la recidiva del carcinoma de células transicionales de vejiga. La muestra utilizada en ambos trabajos consta de 1674 pacientes, con tumores vesicales superficiales (Ta-T1) primarios, que son seguidos durante un período medio de 3,5 años. Los autores realizan un análisis multivariado de los

resultados, ajustando por las variables: edad, sexo, categoría T (Ta vs. T1), grado histológico (G1 vs. G2 vs. G3), número de tumores (uno vs. más de uno), número de áreas vesicales afectadas por el tumor (1 vs. 2 vs. 3 ó más), presencia de carcinoma in situ asociado, y realización de tratamiento intravesical adyuvante (RTU sola vs. agente quimioterápico vs. BCG). Los resultados de ambos estudios muestran algunas diferencias, ya que en 1993 los autores observan que las variables independientes de recidiva son la categoría T, la multifocalidad tumoral, el número de áreas vesicales afectadas por el tumor, y la realización de tratamiento intravesical adyuvante. Sin embargo, en 1996 las variables que muestran una capacidad independiente para predecir la recidiva, son: el grado histológico, la categoría T, y la aplicación de instilaciones intravesicales.

Probablemente las diferencias encontradas entre ambos estudios, sean debidas a que en 1996, las variables grado y categoría T son analizadas conjuntamente, mientras que en 1993 se consideran como variables aisladas. Se utiliza en estos estudios una variable de volumen tumoral poco común, que los autores designan como: número de áreas vesicales afectadas por el tumor. Las áreas a las que se refieren son: cuello, trígono, cúpula, y las caras anterior, posterior, lateral derecha y lateral izquierda. El estudio realizado por Kiemeny et al en 1993 (13) y el de Millán Rodríguez et al en 2000 (12), son los trabajos multivariados de recidiva con una mayor concordancia de resultados, entre todos los trabajos recogidos, aún así podemos comprobar que existen importantes diferencias entre ellos.

Un estudio prospectivo de recidiva en el cáncer de vejiga es efectuado por Parmar et al (158) en 1989, utilizando una población de 305 pacientes con tumores vesicales primarios superficiales (Ta-T1), con un seguimiento medio de 3,1 años. Los autores consideran una serie de factores, para determinar su relación con la recidiva tumoral: resultado de la cistoscopia a los tres meses de la resección del tumor primario, número de tumores, tamaño tumoral, afectación de la cara posterior de la vejiga, grado tumoral (evaluado por el patólogo local y el de referencia), y categoría T del tumor (evaluada por el patólogo local y el de referencia). Tras analizar los citados factores, los autores concluyen que el número de tumores (uno vs. más de uno), y el resultado de la cistoscopia a los tres meses de la resección (tumor vs. no tumor), son las únicas variables que predicen de modo independiente la recidiva tumoral. En función de estas dos variables

independientes, los autores crean tres grupos de riesgo de recidiva, entre los cuales encuentran diferencias estadísticamente significativas. Hay que tener en cuenta que en este estudio, se demuestra una importante falta de uniformidad entre el patólogo local y el de referencia, en la asignación de la categoría T y el grado histológico de los tumores. Esta variabilidad se traduce en unos resultados contradictorios, cuando se analizan ambas variables de forma univariada. Por este motivo, los autores deciden no incluir el grado histológico, ni la categoría T, en el análisis multivariado.

El trabajo publicado por Witjes et al en 1994 (148), arroja unos resultados que contradicen algunas de las conclusiones más destacadas del estudio de Parmar et al (158). Witjes et al estudian de manera prospectiva y randomizada, un total de 469 pacientes con tumores vesicales primarios y recidivantes, pertenecientes a las categorías Ta, T1 y Tis, que son seguidos durante un período medio de tiempo de 2,66 años. Los resultados de este estudio muestran que las únicas variables relacionadas de manera independiente con la recidiva tumoral, son la localización intravesical del tumor y la multifocalidad tumoral. Este estudio, a diferencia del trabajo de Parmar et al (158), no encuentra que la evaluación del grado y la categoría T, por parte del patólogo local o el de referencia, modifique los resultados de manera significativa. En ninguno de los dos casos, se observa una relación significativa entre el grado histológico, la categoría T y la probabilidad de recidiva.

Witjes et al realizan en 1992 otro estudio, en este caso prospectivo y no randomizado (146), cuya finalidad principal es evaluar el papel de la biopsia vesical aleatoria, en la predicción de recidiva tumoral. Se utiliza en el mismo una muestra de 1026 pacientes con tumores vesicales primarios superficiales (categorías Ta y T1), con un seguimiento medio de 3,4 años. Los autores concluyen que las variables independientes en la predicción de recidiva son: la administración de terapia intravesical adyuvante, la categoría T, el número de áreas vesicales afectadas por el tumor, y la multiplicidad tumoral, aunque esta última variable es considerada como independiente, porque los autores amplían mucho el intervalo de la significación estadística, ya que el valor de "p" es 0,09. Respondiendo al título de su trabajo, los autores concluyen que la existencia de CIS en la biopsia vesical randomizada, no proporciona información pronóstica significativa, con respecto a la probabilidad de recidiva.

Otro estudio multivariado de recidiva, es el efectuado por Dalesio et al en 1983 (159), en el cual se evalúa de manera prospectiva y randomizada, una muestra de 308 pacientes de diferentes centros, con tumores vesicales primarios y recidivantes, todos ellos pertenecientes a la categoría T1. Los autores observan, que los factores que afectan de manera independiente a la recidiva son, por orden de importancia: el número de tumores vesicales, la tasa de recidiva (número de recidivas / año) antes de entrar en el estudio, y el tamaño tumoral. La principal conclusión de estos autores es que la tasa de recidiva tumoral antes de entrar en el estudio, predice con mayor precisión la probabilidad de una recidiva ulterior, que el hecho de que el tumor sea primario o recidivante.

Mulders et al (143) realizan en 1994 un estudio prospectivo, que consta de 387 pacientes con tumores vesicales primarios y recidivantes, pertenecientes a las categorías Ta y T1. El seguimiento medio de los pacientes es de 2,25 años, y todos ellos habían recibido terapia intravesical adyuvante con Mitomicina C, BCG-Tice, o BCG-RIVM. Se efectúa un análisis multivariado ajustando por las variables: localización del tumor, multiplicidad, categoría T, grado histológico, historia previa de tumor vesical, tamaño, sexo y edad. Los autores concluyen, en primer lugar, que según los resultados del análisis univariado, existen unas áreas vesicales que se asocian a un alto riesgo de recidiva, cuando el tumor se localiza en ellas; estas áreas son: cuello vesical, uretra prostática, trigono y cara posterior. En segundo lugar, que las únicas variables con capacidad para predecir recidiva de manera independiente, son la localización del tumor y la multifocalidad del mismo, y en función de estas dos variables, establecen dos grupos de riesgo.

El trabajo realizado por Allard et al en 1998 (5), se realiza de manera multicéntrica y prospectiva, y consta de 333 pacientes diagnosticados de tumor vesical primario, en estadio Ta-T1. Se efectúa un seguimiento medio de 2,94 años, observando que las variables relacionadas significativamente con la recidiva, en el análisis multivariado, son la multifocalidad tumoral, el tamaño tumoral (≤ 3 cm vs. >3 cm), el grado histológico (G1 vs. G2-3), y la categoría T (Ta vs. T1). Este trabajo, como otros mencionados con anterioridad, intenta dividir a los pacientes en cuatro grupos de riesgo, en función del número de variables independientes de recidiva, presentes en el momento del diagnóstico

del tumor primario. Adoptando este esquema, los autores observan diferencias significativas entre los cuatro grupos, en cuanto a la probabilidad de recidiva, y por otra parte, que los pacientes que presentan las cuatro variables asociadas de manera independiente a la recidiva, tienen un riesgo de recidivar 4,39 veces superior, al de aquellos pacientes en los que no se identifica ninguna de estas cuatro variables.

Páez Borda et al (166), en un estudio prospectivo realizado con 62 pacientes, con tumores vesicales de las categorías Ta y T1, que son seguidos durante un período medio de 1,16 años, concluyen que la edad del paciente (<65 vs. ≥65) es la única variable con capacidad pronóstica independiente en la recidiva tumoral. El seguimiento medio de los pacientes de este estudio es bastante reducido, y el porcentaje de pacientes que presentan recidiva al final del mismo es del 46,7%. Si el período de seguimiento fuese más prolongado, aparecerían inevitablemente más recidivas, que podrían cambiar sustancialmente los resultados obtenidos. Esta observación es compartida por los autores, tras realizar una revisión de la serie, aproximadamente un año después, y así lo manifiestan al final del artículo.

Pawinski et al (145) realizan un ensayo clínico en 1996, cuyas características ya fueron descritas con anterioridad. Los resultados de este estudio, en lo que a la supervivencia libre de recidiva se refiere, muestran que la administración de agentes quimioterápicos intravesicales adyuvantes, se asocia a una disminución estadísticamente significativa del riesgo de recidiva ($p < 0,01$). Esta disminución del riesgo de recidiva es del $20 \pm 6\%$ en el grupo que recibió tratamiento. Los autores realizan también un análisis, considerando exclusivamente los tumores primarios, y los resultados, en lo que a recidiva se refiere, son prácticamente idénticos a los del análisis del grupo entero ($p < 0,01$).

Los resultados del trabajo de Pawinski et al (145) son coincidentes con los de la mayoría de los análisis multivariados, en los que se analiza la importancia de realizar instilaciones intravesicales. Así los trabajos de Witjes et al (146), Millán-Rodríguez et al (12), y los dos de Kiemeny et al (13, 169) también resaltan la gran importancia pronóstica que tiene la administración de tratamiento intravesical adyuvante, en la prolongación de la supervivencia libre de recidiva, de los tumores superficiales de vejiga.

La inclusión de marcadores del ámbito de la biología molecular, como la expresión inmunohistoquímica de p53 o ki67, ha alterado sustancialmente los resultados obtenidos en los estudios que analizan el riesgo de recidiva de los pacientes con cáncer de vejiga. En cuanto a la importancia pronóstica de estos dos marcadores en la recidiva tumoral, los trabajos realizados a tal efecto, muestran una amplia variedad de resultados, en ocasiones divergentes.

El trabajo publicado por Esrig et al en 1994 (61), y que fue analizado previamente en relación con la supervivencia, realiza también un estudio multivariado de recidiva. Los resultados ponen de manifiesto que la expresión de p53 es una variable independiente en la predicción de recidiva tumoral, cuando se ajusta por categoría pT, grado histológico, categoría pN y expresión de p53; es más, en los tumores órgano-confinados, p53 es la única variable independiente de recidiva. Los autores se apoyan en sus resultados para sugerir que aquellos pacientes con tumores órgano-confinados, que muestran una sobreexpresión de p53, podrían beneficiarse de la administración de quimioterapia sistémica adyuvante. Es importante tener en cuenta que en pacientes sometidos a cistectomía radical, los conceptos recidiva y progresión tumoral, son prácticamente superponibles.

Una conclusión totalmente diferente a la del estudio de Esrig et al, es la obtenida por Nakopoulou et al en 1995 (68). Los autores de este trabajo, que ya fue comentado con anterioridad, no realizan un análisis multivariado de recidiva, pero en el análisis univariado no encuentran una relación significativa entre la expresión de p53 y la recidiva de los tumores superficiales. Unos resultados similares, también mediante análisis univariado, son obtenidos por Skopelitou et al en 1997 (27), quienes en una muestra muy heterogénea de 110 pacientes, no observan correlación significativa entre la expresión de p53 y la probabilidad de recidiva en los tumores superficiales.

Cote et al en 1998 (65), en un estudio ya analizado previamente, observan que la sobreexpresión de p53 se relaciona de manera significativa con la probabilidad de recidiva. Al igual que en la supervivencia, observan un efecto sinérgico entre la sobreexpresión de p53 y pRb, de modo que, cuando ambos marcadores se encuentran sobreexpresados, su relación con la recidiva es aún mayor, que la de p53 de forma aislada. Una limitación importante de este estudio, como la de los dos anteriormente mencionados,

es que sus resultados son obtenidos mediante análisis univariado, con lo cual su valor pronóstico es evidentemente menor.

En el estudio prospectivo y randomizado de Liukkonen et al (21), cuyas características fueron definidas anteriormente, se analiza la expresión de p53 y ki67, y su relación con la recidiva tumoral. En el análisis univariado, ambos marcadores se relacionan de manera significativa con la recidiva, sin embargo en el análisis multivariado, pierden su importancia pronóstica, siendo el grado histológico la única variable independiente en la predicción de recidiva tumoral.

Zlotta et al (138) realizan un estudio en 1999, en el que tratan de evaluar de manera retrospectiva la relación existente entre las expresiones de p53, p21 y ki67, y el pronóstico de los tumores vesicales superficiales tratados con BCG. Para ello examinan una muestra de 47 pacientes con tumores primarios y recidivantes, pertenecientes a las categorías Ta y T1, que son seguidos durante un período medio de 2 años. Los autores comprueban que la única variable independiente de recidiva tumoral, es la categoría T, mientras que la expresión de ki67, modifica significativamente la recidiva en el análisis univariado, pero carece de valor pronóstico en el multivariado. Por su parte, la expresión de p53 no muestra relación con la recidiva, en ninguno de los dos tipos de análisis. Los autores concluyen que las expresiones de p53 y ki67, no tienen capacidad para predecir la recidiva de los tumores vesicales superficiales tratados con BCG.

