

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES EN CÁNCER DE VEJIGA

TESIS DOCTORAL

*Tesis presentada por Fco. Javier García del Muro Solans
para optar al grado de Doctor en Medicina*

Director de la Tesis: Dr. José Ramón Germá Lluch

Barcelona, 2004

A mi mujer, Luisa

*A la memoria de mi padre,
i a la meva mare*

Cuando el tumor extiende sus pies desde todas las caras de su cuerpo al interior de las venas, la enfermedad produce la imagen de un cangrejo

Galeno

En el ámbito más profundo de la ciencia, allí donde ésta se convierte en hechizo, lo económico, el aspecto de poder, cautiva menos que el aspecto lúdico. Queda claro entonces que somos presas de un juego, de una danza del espíritu que ningún arte aritmético es capaz de captar. El último confín de nuestra ciencia es la intuición, la llamada del destino, la mera figuración

Ernst Jünger

PUBLICACIONES INCLUIDAS:

La presente Tesis Doctoral está realizada según el sistema de artículos, y se basa en las siguientes publicaciones originales:

1. Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer.

X Garcia del Muro, A Torregrosa, J Muñoz, X Castellsagué, E Condom, F Vignes, A Arance, A Fabra, JR Germá.

Eur J Cancer 2000; 36:357-362

2. p53 and p21 expression predict organ preservation and survival in invasive bladder cancer treated with combined modality approach.

X Garcia del Muro, E Condom, F Vigués, X Castellsagué, A Figueras, J Muñoz, J Solá, T Soler, G Capellà, J R Germà.

Cancer 2004; 100:1859-1867

BECAS:

Los estudios que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han sido realizados con el soporte de la siguiente ayuda a la investigación:

- Beca del Fondo de Investigación Sanitaria, FIS 98/663, al proyecto: "Valor pronóstico de las proteínas implicadas en la invasividad local y metastásica en el cáncer de vejiga".
Investigador Principal: Fco Javier Garcia del Muro Solans.

AGRADECIMIENTOS:

En la realización de los estudios que componen esta tesis doctoral han sido innumerables las personas que, de un modo u otro, han contribuido a que ésta pudiera llegar a buen fin. A todos ellos les estoy sinceramente agradecido, pero quisiera personalizar mi agradecimiento a algunas personas que me han ayudado de forma especial.

A José Ramón Germà, director de esta tesis, al que quisiera agradecer especialmente su vivo estímulo en la investigación translacional, que fue fundamental para poner en marcha estos estudios, y el haber creado las condiciones necesarias en nuestro medio para poder llevarlos a cabo.

A José Muñoz y Francesc Vigués, facultativos del Servicio de Urología del Hospital Universitari de Bellvitge, y Enric Condom y Agust Vidal, del Servicio de Anatomía Patológica. Su interés en la investigación en cáncer de vejiga, y su experiencia y su dedicación al tratamiento de esta enfermedad, han sido esenciales en el desarrollo de estos estudios. A Salvador Villá, oncólogo radioterapeuta, experto en el tratamiento de esta enfermedad.

A Gabriel Capellà, que ha luchado para que nuestra línea de investigación pudiera desarrollarse, nos ha proporcionado los medios necesarios en el laboratorio, y nos ha aportado asistencia en tantas ocasiones. A Agnés y a Esther, que han trabajado duro en el laboratorio. A Angels Torregrosa que con su trabajo y experiencia hizo posibles los inicios. A Xavier Castellsagué, que con rigor ha dirigido sabiamente el análisis estadístico. A Judit Solá, que ha trabajado incansablemente en la realización de este análisis. A Ron Clapp, por su paciencia en la revisión del inglés.

A mis compañeras de la División C del Servicio de Oncología Médica del ICO Durà i Reynals: Matilde Navarro, Maica Galán, Merche Martínez y Gema Soler, que comparten la asistencia a estos pacientes, y con las que es para mí un privilegio trabajar en el día a día. Su ayuda y comprensión han sido esenciales para poder finalizar esta tesis. A todos los facultativos del Servicio de Oncología Médica, cuya entrega y profesionalidad admiro.

A mi familia. A mis padres y a mis hermanos, Juan, Belén y Montse, por su estímulo y apoyo. A Luisa, mi mujer, su mérito en que esta tesis se haya finalizado es casi tan grande, si no más, que el mío propio. A Paula y Xavier, mis hijos, que si bien habrán probablemente contribuido a que la finalización de esta tesis se haya retrasado, han

hecho que mi trabajo sea más agradable y gratificante. Y, muy especialmente, a mi tío Josep Solans, trabajador incansable y verdadero estímulo intelectual durante todo el tiempo que estuvo con nosotros.

INDICE:

1. Introducción	9
1.1 Epidemiología e importancia clínica del cáncer de vejiga	10
1.2 Características clínico-patológicas y biológicas del cáncer de vejiga.....	11
1.3 Valoración pronóstica en cáncer de vejiga: un problema clínico	14
1.4 Factores pronósticos en cáncer de vejiga.....	15
1.4.1 Factores pronósticos clínico-patológicos.....	16
<i>a. Tumores superficiales</i>	16
<i>b. Tumores infiltrantes</i>	17
1.4.2 Factores pronósticos moleculares.....	18
<i>a. Proteínas reguladoras del ciclo celular</i>	21
-p53.....	22
-p21.....	28
-pRB.....	29
-Mdm2.....	31
-p27, ciclina E, ciclina D1.....	31
-p16, p15, p14.....	32
<i>b. Moléculas de adhesión celular</i>	32
-Complejo caderina-catenina.....	33
-CD44	36
<i>c. Otros marcadores moleculares</i>	37
-Antígenos de proliferación nuclear.....	37
-Oncogenes.....	37
-Marcadores de apoptosis.....	38
-Angiogénesis e inhibidores de la angiogénesis	39
-Predictores de quimiosensibilidad y respuesta al tratamiento.....	40
2. Justificación y Objetivos de la Tesis	44
2.1 - Estudio 1.....	46
2.2 - Estudio 2.....	47
3. Artículos que constituyen la Tesis	50
- Artículo 1: Eur J Cancer 2000; 36: 357-362.....	51
- Artículo 2: Cancer 2004; 100: 1859-1867.....	57
4. Discusión	66
4.1 Moléculas de adhesión y pronóstico en cáncer de vejiga	69
4.2 Proteínas reguladoras del ciclo celular y pronóstico del cáncer de vejiga tratado con quimioterapia neoadyuvante.....	74
5. Conclusiones	84
6. Bibliografía	87

INTRODUCCION

1.1 EPIDEMIOLOGIA E IMPORTANCIA CLINICA DEL CANCER DE VEJIGA

El cáncer de vejiga representa en Europa aproximadamente un 7% del total de tumores malignos, y ocupa el cuarto lugar en orden de frecuencia en el varón. En 1995, se estimó que en los países de la Unión Europea se presentaban alrededor de 84.000 casos nuevos al año, y que se producían unas 31.000 muertes a consecuencia de esta enfermedad (1). Su incidencia posee una clara tendencia creciente, habiéndose estimado un incremento del 5-20% cada 5 años en el varón.

Los seis registros de cáncer españoles muestran una tasa de incidencia situada en el tercio superior del conjunto de registros del mundo, siendo el de Tarragona el que posee una tasa más alta (2). En nuestro país, el cáncer de vejiga constituye el segundo cáncer en orden de frecuencia en el varón, en el que representa el 11% de los cánceres, mientras que en la mujer representa un 3%. Se ha observado un porcentaje de aumento de la incidencia anual del 4.4%.

Al tratarse de un tumor fuertemente relacionado con carcinógenos ambientales, se ha aducido que algunos factores como el consumo de tabaco y la exposición a carcinógenos ocupacionales, de gran importancia en algunas áreas, podrían encontrarse relacionados con esta elevada incidencia. De hecho, se ha estimado un riesgo hasta 2 o 3 veces mayor de cáncer de vejiga en los fumadores de tabaco negro que en los de tabaco rubio. Este posible papel del tabaco negro, que contiene concentraciones elevadas de aminas aromáticas como factor específico de riesgo, podría ser un factor importante para explicar la magnitud del problema en nuestro medio (2,3).

