

## Gen supresor de tumor p53 como factor de recurrencia y progresión en cáncer de vejiga

Gustavo Morales Montor,\* Joel Soel Encalada,\*\* Rafael Maldonado Valadez,\*\*  
Mario Solares Sánchez,\*\* José Manuel Viveros,\*\* Sara Parraguirre,\*\*\* Francisco Calderón Ferro\*\*\*\*

### RESUMEN

**Antecedentes.** El cáncer vesical es la segunda neoplasia de la vía urinaria y la 5ta. causa de muerte en los varones. En México se presentó un incremento de 11 a 14 x 100,000 habitantes de 1985 a 1994. Numerosos investigadores han estudiado el efecto y el rol de las proteínas reguladoras del ciclo celular, el p53 gen supresor implicado con frecuencia en este tipo de tumores juega un papel aún discutido. **Objetivo.** Determinar la utilidad de p53 como factor pronóstico en el cáncer urotelial de vejiga. **Material y métodos.** Estudio retrospectivo, abierto, transversal, comparativo y observacional, de casos y controles, se incluyen pacientes de los 11 últimos años con diagnóstico y tratamiento por cáncer de vejiga. Se analiza edad, sexo, tamaño de tumor, estadio patológico, grado nuclear, inmunohistoquímica p53, recurrencia y progresión. El análisis estadístico se realizó con estadística descriptiva, razón de momios y  $\chi^2$ . **Resultados.** Sesenta y tres pacientes fueron estudiados, 44 hombres y 19 mujeres, 58% superficiales y 42% invasores, la inmunohistoquímica para p53 fue positiva en 45 pacientes del total de la muestra analizada (71%), la recurrencia y progresión fue mayor en los pacientes con tumores positivos para p53. **Conclusiones.** El p53 puede utilizarse como predictor de recurrencia y progresión en cáncer urotelial de vejiga.

**Palabras clave:** P53, cáncer vesical, recurrencia, progresión.

### ABSTRACT

**Background.** Bladder cancer is the second most frequent neoplasm of the urinary system, and the fifth cause of death in males. In Mexico there was an increase from 11 to 14 x 100,000 inhabitants from 1985 to 1994. Several researchers have studied the effect and role of the cellular cycle regulating proteins. The p53 suppressor gene, frequently implicated in several tumors plays a still debated role in bladder cancer. **Objective.** The purpose of this study is to determine if p53 can be used as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the bladder. **Material and methods.** Open, retrospective, transversal, comparative and

---

\* Adscrito al Servicio de Urología Hospital General "Dr. Manuel Gea González". \*\* Residente del Servicio de Urología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". \*\*\* Jefe del Servicio de Patología Hospital General "Dr. Manuel Gea González". \*\*\*\* Jefe del Servicio de Urología Hospital General "Dr. Manuel Gea González". División de Urología Hospital General "Dr. Manuel Gea González", SSA. México, D.F.

*observational study. Patients from the last 11 years with diagnosis of bladder cancer, who received treatment, were included. The variables analyzed were: age, gender, tumor size, pathologic stage, nuclear stage, positivity to p53 immunohistochemistry, recurrence and progression. Statistic analysis was realized using descriptive statistics, Odds ratio and Chi square. Results. 63 patients were studied (44 male and 19 female), 58% had superficial tumors and 42% were invasive. Immunohistochemistry of p53 was positive in 45 patients out of 63 (71%). Recurrence and progression were more frequent in p53 positive patients. Conclusions. P53 positivity can be used as a predictor factor of recurrence and progression in transitional bladder cancer.*

**Key words:** P53, bladder cancer, recurrence, progression.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer vesical es la segunda lesión maligna más frecuente de la vía urinaria y la quinta causa de muerte en los varones en los Estados Unidos, la incidencia anual es de 18 casos por 100,000 habitantes; más de 50,000 nuevos casos al año, predomina en el hombre con relación 3:1.<sup>1</sup> En México hubo un incremento de 11 a 14 por 100,000 de 1985 a 1994, respectivamente.<sup>2</sup>