Un estudio muy reciente de Gontero et al (170), efectuado en el año 2000, analiza también el papel de p53 y ki67 en la recidiva tumoral. Sobre una muestra de 192 pacientes con tumores Ta y T1, los autores crean dos grupos de 104 y 88 pacientes, correspondientes a los tumores primarios y a los recidivantes, respectivamente. Los pacientes son estudiados de manera retrospectiva y el seguimiento medio es de 2,17 y 2,33 años para cada uno de los grupos. Se considera un umbral de positividad inmunohistoquímica del 20%, tanto para p53, como para ki67. Controlando por diversas covariables, se observa que la expresión de ki67 es el único factor que predice de manera independiente la recidiva tumoral, en ambos grupos de pacientes. No se encuentra una relación significativa entre p53 y la recidiva.

Pfister et al (34) realizan un estudio prospectivo con 308 pacientes y un seguimiento medio de 5,64 años. Todos los tumores son primarios y pertenecen a las

categorías Ta y T1. Se realiza un análisis multivariado, controlando por edad, sexo, categoría T, grado histológico, tamaño tumoral, multifocalidad y expresión de ki67 ($>$ ó $<$ 10%). Las variables asociadas de manera significativa con la recidiva son: la categoría T, el tamaño tumoral y la multifocalidad. La expresión de ki67 no se muestra como una variable independiente de recidiva. Sin embargo, cuando los autores efectúan un análisis limitado a los tumores mayores de 3 cm, observan que la expresión de ki67 predice de manera independiente de recidiva, en este subgrupo de tumores.

Los resultados del análisis multivariado de nuestro estudio muestran, que las variables que predicen de manera independiente la recidiva tumoral, al analizar conjuntamente los tumores pertenecientes a las categorías T1 y T2a, son: categoría TG ($p=0,0148$), multifocalidad tumoral ($p=0,0001$), tamaño tumoral $>3\text{cm}$ ($p=0,0150$), presencia de CIS en la biopsia aleatoria ($p=0,0044$), y expresión de ki67 ($p=0,0461$). Entre todas las variables independientes, merece la pena destacar la variable multifocalidad tumoral, ya que se puede observar que aquellos pacientes con más de un tumor, tienen un riesgo de recidivar 2,83 veces superior al de los pacientes con un solo tumor.

En el análisis univariado encontramos que la expresión de p53 modifica significativamente la recidiva, y observamos que los tumores cuya expresión de p53 es $\leq 0,2\%$, presentan una supervivencia libre de recidiva del 58,44%, tras 12 años de seguimiento, mientras que en aquellos con p53 $>14\%$, es del 32,35%, tras 11 años de seguimiento. En cuanto a la expresión de ki67, también se observan diferencias significativas en relación con la recidiva. Un 59,08% de los pacientes con ki67 $\leq 5\%$, permanecen libres de recidiva tras 12 años de seguimiento, frente al 31,70%, cuando ki67 es $>27\%$.

Examinando solamente el subgrupo de tumores pertenecientes a la categoría T1, encontramos que las variables con capacidad para predecir la recidiva de manera independiente son: grado histológico ($p=0,0185$), multifocalidad tumoral ($p=0,0000$), tamaño tumoral $>3\text{cm}$ ($p=0,0173$), CIS en la biopsia aleatoria ($p=0,0165$), y expresión de ki67 $>27\%$. Merece la pena destacar de nuevo la variable multifocalidad tumoral, por el elevado riesgo relativo de recidiva (17,73), que presentan los pacientes con más de un tumor.

En cuanto a la probabilidad de recidiva de los tumores T1 en función de la expresión de p53, observamos que los pacientes con una expresión de p53 $\leq 0,2\%$ permanecen libres de recidiva en el 64,94%; por el contrario, cuando la expresión de p53 es $>14\%$, sólo permanecen libres de recidiva el 30,36%. Estos resultados son estadísticamente significativos en el análisis univariado, pero pierden su significación en el multivariado. Por lo que respecta a la expresión de ki67, se observa que cuando ki67 es $\leq 5\%$, la supervivencia libre de recidiva a los 12 años es 59,65%, frente al 39,52%, cuando ki67 es $>27\%$. Estos resultados no son estadísticamente significativos.

En los tumores de la categoría T2a de nuestro estudio, y controlando por las variables: edad, sexo, grado histológico (G2 vs. G3), tamaño tumoral ($\leq 3\text{cm}$ vs. $>3\text{cm}$), expresión de p53 en cuartiles y expresión de ki67 en cuartiles, observamos que ninguna de ellas se encuentra significativamente relacionada con la recidiva.

La existencia de multifocalidad tumoral, en el momento de la resección transuretral del tumor vesical primario es, según se desprende de la mayoría de los estudios, uno de los factores clínico-patológicos más importantes en la predicción de recidiva tumoral. Todos los trabajos analizados, tanto univariados como multivariados, señalan de manera unánime la gran importancia de esta variable en la recidiva (5, 12, 13, 34, 143, 146, 148, 158, 159). Los resultados de nuestro estudio son totalmente coincidentes con la literatura, ya que comprobamos que el riesgo relativo de recidiva de los tumores múltiples es 2,83, cuando se consideran las categorías T1 y T2a conjuntamente, siendo este riesgo relativo 3,65, cuando se considera solamente la categoría T1. En ambos grupos, la multifocalidad tumoral es la variable independiente que muestra una mayor asociación con la recidiva.

El hecho de que un tumor se manifieste de manera multifocal desde el inicio, es un reflejo de la multicentricidad inherente del tumor urotelial, en el que existen lesiones endoscópicamente visibles, acompañadas de lesiones displásicas o premalignas, que se manifestarán en otro momento de la historia natural del tumor. En los tumores únicos, la inestabilidad genética del urotelio vesical es ya manifiesta, como lo demuestra el hecho de que el 70% de las recidivas son realmente nuevas ocurrencias, es decir, que el nuevo tumor no emerge sobre el lecho cicatricial de la resección anterior, sino que lo hace sobre un área

endoscópicamente indemne. En el caso de los tumores múltiples existe probablemente un mayor grado de inestabilidad genética del epitelio (17, 47, 140, 144, 167, 168), ya que se desarrollan de manera sincrónica varios tumores en diferentes localizaciones de la cavidad vesical, además de asociarse a un riesgo significativamente elevado de recidiva vesical, y de constituir el principal factor de riesgo de recidiva en el tracto urinario superior, después de un tumor primario vesical, según demuestran Millán-Rodríguez et al (171) en un estudio multivariado.

Otro de los factores que en nuestro estudio, muestra una capacidad independiente para predecir recidiva, es el tamaño tumoral >3cm. Nuestros resultados son consistentes con los de la literatura revisada, ya que a pesar de que el tamaño es una variable pronóstica considerada en muy pocas ocasiones, para la realización de estudios de recidiva, esta variable muestra importancia pronóstica en la mayoría de dichos estudios (5, 12, 34, 159). Las categorías de esta variable son confeccionadas por cada autor de manera aleatoria, aunque 3 cm es el tamaño crítico, utilizado por la mayoría de los autores para dividir los grupos.

El papel del grado histológico del tumor en la recidiva tumoral es controvertido, y los estudios se dividen, aproximadamente en la misma proporción, entre los que consideran esta variable como un factor pronóstico de recidiva (5, 21, 146, 169), y los que no observan una relación significativa con la misma (12, 13, 148, 158). En nuestro estudio, el grado histológico se muestra como una variable independiente de recidiva en los tumores de la categoría T1, pero paradójicamente, la mayor probabilidad de recidiva se asocia a los tumores de grado 1, siendo los de grado 3 los que recidivan con menos frecuencia. Como ya hemos comentado con anterioridad, creemos que el grado histológico tiene un valor pronóstico relativo, debido a la enorme variabilidad que existe en su interpretación.

La existencia de carcinoma in situ en la biopsia aleatoria de la vejiga, muestra en nuestro estudio, capacidad para predecir de manera independiente la recidiva tumoral. La comparación con la literatura resulta difícil en este caso, ya que existen muy pocos estudios que evalúen de manera multivariada la importancia de esta variable en la recidiva (12, 13, 146), y las conclusiones de los mismos son divergentes. Millán-Rodríguez et al (12), comprueban en su estudio que la existencia de CIS en la biopsia randomizada,

predice la recidiva tumoral de manera independiente, sin embargo Kiemeny et al (13) no encuentran una relación significativa entre la positividad de la biopsia aleatoria y la recidiva tumoral. Estos dos estudios son prácticamente incomparables, en lo que a esta variable se refiere, ya que existe una diferencia radical en el concepto de biopsia positiva. Así el estudio de Kiemeny et al (13), considera como biopsia positiva la presencia de carcinoma in situ, o cualquier grado de displasia (severa, moderada o leve), y recordemos que en la actualidad se acepta que los términos carcinoma in situ y displasia severa son sinónimos (69, 70), pero las displasias moderada y leve, son entidades diferentes. Millán-Rodríguez et al (12), por su parte, califican adecuadamente como biopsia positiva, sólo aquella en la que existe CIS.

En otras ocasiones las diferencias encontradas entre los estudios, están relacionadas con el método para obtener las biopsias aleatorias (pinza fría o asa de resector), o con el tipo de mucosa donde se recoge la biopsia (mucosa endoscópicamente sana o mucosa sospechosa). Según la mayoría de los autores, las biopsias deben ser tomadas mediante pinza fría, de un área de mucosa endoscópicamente normal (144).

El número de biopsias aleatorias realizadas por los distintos autores, es también variable, así Witjes et al (146), tomando 4 muestras biópsicas, no encuentran una relación significativa entre la positividad de la biopsia y la recidiva, mientras que Millán-Rodríguez et al (12), con 6 muestras de biopsia, sí la encuentran. Estos últimos autores atribuyen la discrepancia en los resultados de los dos estudios (12, 146), al diferente número de biopsias realizado, sin embargo nuestros resultados coinciden con los de Millán-Rodríguez et al (12), a pesar de que nosotros hemos efectuado 5 tomas de biopsia aleatoria (incluyendo la uretra prostática), por lo que no creemos que esta sea la única causa de tal discrepancia. Otra de las razones que pueden contribuir a estas diferencias es que, los tumores que conforman estas dos series de gran tamaño, tienen una distribución totalmente diferente, así la serie de Witjes et al (146), está formada por un 67,35% de tumores Ta y un 32,65% de T1, mientras que la de Millán-Rodríguez et al (12), consta de un 36% de tumores Ta y un 64% de T1. Nuestra serie de tumores superficiales, consta solamente de tumores de la categoría T1, quizás por ello nuestros resultados coinciden con los de Millán-Rodríguez et al (12), en cuya serie los tumores T1 constituyen dos tercios del total.

La expresión nuclear de p53, determinada por métodos inmunohistoquímicos, muestra en la mayoría de los estudios multivariados poca relevancia, en la predicción de recidiva tumoral. Solamente hemos encontrado un estudio multivariado de recidiva, en el que la expresión de p53 se muestre como una variable independiente (61). Tal y como sucede en nuestro estudio, Liukkonen et al (21) y Zlotta et al (138), encuentran una relación significativa entre esta variable y la recidiva, en el análisis univariado, que se pierde al ajustar por otras covariables. El estudio de Nakopoulou et al (68), realizado en pacientes con CIS, concluye que la expresión de p53 no guarda ninguna relación con la recidiva tumoral, en el análisis univariado, ni en el multivariado.

La expresión inmunohistoquímica de ki67, determinada mediante MIB-1, es uno de los índices de actividad proliferativa tumoral más ampliamente reconocidos. El número de trabajos que analizan de forma multivariada la importancia de ki67 en la recidiva tumoral, es muy reducido, y existe una ausencia total de unanimidad en los resultados comunicados. Mientras Gontero et al (170) y Popov et al (172), observan en ki67 una capacidad pronóstica independiente de recidiva, Zlotta et al (138) y Liukkonen et al (21), no encuentran una relación significativa entre ki67 y recidiva. Pfister et al (34), por su parte, observan que la expresión de ki67 sólo presenta una asociación significativa con la recidiva en un subgrupo de la muestra, correspondiente a los tumores mayores de 3 cm.

Los resultados de nuestro estudio muestran que la expresión de ki67 es un factor independiente en la predicción de recidiva tumoral, al analizar conjuntamente los tumores T1 y T2a. Del mismo modo, en los tumores de la categoría T1, la expresión de ki67 por encima del 27%, se muestra como un factor de importancia pronóstica independiente. Es posible que los tumores T1, con expresión de ki67 >27%, deban ser considerados como tumores de alto riesgo de recidiva, y ser tratados como tales, como ocurre con los tumores de la categoría T1, que son multifocales, mayores de 3 cm, o presentan CIS asociado. La independencia de dichas variables en la predicción de recidiva, se demuestra también en nuestro estudio.

6.3. Progresión:

La progresión tumoral es un momento crítico en la historia natural del cáncer de vejiga. Esta progresión es especialmente importante entre los tumores pertenecientes al estadio T1, ya que en ellos el incremento de la categoría T, y por lo tanto el desarrollo de infiltración de la capa muscular propia, supone un cambio drástico desde el punto de vista pronóstico, y especialmente terapéutico. En los tumores del estadio T1, la identificación de nuevos factores pronósticos, que permitan delimitar diferentes grupos de riesgo, nos ayudaría a tomar decisiones terapéuticas más precisas, adecuando el tratamiento a cada caso en particular, evitando de este modo un gran número de muertes y de cistectomías innecesarias.

Por otra parte, el dilema terapéutico no surge solamente a la hora de indicar una cistectomía, sino que en muchas ocasiones tenemos que decidir el tipo de agente quimio o inmunoterápico intravesical más oportuno, la dosis del mismo, el número de instilaciones, o bien la periodicidad del seguimiento y el tipo de prueba diagnóstica que se utilizará para efectuar este seguimiento. Sería también muy interesante la identificación de nuevos factores pronósticos de progresión en los tumores músculo-infiltrantes, para poder definir con claridad qué pacientes son susceptibles de tratamiento de preservación vesical, y cuáles son candidatos a cirugía radical. En este último grupo, la identificación de diferentes grupos de riesgo, permitiría determinar qué pacientes se beneficiarían de quimioterapia adyuvante o neoadyuvante, o bien de radioterapia.