1.2 CARACTERISTICAS CLINICOPATOLOGICAS Y BIOLOGICAS DEL CANCER DE VEJIGA

Histológicamente, más del 90% de los tumores de vejiga son carcinomas uroteliales. Poseen idénticas características al carcinoma urotelial originado en otras áreas de las

vías urinarias (pelvis renal, uréter, ductos prostáticos o uretra). El carcinoma urotelial de vejiga es, sin embargo, una enfermedad enormemente heterogénea, cuyo espectro de presentación oscila desde tumores superficiales papilares bien diferenciados a tumores sesiles pobremente diferenciados e invasivos.

Esta heterogeneidad se manifiesta también en la evolución clínica. Se distinguen dos formas de presentación, los tumores superficiales y los tumores infiltrantes, cuya historia natural y, en consecuencia, el tratamiento a aplicar, están claramente diferenciados. Los tumores superficiales, confinados a la mucosa (Ta) o con invasión de submucosa o lámina propia (T1), constituyen el 75% de los cánceres de vejiga. Tras el tratamiento con resección transuretral (RTU), asociada o no a instilación de BCG o quimioterapia endovesical, cerca del 75% de los pacientes experimentarán posteriores recidivas superficiales, habitualmente de características parecidas a las del tumor inicial, en un periodo de tiempo que puede comprender muchos años. Sin embargo, en alrededor de una cuarta parte de los pacientes, la enfermedad progresará, desarrollando en recidivas posteriores un carcinoma infiltrante (4). El carcinoma in situ (Tis) es habitualmente más agresivo, y comporta un mayor riesgo de progresión. El resto de tumores, aproximadamente un 25% del total, son infiltrantes de la capa muscular (T2-4) en el momento de su presentación inicial. En ellos, el curso es con frecuencia muy agresivo, y tras tratamiento mediante cistoprostatectomía radical o terapéutica multimodal con conservación vesical selectiva, se producen metástasis a distancia durante el seguimiento en aproximadamente la mitad de los pacientes (4).

En la actualidad, basándose en los datos histológicos y genéticos disponibles, se considera que los tumores superficiales y los infiltrantes poseen una diferente historia natural. Así, la mayoría de tumores infiltrantes no poseen precursor papilar previo conocido, y se asocian con frecuencia a carcinoma in situ en otras áreas de la vejiga. Se ha propuesto un modelo de progresión para estos tumores que consistiría en un primer

lugar en atipia urotelial, seguida de displasia, posteriormente carcinoma in situ, y finalmente carcinoma infiltrante (5).

En los últimos años, ha despertado un gran interés el estudio del espectro de cambios genéticos que acontecen durante la transformación tumoral en el cáncer de vejiga. El análisis genético ha mostrado que el Tis contiene con frecuencia una serie de alteraciones genéticas, entre las que destacan mutaciones de p53 y pérdida de heterocigosidad de 3p, 13q y 17p, similares a las observadas en el carcinoma infiltrante y claramente diferenciadas de las visualizadas habitualmente en los tumores superficiales papilares. En éstos, la única alteración frecuente y característica es la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 9 (6). El modelo propuesto de desarrollo de estos tumores superficiales consiste en hiperplasia urotelial, atipia urotelial y finalmente tumor papilar de bajo grado (6). De este modo, la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 9 sería un evento crucial en la transición del urotelio normal a carcinoma papilar, mientras que la aparición de mutaciones de p53 estaría implicada en el desarrollo de carcinoma in situ y carcinoma infiltrante (7).

Las alteraciones identificadas son con frecuencia múltiples y se encuentran predominantemente en los tumores infiltrantes. Se han observado con gran frecuencia mutaciones de genes que codifican proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, como p53, retinoblastoma (pRB), p16, p15 y ciclina D1. Otras alteraciones observadas con cierta frecuencia en este tumor se encuentran en oncogenes como H-ras, EGFR y erbB-2. La pérdida de expresión de una molécula de adhesión, E-cadherina, parece poseer también un papel importante en la progresión tumoral (7,8).

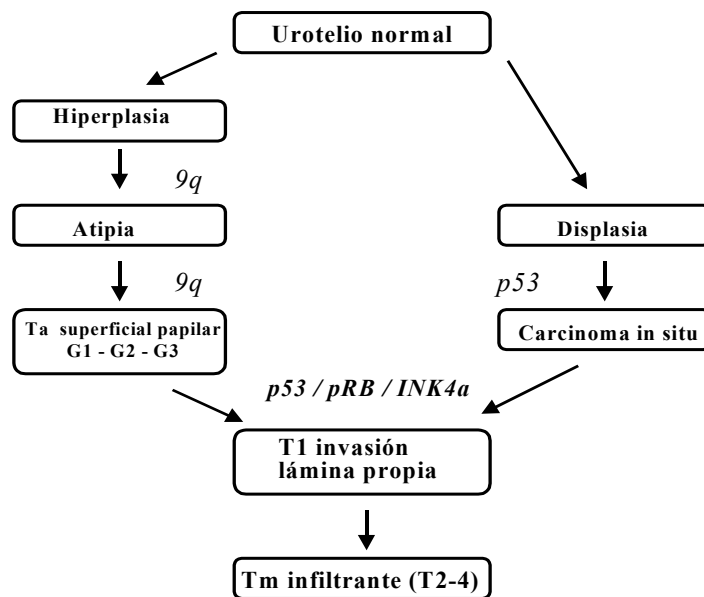


FIG.1. Modelo de progresión en dos vías diferentes del carcinoma urotelial de vejiga

1.3 VALORACION PRONOSTICA EN CANCER DE VEJIGA: UN PROBLEMA CLINICO

Globalmente, la supervivencia estimada a 5 años del cáncer de vejiga se encuentra en torno al 65% (9). La gran heterogeneidad en cuanto a historia natural que posee el carcinoma de vejiga, dificulta la predicción de la evolución clínica posterior en un caso determinado. Así, en los tumores superficiales sería de gran interés poder identificar qué casos presentarán únicamente recidivas locales superficiales tras el tratamiento, y cuales son esa pequeña fracción de casos que poseen capacidad de progresar a tumor infiltrante, desarrollar metástasis y finalmente matar al paciente. Si fuera posible identificar a estos últimos pacientes al inicio, es probable que pudieran beneficiarse de terapéuticas más agresivas aplicadas más precozmente.

Por otro lado, en los pacientes con tumor infiltrante, sería de gran interés poder caracterizar mejor al grupo de pacientes que, tras tratamiento con cistectomía radical, desarrollarán metástasis que conducirán al fallecimiento del paciente, frente al grupo que quedarán curados de su enfermedad tras la práctica de la cirugía. La utilización de

tratamientos más agresivos complementando a la cirugía podría beneficiar al primer grupo de pacientes.

Por otro lado, en la actualidad hay disponibles alternativas terapéuticas diferentes a la cistectomía radical para el tratamiento del carcinoma infiltrante. El tratamiento multimodal con preservación vesical selectiva, que en líneas generales consiste en quimioterapia neoadyuvante y radioterapia posterior o simultánea, permite limitar la práctica de la cistectomía a aquellos pacientes con pobre respuesta al tratamiento, y obtiene unas cifras de supervivencia similares a las alcanzadas con la cistoprostatectomía radical. Posee la gran ventaja de que consigue conservar a largo plazo la vejiga libre de tumor en un 40-45% de los pacientes tratados (10). La posibilidad de determinar previamente qué pacientes poseen grandes probabilidades de conservar la vejiga a largo plazo con tratamiento multimodal, permitiría una mejor selección de los candidatos a recibirlo, y también evitaría una quimioterapia innecesaria y un retraso en la cirugía en los pacientes con escasas probabilidades de responder a dicho tratamiento.