La estirpe histológica más frecuente es el carcinoma de células transicionales, con 95%; 80% son superficiales y bien diferenciados; el resto invade la muscular y hasta 50% presentan metástasis no detectadas o las desarrollan en los siguientes dos años. Cincuenta y cinco por ciento de los tumores superficiales recurren en los primero tres años, generalmente de bajo grado y sólo 30% progresa a la invasión.<sup>2,3</sup>

Los factores de progresión conocidos son el grado histológico, el estadio (invasión de pared vesical), permeación vascular, invasión linfática y asociación con carcinoma *in situ*. El uso de marcadores histológicos no es suficientemente sensible para determinar el potencial biológico de un cáncer en particular.

Existen alteraciones en el ADN de los mecanismos normales de diferenciación y proliferación celular que llevan a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes tumor-supresores, resultando en la transformación maligna de la célula. El cáncer de urotelio se puede presentar en la pelvis renal, uretero o vejiga, dada la exposición al carcinógeno en la orina, suele presentarse en forma multicéntrica y migrar a otros sitios del urotelio.<sup>4</sup>

Los pasos de la carcinogénesis son:

1. Iniciación (cambio genético irreversible que induce y mantiene el fenotipo maligno).
2. Promoción (induce directa o indirectamente cambios genéticos adicionales para expresar el fenotipo) y
3. Progresión (las células transformadas adquieren las características necesarias para continuar el crecimiento, permitir invasión tisular y favorecer embolismo e implantación).

Los oncogenes (genes normales "alterados") codifican para el genotipo maligno, permiten a las células escapar al mecanismo habitual de crecimiento. Los genes asociados, como el p21ras, correlacionan con el grado histológico hasta en 10%, el oncogén c myc aumenta la recurrencia y progresión frecuentemente asociado.<sup>5</sup>

Dos mecanismos fundamentales en el proceso de carcinogénesis son:

1. La activación de protoncogenes, que predispone a la proliferación celular, y
2. La mutación del gen tumor-supresor, parece ser que el daño al ADN y la apoptosis son los factores relacionados en la transformación celular.

Los dos puntos más importantes del ciclo celular donde puede ocurrir la oncogénesis están entre la fase G1, la fase S, la G2 y la fase M. El primer punto de regulación ocurre entre la formación de los componentes celulares necesarios para la síntesis del ADN y la replicación del genoma, el segundo está situado justo al inicio de

la mitosis. La desregulación del ciclo celular puede conllevar a una falta de restricción del crecimiento celular.<sup>6,7</sup>

Los genes tumor-supresores implicados con mayor frecuencia en el carcinoma urotelial son el p53, el rb (retinoblastoma), p15 y p16; son igual de importantes que los oncogenes, ya que codifican para proteínas que regulan el crecimiento celular, la reparación del ADN o la apoptosis; su delección o inactivación favorece el crecimiento sin control o falla para que las células con alteraciones genéticas sufran apoptosis.

Uno de los trastornos genéticos más frecuentes en todos los tipos de cáncer en el hombre es una alteración en el gen p53 que habitualmente se asocia a tumores agresivos. El defecto genético más común en el cáncer de vejiga en humanos es la mutación en el gen p53. Este gen tumor-supresor se localiza en el cromosoma 17p31, está involucrado en la regulación del ciclo celular, cuando el genoma se daña la proteína p53 salvaje impide la propagación del gen defectuoso, sin embargo, las mutaciones del gen p53 permiten la replicación del ADN anormal y la expansión clonal de las células mutadas.<sup>8-15</sup>

Los pacientes con tumores vesicales con inmunoreactividad positiva para la p53 están expuestos a un riesgo de recurrencia tumoral mucho más alto y a una probabilidad menor de sobrevida; se considera anormal la presencia de expresión de la mutación de p53 en más de 10% de las células y se han detectado mutaciones del p53 en más de 50% de los tumores invasores de la mucosa y carcinoma *in situ*.<sup>16</sup>

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la utilidad clínica de la expresión del p53 por inmunohistoquímica en los pacientes con cáncer de vejiga y correlacionar con la recurrencia y progresión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles, retrospectivo, comparativo, observacional y transversal.