Es importante clasificar como progresión no solamente aquellos casos en los que se produce un incremento de las categorías T, N ó M, sino que también deben considerarse como progresión, aquellas muertes que se producen a consecuencia del tumor de vejiga, aunque no se haya demostrado dicha progresión en el estudio anatomopatológico de una pieza quirúrgica, o mediante técnicas de imagen.

En 1998, Fujii et al (10) realizan un estudio retrospectivo, utilizando una muestra de 277 pacientes con tumores superficiales primarios de vejiga (Ta, T1), en los que se realiza un seguimiento medio de 7,7 años. En este estudio se evalúan de manera uni y multivariada los factores pronósticos implicados en la progresión tumoral. A pesar de que

en el estudio univariado, son numerosas las variables clínico-patológicas que se relacionan significativamente con la progresión, al realizar el análisis multivariado, tan solo el grado histológico (G1-G2 vs. G3), el estadio clínico (Ta vs. T1) y la afectación tumoral del cuello vesical, se manifiestan como variables independientes de progresión. Los autores utilizan estas tres variables independientes, para crear diferentes grupos de riesgo, en función de la existencia de: ningún factor de riesgo, un factor, ó 2-3 factores; encontrando, de este modo, diferencias significativas entre los grupos. Una de las conclusiones más importantes de este trabajo, es que la afectación tumoral del cuello vesical constituye el principal indicador de progresión, observándose en estos tumores un riesgo de desarrollar progresión 4,85 veces superior, al de los tumores localizados en otras áreas anatómicas.

Sánchez de la Muela et al (173) realizan en 1990 un estudio retrospectivo con 123 pacientes, diagnosticados de tumor vesical urotelial primario o recidivante, incluidos en las categorías Ta-T2. Las covariables utilizadas en el análisis multivariado son: antecedentes de tumor vesical, estadio tumoral, displasia peritumoral, displasia difusa, infiltrado inflamatorio y persistencia tumoral tras la resección transuretral. Los autores comprueban, que los únicos factores con influencia significativa en la progresión tumoral, son los antecedentes de tumor vesical y la presencia de lesiones displásicas diseminadas en el urotelio.

En el estudio realizado por Millán-Rodríguez et al (12) en el año 2000, cuyas características han sido comentadas con anterioridad, son considerados una serie de parámetros clínico-patológicos y terapéuticos, con el fin de evaluar el papel de los mismos en la progresión tumoral. El análisis de los resultados, pone de manifiesto que el factor pronóstico más importante en la progresión es el grado histológico 3. Otras variables independientes de progresión tumoral son: existencia de carcinoma in situ asociado, multiplicidad tumoral, tamaño tumoral >3 cm, y realización de instilaciones intravesicales. La categoría T del tumor es el único factor, entre los analizados, que no muestra una relación significativa con la progresión tumoral.

Unos resultados prácticamente iguales a los del estudio anterior, son observados por Kiemeny et al en dos trabajos publicados en 1993 (17) y 1996 (169), que ya han sido comentados con anterioridad. El grado histológico, la categoría T, la existencia de carcinoma in situ en la biopsia aleatoria y la multiplicidad tumoral, son consideradas

como variables independientes en cuanto a su capacidad de predecir progresión tumoral. A diferencia del trabajo de Millán-Rodríguez et al (12), la administración de instilaciones vesicales no influye significativamente en la progresión tumoral.

Herr et al (160) en 1989, realizan uno de los primeros análisis multivariados de progresión en el carcinoma de células transicionales de vejiga. La muestra consta de 221 pacientes con tumores vesicales recidivantes pertenecientes a las categorías Tis, Ta y T1, que son tratados en su totalidad con BCG adyuvante a la RTU, realizándose un seguimiento medio de 5 años. Las variables analizadas son: edad, sexo, categoría T, grado histológico, multifocalidad, tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor primario hasta la primera recidiva (< ó > 1 año), citología de orina, realización de quimioterapia intravesical previa, régimen terapéutico de BCG (intravesical e intradérmico vs. intravesical vs. intravesical y mantenimiento). El análisis multivariado de los datos, permite a los autores concluir, que los únicos factores relacionados de manera independiente con la progresión tumoral, son el estadio clínico T1 y la existencia de un intervalo menor de un año entre el diagnóstico de la enfermedad y la presentación de la primera recidiva. Es importante señalar que en este estudio, 111 pacientes (aproximadamente la mitad), pertenecen a la categoría Tis, por ello es extremadamente difícil comparar sus resultados con otros trabajos, que cuando estudian los factores relacionados con la progresión de los tumores superficiales, consideran solamente las categorías Ta y T1 (10, 12, 21, 34, 169).

El interés despertado por la proteína p53 en los últimos años, se ha transmitido ampliamente al campo de la Urología, y ha llevado a algunos autores a examinar el papel de p53 en la progresión del cáncer de vejiga. Schmitz-Dräger et al (46) en 1997, estudian la importancia pronóstica de la expresión de p53, considerando 186 muestras tumorales, pertenecientes a 92 pacientes, además de 16 muestras de urotelio normal. Los casos analizados pertenecen a la categorías Tis-T3b (UICC 1992), además de 10 casos de displasia, aunque para el análisis multivariado solamente son considerados 61 pacientes, con tumores superficiales primarios. Los factores analizados son, el hábito tabáquico, la multifocalidad tumoral, la expresión de p53, y la expresión combinada de p53 y mdm2. Se observa que la expresión de p53 predice de manera independiente la progresión tumoral, aumentando su capacidad pronóstica cuando se combina con la expresión de mdm2. La multifocalidad tumoral también se manifiesta como una variable

independiente de progresión. El umbral de p53 utilizado para definir los casos positivos es del 5%. Por otra parte, los autores realizan una interesante valoración inmunohistoquímica de muestras de epitelio sano, comprobando la ausencia de expresión de p53 en todas ellas.

Zlotta et al (138), en un trabajo ya comentado en el apartado de recidiva, obtienen unos resultados sustancialmente diferentes a los del anterior estudio, observando que ninguna de las variables analizadas, influye de manera significativa en la progresión tumoral. Las diferencias con respecto al anterior estudio (46) son muy importantes, aunque los resultados de ambos trabajos son difícilmente comparables, ya que en este último, el punto de corte considerado para la expresión de p53 es del 10%. Otra gran diferencia, quizás más importante que la anterior, es el hecho de que en el estudio de Zlotta et al (138), sólo se analizan pacientes con tumores de riesgo intermedio o elevado, entre los cuales se incluyen casos de carcinoma in situ.

Lacombe et al (147) llevan a cabo en 1996 un estudio de características similares al de Zlotta et al (138), en el que se evalúa el papel pronóstico de p53 en una población de tumores de alto riesgo, tratados con BCG. Los resultados de este estudio son radicalmente opuestos a los obtenidos por Zlotta, ya que se demuestra que la expresión de p53 y el estadio clínico T1 son variables independientes de progresión, en tumores superficiales tratados con BCG, y que, por otra parte, la expresión de p53 es la única variable que predice de manera significativa la progresión tumoral, en los pacientes no respondedores. La muestra utilizada por Lacombe et al, está formada por tumores primarios y recidivantes, como en el estudio de Zlotta (138); también la cepa y la dosis de BCG son coincidentes en ambos estudios. La divergencia en los resultados observados en ambos estudios podría estar justificada, por la elevada proporción de pacientes con carcinoma in situ (58,2%), existente en el trabajo de Lacombe, frente al 6,4%, en el de Zlotta (138), así como por la consideración por parte de Lacombe, de un umbral de positividad de p53 del 20%. Los autores concluyen que en el grupo de pacientes que no responden a la BCG, la expresión de p53 predice mejor la progresión tumoral, que el estadio clínico post-BCG. Por este motivo, los autores proponen la realización de cistectomía en aquellos pacientes que no responden a la BCG, y cuya expresión de p53 es elevada.

La probabilidad de progresión del carcinoma in situ, también guarda relación con la expresión nuclear de p53, según demuestran Sarkis et al (114), en un estudio

retrospectivo efectuado en 1994, con una muestra de 33 pacientes con carcinoma in situ primario de vejiga, que son seguidos durante un período medio de 10,33 años. En el análisis multivariado, y controlando por las variables: expresión de p53 ($> \text{ ó } < 20\%$), edad ($> \text{ ó } < 60$), sexo, existencia de tumor Ta asociado, y realización de tratamiento con BCG; los autores observan que la única variable independiente de progresión es la sobreexpresión de p53. Los pacientes con p53 $<20\%$, progresan en el 16,7% de los casos, mientras que aquellos con una expresión de p53 $>20\%$, lo hacen en el 86,7%. Asimismo se observa que el riesgo de progresar de los pacientes con sobreexpresión de p53, es 9 veces superior al de los pacientes con p53 $<20\%$.

Otro trabajo que resalta la gran importancia pronóstica de la proteína p53 en la progresión del carcinoma de células transicionales de vejiga, es el realizado por Serth et al (174) en 1995, sobre una muestra de 69 pacientes con tumores T1/G1-2. Los autores comprueban que la expresión de p53 por encima del 20%, es el factor pronóstico que mejor predice la progresión en este grupo de tumores, detectando progresión tan solo en el 1,8% de los tumores con p53 $<20\%$, lo cual contrasta con el 86% de progresión observado, cuando la expresión de p53 es $>20\%$. En el análisis multivariado, la expresión de p53 es la única variable independiente de progresión, cuando se ajusta por edad, sexo, grado histológico, expresión de p53, y actividad proliferativa celular, cuantificada en función del PCNA. Los autores concluyen, que si los resultados observados en su estudio fuesen corroborados por estudios prospectivos, con amplias muestras de pacientes, aquellos tumores de la categoría T1 con una expresión elevada de p53, que no respondieran a una terapia de instilaciones intravesicales, deberían ser tratados mediante cirugía radical, ya que esta sería su única alternativa para lograr la curación.

En el estudio de Barton Grossman et al (56), realizado en 1998, la expresión inmunohistoquímica de p53 no muestra capacidad para predecir progresión, en tumores pertenecientes a la categoría T1. Sin embargo, al considerar la expresión de p53 y Rb, de manera conjunta, los autores observan que la expresión anormalmente elevada de ambos marcadores, pronostica la progresión tumoral de manera estadísticamente significativa. Una importante limitación de este trabajo, es que en él sólo se realiza un análisis univariado de los datos, por lo que la trascendencia de sus resultados es obviamente menor, que la de los estudios citados con anterioridad.

Existen una serie de marcadores o indicadores, que miden la actividad proliferativa celular, y que han sido estudiados con el propósito aproximarse, desde el momento del diagnóstico, al comportamiento de un determinado tumor (1, 2, 18, 25, 34). Algunos de los marcadores de actividad proliferativa, evaluados en relación con pronóstico del cáncer de vejiga, han sido: la fracción de células en fase S, el índice mitótico, el índice mitótico corregido por volumen (índice M/V), la expresión de PCNA, y la expresión nuclear de ki67. La actividad proliferativa de los tumores, se relaciona íntimamente con el grado de diferenciación histológica de los mismos. Los índices de actividad proliferativa tienen la ventaja de ser métodos cuantitativos, que no se hallan sometidos a la subjetividad inherente, que existe en la evaluación del grado histológico (21, 24, 26, 27).

El papel de ki67 en la progresión del carcinoma de células transicionales de vejiga, ha sido estudiado en menos ocasiones que el de p53. En el caso de ki67, los resultados observados en los distintos trabajos son también muy variables, e incluso contradictorios, creando una cierta confusión sobre la importancia pronóstica de este antígeno. Por otra parte, existe una gran variabilidad en el diseño de los trabajos, que hace que la comparación de los mismos, y la extracción de conclusiones claras, resulte ciertamente difícil.

Pfister et al (34), en un trabajo realizado para estudiar fundamentalmente recidiva tumoral, y que ya fue descrito en el apartado correspondiente, comprueban que la expresión de ki67 no modifica significativamente la probabilidad de progresión, en el análisis univariado. Este trabajo, por las características de su diseño, no es el idóneo para evaluar la importancia de ki67 en la progresión tumoral. El trabajo de Zlotta et al (138), que ha sido comentado con anterioridad, tampoco encuentra una relación significativa entre la expresión de ki67 y la progresión del tumor, tanto de forma univariada, como multivariada.

Un resultado completamente diferente al de los dos trabajos anteriores, es el obtenido por Liukkonen et al (21) en 1999, en un estudio ya comentado con anterioridad. Tras realizar un análisis multivariado, los autores observan que la expresión de ki67 >10% y la morfología sólida del tumor, son las dos únicas variables que predicen de manera independiente la progresión tumoral, siendo la expresión de ki67 la más importante de las dos. La expresión de p53 no modifica, por el contrario, la probabilidad de progresión tumoral, en el análisis multivariado.

En el análisis multivariado de nuestro estudio, las covariables que muestran una capacidad independiente para predecir la progresión tumoral, son la edad ($p = 0,0177$), la expresión de p53 en general ($p = 0,0197$), la expresión de p53 entre 2-14% ($p = 0,0397$), y la expresión de p53 >14% ($p = 0,0029$), cuando se consideran de manera conjunta los tumores pertenecientes a las categorías T1 y T2a.

En el análisis univariado, son muy llamativos los resultados de progresión asociados a la variable p53, ya que se observa que la probabilidad de permanecer libre de progresión a los 12 años es del 94,07%, en aquellos tumores cuya expresión de p53 es $\leq 0,2\%$, mientras que dicha probabilidad se reduce al 32,52% (a los 11 años), cuando la expresión es >14%. En el análisis multivariado, se observa que el riesgo de presentar progresión durante el seguimiento, en el grupo con expresión de p53 >14%, es casi nueve veces superior al del grupo con expresión $\leq 0,2\%$.