El estadio clínico y el grado histológico, así como otros factores pronósticos cliniopatológicos, permiten un cierto grado de estratificación del potencial evolutivo del tumor, de utilidad en la práctica clínica. No obstante, su valor predictivo es limitado, y persiste un considerable grado de heterogeneidad en los diferentes subgrupos pronósticos. La identificación de nuevos marcadores pronósticos y predictores de respuesta al tratamiento, basados en las características biológicas del tumor, podría permitir una selección más precisa de los tratamientos a aplicar, acorde con el potencial biológico de cada caso concreto.

1.4 FACTORES PRONOSTICOS EN CANCER DE VEJIGA

En los últimos años, la comprensión progresiva de algunos de los mecanismos celulares implicados en el desarrollo del cáncer, ha permitido identificar varios grupos de moléculas que podrían desempeñar un papel importante en la carcinogénesis y la progresión del

cáncer de vejiga. Este hecho ha despertado un gran interés por la realización de estudios dirigidos a evaluar el valor pronóstico potencial, sobre el riesgo de recurrencia y progresión tumoral en los tumores superficiales, y sobre el desarrollo de metástasis y la supervivencia en los tumores infiltrantes, de muchas de estas moléculas. Y también sobre su utilidad potencial en la predicción de la respuesta a determinadas alternativas terapéuticas.

A continuación se revisan los diferentes factores pronósticos clínico-patológicos y los principales marcadores moleculares cuyo efecto pronóstico ha sido estudiados en cáncer de vejiga.

1.4.1 FACTORES PRONOSTICOS CLINICO-PATOLOGICOS:

1.4.1.a Tumores superficiales:

El riesgo de progresión a tumor infiltrante se halla fuertemente asociado al grado histológico y al estadio clínico (T1 versus Ta), que son los factores pronósticos clásicos más importantes (11). El riesgo de progresión en el grado I es aproximadamente del 6%, en el grado II del 12% y en el grado III del 30%. Cerca de un 6% de tumores Ta progresarán, frente a un 30% de T1. Combinando grado histológico y estadio, el riesgo de progresión se acerca al 50% en los tumores T1G3 (12).

La presencia de invasión vascular o linfática en un T1 es un signo adverso, que se asocia frecuentemente a progresión a tumor infiltrante en 1 o 2 años. El Tis es habitualmente más agresivo, y el riesgo de progresión es mayor. Sin embargo, deben distinguirse tres situaciones diferenciadas: el Tis unifocal, de menor agresividad; el multifocal que causa con frecuencia síntomas irritativos, y se asocia en más de un 50% de los casos a progresión; y el Tis asociado a tumor infiltrante, que posee todavía peor pronóstico (13). Otros factores reconocidos desde hace largo tiempo son la multifocalidad tumoral en el momento de la presentación, la recidiva de la enfermedad en los 3 primeros

meses de seguimiento y, en menor medida, el tamaño tumoral y la presencia de displasia en otras zonas de la vejiga (14).

1.4.1.b Tumores infiltrantes:

El factor pronóstico más importante en los pacientes tratados mediante cistectomía radical es la presencia de afectación ganglionar regional, que está presente en aproximadamente 15-25% de los casos. La supervivencia a 2 años de los pacientes con afectación ganglionar, considerados globalmente, es inferior al 15%. Es una excepción el reducido grupo de pacientes con N1 que presentan invasión ganglionar microscópica en un solo ganglio. Estos poseen una supervivencia mejor, cercana al 35% tras cirugía radical (15). Los pacientes con N2-3 tienen una supervivencia muy pobre, inferior al 10%, presentando hasta un 70% de muertes durante el primer año.

Otro factor pronóstico relevante es el estadio (16). En los tumores T2 se obtiene supervivencias a los 5 años cercanas al 60%, frente a un 10-30% en los tumores con afectación de grasa perivesical (T3) u órganos vecinos (T4). Además, en más de la mitad de casos, los estadios avanzados (T3b-4) se asocian a afectación ganglionar. La infiltración de próstata es también un factor adverso, y otro factor conocido es la presencia de obstrucción ureteral secundaria. A diferencia de los tumores superficiales, el papel pronóstico del grado histológico es muy limitado en los pacientes con tumores infiltrantes, pues prácticamente en todos los casos se trata de tumores de grado alto.

En los pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante en pautas de conservación vesical multimodal selectiva, los factores predictivos de éxito terapéutico mejor reconocidos son estadio tumoral y presencia de uropatía obstructiva secundaria (10,17). Asimismo, la práctica de una RTU completa antes de la quimioterapia ha mostrado poseer valor pronóstico favorable (18).

1.4.2 FACTORES PRONOSTICOS MOLECULARES

Entre las diferentes moléculas cuyo valor pronóstico ha sido estudiado en cáncer de vejiga, poseen un interés especial las proteínas implicadas en el control del ciclo celular y las moléculas de adhesión celular, debido a su posible papel predominante en la carcinogénesis de este tumor. También han sido estudiados una extensa serie de factores pronósticos moleculares que inciden a otros niveles de la progresión tumoral, y se revisarán a continuación.

La inmunohistoquímica es el método más ampliamente utilizado en la evaluación de marcadores pronósticos, dada la orientación eminentemente dirigida a la aplicación práctica que posee la investigación en factores pronósticos. La inmunohistoquímica puede resultar fácilmente utilizable en la práctica clínica, sin requerir un incremento excesivo en la sofisticación técnica y el coste (19). Otras técnicas moleculares de mayor complejidad son de gran interés en la investigación básica, pero su aplicación en la práctica asistencial es por el momento escasa. La inmunohistoquímica, sin embargo, posee algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta para permitir una valoración adecuada de los resultados de los diferentes estudios. Se trata de una técnica compleja, que comprende diversos pasos con diferentes componentes, que se centran sobre todo en: los anticuerpos y reactivos utilizados, que con frecuencia varían entre los diferentes laboratorios; los procedimientos técnicos, que incluyen el manejo y procesamiento de los tejidos, y pueden afectar a la inmunotinción; y la interpretación y comunicación de los resultados, que incluye especialmente los puntos de corte utilizados, con frecuencia controvertidos (19-21).

En los últimos años, se están desarrollando nuevas metodologías que permiten evaluar de forma simultánea y más completa varios genes en un determinado tumor, como las matrices de ADN (arrays). Las micromatrices de ADN (microarrays) permiten la evaluación simultánea de múltiples genes de un tumor en una sola muestra, y las micromatrices de tejido permiten el análisis simultáneo de determinados marcadores en

múltiples tumores. La aplicación de estas tecnologías al estudio del cáncer de vejiga se ha iniciado en los últimos años, con resultados iniciales prometedores (22,23). Su utilización en series muy amplias de pacientes con tumores bien caracterizados, con un tratamiento homogéneo y un seguimiento correcto, puede conducir, en unos años, a disponer de herramientas de gran utilidad para la valoración pronóstica del cáncer de vejiga.

En la actualidad, los datos disponibles acerca del valor pronóstico de muchos marcadores moleculares proceden, con frecuencia, de estudios iniciales, y requieren confirmación en series más amplias. No obstante, determinados resultados sugieren de forma consistente que algunos de estos marcadores podrían ser útiles en la evaluación pronóstica del cáncer de vejiga.

TABLA 1: Factores Pronósticos Moleculares en Cáncer de Vejiga.