El tamaño de la muestra se calculó considerando 40% de p53 en pacientes con cáncer urotelial de vejiga, un valor alfa de 0.05 y  $1-\beta$  de 0.10 con

razón de momios de 3.0. Se incluyeron todos los pacientes diagnosticados en nuestro hospital en los últimos 11 años. Se analizaron las siguientes variables: edad, sexo, estadio clínico, grado de diferenciación nuclear, multicentricidad del tumor, recurrencia, progresión y presencia de p53 en la prueba de inmunohistoquímica, así como sobrevida y periodo libre de enfermedad.

Se utiliza la clasificación de la TNM y la OMS para la diferenciación nuclear de 1997, la inmunohistoquímica realizada por el mismo técnico e interpretada siempre por el mismo patólogo. Se revisaron las laminillas de cada paciente y se seleccionó la representativa y se desparafinó en xilol, se hidrataron los cortes en etanol absoluto, agua corriente y destilada, la recuperación antigénica en tris buffer en baño maría dentro de microondas por cinco minutos, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Se enjuagó con agua destilada y se incubó por 10 minutos. Se secó el exceso de PBS y se aplicó el anticuerpo primario 8 monoclonal Mouse Anti-Human, p-53 protein clona DC 7 DAKO concentrado, dilución 1:50, se incubó por 24 horas en cámara de humedad a 4 °C.

Se realizó la medición de las áreas focales de la siguiente manera: 0-5 células una +, 5-25 células por campo ++, y más de 25 células por campo +++.

La medición del análisis estadístico se realizó utilizando el producto límite o estimador de Kaplan Meier, cálculo de la razón de momios y  $\chi^2$ .

## RESULTADOS

Un total de 93 expedientes fueron revisados, sólo 63 se incluyeron en el estudio, 43 hombres y 20 mujeres, la edad fue similar en ambos sexos, con un rango de 27-93 años, con una media de 58.7, al momento del diagnóstico 38 casos fueron cánceres superficiales (60%) y 25 invasores (40%), la clasificación patológica fue de la siguiente forma: T1 el más frecuente, con 52.3% del total de la muestra; el menos frecuente fue el T4 con sólo 1.59%, el grado de diferenciación nuclear fue grado I 18 casos (28.5%), grado II 17 casos (26.98%), grado III 28 casos 44.4%, la resección transuretral de vejiga (RTUV) se realizó en 82% de los casos, la inmunoterapia con BCG fue la indi-

cada en los tumores superficiales, los tumores multicéntricos se presentaron en 52.38% de los pacientes. Al revisar la recurrencia encontramos que 34 pacientes la presentaron (53.97%) y la progresión a un estadio mayor o grado de diferenciación más agresivo se presentó en 31 casos (42.2%); el p53 se expresó en 45 pacientes del total de la muestra (71%), existió una relación entre la recurrencia y la progresión, con un valor de  $p > 0.005$ , el periodo libre de enfermedad fue de 24 meses en los superficiales y seis en los invasores; el seguimiento promedio fue de 36 meses, la mortalidad a cinco años en los superficiales fue de 4% y para los invasores de 76%.

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al realizar el análisis multivariado encontramos que de los 45 pacientes positivos para p53 26

fueron cánceres de presentación superficial y 19 invasores, de los 45 recurrieron 34 que corresponden a 77.7%, existió progresión en 31 casos (90%) (*Cuadro 1*).

Analizamos la recurrencia en los tumores superficiales, de los 38 casos 20 pacientes presentaron recurrencia (52.6%) y 42.1% progreso; 10 a una etapa invasora y siete a un grado mayor de diferenciación nuclear, el p53 fue positivo en 17 casos de las recurrencias: En esta asociación existió una relación estadísticamente significativa con una  $p > 0.001$  (*Figura 1*).