Las cifras de progresión observadas en los distintos intervalos de ki67, también muestran unas diferencias significativas, en el análisis univariado; así, la supervivencia libre de progresión a los 12 años, se sitúa en el 87,99%, cuando la expresión de ki67 es $\leq 5\%$, por el contrario, esta cifra se reduce al 38,61%, en aquellos tumores cuya expresión de ki67 es >27%. En el análisis multivariado, se observa que los pacientes con expresión de ki67 >27%, tienen un riesgo de progresar 3,45 veces superior al grupo con ki67 $\leq 5\%$, aunque en este caso no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0600$).

Al analizar de forma multivariada los tumores de nuestro estudio, pertenecientes a la categoría T1, podemos comprobar que las covariables independientes de progresión tumoral son: la edad ($p = 0,0333$), la multifocalidad tumoral ($p = 0,0145$), la morfología microscópica sólida ($p = 0,0000$), la expresión de p53 en general ($p = 0,0002$), la expresión de p53 entre 0,2-2% ($p = 0,0334$), la expresión de p53 entre 2-14% ($p = 0,0070$), la expresión de p53 >14% ($p = 0,0002$), la expresión de ki67 en general ($p = 0,0040$), y la expresión de ki67 >27% ($p = 0,0102$).

La supervivencia libre de progresión de los tumores T1, con una expresión de p53 $\leq 0,2\%$, es del 97,83% tras 12 años de seguimiento, mientras que aquellos cuya expresión es >14%, tienen una probabilidad de permanecer libres de progresión tan solo del

25,85%, a los 10 años ($p = 0,0000$). En el caso de ki67, el 89,53% de los tumores cuya expresión es $\leq 5\%$, se encuentran libres de progresión, tras 12 años de seguimiento, y tan solo el 38,36%, cuando la expresión de ki67 es $> 27\%$ ($p = 0,0000$).

Existe también una relación significativa entre la expresión de p53 en cuartiles y el desarrollo de metástasis, en los tumores T1 (Test Log rank = 27,51; $p = 0,0000$), comprobándose que la supervivencia libre de metástasis al cabo de 12 años, es de 100%, 93,69%, 83,64% y 55,57%, para una expresión de p53 del 0-0,2%, 0,2-2%, 2-14% y $> 14\%$, respectivamente. La expresión de ki67 en cuartiles por el contrario, no se relaciona de manera significativa con el desarrollo de metástasis (Test Log rank = 3,26; $p = 0,3525$).

Nuestro análisis de los tumores pertenecientes a la categoría T2a, nos muestra que la única variable que predice de manera independiente la progresión en esta categoría, es el grado histológico 3 ($p = 0,0125$).

Las variables relacionadas con la progresión, recidiva y supervivencia de los pacientes con carcinoma in situ, no han podido ser convenientemente estudiadas, debido al reducido número de pacientes con CIS. En algunas ocasiones la ausencia de casos en alguno de los grupos, no ha permitido medir diferencias entre dichos grupos. En otras, tales diferencias sí pudieron ser medidas, pero los resultados eran totalmente ilógicos y carecían de sentido clínico, debido al reducido número de pacientes de cada grupo.

Nuevamente, como en el estudio de supervivencia, observamos que el grado histológico del tumor no predice de manera independiente la progresión tumoral, tanto si se analiza combinado con el estadio clínico, en una sola variable (categoría TG), como si se considera de manera aislada. Una excepción a este hecho lo constituye la categoría tumoral T2a, en la que el grado histológico (T2aG2 vs. T2aG3), sí se manifiesta como una variable independiente de progresión, cuando los tumores de esta categoría se analizan de manera aislada. Estos resultados son concordantes, *grosso modo*, con los observados en otros estudios diseñados de forma similar (21, 46, 138, 147, 174).

Examinando la literatura, se puede observar que son varios los estudios multivariados de progresión, algunos de ellos con un gran número de pacientes, que atribuyen una importante significación pronóstica al grado histológico del tumor (10, 12, 13, 169). El nexo común de dichos trabajos, es que sus resultados se basan en la evaluación

de factores pronósticos clásicos, es decir variables predominantemente clínicas y anatomopatológicas. En la otra vertiente, existe un importante grupo de estudios, todos ellos realizados de forma multivariada, en los que además de los factores clínico-patológicos involucrados clásicamente en la progresión tumoral, se analizan una serie de nuevos marcadores tumorales, relacionados con la biología molecular (genes supresores tumorales e indicadores de la actividad proliferativa celular, fundamentalmente). En todos estos trabajos, el grado histológico no se manifiesta como una variable predictora de progresión (21, 46, 138, 147, 174). A la vista de estos datos, parece razonable pensar que la pérdida de significado pronóstico del grado histológico, es una consecuencia de la inclusión de los nuevos marcadores tumorales, en los estudios de progresión del cáncer de vejiga.

La enorme subjetividad existente en la asignación del grado histológico de un tumor vesical, así como la escasa reproductibilidad que esta variable posee, cuando es estudiada por diferentes patólogos, hace que el grado histológico no sea una variable pronóstica ideal (33, 146). Se estima que ante un caso concreto, la inconsistencia de los resultados entre diversos patólogos (variabilidad interobservador), así como en un mismo patólogo, en dos momentos separados en el tiempo (variabilidad intraobservador), se aproxima al 50% (3, 21, 148, 166, 175). Se ha comprobado también que dicha variabilidad interindividual, no depende de la experiencia del patólogo que analiza la muestra (166, 175). Parmar et al (158) observan diferencias en la capacidad pronóstica del grado histológico, en función de quien realiza la evaluación del mismo, encontrando que dicha variable presenta importancia pronóstica, en el análisis univariado, cuando es evaluada por el patólogo de referencia, perdiendo dicha capacidad cuando el patólogo local es el que realiza el estudio del grado.

Existe, por otra parte, una llamativa tendencia por parte de los patólogos a clasificar una gran proporción de tumores superficiales como moderadamente diferenciados, es decir grado 2. Ello da lugar a la formación de un amplio grupo de pacientes de pronóstico incierto, por la inclusión de diferentes grados histológicos, en un mismo grupo de tumores (21).

La subjetividad en la determinación del grado y la inconsistencia existente entre diferentes patólogos, hace que algunos autores se cuestionen, tanto la oportunidad de

incluir esta variable en los estudios pronósticos multivariados (143), como la utilidad de la misma en la toma de decisiones terapéuticas (166, 175).

Encontramos en nuestro estudio, que la multifocalidad tumoral es una variable independiente, en la predicción de progresión de los tumores del estadio T1, quedándose cercana a la significación estadística en el análisis conjunto de las categorías T1 y T2a ($p = 0,0702$). La importancia de la multifocalidad tumoral en el cáncer superficial de vejiga, es observada en la mayoría de los trabajos de investigación, que llevan a cabo un análisis multivariado (12, 13, 46), siendo en algunos de ellos, el factor aislado más importante en la predicción de progresión (13, 46). El estudio realizado por Herr et al en 1989 (160), observa que la multifocalidad tumoral es una variable independiente, en el análisis efectuado a los 3 meses, sin embargo no observa tal independencia antes de iniciar el tratamiento, ni a los 6 meses de seguimiento. Otros trabajos recientes, en los que además de factores clínico-patológicos, se evalúan diversos marcadores tumorales, no contemplan la variable multiplicidad tumoral en su análisis (21, 138, 147, 174).

El patrón de crecimiento microscópico del tumor se muestra en nuestro estudio, no sólo como una variable independiente, sino como un importantísimo factor pronóstico de progresión en los tumores de la categoría T1, presentado los tumores sólidos de esta categoría tumoral, un riesgo de progresión 55 veces superior a los papilares. Liukkonen et al (21) concluyen en su estudio, efectuado en 1999, que la morfología microscópica del tumor es uno de los factores pronósticos más importantes, en la progresión de los tumores vesicales superficiales (21), comprobando que la morfología papilar ejerce un efecto protector, ya que el riesgo relativo de progresión papilar/sólido es de 0,31. En la mayoría de los estudios multivariados de progresión, no se tiene en cuenta la morfología microscópica del tumor, a pesar de que es un parámetro fácilmente medible y con escasa carga de subjetividad (12, 13, 46, 138, 147, 160, 174). La inclusión rutinaria de esta variable en los estudios de progresión, sería suficiente para consolidar la gran importancia pronóstica de la misma. Por ello creemos que, como en el caso de los estudios de supervivencia, la variable morfología microscópica del tumor, debe ser evaluada en los estudios de progresión del cáncer de vejiga.

La expresión inmunohistoquímica de ki67 es un índice de proliferación celular, con capacidad para cuantificar la fracción de crecimiento tumoral. Según estas

características, ki67 debería mostrarse a priori, como un buen indicador de progresión tumoral en el carcinoma de células transicionales de vejiga. Los resultados de nuestro estudio son coincidentes con los del trabajo de Liukkonen et al (21), ya que encontramos que la expresión de ki67 predice de manera independiente la progresión tumoral, en la categoría T1, cuando su expresión es superior al 27%. Sin embargo, Pfister et al (34) y Zlotta et al (138), no observan una relación significativa entre ki67 y progresión. Son pocos los estudios multivariados existentes sobre el papel de ki67 en la progresión, y en ellos se observan importantes variaciones metodológicas, especialmente en el tipo de variables consideradas para el análisis. Es muy difícil, por lo tanto, definir acertadamente el papel de este marcador, en la progresión del cáncer de vejiga.

Las mutaciones del gen *p53* en las células tumorales, pueden ser detectadas mediante técnicas inmunohistoquímicas, debido a la estabilización metabólica que la mutación ocasiona en la proteína resultante. Es conocido que, tan solo las mutaciones de diferente sentido (missense mutations) inducen inmunorreactividad nuclear, mientras que el resto de las mutaciones que puede sufrir el gen *p53*, no tienen traducción inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica permite detectar la mayoría de las mutaciones de *p53* en el cáncer de vejiga, ya que se estima que más del 90% de las mutaciones son de diferente sentido (46, 127, 132). Bernardini et al (64) realizan un estudio, comparando los resultados del estudio inmunohistoquímico y del análisis de secuenciación del DNA del gen *p53*, y comprueban que la correspondencia existente entre ambas técnicas es del 88,46% ($p < 0,0001$). En este estudio se puede observar también una elevada sensibilidad (91,6%) y especificidad (87,5%) de la técnica inmunohistoquímica. Pages et al (176) observan correspondencia entre el análisis inmunohistoquímico de *p53* (Anticuerpo DO7), y el análisis genómico de *p53* (SSCP), en 11 de los 12 pacientes analizados. Dalbagni et al (177) analizan la correlación existente entre la inmunohistoquímica y el análisis genético mediante SSCP y secuenciación, otorgando al método inmunohistoquímico una sensibilidad del 90,3%. Esta elevada correspondencia entre ambos métodos de detección de las mutaciones de *p53* en el cáncer de vejiga, es corroborada por otros autores (61, 127, 131, 132, 147, 174, 178).

De acuerdo con los datos expuestos con anterioridad, parece evidente que el análisis inmunohistoquímico de p53, reproduce de manera muy fiable las mutaciones subyacentes del gen *p53*. Si a esto añadimos que se trata de una técnica económica y de sencilla ejecución, creemos que, en la mayoría de las ocasiones, puede eliminar la necesidad de efectuar una secuenciación directa de DNA, para determinar el status de *p53*.

Por los argumentos anteriormente expuestos, y por la elevada correspondencia existente entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y el pronóstico de la enfermedad, creemos que la expresión inmunohistoquímica de p53 puede ser utilizada, de manera segura, para la toma de decisiones terapéuticas, en los pacientes con cáncer de vejiga.

El estudio de la relación existente entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y el pronóstico (supervivencia, recidiva y progresión) del carcinoma de células transicionales de vejiga, es enfocado, en la mayoría de los trabajos, hacia los tumores superficiales, es decir, las categorías Tis, Ta y T1. Es lógica esta focalización de los estudios, ya que es en los tumores superficiales, donde la expresión de p53 parece jugar un papel pronóstico más destacado (114, 147, 174).

Dentro de la aparente uniformidad de los trabajos que evalúan el papel de p53 en los tumores superficiales, existen importantes diferencias, empezando por la selección de pacientes, ya que mientras unos analizan exclusivamente tumores en estadio T1 (56, 174), otros incluyen en su muestra tumores de pronósticos tan diferentes como Ta y Tis, además de T1 (138, 147). Otra importante diferencia observada, no sólo en los estudios de progresión, sino en todos los estudios pronósticos analizados, guarda relación con el umbral de positividad considerado, para definir la existencia de sobreexpresión de p53. Así, podemos observar que dicho umbral oscila entre > 0%, establecido por Wright et al (57); o el 1% adoptado por Skopelitou et al (27); hasta el 40% utilizado por Kuczyk et al (165); pasando por el 10% considerado por Esrig (61), Özdemir (41), Têtu (47), Cote (65), y Zlotta (138), entre otros; y el 20% establecido en los estudios de Liukkonen (21), Qureshi (162), Lacombe (147), Serth (174), Sarkis (114), y otros muchos.

El anticuerpo monoclonal utilizado en el estudio inmunohistoquímico de p53, es otra de las fuentes de discrepancia existentes entre los distintos trabajos. En los estudios pronósticos revisados, se comprueba la utilización de cinco tipos diferentes de

anticuerpos: DO7 (59, 62, 64, 138), Pab 1801 (61, 63, 147, 179), DO1 (46, 56), CM1 (21, 41), y Pab 240 (57); aunque se han comercializado algunos más, como BP53-12 y Pab1620.