Función Biológica	Marcador Pronóstico
Regulación ciclo celular	p53 p21 pRB p27 Mdm2 Ciclinas D1 y E p16, p15, p14
Adhesión celular	E-caderina Alfa, beta y gamma cateninas CD44
Antígenos de proliferación nuclear	Ki-67 PCNA
Oncogenes	c-erb-B1 (EGFR) c-erb-B2 (Her-2/ neu) cH-ras c-myc
Apoptosis	Survivina Bcl-2, BAX, CD40L
Angiogénesis	Densidad microvasos VEGF Trombospondina-1 PDEC GF bFGF
Respuesta a la Quimioterapia	p53, p21, pRB p-glicoproteína MRP1, BCRP, LRP

1.4.2.a Proteínas reguladoras del ciclo celular:

La proliferación tumoral depende, en gran medida, de la presencia de alteraciones en el control y la progresión del ciclo celular normal (24). Los complejos de proteínas asociadas al ciclo celular, compuestos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, participan en la regulación del ciclo celular. Por otro lado, varios genes supresores de tumores y sus productos proteicos actúan en la transición de G0/G1, previniendo la pérdida de control y la consiguiente progresión tumoral (25). Entre ellos cabe destacar p53, pRB, p27^{Kip1}, p16^{INK4A} y p14^{ARF}.

Algunos datos recientes sugieren que la interacción entre algunas de estas moléculas puede producir alteraciones en las vías de regulación del ciclo celular, y su

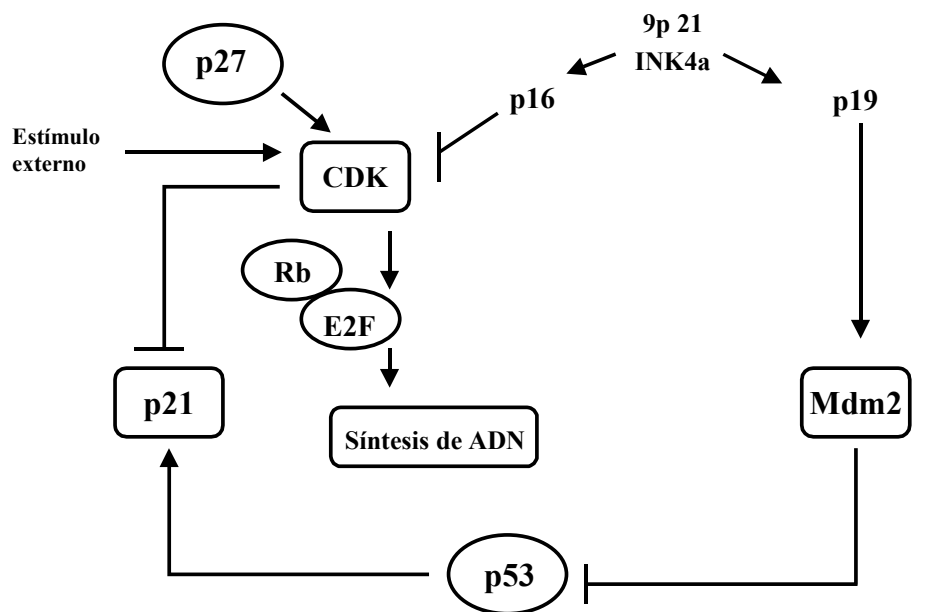


FIG.2. Reguladores del ciclo celular. Estimulador: \longrightarrow Inhibidor: \perp

evaluación conjunta podría reflejar de forma más precisa los eventos responsables de la progresión tumoral (26,27). Recientemente, un estudio analizó el valor pronóstico de las alteraciones en la vía de p53, incluyendo en el estudio mutaciones de p53, y determinación inmunohistoquímica de la expresión de p53, p21 y Mdm2. La afectación de

dicha vía a múltiples niveles se asoció a una peor supervivencia (27). Estos resultados sugieren que el análisis de múltiples miembros de una vía reguladora específica, podría ser más informativo a nivel pronóstico que el análisis de un marcador biológico aislado.

- p53:

·Características básicas y Función: El gen supresor p53, localizado en el cromosoma 17p13, constituye el gen más extensamente estudiado en numerosos tumores, entre los que se encuentra el cáncer de vejiga. Se trata del gen que se encuentra mutado con mayor frecuencia en el cáncer humano. p53 es el encargado de mantener la integridad genómica frente al daño del ADN, causado, por ejemplo, por carcinógenos, radiaciones o quimioterapia. Cuando el daño del ADN es detectado, el nivel de la proteína p53 aumenta, conduciendo a la detención del ciclo celular. Ello permite la reparación del ADN y previene la propagación de los defectos genéticos producidos (28). Sin embargo, cuando el daño producido es demasiado importante, p53 induce apoptosis.

La vida media de la proteína p53 es normalmente muy breve, debido a la rápida degradación que sufre. Sin embargo, la vida media se prolonga sustancialmente tras la aparición de mutación missense (que conduce a cambio de un aminoácido), que es, con diferencia, la alteración genética más frecuente de p53. La presencia de delección pueden causar también el mismo efecto. De este modo, la proteína resultante de la mutación de p53 es disfuncional y posee una vida media prolongada, lo que provoca su acumulación nuclear. Este hecho hace que resulte fácilmente detectable por inmunohistoquímica. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que en algunos casos de delección o mutación nonsense (sin sentido, genera un codón de terminación), la inmunotinción puede ser negativa. También puede existir, en algunas situaciones, sobreexpresión nuclear de proteína normal, lo que podría dar lugar a tinción positiva. A pesar de ello, las alteraciones genéticas generalmente se manifiestan como sobreexpresión de p53 (29). La proteína mutante puede actuar de forma transdominante,

inactivando la forma silvestre (wild-type) endógena por formación de complejos multiméricos (30).

p53 funciona como un factor de transcripción, activando la expresión de genes que controlan la transición entre diferentes fases del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del DNA y la angiogénesis (31,32). En cuanto a la regulación del ciclo celular, p53 está implicada en varias vías de control, como son la vía p16-ciclina D1-quinasa ciclín-dependiente 4-Rb, que regula la transición del ciclo celular de G1 a la fase S (33); y la vía de p21, que produce detención del ciclo celular, sin afectar la reparación del DNA (34). p53 posee también un importante papel como mediador de la apoptosis (35), ya que produce la activación de la transcripción de varios genes diferentes implicados en la apoptosis (36). Dianas apóptóticas conocidas de p53 son el gen pro-apoptótico BAX (37), Noxa y PUMA, pertenecientes a la familia Bcl-2, así como p53AIP1 (38). Estas proteínas se localizan en la mitocondria y promueven la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y liberación del citocromo C, produciéndose la activación de la cascada Apaf-1/caspasa-9 (39). Otros mecanismos de apoptosis p53-dependiente implican a los receptores FAS/APO1 y DR5, y al ligando del receptor FASL (40), y también a la proteína PIDD (41). p53 está asimismo implicado en la senescencia celular (42), y de forma importante en la angiogénesis tumoral (43).