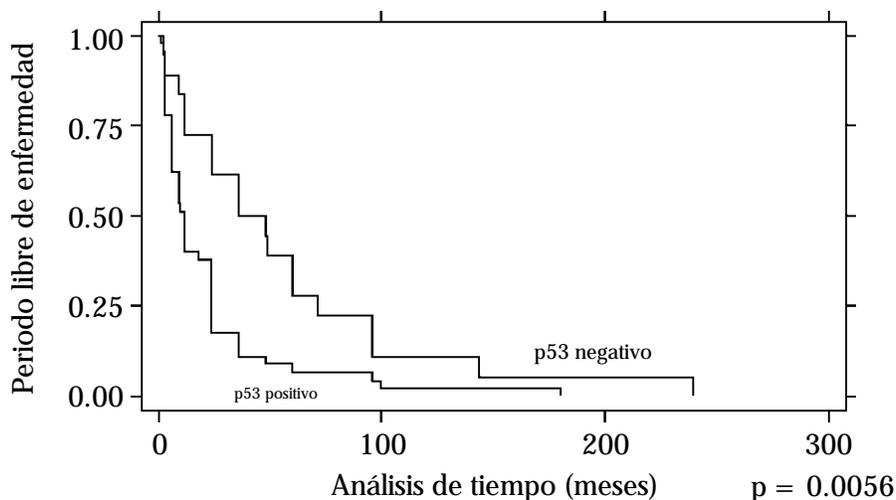
Al analizar los pacientes con progresión y expresión del p53 encontramos una fuerte correlación estadísticamente significativa, con una  $p > 0.000$  (*Cuadros 2 y 3*).

En los tumores invasores encontramos expresado el p53 en 19 casos de los 25 invasores (76%), en este grupo hubo recurrencia en 14 pacientes

**Cuadro 1.** Relación de pacientes por estadio, grado nuclear, con expresión de p53.

Estadio clínico	No. de casos	Grado nuclear			Recurrencia	Progresión	Expresión de P53	Vivo
		I	II	III				
Ta	5	4	0	1	0	0	2	4
T1	33	13	13	7	20	17	24*	23
T2	18	0	3	15	12	12	12*	6
T3	6	1	1	4	1	1	6	1
T4	1	0	0	1	1	1	1	0
Total	63	18	17	28	34	31	45	34

\*  $p < 0.005$ .



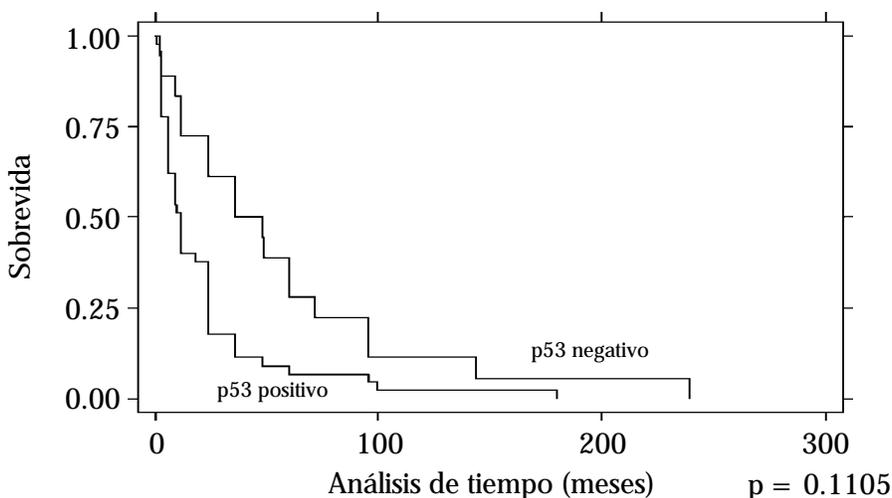
**Figura 1.** Periodo libre de enfermedad y p53.

**Cuadro 2.** Razón de momios para recurrencia y progresión.

Recurrencia	Con progresión	Sin progresión	Total	Razón de momios	Intervalo de confianza	Valor de p
Sí	28	6	34	40.44	(7.9-253.5)	0.000
No	3	26	29			
Total	31	32	63			

**Cuadro 3.** Razón de momios en relación con progresión y p53 positivo.

Progresión	P53 (+)	P53(-)	Total	Razón de momios	Intervalo de confianza	Valor de p
Sí	27	4	31	5.25	1.32-24.82	0.067
No	18	14	32			
Total	45	18	63			



**Figura 2.** Expresión de p53 y sobrevida.

(73%), de éstos 11 progresaron (78.5%) y todos fueron positivos a p53.