Los anticuerpos monoclonales disponibles para p53, se distinguen entre sí por reconocer diferentes epitopos de la molécula. Se ha comprobado que existen importantes diferencias en la inmunorreactividad, entre los distintos clones de anticuerpos, observando que el clon DO7 y el BP53-12 son los más adecuados para realizar los estudios inmunohistoquímicos, ya que muestran un mayor porcentaje de núcleos celulares teñidos, con una mayor intensidad de tinción y con eliminación de la tinción inespecífica, tanto la citoplasmática como la de fondo (113). Las diferencias pueden ir más allá del tipo de anticuerpo empleado, ya que se ha demostrado que la utilización de buffer de citrato en el desenmascaramiento de antígenos, incrementa la inmunorreactividad del tejido (113). Incluso existen ciertas diferencias en la reactividad de un mismo clon de anticuerpo, en función de la firma que realice su comercialización (113). De todo ello se puede deducir, que el empleo de uno u otro anticuerpo monoclonal, y otros factores técnicos diversos, pueden dar lugar a importantes diferencias en los resultados de un estudio.

Si revisamos con detenimiento el apartado de material y métodos de cada uno de los estudios, podemos encontrar una serie de diferencias metodológicas, especialmente en lo que se refiere a la técnica inmunohistoquímica, cuya influencia en los resultados del estudio no es fácilmente cuantificable. Algunas de estas diferencias, aparte de las ya comentadas, son: la técnica de desenmascaramiento antigénico, la realización de una predigestión enzimática, y la dilución antigénica de trabajo, entre otras.

El estudio inmunohistoquímico de ki67 plantea esencialmente los mismos problemas que el de p53, ya que el proceso seguido para la inmunotinción es prácticamente igual con ambos anticuerpos. Quizás las diferencias entre los estudios sean menores en el caso de ki67, ya que sólo existen dos tipos de anticuerpos monoclonales comercializados, para el estudio inmunohistoquímico. El anticuerpo monoclonal ki67 fue el primero en utilizarse, y tiene la desventaja de que sólo puede ser utilizado en secciones de tejido frescas y congeladas, ya que el epitopo del antígeno ki67 al que se une, sufre una degradación tras la inclusión del tejido en parafina. El anticuerpo MIB-1 reconoce igualmente el antígeno ki67, pero a diferencia del anterior, puede ser utilizado con muestras tisulares fijadas en formol e incluidas en parafina, ya que identifica un epitopo de la

molécula de ki67 que es formalín-resistente. El desarrollo del anticuerpo MIB-1, ha permitido la realización de estudios retrospectivos, que con el anticuerpo monoclonal ki67, no eran posibles. La efectividad de ambos anticuerpos monoclonales es similar, al menos así lo demuestra un estudio comparativo realizado en pacientes con cáncer de mama (34), en el que los resultados observados con ambos anticuerpos son superponibles, aunque la inmunotinción media obtenida con MIB-1, es mayor que con ki67 (21% frente a 13%).

Existe una importante variación en el umbral de positividad inmunohistoquímica de ki67 considerado por los distintos autores, oscilando entre > 0%, considerado por Wright et al (57), y el 32% adoptado por Tsuji et al (28). Estas diferencias metodológicas dificultan en gran medida, la realización de comparaciones entre los distintos trabajos.

Los factores pronósticos relacionados con la progresión tumoral del cáncer de vejiga, son especialmente importantes en los tumores superficiales de la categoría T1, ya que en este subgrupo, el desarrollo de progresión, frecuentemente se acompaña de un cambio drástico en el planteamiento terapéutico.

Los tumores superficiales del estadio T1, son habitualmente tratados mediante resección transuretral, utilizando en un porcentaje elevado de casos algún tipo de agente quimio o inmunoterápico intravesical (180). Este tratamiento, asociado a una adecuada revisión periódica, permite el control de la enfermedad y la preservación vesical, en la mayoría de los pacientes (181). Sin embargo, la resección transuretral no siempre permite realizar una adecuada estadificación del tumor, por lo que estaremos tratando como superficiales algunos tumores que en realidad son músculo-infiltrantes. La supraestadificación patológica en las piezas de cistectomía, cuando esta se realiza por tumores en estadio clínico T1, se produce en un 25% de las ocasiones según Hermann et al (67), en un 26% según Amling et al (149), y en un 34% según Freeman et al (150).

Aproximadamente un 50% de los pacientes con carcinoma vesical músculo-infiltrante, presentan micrometástasis en el momento del diagnóstico (17, 103, 182), y por lo tanto la cistectomía radical, como terapia única, no sería una técnica curativa en estos pacientes. Por este motivo, se ha hablado en muchas ocasiones, y en diferentes épocas de la Urología, de la realización de cistectomía precoz, designando como precoz a la cistectomía realizada en pacientes con tumores superficiales. Habitualmente los tumores tratados

mediante cistectomía precoz, reúnen una serie de factores de mal pronóstico, a partir de los cuales se puede prever una evolución más o menos segura hacia la infiltración de la capa muscular y el desarrollo de metástasis a distancia (183). La realización de cirugía radical precoz, podría reducir en gran medida el porcentaje de pacientes con metástasis ocultas en el momento de la cistectomía, y aumentar de este modo, la supervivencia a largo plazo. Se trata por lo tanto, como subrayó Whitmore en 1988, de anticiparse a la progresión de la enfermedad, y ajustar la indicación de la cistectomía al momento en que la lesión, estando aún localizada, va a dejar de responder al tratamiento local (85, 184).

Sobre este tema ha habido grandes discrepancias, al no existir ningún factor de riesgo ideal, que permita asegurar que en su presencia, se va a producir una mala evolución, en términos de progresión o de supervivencia. Son muchos los estudios que han establecido en qué circunstancias un tumor vesical superficial debería ser sometido a cistectomía radical.

A pesar de que es muy difícil y arriesgado hablar de manera generalizada, sobre el tratamiento óptimo de los tumores vesicales, podemos decir que las indicaciones de cistectomía radical, más comúnmente aceptadas, en el tumor vesical superficial son: 1) compromiso de la uretra prostática, con afectación estromal o ductal extensa; 2) enfermedad superficial incontrolable mediante resección transuretral y terapia intravesical; 3) tumores T1 de alto grado, con o sin CIS secundario, 4) tumores T1 múltiples y/o recidivantes, especialmente si la recidiva es precoz; 5) CIS persistente o recidivante, a pesar de una pauta adecuada de BCG; 6) efectos adversos severos de la terapia intravesical, que obligan a suspenderla, perdiendo así el control de la enfermedad; y 7) trastornos clínicos y/o funcionales severos derivados de la enfermedad vesical, como el síndrome miccional severo y progresivo producido por el CIS, o las instilaciones intravesicales, y los síntomas de almacenamiento derivados de la baja capacidad vesical, observada en vejigas sometidas a resecciones múltiples (17, 78, 85, 92, 95, 103, 185). Existen otras indicaciones de cistectomía en tumores superficiales, que son habitualmente una consecuencia del estudio de nuevos factores pronósticos. Estos factores muestran, en ocasiones, una relación con la progresión tumoral y la supervivencia, igual o mayor que la de los factores pronósticos clásicos, como ocurre con la expresión inmunohistoquímica de los marcadores p53 y ki67.

Son varios los estudios multivariados, en los que se sugiere que aquellos tumores vesicales con una sobreexpresión de p53, presentan una probabilidad significativamente elevada de progresión (46, 114, 147, 174). Por el contrario, en otros trabajos, también multivariados, la expresión inmunohistoquímica de p53 no se muestra como un factor independiente de progresión (21, 138).

En nuestro estudio hemos observado que la expresión de p53 es el principal factor pronóstico de progresión, tanto si se consideran conjuntamente las categorías T1 y T2a, como si se analizan exclusivamente los tumores T1. Resultados similares han sido encontrados en el estudio de Serth et al (174), en el que p53 es el factor aislado con mayor importancia en la progresión tumoral. Para Schmitz-Dräger et al (46), la expresión de p53 es una variable independiente de progresión tumoral, convirtiéndose en el factor con mayor influencia en la progresión, cuando se combina con la expresión de mdm2. En el trabajo de Lacombe et al (147), en el que se evalúa la expresión de p53 en tumores superficiales de alto riesgo tratados con BCG, se pone de manifiesto que la expresión de p53 es la única variable independiente en la progresión tumoral de los pacientes no respondedores.

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio, y en los otros estudios de progresión revisados, creemos que la expresión inmunohistoquímica de p53 debe ser considerada, como uno de los factores de riesgo más importantes en la progresión del carcinoma de células transicionales de vejiga, especialmente en el estadio T1. Otros factores que clásicamente se han asociado a la progresión tumoral, como es el caso del grado histológico, quedan relegados a un segundo plano, cuando en el análisis se incluye la variable p53.

En nuestro estudio hemos dividido las variables p53 y ki67 en cuartiles, con la intención de obtener una mayor precisión pronóstica. La división de la muestra en dos intervalos, en función de un punto de corte determinado, permite obtener dos grupos, con pronósticos totalmente divergentes. Esto disminuye sustancialmente la precisión pronóstica y dificulta enormemente las decisiones terapéuticas, especialmente en aquellos casos que se encuentran en el límite entre los dos intervalos. Por el contrario, la división de la variable p53 en cuatro intervalos, en función de sus cuartiles, permite estratificar mucho mejor el riesgo, que con sólo dos intervalos, y se puede identificar un pequeño grupo de pacientes con un riesgo enormemente elevado de progresión y muerte.

En los tumores de la categoría T1 de nuestro estudio, la expresión de p53 >14% se asocia a una probabilidad de progresión de aproximadamente el 75% a los 10 años, convirtiéndose en la variable con mayor importancia en la progresión de esta categoría tumoral, con un riesgo relativo de 74. En el estudio de supervivencia se observa asimismo, que la probabilidad de supervivencia cáncer-relacionada de los pacientes en estadio T1, con una expresión de p53 >14%, es del 41% a los 12 años, constituyendo, con un riesgo relativo de 42, la variable con mayor importancia en la predicción de supervivencia cáncer-relacionada, al igual que en el estudio de progresión.

Existe una excelente correlación entre la expresión de p53 y las probabilidades de progresión y supervivencia de los tumores T1, como se demuestra en nuestro estudio y en otros similares. Por ello creemos que la determinación de la expresión inmunohistoquímica de p53, debería ser efectuada de manera rutinaria en los tumores de la categoría T1. Por otra parte, consideramos que aquellos tumores del estadio T1, con una expresión de p53 >14%, deben ser calificados como tumores de alto riesgo de progresión y muerte, y deben ser tratados como tales, independientemente de la presencia de factores clásicamente asociados al alto riesgo, como la multifocalidad tumoral, el elevado grado histológico, la multirrecidiva, y el CIS secundario, entre otros.

La BCG aplicada de forma adyuvante a la RTU, es el tratamiento más habitualmente empleado, y quizás la terapia de elección, en los tumores considerados de alto riesgo, ya que es el único agente intravesical que ha probado su capacidad para aumentar de manera significativa el intervalo libre de progresión hacia la infiltración muscular y/o desarrollo de metástasis (92, 144, 186, 187, 188, 189, 190, 191); y para aumentar, según algunos estudios, la supervivencia de los pacientes (192). Por otra parte, varios estudios han demostrado que el nivel de expresión de p53 no predice la respuesta al tratamiento con BCG (44, 56, 66, 138, 147, 176, 191, 193), por lo que dicho agente inmunoterápico puede ser efectivo, aún en presencia de una sobreexpresión de p53. Otros estudios atribuyen a la administración intravesical de BCG, capacidad para inducir la activación de la proteína p53 nativa, y otras proteínas supresoras tumorales como p21, y relacionan esta activación con la capacidad tumoricida de la BCG (106). Por todo esto, es posible que los tumores cuya expresión de p53 es >14%, puedan ser unos candidatos adecuados al tratamiento adyuvante con BCG, como primer escalón terapéutico, aunque

asumimos que el establecimiento de implicaciones terapéuticas sólo sería posible mediante un ensayo clínico.

En los tumores superficiales, que no responden a la terapia intravesical con BCG, la sobreexpresión de p53 es, según algunos autores, un indicador de mal pronóstico, que predice de forma independiente la progresión tumoral (147).

Los pacientes con tumores en estadio T1, presentan un riesgo elevado de recidiva, progresión y muerte por cáncer de vejiga (44). Son diversos los trabajos en los que se observa que el estadio infiltrativo T1 es un factor pronóstico independiente de progresión tumoral, en los tumores superficiales de vejiga (13, 147, 160, 169, 194). Por otra parte, aquellos tumores superficiales que no muestran respuesta a la terapia intravesical con BCG, también se asocian a un riesgo significativamente elevado de progresión tumoral, llegándose a observar una progresión del 40-80% en aquellos en los que persiste la enfermedad en estadio T1 a los 3-6 meses tras la aplicación de las instilaciones con este agente inmunoterápico (147, 195, 196). De todo ello se puede deducir que aquellos tumores pertenecientes al estadio T1 que presentan una sobreexpresión de p53 (un p53>14%, en nuestro estudio), y que no responden a la terapéutica con BCG, podrían ser unos candidatos óptimos a la cistectomía radical, debido el elevadísimo riesgo de progresión asociado a este grupo de tumores.

La realización de cistectomía radical en los tumores superficiales de alto riesgo de progresión y muerte, ha sido un motivo de controversia constante. Los que se oponen a la cistectomía radical, argumentan que esta es mutilante y encierra un riesgo quirúrgico elevado. Sin embargo, estos argumentos han perdido valor en el momento actual, ya que la mortalidad operatoria se ha reducido desde casi un 20% antes de 1970, hasta el 1-2% que presentan la mayoría de los centros en la actualidad; asimismo, la morbilidad perioperatoria grave ha descendido desde el 35%, hasta el 5-10% (17, 197, 198). Indudablemente, en el pasado, la cistectomía era una operación mutilante, sin embargo hoy en día, con la incorporación a la Urología de técnicas de cirugía reconstructiva, es posible realizar derivaciones urinarias mediante neovejigas ortotópicas, que permiten la continencia urinaria y la micción uretral. Por otra parte la realización de reconstrucción vaginal en la mujer, y de cirugía con preservación de haces neurovasculares en el hombre, hacen posible la continuidad de la vida sexual del paciente. De este modo, es

posible ofrecer al paciente la oportunidad de desarrollar una vida normal, después de la cirugía radical (81, 150, 185, 199).