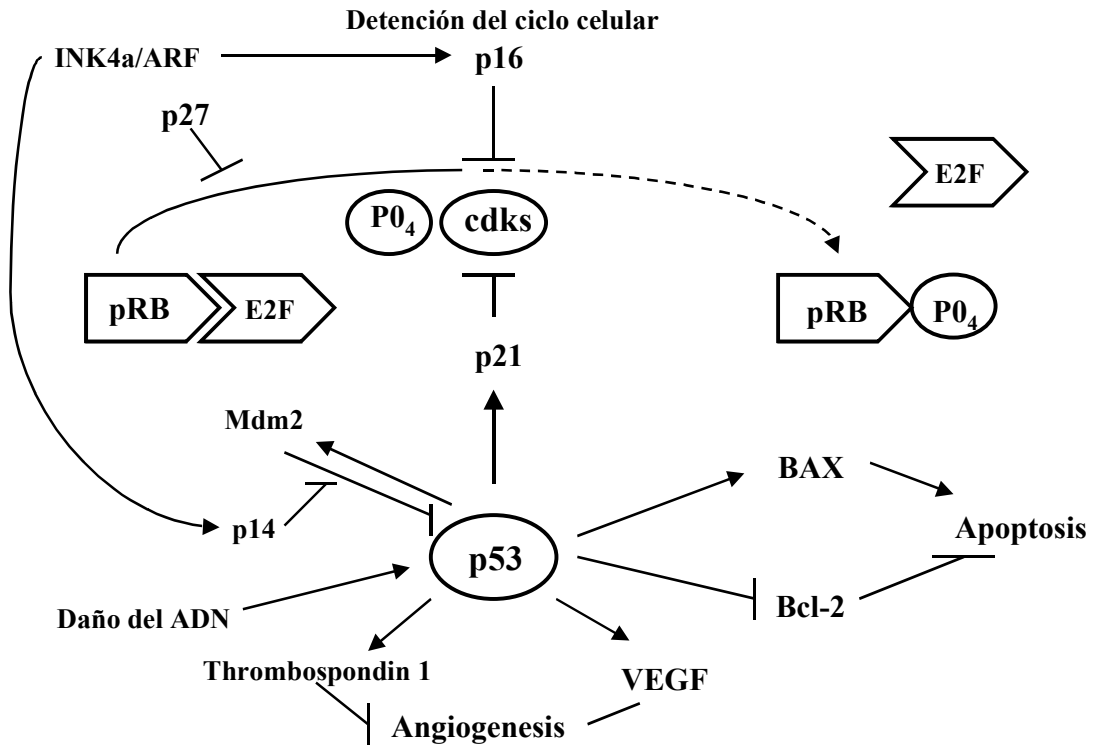


FIG 3. Funciones Biológicas de p53

Además de prevenir la replicación de las células con genoma dañado, por medio de la detención del ciclo celular y la apoptosis, p53 participa en la reparación del daño del DNA a varios niveles. Un gen ribonucleotidasa reductasa, p53R2, constituye una diana directa de p53 (44). También se ha documentado una implicación directa de p53 en la reparación mediante excisión de bases y la reparación mediante excisión de nucleótidos (45). Otro gen diana de p53 que participa en la reparación del DNA es GADD45.

Las críticas actividades de p53 requieren una regulación a múltiples niveles, tanto positiva como negativa, realizada por otros factores. De ahí la importante interacción que p53 puede presentar con multitud de productos de oncogenes, factores de transcripción y proteínas virales. Mdm2 es un proto-oncogen capaz de inhibir la función de p53 por

diversas vías (33), y cuya expresión está interrelacionada con la de p53 por un mecanismo de autoregulación (46). p14/hARF participa también en la regulación de la función de p53 (47).

p53 en cáncer de vejiga: En dos estudios clásicos realizados en cáncer de vejiga, la sobreexpresión de p53 detectada por inmunohistoquímica se correlacionó estrechamente con la existencia de mutaciones en dicho gen, detectadas por métodos moleculares (48,49). No obstante, un estudio más reciente ha mostrado algunas limitaciones de esta técnica. Se incluyeron 50 muestras procedentes de los 5 laboratorios participantes en el estudio, y en cada uno de ellos se realizó la tinción para p53 de unas secciones de cada muestra y su posterior evaluación. La reproducibilidad de los resultados intralaboratorio fue muy elevada, mientras que la reproducibilidad entre los diferentes laboratorios fue buena en los resultados extremos, tanto positivos como negativos, pero existía un nivel de concordancia reducido en el rango intermedio de positividad. Las discordancias se debieron tanto a diferencias en la tinción como en la valoración (50). Este resultado indica que es necesaria cierta precaución cuando se comparan resultados procedentes de series diferentes. La estandarización de los protocolos de inmunotinción y el establecimiento de un criterio uniforme en la interpretación de resultados podría mejorar la reproducibilidad de resultados.

Se ha observado en numerosos estudios, realizados en pacientes con cáncer de vejiga, la existencia de una asociación entre la sobreexpresión de p53 y las características clínicas adversas, principalmente alto grado y estadio avanzado. En tumores superficiales T1, la sobreexpresión de p53 se asoció a un riesgo significativamente superior de progresión (51). Asimismo, en los T1, la positividad de p53 se correlacionó con la profundidad de la infiltración, siendo más frecuente en T1b y T1c que en T1a. Sin embargo, el estado de p53 no poseyó valor pronóstico independiente en el análisis multivariado, mientras que sí lo tuvo el nivel de profundidad de la infiltración

(52). En el carcinoma in situ, la incidencia de sobreexpresión de p53 por inmunohistoquímica es muy elevada. En un estudio se observó que la sobreexpresión de p53 en Tis se asociaba a progresión, y que p53 fue el único factor pronóstico independiente asociado a una peor supervivencia específica (53). Asimismo, la sobreexpresión de p53 tras tratamiento con BCG endovesical por tumor superficial de vejiga se asoció a un riesgo elevado de progresión (54), siendo un predictor más potente incluso que el estadio posttratamiento con BCG.

Un estudio basado en una serie amplia de pacientes con carcinoma infiltrante de vejiga, tratados con cistectomía radical, mostró que la sobreexpresión de p53 se asociaba de forma significativa e independiente de los factores pronósticos clásicos, a progresión y peor supervivencia (55). Algunas series, sin embargo, no han arrojado resultados tan concluyentes (56,57). En una serie de pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante MVAC, y en la mayoría de pacientes cirugía posterior, la sobreexpresión de p53 pretratamiento se asoció a peor supervivencia (58). Este efecto fue especialmente evidente en los pacientes con tumor confinado a la vejiga. Otro estudio, sin embargo, no consiguió establecer asociación alguna entre la expresión de p53 y la respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino o la supervivencia (59).

Estos resultados contrastan con los de un estudio amplio realizado en una serie de pacientes con carcinoma infiltrante sometidos a cistectomía radical, que posteriormente fueron randomizados dentro de un ensayo fase III que comparaba la administración de quimioterapia complementaria y observación. La quimioterapia adyuvante únicamente benefició a los pacientes con alteraciones en la expresión de p53, resultando en una mejoría significativa de la supervivencia al compararlo con el grupo de pacientes con alteraciones de p53 que fueron sometidos a observación; mientras que en el grupo de pacientes que no presentaban dichas alteraciones, no se hallaron diferencias en la supervivencia en función de la administración o no de quimioterapia (60). En los pacientes con carcinoma infiltrante de vejiga tratados con radioterapia, los estudios

acerca del valor pronóstico de la expresión de p53 han mostrado resultados discordantes. En numerosos estudios no se ha observado correlación con la respuesta al tratamiento ni la supervivencia (61), mientras que en otros la presencia de sobreexpresión de p53 se ha asociado a radioresistencia (62), o incluso a mayor radiosensibilidad (63).

- **p21:** Es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas, que previene la fosforilación de pRB y la liberación resultante de E2F, bloqueando de este modo la entrada de las células en la fase S del ciclo celular y, por tanto, la progresión del ciclo celular (64). La expresión de p21 se encuentra regulada directamente por p53. De hecho, la detención del ciclo celular que desencadena p53 en presencia de daño en el ADN, se efectúa a través de p21. p21 se encuentra también relacionada con la senescencia, podría jugar un papel en la modulación de la apoptosis y, mediante su asociación a PCNA, puede inhibir la replicación del ADN sin afectar su capacidad de reparación. Recientemente se han identificado vías alternativas en las que la expresión de p21 es mediada de forma independiente de p53. Así, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de los fibroblastos pueden inducir la expresión de p21 en células de carcinoma escamoso deficientes en p53 (65). Este hecho sugiere que a pesar de existir mutaciones en p53, la expresión de p21 puede estar conservada, y por tanto el control del ciclo celular.

La presencia de alteraciones en la expresión de la proteína p21 no se correlaciona habitualmente con la existencia de mutaciones o deleciones del gen de p21, que son extraordinariamente raras en cáncer de vejiga (66).

En un estudio clásico realizado en una serie de 242 pacientes con carcinoma avanzado de vejiga tratados con cirugía radical, con seguimiento prolongado, la ausencia de expresión del p21 se asoció a una mayor probabilidad de recidiva y una supervivencia reducida (67). Además, la positividad de p21 en los tumores con alteración de p53 parecía poseer un efecto protector frente al papel adverso de p53. El mismo efecto se

observó en una serie de tumores superficiales (68), aunque otras series similares no han conseguido confirmar este efecto (69). La evaluación combinada de la expresión de p21, junto a la de p53 y Mdm2, podría aportar más información pronóstica en los tumores superficiales (70).