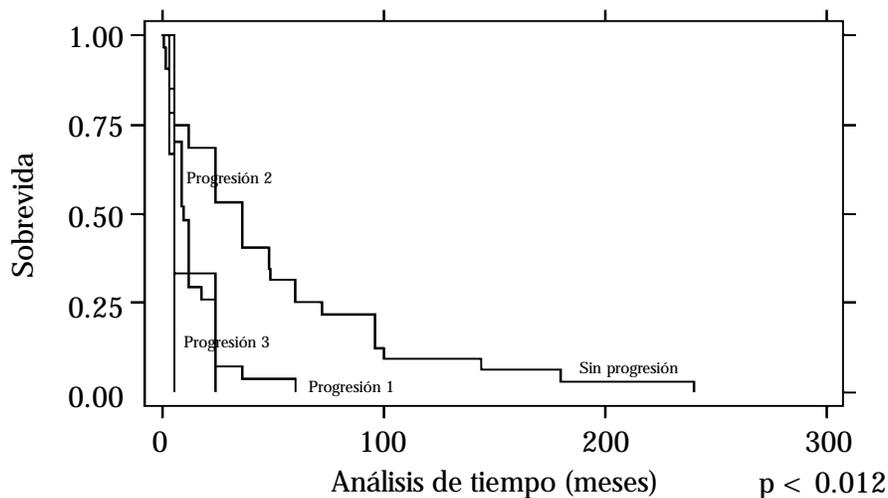
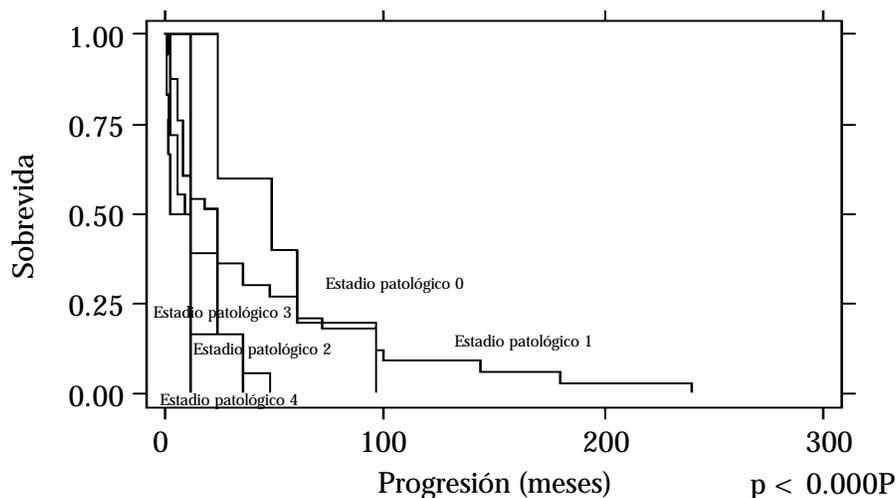
Al analizar la relación entre p53, recurrencia y progresión en la logística encontramos una  $p > 0.002$ , analizando el p53 como factor independiente en la sobrevida pudimos observar que no hay una relación estadísticamente significativa según las curvas de sobrevida de Kaplan Meier (Figura 2). En el análisis multivariado para sobrevivencia encontramos que sólo el estadio patológico y la progresión son predictivos para la mortalidad (Figura 3).

Los tumores multicéntricos que se presentaron en 33 casos del total de la muestra estudiada, no

demonstró ser un factor para recurrencia según se observa en la figura 4 con una  $p > 0.59$ ; cuando analizamos la recurrencia observamos que los pacientes que la presentaron no se asoció en forma estadísticamente significativa  $p > 0.16$ .

El grado de diferenciación nuclear no mostró ser un factor independiente en la sobrevida según las curvas de estimación de sobrevida de Kaplan Meier con un valor de  $p > 0.1485$ , sin embargo, sí lo es para la recurrencia con un valor de  $p > 0.0426$  (Figura 5).