Hay que tener presente que el cáncer superficial de vejiga pierde su buen pronóstico, desde el momento en que invade la lámina propia. Pugh (200), desde un punto de vista anatomopatológico, y Skinner (82), desde un punto de vista clínico, ponen verdadero énfasis en la importancia de tener presente esa frontera (lámina propia), a la hora de decidir la estrategia terapéutica (81).

En el momento actual, la tasa de curación de los pacientes con cáncer de vejiga en estadio T1, tratados mediante cistectomía radical, es muy elevada, así Stöckle et al (201), observan un 90% de supervivencia a los 5 años, en pacientes sometidos a cistectomía inmediata, frente a un 62,5% de supervivencia si la cistectomía se lleva a cabo tras la aparición de recidiva o progresión. Malkowicz et al (185), por su parte, también encuentran un 79,1% de supervivencia general, en pacientes en estadio T1 tratados mediante cistectomía precoz, tras un seguimiento medio de 5 años. En la serie de Amling et al (149), publicada en 1994, formada por tumores de la categoría T1, la supervivencia cáncer-relacionada es del 76%, tras 5 años de seguimiento. Finalmente, el estudio realizado por Freeman et al (150) en 1995, muestra una supervivencia general y cáncer-relacionada del 72% y 83,6%, respectivamente, en pacientes con tumores superficiales (Ta, T1 y Tis), sometidos a cistectomía radical, tras 5 años de seguimiento.

En el análisis multivariado de los tumores de la categoría T2a, pertenecientes a nuestro estudio, las expresiones de p53 y ki67, no muestran una relación significativa con la supervivencia, con la recidiva, ni con la progresión. Por ello creemos que la determinación rutinaria de estos marcadores inmunohistoquímicos, no resultaría útil en la planificación terapéutica de los tumores de esta categoría, ya que ninguno de ellos incrementa la precisión de los factores pronósticos ya existentes.

6.4. Limitaciones del estudio:

La selección de la muestra corresponde a los pacientes del área de referencia del Hospital Xeral-Cíes de Vigo. Podría pensarse que la muestra no fuese representativa, de la población de pacientes con carcinoma de células transicionales de vejiga. Sin embargo la consistencia de nuestros hallazgos, con respecto a distribución de las variables clínico-patológicas de las publicaciones previas, demuestra que no ha habido un sesgo de selección.

La recogida retrospectiva de los datos podría generar un sesgo de información, por no disponer de datos en todas las variables analizadas, pero dado que los resultados de nuestro estudio son a su vez consistentes con los observados en la literatura, parece que el posible sesgo de recogida de información, no afecta a la validez del estudio.

Inicialmente se consideró la supervivencia general, pero al observar diferencias entre los resultados de supervivencia general y cáncer-relacionada, decidimos incluir en el estudio ambos tipos de supervivencia, aunque posteriormente centramos nuestro interés en la supervivencia cáncer-relacionada. Al estudiar ambos tipos de supervivencia, eliminamos cualquier posible limitación relacionada con el concepto de muerte considerado. Este doble análisis realizado, nos ha permitido demostrar que existen diferencias según se considere para el estudio, la muerte relacionada o la no relacionada con el cáncer de vejiga.

Algunas de las variables numéricas del estudio han sido dicotomizadas o categorizadas, en un intento de buscar una consistencia en los resultados, con otros autores, que han hecho la misma categorización. Por otra parte, la categorización nos permite incrementar el poder estadístico, para discriminar entre diferentes grupos. A pesar de todo, con las variables continuas de interés, hemos realizado curvas ROC, para poder identificar los puntos de mayor y menor sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Debido al pequeño tamaño muestral de la categoría carcinoma in situ, no se han podido extraer conclusiones con respecto al pronóstico de esta categoría tumoral.

Nuestro estudio podría tener sesgos de confusión, al no considerar determinadas variables que pudiesen tener capacidad pronóstica (ciertos marcadores

citométricos y genético-moleculares, por ejemplo). Dichos sesgos pueden existir, aunque nosotros hemos utilizado 177 variables, entre las cuales se incluyen aquellas, que con la evidencia actual, se consideran relacionadas con el pronóstico del cáncer de vejiga, así como otras, cuya relación con el pronóstico de esta enfermedad es controvertida.

La calidad de vida de los pacientes con cáncer de vejiga, es valorada en muy pocas ocasiones, ya que la mayoría de los estudios sobre esta enfermedad, intentan determinar indicadores cuantitativos de supervivencia, recidiva o progresión. En nuestro estudio, tampoco se considera la calidad de vida del paciente, ya que no formaba parte de los objetivos del estudio.

7. CONCLUSIONES:

1. La supervivencia de los pacientes de la categoría T1, disminuye significativamente con el incremento de la edad, el tamaño tumoral > 3 cm, y el patrón de crecimiento microscópico sólido.
2. La recidiva de los tumores de la categoría T1, aumenta significativamente con la multifocalidad tumoral, el tamaño tumoral > 3 cm, y la existencia de carcinoma in situ en la biopsia vesical aleatoria.
3. La progresión de los tumores de la categoría T1, aumenta significativamente con el incremento de la edad, la multifocalidad tumoral, y el patrón de crecimiento microscópico sólido.
4. La supervivencia de los pacientes de la categoría T2a, disminuye significativamente con el incremento de la edad. En esta misma categoría, el grado histológico 3, se asocia de forma independiente con una menor probabilidad de supervivencia y una mayor probabilidad de progresión.
5. La expresión inmunohistoquímica de p53 predice de manera independiente la supervivencia y la progresión, en los pacientes de la categoría T1. Se observa un efecto dosis-respuesta, de forma que ante una mayor expresión de p53, existe una menor probabilidad de supervivencia y una mayor probabilidad de progresión.
6. La expresión inmunohistoquímica de ki67 $> 27\%$ predice de forma independiente la recidiva y la progresión, en los pacientes de la categoría T1.
7. La expresión de p53 predice el pronóstico de los pacientes con carcinoma de células transicionales de vejiga en estadio T1, mejor que la expresión de ki67.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 1998; 160: 645-659.
2. Lipponen PK. Review of cytometric methods in the assesment of prognosis in transitional cell bladder cancer. *Eur Urol* 1992; 21: 177-183.
3. Witjes JA, Kiemeney LALM, Oosterhof GON, Debruyne FMJ. Prognostic factors in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1992; 21: 89-97.
4. López-Beltrán A, Croghan GA, Croghan I, Huben RP, Mettlin C, Gaeta JF. Prognostic factors in survival of bladder cancer. *Cancer* 1992; 70: 799-807.
5. Allard P, Bernard P, Fradet Y, Têtu B. The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol* 1998; 81: 692-698.
6. Sánchez de la Muela P, Rosell D, Agüera L, De Castro F, Isa W, Robles JE, et al. Superficial bladder cancer: survival and prognostic factors. *Eur Urol* 1991; 20: 184-191.
7. Sánchez de la Muela P, Rosell D, Agüera L, De Castro F, Isa W, Robles JE, et al. Multivariate analysis of progression in superficial bladder cancer. *Br J Urol* 1993; 71: 284-289.
8. Cifuentes Delatte L, García de la Peña E, Vela Navarrete R. Survival rates of patients with bladder tumours. An experience of 1744 cases. *Br J Urol* 1982; 54: 267-274.
9. Stephenson WT, Holmes FF, Noble JJ, Gerald KB. Analysis of bladder carcinoma by subsite: Cystoscopic location may have prognostic value. *Cancer* 1990; 66: 1630-1635.
10. Fujii Y, Fukui I, Kihara K, Tsujii T, Ishizaka K, Kageyama Y, et al. Significance of bladder neck involvement on progression in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1998; 33: 464-468.

11. Raitanen MP, Nieminen P, Tammela TLJ. Impact of tumour grade, stage, number and size, and smoking and sex, on survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1995; 76: 470-474.
12. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 2000; 163: 73-78.
13. Kiemeny LALM, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek ALM, Debruyne FMJ. Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol* 1993; 150: 60-64.
14. Zieger K, Wolf H, Olsen PR, Hojgaard K. Long-term survival of patients with bladder tumours: the significance of risk factors. *Br J Urol* 1998; 82: 667-672.
15. Halebian GE, Skinner EC, Dickinson MG, Lieskovsky G, Boyd SD, Skinner DG. Hydronephrosis as a prognostic indicator in bladder cancer patients. *J Urol* 1998; 160: 2011-2014.
16. Mayordomo JI, Sáenz A, García MD, Tres A. Factores pronósticos en el cáncer de vejiga. *Rev cancer* 1998; 12(5): 190-195.
17. Catalona WJ. Tumores uroteliales del tracto urinario. En: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED, editores. *Campbell Urología*. 6ª edición en español. Buenos Aires, Argentina, Editorial Panamericana; 1992. p. 1090-1154.
18. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Kiviranta J, Pesonen E. Prognosis of transitional cell bladder cancer: a multivariate prognostic score for improved prediction. *J Urol* 1991; 146: 1535-1540.
19. Malmström PU, Norlen BJ, Andersson B, Busch C. Combination of blood group ABH antigen status and DNA ploidy as independent prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Urol* 1989; 64: 49-55.
20. Mostofi FK, Sobin LH, Torlani H. Histological typing of urinary bladder tumors. En *International Histological Classification of Tumours*. Nº 10: Geneva: World Health Organization, 1973.
21. Liukkonen T, Rajala P, Raitanen M, Rintala E, Kaasinen E, Lipponen P. Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary

- superficial (Stage pTa/T1) bladder cancer: A prospective comparative study. *Eur Urol* 1999; 36: 393-400.
22. Catalona WJ. Practical utility of specific red cell adherence test in bladder cancer. *Urology* 1981; 18: 113-116.
 23. Orihuela E, Shahon RS. Influence of blood group type on the natural history of superficial bladder cancer. *J Urol* 1987; 138: 758-759.
 24. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Nordling S. Progression and survival in transitional cell bladder cancer. A comparison of established prognostic factors, S phase, fraction and DNA ploidy. *Eur J Cancer* 1991; 27: 877-881.
 25. Haapasalo H, Pesonen E, Collan Y. Volume corrected mitotic index (M/V-index). The standard of mitotic activity in neoplasms. *Path Res Pract* 1989; 185: 551-555.
 26. Krüger S, Müller H. Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and ki67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol* 1995; 75: 480-484.
 27. Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Dimopoulos D, Kamina S, Krikoni O, Alexopoulou V, et al. p53 and c-jun expression in urinary bladder transitional cell carcinoma: correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA), histological grade and clinical stage. *Eur Urol* 1997; 31: 464-471.
 28. Tsuji M, Kojima K, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S. Prognostic value of Ki-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997; 79: 367-372.
 29. Masuda M, Iki M, Takano Y, Asakura T, Noguchi S, Ikeda I, et al. Prognostic significance of ki67 labeling index in urothelial tumors of the renal pelvis and ureter. *J Urol* 1996; 155: 1877-1881.
 30. Stavropoulos NE, Ioackim-Velogianni E, Hastazeris K, Kitsiou E, Stefanaki S, Agnantis N. growth fractions in bladder cancer defined by ki67: Association with cancer grade, category and recurrence rate of superficial lesions. *Br J Urol* 1993; 72: 736-739.
 31. Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos MA. The prevalence of bcl-2, p53, and ki-67 immunoreactivity in transitional cell

- bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 1998; 29(2): 146-154.
32. Okamura K, Miyake K, Koshikawa T, Asai J. Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody ki-67. *J Urol* 1990; 144: 875-878.
 33. Mellon K, Neal DE, Robinson MC, Marsh C, Wright C. Cell cycling in bladder carcinoma determined by monoclonal antibody ki67. *Br J Urol* 1990; 66: 281-285.
 34. Pfister C, Lacombe L, Vezina MC, Moore L, Larue H, Têtu B, et al. Prognostic value of the proliferative index determined by ki-67 immunostaining in superficial bladder tumors. *Hum Pathol* 1999; 11: 1350-1355.
 35. Droller MJ: Editorial. Markers in bladder cancer-issues to consider. *J Urol* 1998; 160: 2009-2010.
 36. Sánchez-Carbayo M, Herrero E, Megías J, Mira A, Soria F. Evaluation of nuclear matrix protein 22 as a tumour marker in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1999; 84: 706-713.
 37. Halachmi S, Linn JF, Amiel GE, Moskovitz B, Nativ O. Urine cytology, tumour markers and bladder cancer. *Br J Urol* 1998; 82: 647-654.
 38. Imao T, Koshida K, Endo Y, Uchibayashi T, Sasaki T, Namiki M. Dominant role of E-cadherin in the progression of bladder cancer. *J Urol* 1999; 161: 692-698.
 39. Muñoz A. *Cáncer: Genes y Nuevas Terapias*. Madrid: Editorial Hélice; 1997.
 40. Kitagawa Y, Kunimi K, Ito H, Sato H, Uchibayashi T, Okada Y, et al. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas. *J Urol* 1998; 160: 1540-1545.
 41. Özdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Habuchi T, Okada Y, Yoshida O. Strong correlation of basement membrane degradation with p53 inactivation and/or MDM2 overexpression in superficial urothelial carcinomas. *J Urol* 1997; 158: 206-211.
 42. Morita T, Kikuchi T, Hashimoto S, Kobayashi Y, Tokue A. Cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) in bladder cancer. *Eur Urol* 1997; 32: 237-244.
 43. Crew JP. Vascular endothelial growth factor: an important angiogenic mediator in bladder cancer. *Eur Urol* 1999; 35: 2-8.