-pRB: El gen supresor RB (gen del retinoblastoma), que se localiza en el cromosoma 13p, codifica una fosfoproteína (pRB) que en su forma activa está infrafosforilada y se une a varias proteínas celulares. Esta forma infrafosforilada es la predominante en G1, ejerciendo un efecto supresor sobre el crecimiento. pRB se vuelve fosforilada en el inicio de la fase G2 y permanece así en las fases G2 y M. pRB interactúa con múltiples proteínas reguladoras del ciclo celular, y se considera que regula la proliferación celular restringiendo la progresión del ciclo celular en la transición de G1/S, al unirse al factor de transcripción E2F. Constituye una vía primordial en el control del ciclo celular, al igual que la de p53. Su papel en la progresión del cáncer de vejiga parece ser de gran importancia, y se ha postulado incluso como una posible vía alternativa a la de p53 en progresión la tumoral (71).

En cáncer de vejiga, la pérdida de expresión de pRB detectada por inmunohistoquímica se correlacionó con la pérdida de heterocigosidad del gen RB (71). En los primeros estudios clínicos, la pérdida de expresión de pRB se asoció a alto grado y estadio avanzado (72). En dos estudios posteriores, la pérdida de pRB se correlacionó con progresión en cáncer de vejiga avanzado (73) y en uno de ellos también con una supervivencia inferior (74). Un estudio reciente realizado en una serie de 185 pacientes con cáncer avanzado de vejiga tratados mediante cistectomía radical, mostró que tanto la pérdida de expresión como la sobreexpresión de pRB se asociaban a peor pronóstico (75). Ello se ha atribuido a que la proteína sobreexpresada probablemente sea una forma predominantemente hiperfosforilada, que produciría liberación de E2F y conduciría a la transcripción de efectores que permitieran superar de este modo la

transición de G1/S. En pacientes tratados con radioterapia preoperatoria y cirugía, la pérdida de pRB, paradójicamente, se asoció a una mejor respuesta al tratamiento y también a mejor supervivencia (76), sugiriendo que la pérdida de pRB se asociaría a un incremento en la radiosensibilidad.

Dos estudios recientes sugieren la utilidad de la evaluación combinada de pRB y p53 como marcador pronóstico en cáncer de vejiga (77,78). Cuando ambos marcadores eran normales, la tasa de recurrencia era menor, mientras que cuando coexistían alteraciones en ambos, ésta era significativamente superior. Los pacientes con alteración de una sola de dichas proteínas, poseían tasas de recidiva intermedias. Estos resultados sugieren que las alteraciones en ambas vías actúan de forma cooperativa o sinérgica para promover la progresión del cáncer vesical, y que la información aportada por la combinación de ambos marcadores puede mejorar la estratificación pronóstica.

-Mdm2: la proteína Mdm2 es producto de un proto-oncogen, y es capaz de inhibir la función de p53 (33,46). Además, su expresión está interrelacionada con la de p53. Se encuentra sobreexpresada con frecuencia en cáncer de vejiga (79,80). No obstante, su potencial efecto pronóstico no ha sido bien establecido. Algunos datos, sin embargo, apuntan a que la evaluación de la expresión de Mdm2 conjuntamente con la de p53, podría aportar mayor información pronóstica que la de éste último marcador aislado (81).

-p27, ciclina E y ciclina D1: Recientemente ha sido explorado en el cáncer vesical el efecto pronóstico de la expresión de p27, una proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas en la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. La pérdida de expresión de p27 se asoció a peor pronóstico en pacientes con tumor infiltrante (82) y en aquellos con tumor superficial (83). También se ha evaluado la expresión de p27 conjuntamente con la de ciclina E. Algunos estudios indicaron que la pérdida de expresión de ambos marcadores comportaba una peor evolución clínica (84).

Sin embargo, un estudio extenso que incluyó 1842 pacientes con tumores superficiales e infiltrantes, evaluados mediante micromatrices de tejido, mostró que la pérdida de expresión de ciclina E perdía su efecto pronóstico en el análisis multivariado al incluir el estadio clínico (85).

La expresión disminuida de ciclina D1 se ha asociado también a recidiva en tumores superficiales, especialmente al ser valorada conjuntamente con p27 y ki67 (86). Otro estudio mostró que la pérdida de expresión de ciclina D1 se asociaba a peor supervivencia en tumores infiltrantes (87).

-p16^{INK4A/CDKN2}, p15^{INK4B/MTS2} y p14^{ARF}: Productos proteicos de tres genes localizados en la región 9p21, que con frecuencia se encuentra alterada precozmente en cáncer de vejiga (88). p16 y p15 son quinasas dependientes de las ciclinas, con efecto regulatorio sobre el ciclo celular. La pérdida de expresión de p16, un inhibidor de la fosforilación de pRB, parece poseer un efecto adverso sobre la evolución clínica y la recurrencia (89). La presencia de alteraciones en p16 y p15 es frecuente en cáncer de vejiga, y se asocia a bajo grado y estadio (90). p14 relaciona las vías de p16/pRB y p53, ya que el gen p14 ARF comparte una porción de la unidad de transcripción p16 y codifica una proteína que interacciona con Mdm2, aumentando la disponibilidad de p53.

1.4.2.b Moléculas de adhesión celular:

La separación de las células tumorales de la lesión primaria, se considera un paso principal en el proceso de invasión neoplásica de los tejidos vecinos y en la capacidad para desarrollar metástasis. Existen una serie de moléculas encargadas de mantener la interacción célula-célula, y también la de la célula con la matriz extracelular, que son denominadas moléculas de adhesión. La presencia de alteraciones en ellas podría favorecer la invasión tumoral. Se han descrito más de 50 moléculas de adhesión diferentes, que se engloban en cuatro grandes familias: caderinas, integrinas, selectinas y

moléculas de adhesión celular similares a inmunoglobulinas. Las moléculas de adhesión han sido implicadas en varias funciones celulares importantes, entre las que destacan la transducción de señales, la comunicación y el reconocimiento intercelular, la embriogénesis, la respuesta inflamatoria e inmune y la apoptosis (91).

-Complejo caderina-catenina: La familia de las caderinas, proteínas transmembrana dependientes del calcio, que median el contacto célula-célula y poseen además un papel esencial en el desarrollo tisular (92), constituye uno de los grupo de moléculas de adhesión mejor estudiados. Los genes que las codifican se consideran genes supresores de tumores, y los defectos en su expresión o función se han relacionado con progresión tumoral (93). **E-caderina** es el prototipo de las caderinas clásicas, que actúa como un importante supresor de la invasión y las metástasis en las células tumorales epiteliales (94). E-caderina posee una relación crítica con un grupo de proteínas intracelulares denominadas cateninas, las cuales se ligan al citoesqueleto de actina y median en los mecanismos de transducción de señales que regulan el crecimiento celular y la diferenciación (95). Se conocen tres tipos diferentes: **Alfa-catenina**, **Beta-catenina** y **Gamma-catenina**, que forman complejos entre ellas y con las caderinas. La observación de que las células tumorales poseen una reducción de la adhesión celular, y que la expresión de E-caderina se pierde a menudo en los carcinomas, sugieren que el complejo caderina-catenina podría desempeñar un papel importante en el desarrollo y la progresión tumoral. La disrupción del complejo caderina-catenina ha sido descrita en una variedad de carcinomas y se ha correlacionado con frecuencia con características clínicas y patológicas adversas.

Varios procesos diferentes pueden afectar a la función del complejo caderina-catenina en las células cancerosas, como mutaciones con pérdida de función, y defectos en la expresión de E-caderina y ciertas cateninas. Beta-catenina puede estar desregulada como resultado de mutaciones que inactivarían las proteínas de los genes APC y AXIN

(96), y también de mutaciones con ganancia de función a nivel del gen de beta-catenina. Además, Beta-catenina puede formar un complejo con el factor de transcripción LEF-1, que podría resultar en la activación de varios genes implicados en la proliferación celular (97), lo que sugiere que esta molécula podría poseer un papel importante en la progresión tumoral. Asimismo, la expresión alterada de Beta-catenina puede desensamblar la unión celular (93).