Existió una diferencia en la sobrevida en los pacientes superficiales y profundos como se muestra en la figura 6.



**Figura 3.** Estadio patológico, progresión y sobrevida.

Existen factores que pueden determinar el periodo libre de enfermedad y es la adyuvancia, encontrando una asociación importante en aquellos pacientes que recibieron algún tipo (inmunoterapia, RT-QT) en la sobrevida y el periodo libre de enfermedad.

#### DISCUSIÓN

Aunque en nuestro estudio se observa una asociación importante entre el p53 y la recurrencia y ésta, a su vez, con la progresión, el análisis estadístico demuestra que como factor independiente no se relaciona con la sobrevida, como se comenta por el Dr. Wu en su artículo publicado en 1996 donde encuentra que no existe relación

entre la expresión de p53 y la respuesta al tratamiento con radioterapia en los tumores invasores.<sup>16</sup> Es de llamar la atención que la expresión de p53 en nuestro estudio fue mayor comparado con el único estudio nacional sobre este oncogén realizado en 1998,<sup>3</sup> existen otros factores de comorbilidad que se asociaron fuertemente con la mortalidad y periodo libre de enfermedad como lo es el estadio, grado nuclear; la multicentricidad en nuestro estudio no mostró ser un factor de recurrencia ni tampoco influir en la sobrevida; sin embargo, el valor de p para esta variable fue de 0.059, por lo que pensamos que por el tamaño de la muestra no hubo significancia estadística.

Ya ha sido demostrada la importancia del p53 en el cáncer de vejiga, y la acumulación de esta

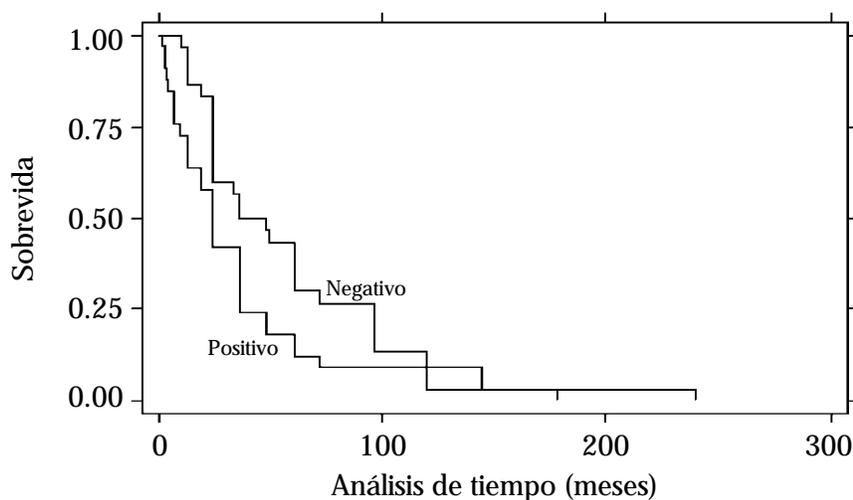
proteína para ser fenotípicamente más agresivo, de ahí que haya sido utilizado como marcador inmunohistoquímico en un intento por predecir la progresión y pronóstico,<sup>17</sup> al correlacionar la aneuploidia más la mutación en el p53 parece ser que existe una asociación importante en la supervivencia, otros estudios mencionan que cuando existe acumulación de esta proteína como factor de falla para terapia intravesical con BCG, debe ser evaluada la posibilidad de cistectomía radical.<sup>18</sup>

Desde las dos últimas décadas en donde ya han sido descritas la estructura, función y la interacción para ser “guardián del genoma” numerosos estudios retrospectivos han sido realizados en un intento por conocer el valor pronóstico de este oncogén, desafortunadamente sólo existen dos