44. Dinney CPN, Babkowsky RC, Antelo M, Perrote P, Liebert M, Zhang HZ, et al. Relationship among cystectomy, microvessel density and prognosis in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1998; 160: 1285-1290.
45. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S, et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 219-227.
46. Schmitz-Dräger BJ, Kushima M, Goebell P, Jax TW, Gerharz CD, Bültel H, et al. p53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer. *Eur Urol* 1997; 32: 487-493.
47. Têtu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Roberge N, Bernard P. Prevalence and clinical significance of HER-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol* 1996; 155: 1784-1788.
48. Mellon JK, Lunec J, Wright C, Horne CH, Kelly P, Neal DE. c-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol* 1996; 155: 321-326.
49. Ye D, Li H, Qian S, Sun Y, Zheng J, Ma Y. bcl-2/bax expression and p53 gene status in human bladder cancer: relationship to early recurrence with intravesical chemotherapy after resection. *J Urol* 1998; 160: 2025-2029.
50. Kirsh EJ, Baunoch DA, Stadler WM. Expression of bcl-2 and bcl-x in bladder cancer. *J Urol* 1998; 159: 1348-1353.
51. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Arakawa S, Kamidono S. Synergistic enhancement of resistance to cisplatin in human bladder cancer cells by overexpression of mutant-type p53 and bcl-2. *J Urol* 1999; 162: 2176-2181.
52. Pfister C, Flaman JM, Dunet F, Grise P, Frebourg T. p53 mutations in bladder tumors inactivate the transactivation of the p21 and Bax genes, and have a predictive value for the clinical outcome after Bacillus Calmette-Guérin therapy. *J Urol* 1999; 162: 69-73.
53. Lee CCR, Yamamoto S, Morimura K, Wanibuchi H, Nishisaka N, Ikemoto S, et al. Significance of cyclin D1 overexpression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features. *Cancer* 1997; 79(4): 780-789.

54. Suwa Y, Takano Y, Iki M, Takeda M, Asakura T, Noguchi S, et al. Cyclin D1 protein overexpression is related to tumor differentiation, but not to tumor progression or proliferative activity, in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1998; 160: 897-900.
55. Cotran RS, Kumar V, Collins L. Neoplasia. En: Robbins SL. *Pathologic basis of disease*. 6th edition. Philadelphia: Saunders; 1995. p. 260-327.
56. Barton Grossman H, Liebert M, Antelo M, Dinney CPN, Hu SX, Palmer JL, et al. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 829-834.
57. Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Wilson Horne CH. Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation with ki67 index. *Br J Urol* 1995; 75: 173-179.
58. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair Wr, Fuks Z, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1251-1256.
59. Jahnson S, Karlsson MG. Predictive value of p53 and pRb immunostaining in locally advanced bladder cancer treated with cystectomy. *J Urol* 1998; 160: 1291-1296.
60. Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Expression of p21 (waf1/cip1) protein in transitional cell bladder tumours and its prognostic value. *Eur Urol* 1998; 34: 237-243.
61. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 1259-1264.
62. Raitanen MP, Tammela TLJ, Kallioinen M, Isola J. p53 accumulation, deoxyribonucleic acid ploidy and progression of bladder cancer. *J Urol* 1997; 157: 1250-1253.
63. Herr HW, Bajorin DF, Scher HI, Cordon-Cardo C, Reuter VE. Can p53 help select patients with invasive bladder cancer for bladder preservation?. *J Urol* 1999; 161: 20-23.

64. Bernardini S, Adessi GL, Billerey C, Chezy E, Carbillet JP, Bittard H. Immunohistochemical detection of p53 protein overexpression versus gene sequencing in urinary bladder carcinomas. *J Urol* 1999; 162: 1496-1501.
65. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, et al. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* 1998; 58: 1090-1094.
66. Ovesen H, Horn T, Steven K. Long-term efficacy of intravesical Bacillus Calmette-Guérin for carcinoma in situ: relationship of progression to histological response and p53 nuclear accumulation. *J Urol* 1997; 157: 1655-1659.
67. Hermann GG, 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 cell bladder cancer. *J Urol* 1998; 159: 91-94.
68. Nakopoulou L, Constantinides C, Papandropoulos J, Theodoropoulos G, Tzonou A, Giannopoulos A, et al. Evaluation of overexpression of p53 tumor suppressor protein in superficial and invasive transitional cell bladder cancer: Comparison with DNA ploidy. *Urology* 1995; 46: 334-340.
69. Cheng L, Cheville JC, Neumann RM, Bostwick DG. Flat intraepithelial lesions of the urinary bladder. *Cancer* 2000; 88(3): 625-631.
70. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 1435-1438.
71. Boccon-Gibod L. Primary Carcinoma in situ of the urinary bladder: Diagnosis and Management. *Eur Urol* 1999; 35(3) (Curric Urol 6.3: 1-6).
72. Hudson MA, Herr HW. Carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1995; 153: 564-572.
73. Solsona E. Curso Internacional de Urología, Progresos en Urología'99: Carcinoma in situ: qué es y su valor pronóstico. Dificultades diagnósticas, presentación clínica y valoración de los factores pronósticos. Barcelona, Marzo 1999.
74. Norming U, Tribukait B, Gustafson H, Nyman CR, Wang NN, Wijkstrom H. Deoxyribonucleic acid profile and tumor progression in primary carcinoma in situ of the bladder: a study of 63 patients with grade 3 lesions. *J Urol* 1992; 147: 11-15.

75. Brosman SA. Inmunoterapia con bacilo Calmette-Guérin. Técnicas y resultados. En: Braslis K, Soloway MS, editores. Casos prácticos de Urología. Volumen 3: Tratamiento del cáncer vesical (primera parte). Edición española. American Urological Association, Inc. Office of Education. Bellaire, Texas; 1995. p. 21-31.
76. Fontana D, Bellina M, Galietti F, Scoffone C, Cagnazzi E, Guercio S, et al. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin (BCG) as inducer of tumor-suppressing proteins p53 and p21^{Waf1-Cip1} during treatment of superficial bladder cancer. *J Urol* 1999; 162: 225-230.
77. Solsona E. Curso Internacional de Urología, Progresos en Urología'96: ¿Hasta cuándo el tratamiento conservador en el carcinoma in situ vesical?.. Barcelona, Marzo 1996.
78. Hudson MA. Indicación de cistectomía en el tumor superficial. En: Braslis K, Soloway MS, editores. Casos prácticos de Urología. Volumen 3: Tratamiento del cáncer vesical (primera parte). Edición española. American Urological Association, Inc. Office of Education. Bellaire, Texas; 1995. p. 81-91.
79. Narayan P, Patel M. Curso Internacional de Urología, Progresos en Urología'96: Other treatments than BCG in carcinoma in situ of the bladder. Barcelona, Marzo 1996.
80. Walther MM, Delaney TF, Smith PD, Friauf WS, Thomas GF, Shawker TH, et al. Phase I trial of photodynamic therapy in the treatment of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1997; 50(2): 199- 207.
81. Nogueira March JL. Curso Internacional de Urología, Progresos en Urología'96: Alternativas terapéuticas en el manejo del tumor T1G3. Oportunidad de la cistectomía radical. Barcelona, Marzo 1996.
82. Skinner DG, Liesdowsky G. Contemporary cystectomy with pelvic node dissection compared to preoperative radiation therapy plus cystectomy in management of invasive bladder cancer. *J Urol* 1984; 131: 1069-1072.
83. Herr HW, Jakse G, Sheinfeld J. El tumor vesical T1. En: Braslis K, Soloway MS, editores. Casos prácticos de Urología. Volumen 3: Tratamiento del cáncer vesical (primera parte). Edición española. American Urological Association, Inc. Office of Education. Bellaire, Texas; 1995. p. 1-11.

84. Heney NM, Nocks BN, Daly JJ, Prout GR Jr, Newall JB, Griffin PP, et al. Ta and T1 bladder cancer: location, recurrence and progression. *Br J Urol* 1982; 54: 152-157.
85. Nogueira March JL, Ojea Calvo A, Castro Iglesias AM, Rodríguez Iglesias B. Carcinoma superficial de vejiga. El tumor pT1G3: Progresión, recidiva y supervivencia. Tratamiento. *Actas Urol Esp* 1992; 16: 682-690.
86. Nogueira March JL. Superficial bladder carcinoma. The pT1G3 tumour: progression, recurrence and survival. Treatment. En: H Villavicencio, WR Fair, editores. *Evaluation of chemotherapy in bladder cancer*. New York: Churchill Livingstone; 1992. p. 45-59.
87. England HR, Paris AMI, Blandy JP. The correlation of T1 bladder tumour history with prognosis and follow-up requirements. *Br J Urol* 1981; 53: 593-597.
88. Jakse G, Loidl W, Seeber G, Hofstadter F. Stage T1, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder: an unfavourable tumor?. *J Urol* 1987; 137: 39-43.
89. Soloway MS, Murphy W, Rao MK, Cox C. Serial multiple site biopsies in patients with bladder cancer. *J Urol* 1978; 120: 57-59.
90. Birch BRP, Harland SJ. The pT1G3 bladder tumour. *Br J Urol* 1989; 64: 109-116.
91. Nogueira March JL. Reunión del Grupo Uro-Oncológico de la Asociación Española de Urología, comunicación personal: Tumores pT1G3, casuística personal. Madrid, Febrero 1991.
92. Witjes JA. Superficial bladder cancer, including T1G3 disease. *Eur Urol* 1998; 34(2) (Curric Urol 6.2: 1-6).
93. Somogyi L. Tumour progression and survival in patients with T1G3 bladder tumours. *Br J Urol* 1998; 82: 608-610.
94. Martínez Sarmiento M, Vera Donoso CD, Jiménez Cruz JF. Tratamiento de la recidiva del tumor vesical superficial. En: Jiménez Cruz JF, Vera Donoso CD, editores. *Diagnóstico y tratamiento de la recidiva en los tumores urológicos*. Madrid: Grupo Aula Médica SA; 1996. p. 89-109.
95. Herr HW. Tumour progression and survival in patients with T1G3 bladder tumours: 15-year outcome. *Br J Urol* 1997; 80: 762-765.
96. Botto H. Curso Internacional de Urología, Progresos en Urología'96: BCG in the treatment of T1G3 bladder cancer. Barcelona, Marzo 1996.

97. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordón-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 53-59.
98. Witjes JA. Superficial bladder cancer, including T1G3 disease. *Eur Urol* 1998; 34(2)(Curric Urol 6.2: 1-6).
99. Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH. TNM Atlas. Illustrated Guide to the TNM/pTNM Classification of Malignant Tumours. Separata de la 4ª edición inglesa. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1997. p. 263-326 y apéndice.
100. Ojea A, Nogueira JL, Figueiredo L, Jamardo D. Tratamiento conservador con resección transuretral del cáncer de vejiga estadio T2: estudio retrospectivo. *Actas Urol Esp* 1989; 13: 441-443.
101. García Reboll L, Jiménez Cruz JF. Cáncer vesical infiltrante: visión de conjunto. En: Jiménez Cruz JF, Vera Donoso CD, editores. Diagnóstico y tratamiento de la recidiva en los tumores urológicos. Madrid: Grupo Aula Médica SA; 1996. p. 111-129.
102. Herr HW. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. *J Urol* 1999; 162: 74-76.
103. Pressler LB, Petrylak DP, Olsson CA. Invasive transitional cell carcinoma of the bladder: prognosis and management. En: Oesterling JE, Richie JP, editores. *Urologic Oncology*. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 1997. p. 275-291.
104. Skinner DG, Stein JP, Lieskovsky G, Skinner EC, Boyd SD, Figueroa A, et al. 25-year experience in the management of invasive bladder cancer by radical cystectomy. *Eur Urol* 1998; 33(suppl 4): 25-26.
105. Skinner DG, Lieskovsky G. Management of invasive and high grade bladder cancer. En: Skinner DG, Lieskovsky G, editores. *Diagnosis and Management of genitourinary cancer*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1988. p. 295-312.
106. Pagano F, Bassi P, Galetti TP, Meneghini a, Milani C, Artibani W, et al. Results of contemporary radical cystectomy for invasive bladder cancer: a clinicopathological study with emphasis on the inadequacy of the tumor, nodes and metastases classification. *J Urol* 1991; 145: 45-50.
107. Culotta E, Koshland DE. p53 sweeps through cancer research. *Science* 1993; 262: 1958-1961.

108. Levine AJ. The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1992; 326(20): 1350-1352.
109. Koshland DE. Molecule of the year. *Science* 1993; 262: 1953-1953.
110. Bonilla F, Orlow I. Ciclo celular y cáncer. *Revis Clin Esp* 1996; 196(11): 766-773.
111. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour supressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
112. Lane DP. p53 and human cancers. *Br Med Bull* 1994; 50(3): 582-599.
113. Linden MD, Nathanson SD, Zarbo RJ. Evaluation of anti-p53 antibody staining. Quality control and technical considerations. *Appl Immunohistochem* 1994; 2(3): 218-224.
114. Sarkis AS, Dalbagni G, Córdón-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, et al. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994; 152: 388-392.
115. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
116. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.
117. Casey G, Lo-Hsueh M, López ME, Vogelstein B, Stanbridge EJ. Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. *Oncogene* 1991; 6: 1791-1797.
118. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-915.
119. Sancar A. DNA repair in humans. *Annu Rev Genetics* 1995; 29: 69-105.
120. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Graig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-6311.
121. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849.
122. Lowe SW, Jacks T, Housman DE, Ruley HE. Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2026-2030.