Las consecuencias de la existencia de alteraciones en el complejo caderina-catenina en las células cancerosas pueden ser de tres tipos: la pérdida de la función de adhesión, generalmente atribuida a inactivación de E-caderina o Alfa-catenina; la formación de complejos caderina-catenina aberrantes por expresión inadecuada de caderinas no epiteliales en lugar de E-caderina en tumores epiteliales o “*cadherin switching*” (98); y la alteración del sistema de señales y la transcripción, resultante de la desregulación de Beta-catenina (98). Este último aspecto que relaciona proteínas del complejo caderina-catenina con el sistema de señales es un área aún poco conocida que podría ser de gran importancia en el desarrollo tumoral (99).

Los primeros estudios realizados en líneas celulares de carcinoma urotelial de vejiga mostraron una asociación entre la pérdida de expresión de E-caderina y una reducción en la diferenciación celular con aumento de la invasividad de las células tumorales, mientras que la transfección de esas células con ADN complementario suprimía esa invasividad (100). En estudios realizados en muestras patológicas procedentes de tumores uroteliales humanos, la pérdida de expresión de E-caderina detectada por inmunohistoquímica se correlacionó con una mayor agresividad tumoral y, en algunos estudios, también con progresión y peor supervivencia (101-108). Sin embargo, este efecto no se manifestó como independiente de los factores pronósticos clinicopatológicos clásicos (101,103).

La pérdida de inmunoreactividad de membrana de Alfa-catenina, Beta-catenina y Gamma-catenina en cáncer de vejiga ha sido menos explorada. En un estudio la pérdida

de inmunoreactividad de Beta-catenina, Alfa-catenina y E-caderina se asociaron a peor pronóstico (109). Los resultados de otros dos estudios sugieren que la expresión de Alfa-catenina (110) y Gamma-catenina (111) podrían estar correlacionadas con el pronóstico.

Un aspecto diferente, que ha despertado gran interés en los últimos años, es la detección de niveles aumentados de E-caderina soluble en la orina (112) y el suero (113) de pacientes con carcinoma urotelial. Niveles séricos elevados de E-cadherina soluble se asociaron a un riesgo mayor de recidiva (113).

-CD44: es una glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión a la matriz extracelular de las células y la migración celular, que puede encontrarse tanto en las células epiteliales como en las mesenquimales. En la actualidad, se reconoce que juega también un papel significativo en los procesos de transducción de señales (114). La molécula CD44 estándar está codificada por 10 exones, y un procesamiento alternativo del RNA (alternative splicing) puede conducir a la expresión de variantes de CD44. Las variantes de ARNm contienen secuencias de uno o más exones adicionales (v1-10) (115).

La expresión de ciertas variantes de procesamiento, en particular CD44v4-7, se ha implicado en la diseminación metastásica de células tumorales (116). Por este motivo, en los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados a dilucidar el papel pronóstico potencial de la expresión de CD44 y sus variantes. Aunque sus resultados han sido con frecuencia controvertidos, existe una evidencia considerable de que en muchos tumores humanos se expresan variantes de CD44 de forma aberrante. En el carcinoma colorectal la expresión de variantes se asoció a peor pronóstico (117), mientras que la ausencia de expresión de CD44 y sus variantes se asoció a mal pronóstico en carcinoma de próstata y neuroblastoma. En muchas neoplasias, la expresión alterada de CD44 no es el resultado de mutaciones en CD44, sino que puede estar en relación con otras alteraciones genéticas implicadas en la carcinogénesis. Así, el

procesamiento alternativo se encuentra bajo control de señales mitogénicas que incluyen la cascada Ras-MAP kinasa (114).

Aunque ha sido claramente descrita la existencia de alteraciones en la expresión de CD44 en cáncer de vejiga en varios estudios, en la mayoría de ellos no se ha puesto de manifiesto un claro efecto pronóstico (118-120). Un estudio, sin embargo, ha sugerido que la expresión de la variante CD44v6 podría asociarse a mejor evolución tanto en tumores superficiales como infiltrantes (121).

1.4.2.c Otros marcadores moleculares:

- **Antígenos de proliferación nuclear:** Ki-67 y PCNA son dos marcadores inmunohistoquímicos de proliferación celular. Su expresión aumentada indica un nivel elevado de actividad proliferativa en las células tumorales, lo que podría asociarse a una agresividad biológica superior. **Ki-67** es un antígeno que se expresa en el núcleo de las células proliferantes. Su expresión aumentada se ha asociado a una mayor agresividad tumoral en cáncer de vejiga (122,123), y también a un riesgo aumentado de recidiva en tumores superficiales, que es independiente de otros factores pronósticos (124-126). **PCNA** es un antígeno implicado en la replicación del DNA, que se ha correlacionado también en algunas series con mayor probabilidad de recidiva en tumores superficiales (122,127).

- **Oncogenes:** c-erb-B1 y c-erb-B2 codifican proteínas transmembrana implicadas en la transmisión de señales al interior de la célula, como respuesta a determinadas señales externas. El **Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)** es el producto del oncogen **c-erb-B1**. Su sobreexpresión es frecuente en cáncer de vejiga, y se ha asociado de forma independiente a pronóstico adverso en pacientes con tumores superficiales (128,129). Este efecto parece no ser tan manifiesto en los pacientes con tumores infiltrantes (130).

El producto del oncogen **c-erb-B2 (Her-2/neu)** se encuentra sobreexpresado con frecuencia en el cáncer de vejiga. Algunos estudios han descrito una correlación entre su sobreexpresión y peor pronóstico (131-133), si bien, en otros, la determinación de su expresión no aportó información pronóstica adicional sobre los factores clásicos (134). Estas discordancias podrían ser debidas en parte a diferencias en las metodologías y criterios de evaluación utilizados. La presencia de alteraciones en estas moléculas podría poseer también interés terapéutico, dada la disponibilidad actual de tratamientos que bloquean estos receptores.

cH-ras es un oncogen que ha sido implicado en el desarrollo y progresión del cáncer de vejiga. Se han descrito alteraciones en el codón 12 y el 61 del gen H-ras hasta en un 20% de los tumores vesicales (135,136). La sobreexpresión de **c-myc** es también frecuente en cáncer de vejiga, correlacionándose inicialmente con alto grado (137). Sin embargo, en una serie amplia de pacientes no se apreció que poseyera efecto pronóstico independiente (138).

- **Marcadores de apoptosis:** La apoptosis se encuentra regulada, en parte, por una familia de proteínas que incluye los sistemas pro y antiapoptótico bcl-2 y bax. La expresión de **bcl-2** no tuvo correlación con el pronóstico (139). La expresión de las proteínas proapoptóticas **bax** y **CD40L** se asoció mayor supervivencia en una serie reciente (140).

La expresión de **survivina**, un inhibidor de apoptosis, se asoció a mayor riesgo de recurrencia en una serie de pacientes con cáncer de vejiga (141). Por otro lado, alteraciones en el gen **Fas**, implicado también en la regulación de la apoptosis, parecen ser frecuentes en cáncer de vejiga (142).

- **Angiogénesis e inhibidores de la angiogénesis:** El cáncer de vejiga, como otros tumores sólidos, depende de forma directa de la angiogénesis para su progresión y

metastatzación. En pacientes con carcinoma infiltrante de vejiga, se ha demostrado una fuerte asociación entre la **densidad de los microvasos** y la presencia de metástasis ganglionares (143), y también con la supervivencia global, de forma independiente al grado histológico, estadio y afectación ganglionar (144).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (**VEGF**) es probablemente el factor angiogénico más potente y específico conocido, y su expresión se encuentra en relación con la densidad de los microvasos en varios tumores. En el carcinoma de vejiga, se ha observado una expresión superior de ARNm en los tumores superficiales que en los infiltrantes (145), que no se evidenció en un estudio inmunohistoquímico (146). La expresión de ARNm de VEGF poseyó valor pronóstico sobre la recurrencia y la progresión en los tumores T1 (147).