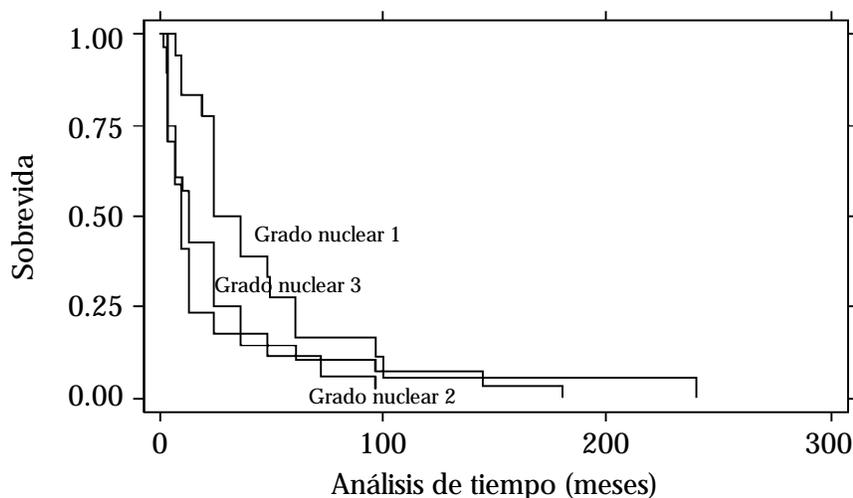
estudios prospectivos al respecto, el primero del MD Anderson-National-Cancer, un estudio fase I usando vector adenoviral para el tipo salvaje de p53 intravesical en pacientes con cáncer avanzado de vejiga, y el segundo, por el University of Southern California National Cancer Institute en un estudio fase basado en la observación vs. quimioterapia sobre el estado del p53.<sup>19</sup>

En nuestro estudio encontramos que la relación del p53 con tumores de alto grado e invasores es bien demostrada, correlacionó con la recurrencia y progresión, no así con la supervivencia, como se comenta en el último artículo de revisión sobre el p53.<sup>19</sup>

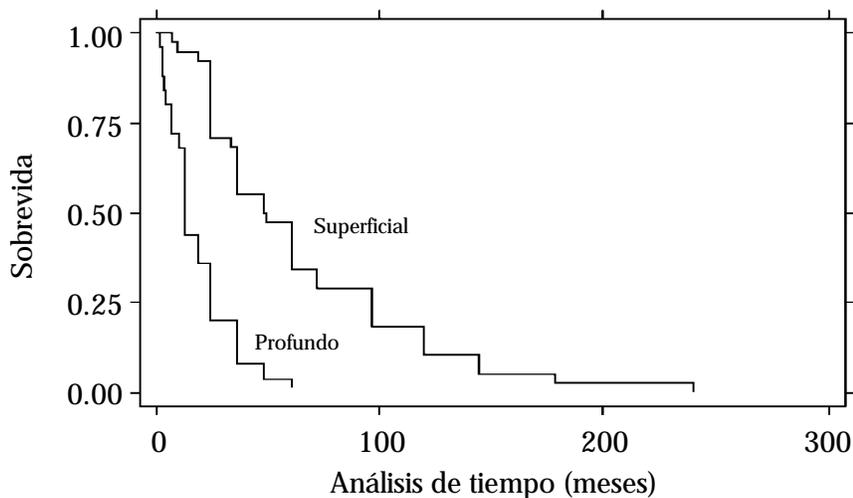
Desafortunadamente parece ser que la utilidad del p53 como se menciona en la literatura no



**Figura 4.**



**Figura 5.**

**Figura 6.**

correlaciona con la respuesta a la terapia en el manejo inicial del cáncer de vejiga, pero como se demostró en este estudio es un marcador para predecir progresión.

Para incrementar la sensibilidad de la prueba se han utilizado otras como el retinoblastoma, el p21, ki67, bcl 2, entre otros, según se ha publicado,<sup>20</sup> sin embargo, la depuración de la técnica y los mejores reactivos han hecho que el p53 por sí solo pueda ser sensible, a diferencia de lo comentado en el único artículo nacional al respecto.<sup>3</sup>

Podemos destacar la importancia de este estudio que demuestra que el p53 puede tener una utilidad en aquellos pacientes con estadios superficiales para predecir recurrencia y posiblemente ante el riesgo de progresión al expresar p53 mutado, tener una agresividad mayor en el manejo.