123. Lane DP. Cancer. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 362: 786-787.
124. Keegan PE, Lunec J, Neal DE. p53 and p53-regulated genes in bladder cancer. *Br J Urol* 1998; 82: 710-720.
125. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-967.
126. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-1327.
127. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
128. Harris CC. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993; 262: 1980-1981.
129. Malkin D. Germline p53 mutations and heritable cancer. *Annu Rev Genet* 1994; 28: 443-465.
130. Jensen RA, Page DL. p53: The promising story continues to unfold. *Hum Path* 1993; 24(5): 455-456.
131. Wynford-Thomas D. p53 in tumour pathology: Can we trust immunocytochemistry?. *J Pathol* 1992; 166: 329-330.
132. Battifora H. p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Hum Pathol* 1994; 25: 435-437.
133. Israeli RS, Fair WR. La reacción en cadena de la polimerasa: aplicaciones en urología. En AUA update series, edición española 1998, volumen 1; 4: 21-27.
134. Iniesta P. Introducción a los métodos utilizados en Biología Molecular. *Rec Cancer* 1999; 13(1): 1-8.
135. Yoshimura I, Kudoh J, Saito S, Tazaki H, Shimizu N. p53 gene mutation in recurrent superficial bladder cancer. *J Urol* 1995; 153: 1711-1715.
136. Izquierdo M. Terapia génica. *Rev Cancer* 1999; 13(1): 9-15.
137. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.

138. Zlotta AR, Noel JC, Fayt I, Drowart A, Van Vooren JP, Huygen K, et al. Correlation and prognostic significance of p53, p21^{WAF1/CIP1} and ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with Bacillus Calmette-Guérin intravesical therapy. *J Urol* 1999; 161: 792-798.
139. Martínez-Piñeiro JA, Martínez-Piñeiro L. Tumores vesicales. En: Jiménez Cruz JF, Rioja Sanz LA, editores. *Tratado de Urología*. Barcelona: JR Prous Editores; 1993. p. 1151-1204.
140. Ojea Calvo A, Nogueira March JL, Alonso Rodrigo A, Vérez Vivero M, Rodríguez Iglesias B, Benavente Delgado J, et al. La toxicidad en la profilaxis de los tumores superficiales de vejiga. *Actas Urol Esp* 1994; 18: 714-722.
141. Gil Fabra J, Fernández Fernández A, Otero Mauricio G. Epidemiología del cáncer de vejiga. Tema monográfico LXIII Congreso Nacional de Urología. Asociación Española de Urología. ENE Ediciones; 1998. p. 19-39.
142. Codes M, Tamarit A, Márquez A. Cáncer de vejiga, historia natural. *Rev Cancer* 1998; 12: 179-183.
143. Mulders PFA, Meyden APM, Doesburg WH, Oosterhof GON, Debruyne FMJ. Prognostic factors in pTa-pT1 superficial bladder tumours treated with intravesical instillations. *Br J Urol* 1994; 73: 403-408.
144. Korman HJ, Watson RB, Soloway MS. Superficial transitional cell carcinoma of the bladder: management and prognosis. En: Oesterling JE, Richie JP, editores. *Urologic Oncology*. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 1997. p. 256-272.
145. Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, Bouffieux C, Van Der Meijden A, Parmar MKB, et al. A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and medical research council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. *J Urol* 1996; 156: 1934-1941.
146. Witjes JA, Kiemeny LALM, Verbeek ALM, Heijbroek RP, Debruyne FMJ. Random bladder biopsies and the risk of recurrent superficial bladder cancer: a prospective study in 1026 patients. *World J Urol* 1992; 10: 231-234.
147. Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF, Cerdón-Cardo C, Fair WR, Herr HW, et al. Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial

- bladder cancer before and after Bacillus Calmette-Guérin therapy: correlation to clinical outcome. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2646-2652.
148. Witjes JA, Kiemeny LALM, Schaafsma HE, Debruyne FMJ. The influence of review pathology on study outcome of a randomized multicentre superficial bladder cancer trial. *Br J Urol* 1994; 73: 172-176.
 149. Amling C, Thraser J, Frazier H. Radical cystectomy for stages Ta, Tis and T1 transitional cell carcinoma of the bladder: *J Urol* 1994; 151: 31-37.
 150. Freeman JA, Esrig D, Stein JP, Simoneau AR, Skinner EC, Chen SC, et al. Radical cystectomy for high risk patients with superficial bladder cancer in the era of orthotopic urinary reconstruction. *Cancer* 1995; 76: 833-839.
 151. Ash JE. Epithelial tumors of the bladder. *J Urol* 1940; 44: 135-145.
 152. Rosai J. Transitional cell carcinoma. En *Ackerman's Surgical Pathology*. St. Louis, Missouri: Mosby; 1996. p. 1195-1204.
 153. Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH. TNM Atlas. Illustrated Guide to the TNM/pTNM Classification of Malignant Tumours. Separata de la 4ª edición inglesa. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1997. p. 263-326 y apéndice.
 154. Hermanek P, Sobin LH. TNM Classification of Malignant Tumours. 4ª edición, Geneva: International Union Against Cancer (UICC); 1987.
 155. Hermanek P, Sobin LH. TNM classification of malignant tumors. 4th ed. 2nd revision. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
 156. Farrow GM. Pathology of carcinoma in situ of the urinary bladder and related lesions. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 161: 39-43.
 157. Takashi M, Murase T, Mizuno S, Hamajima N, Ohno Y. Multivariate evaluation of prognostic determinants in bladder cancer patients. *Urol Int* 1987; 42: 368-374.
 158. Parmar MKB, Freedman LS, Hargreave TB, Tolley DA. Prognostic factors for recurrence and followup policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council Subgroup on superficial bladder cancer (Urological Cancer Working Party). *J Urol* 1989; 142: 284-288.
 159. Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, De Pauw M, Robinson M, Denis L, et al. Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European

- Organization for Research on treatment of cancer: Genitourinary tract cancer cooperative group. *J Urol* 1983; 129: 730-733.
160. Herr HW, Badalament RA, Amato DA, Laudone VP, Fair WR, Whitmore WF Jr. Superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guérin: A multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J Urol* 1989; 141: 22-29.
161. Angulo Cuesta J, Sánchez Chapado M, Guil Cid M, Flores Corral N, Pontes EJ, Grignon DJ. Supervivencia del cáncer de vejiga estadio T2-T3A tratado mediante cistectomía radical. *Arch Esp Urol* 1997; 50(1): 17-25.
162. Qureshi KN, Griffiths TRL, Robinson MC, Marsh C, Roberts JT, Hall RR, et al. TP53 accumulation predicts improved survival in patients resistant to systemic cisplatin-based chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3500-3507.
163. Narayana AS, Loening SA, Slymen DJ, Culp DA. Bladder cancer: factors affecting survival. *J Urol* 1983; 130: 56-60.
164. Ojea Calvo A, Pérez García MD, Rodríguez Alonso A, Domínguez Freire F, Alonso Rodrigo A, Rodríguez Iglesias B, et al. Cáncer superficial de vejiga: ¿qué controles han de seguir y durante cuanto tiempo, los pacientes libres de tumor?. *Actas Urol Esp* 1998; 22: 210-214.
165. Kuczyk MA, Bokemeyer C, Serth J, Hervatin C, Oelke M, Höfner K, et al. p53 overexpression as a prognostic factor for advanced stage bladder cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 2243-2247.
166. Páez Á, Martín E, De la Cal M, Llorente C, Berenguer A. Análisis de los factores pronósticos en los tumores vesicales superficiales. *Arch Esp Urol* 1997; 50: 121-126.
167. Nogueira March JL. Recidivas y nuevas ocurrencias. *Actas Urol Esp* 1991; 15: 211-212.
168. Pycha A, Mian C, Hofbauer J, Brössner C, Haitel A, Wiener H, et al. Multifocality of transitional cell carcinoma results from genetic instability of entire transitional epithelium. *Urology* 1999; 53: 92-97.
169. Kiemeny LALM, Witjes JA, Hejbroek RP, Koper NP, Verbeek ALM, Debruyne FMJ. Should random urothelial biopsies be taken from patients with primary superficial bladder cancer? A decision analysis. *Br J Urol* 1994; 73: 164-171.

170. Gontero P, Casetta G, Zitella A, Ballario R, Pacchioni D, Magnani C, et al. Evaluation of p53 protein overexpression, ki67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumour recurrence in superficial transitional carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2000; 38: 287-296.
171. Millán-Rodríguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Huguet-Pérez J, Vicente-Rodríguez J. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. *J Urol* 2000; 164: 1183-1187.
172. Popov Z, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, 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: 1472-1481.
173. Sánchez de la Muela P, Rosell Costa D, Aguera Fernández L, De Castro Barbosa F, Isa Kroon WA, Robles García JE, et al. Tumores vesicales estadio Ta/T2: Factores pronóstico y progresión. *Actas Urol Esp* 1990; 14: 341-344.
174. Serth J, Kuczyk MA, Bokemeyer C, Hervatin C, Nafe R, Tan HK, et al. p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 1995; 71: 201-205.
175. Ooms EC, Anderson WA, Alons CL, Boon ME, Veldhuizen RW. Analysis of the performance of pathologists in the grading of bladder tumors. *Hum Pathol* 1983; 14: 140-143.
176. Pages F, Flam TA, Vieillefond A, Molinie V, Abeille X, Lazar V, et al. p53 status does not predict initial clinical response to Bacillus Calmette-Guérin intravesical therapy in T1 bladder tumors. *J Urol* 1998; 159: 1079-1084.
177. Dalbagni G, Saez GT, Oliva MR, Pellicer A, Reuter VE, Fair WR, et al. p53 mutations in bladder cancer: correlation between immunohistochemistry (IHC), single strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing. 88° Congreso de la AUA; San Antonio, Texas, USA. *J Urol* 1993; 149: 238A.
178. Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, et al. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 1993; 143: 1389-1397.

179. Lianes P, Charytonowicz E, Cordón-Cardo C, Fradet Y, Barton Grossman H, Hemstreet GP, et al. Biomarker study of primary nonmetastatic versus metastatic invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1267-1271.
180. Maier U, Hobarth K. Long-term observation after intravesical metaphylaxis with mitomycin C in patients with superficial bladder tumors. *Urology* 1991; 37(5): 481-482.
181. Reading J, Hall RR, Parmar MKB. The application of prognostic factor analysis for Ta/T1 bladder cancer in routine urological practice. *Br J Urol* 1995; 75: 604-609.
182. Thrasher JB, Crawford ED. Current management of invasive and metastatic transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1993; 149: 957-972.
183. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, et al. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983; 130: 1083-1086.
184. Whitmore WF. Towards the rational management of bladder cancer: an overview. *Urology* 1988; 31: 5-8.
185. Malkowicz SB, Nichols P, Lieskovsky G, Boyd SD, Huffman J, Skinner DG. The role of radical cystectomy in the management of high grade superficial bladder cancer (PA, P1, PIS and P2). *J Urol* 1990; 144: 641-645.
186. Herr HW, Wartinger DD, Fair WR, Oettgen HF. Bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer. A 10 year follow-up. *J Urol* 1992; 147: 1020-1023.
187. Öbek C, Shelfo SW, Korman HJ, Soloway MS. Intravesical therapy for transitional cell carcinoma of the bladder: The community practice. *Urology* 1999; 53(1): 82-87.
188. Witjes JA, Meijden APM, Collette L, Sylvester R, Debruyne FMJ, Aubel A, Witjes WPJ. Long-term follow-up of an EORTC randomized prospective trial comparing intravesical Bacille Calmette-Guérin-RIVM and Mitomycin C in superficial bladder cancer. *Urology* 1998; 52(3): 403-410.
189. Mungan NA, Witjes JA. Bacille Calmette-Guérin in superficial transitional cell carcinoma. *Br J Urol* 1998; 82: 213-223.
190. Malmström PU, Wijkström H, Lundholm C, Wester K, Busch C, Norlen BJ. 5-year followup of a randomized prospective study comparing Mitomycin C and Bacillus Calmette-Guérin in patients with superficial bladder carcinoma. *J Urol* 1999; 161: 1124-1127.

191. Lebret T, Becette V, Barbagelatta M, Hervé JM, Gaudez F, Barré P, et al. Correlation between p53 overexpression and response to Bacillus Calmette-Guérin therapy in a high risk select population of patients with T1G3 bladder cancer. *J Urol* 1998; 159: 788-791.
192. Herr HW, Laudone VP, Badalament RA, Oettgen HF, Sogani PC, Freedman BD, et al. Bacillus Calmette-Guérin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1450-1455.
193. Özen H. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 1998; 10: 273-278.
194. Zhang GK, Uke ET, Sharer WC, Borkon WD, Bernstein SM. Reassessment of conservative management for stage T1N0M0 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1996; 155: 1907-1909.
195. Dekernion JB, Huang M, Lindner A, Smith RB, Kaufman JJ. The management of superficial bladder tumors and carcinoma in situ with intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *J Urol* 1985; 133: 598-601.
196. Herr HW. Progression of stage T1 bladder tumors after intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *J Urol* 1991; 145: 40-44.
197. Lerner SP. Cistectomía radical en el cáncer vesical avanzado. En: Braslis K, Soloway MS, editores. Casos prácticos de Urología. Volumen 3: Tratamiento del cáncer vesical (primera parte). Edición española. American Urological Association, Inc. Office of Education. Bellaire, Texas; 1995. p. 65-80.
198. Thrasher JB. Carcinoma of the bladder. An overview. En: Crawford ED, Das S, editores. Current Genitourinary cancer surgery. 2ª edición. Baltimore, Maryland: Williams Wilkins; 1997. p. 333-342.
199. Freeman FA, Skinner DG. Partial cystectomy and radical cystectomy. En: Oesterling JE, Richie JP, editores. Urologic Oncology. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 1997. p. 302-317.
200. Pugh RCG. The pathology of cancer of the bladder. *Cancer* 1973; 32: 1267-1274.
201. Stöckle M, Alken P, Engelmann U, Jacobi GH, Riedmiller H, Hohenfellner R. Radical cystectomy. Often too late?. *Eur Urol* 1987; 13: 361-367.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700759547