### CONCLUSIÓN

El comportamiento incierto del cáncer vesical, recurrencia elevada en etapas tempranas y progresión en un porcentaje de hasta 30% plantea la necesidad de tener mayor vigilancia en el seguimiento de los pacientes p53 positivos y aunque no es estandarizado su uso creemos que es una prueba útil para el mejor seguimiento de estos pacientes en un intento por predecir quiénes pudiesen recurrir y proporcionar una terapia más agresiva y seguimiento más estrecho. Es necesario realizar un estudio prospectivo en pacientes con el mismo estadio patológico para

confirmar los resultados obtenidos en esta investigación.

### REFERENCIAS

1. Maldonado VR, Morales MG, et al. Carcinoma superficial de células transicionales de vejiga. Experiencia en 10 años. *Rev Mex Urol* 2001; 61: 13.
2. Maldonado VR, Morales MG, et al. Carcinoma invasor de células transicionales de vejiga en el Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Experiencia en 10 años. *Rev Mex Urol* 2002; 62: 118-21.
3. Zaragoza RI, Muñoz JA, et al. Utilidad clínica de p53 y antígeno de proliferación nuclear (pcna) en las biopsias tempranas de cáncer vesical superficial. *Bol Col Mex Urol* 1998; 15: 27-32.
4. Fleshner N, Kapusta L, Ezer D, et al. P53 nuclear accumulation is not associate with decrease disease free survival in patients with node positive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2000; 164: 1177-82.
5. Millar-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, et al. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol* 2000; 164: 680-4.
6. Lee R, Droller M. *Uroclinics North of America* 2000; 1: 1-13.
7. Carson D, Lois A. Cancer progression and P53. *Lancet* 1995; 346: 1009-11.
8. Knowles M. The genetics of transitional cell carcinoma progress and potential clinical application. *BJU International* 1999; 84: 412-27.
9. Caliskan M, Turkery B, Mansuroglu G. Nuclear accumulation of mutant p53 protein: possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *BJU International* 1997; 79: 373-7.

10. Keegan P, Lunec J, Neal D. P53 and p53 regulated genes in bladder cancer. *BJU International* 1998; 82: 710-20.
11. Adsheed J, Kessler A, Ogden C. Genetic initiation and prognostic markers in transitional cell carcinoma of the bladder: a summary of the structural and transcriptional changes, and the role of developmental genes. *BJU International* 1998; 82: 503-12.
12. Mydlo J, Weinstein R, Shah S, et al. Long term consequences from bladder perforation and/or violation in the presence of transitional cell carcinoma: results of a small series and a review of the literature. *J Urol* 1998; 153: 1128-32.
13. Gohji K, Nomi M, Okamoto M, et al. Conservative therapy for stage T1b, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1999; 53: 308-13.
14. Hall M, Womack S, Sagalowsky A, et al. Prognostic factors, recurrence, and survival in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: a 30 years experience in 252 patients. *Urology* 1998; 52: 594-601.
15. Underwood M, Reeves J, Smith G, et al. Over expression of p53 protein and its significance for recurrent progressive bladder tumors. *BJU International* 1996; 77: 659-66.
16. Wu CS, Pollack A, Czerniak B, Chyle V, Zagars GK, Dinney CP, et al. Prognostic value of p53 in muscle-invasive bladder cancer treated with preoperative radiotherapy. *Urology* 1996; 47: 305.
17. Bernardini S, Billerey C, Martin M, et al. The predictive value of muscularis mucosae invasion and p53 over expression on progression of stage T1 bladder carcinoma. *J Urol* 2001; 265: 42-6.
18. Solsona E, Iborra I, Dumont R, et al. The 3-month clinical response to intravesical therapy as a predictive factor for progression in patients with high risk superficial bladder cancer. *J Urol* 2000; 164: 685-9.
19. Norm DJ, et al. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder.
20. Slaton J, Benedict W, Dinney C. P53 bladder cancer: mechanism of action, prognostic value, and target for therapy. *Urology* 2001; 57: 852-9.