La **tromboespondina-1** es un inhibidor de la angiogénesis que ha sido evaluado en una serie extensa de pacientes con tumor infiltrante. La expresión reducida de tromboespondina-1 se asoció de forma significativa e independiente a un aumento en la densidad de los microvasos y a sobreexpresión de p53, así como a peor supervivencia (148).

El factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de las plaquetas (**PDECGF**) posee un efecto angiogénico intenso, y aunque los datos en carcinoma de vejiga son limitados, se ha descrito una correlación de su expresión determinada mediante inmunoensayo enzimático, con el grado histológico y el estadio (149). El factor de crecimiento básico de fibroblastos (**bFGF**) fue la primera proteína que se identificó con función angiogénica. En un estudio en carcinoma de vejiga se observó una expresión más elevada de bFGF en tejido vesical normal y en tumores infiltrantes que en tumores superficiales (150).

1.4.2.d Predictores de quimiosensibilidad y respuesta al tratamiento: De especial interés, dado que podrían ser útiles en la selección de las diferentes alternativas

terapéuticas. Un ejemplo claro es la administración de quimioterapia neoadyuvante como alternativa a la cistectomía, o también la administración de quimioterapia adyuvante tras la cirugía en los pacientes con elevado riesgo de recidiva.

Existen numerosos datos procedentes de estudios experimentales que indican, de una forma consistente, que las proteínas **p53**, **p21** y **pRB** pueden influir en la respuesta a la quimioterapia y radioterapia de las células tumorales (151,152). Las líneas celulares tumorales portadoras de alteraciones en p53 presentaron una inhibición inferior en su crecimiento tras la exposición a diversos agentes antitumorales, que las que las que poseían p53 normal (153). Varios estudios señalan que p53 desempeñaría un papel decisivo en la respuesta celular al daño del ADN, que derivaría en detención del ciclo celular y apoptosis (154-156). De hecho, el mecanismo antitumoral de muchos agentes quimioterápicos que producen daño en el ADN, como por ejemplo cisplatino y otros agentes alquilantes, es la inducción de la apoptosis (151, 157-160). De este modo, podría decirse que la eficacia en la activación de la apoptosis podría ser determinante en la quimiosensibilidad de un determinado tumor.

En un estudio, la sobreexpresión de p53 fue predictiva de forma independiente de peor supervivencia en los pacientes con carcinoma infiltrante de vejiga tratados con quimioterapia (58). Sin embargo, en otro estudio la quimioterapia adyuvante benefició únicamente a los pacientes con p53 alterada (60). Estas aparentes divergencias en los resultados podrían deberse, en parte, al papel que pueden jugar algunas otras moléculas implicadas en la vía de p53, que en estos estudios no han sido evaluadas, como podrían ser p21 o mdm2 (161). También podrían deberse a limitaciones de las series clínicas analizadas, del diseño del estudio, así como a diferencias en los procesos técnico inmunohistoquímico y en la evaluación de las tinciones (50).

Algunos estudios experimentales han mostrado que la presencia de p21 puede asociarse a resistencia celular a la quimioterapia con agentes alquilantes, al proteger a las células de la entrada en apoptosis como consecuencia del daño en el ADN producido

por las drogas, provocando la detención del ciclo celular en G1, y permitiendo la reparación del daño del ADN (152,161-168). También existe evidencia experimental que

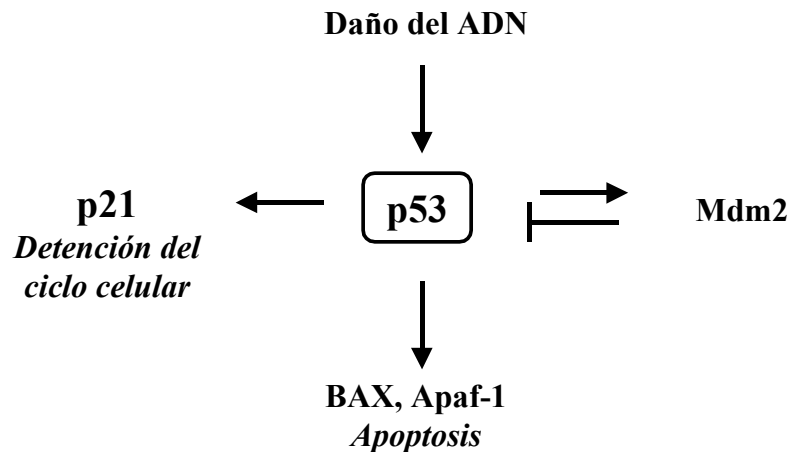


FIG 5. Esquema de la vía de p53 en respuesta al daño del ADN

indica que pRB puede poseer una influencia importante en la respuesta celular a la quimioterapia (169-171).

Por último, la expresión de **p-glicoproteína** ha sido también estudiada en cáncer de vejiga. Su expresión pretratamiento no se correlacionó con la respuesta a quimioterapia (172,173). Un estudio, sin embargo, mostró que la expresión de p-glicoproteína en las biopsias postratamiento, sufría un incremento significativo tras la exposición a quimioterapia tipo MVAC (174). La sobreexpresión de metalotioneína, implicada en la resistencia a cisplatino, se correlacionó con resistencia a la quimioterapia y peor supervivencia en el subgrupo de pacientes con enfermedad metastásica tratados con quimioterapia (173).

Recientemente, un estudio realizado por nuestro grupo ha evaluado la expresión de varias proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples drogas (MDR), en cáncer infiltrante de vejiga tratado con quimioterapia neoadyuvante. Se analizó la expresión de **p-glicoproteína, MRP1, BCRP y LRP**. El estudio mostró que la expresión de LRP se asociaba a una pobre respuesta a la quimioterapia y una probabilidad reducida de conservación vesical (175).

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El cáncer de vejiga es un tumor frecuente en nuestro medio, que causa una mortalidad elevada. En Catalunya, se ha estimado que representa entre un 9.9 y un 11.7% del total de tumores malignos, y comporta un 5.2% de la mortalidad por cáncer en el varón (176). Su evolución es, sin embargo, muy variable. Las opciones terapéuticas disponibles son también muy amplias, como corresponde a una enfermedad tan heterogénea. Los factores pronósticos clinicopatológicos clásicos, principalmente grado y estadio, poseen un valor pronóstico muy limitado a la hora de estratificar a los pacientes con fines terapéuticos.

En los últimos años, se han identificado varios genes potencialmente implicados en la carcinogénesis y la progresión del cáncer de vejiga. Este hecho ha permitido reconocer algunas moléculas cuya expresión podría proporcionar información sobre el potencial biológico de un determinado tumor y, en consecuencia, podrían ser útiles como marcadores pronósticos.

La realización de estudios aplicados, enfocados a evaluar el potencial efecto pronóstico de alteraciones moleculares relevantes en la progresión del cáncer vesical, puede permitir la identificación de factores pronósticos independientes basados en las características biológicas del tumor. Los resultados de estos estudios poseerán una mayor fiabilidad si se basan en series amplias de casos clínicos, homogéneamente tratados, y que dispongan de un seguimiento adecuado.

Los estudios que constituyen esta tesis exploran el efecto pronóstico de proteínas pertenecientes a dos grupos importantes de alteraciones moleculares presentes con frecuencia en el cáncer de vejiga, las proteínas implicadas en el control del ciclo celular, y las moléculas de adhesión celular. Los estudios se han realizado en series clínicas homogéneas de pacientes tratados en un mismo centro.

2.1 ESTUDIO 1º:

Valor pronóstico de la expresión de E-cadherina y Beta-catenina en cáncer de vejiga

La separación de las células tumorales del tumor primario constituye un hecho esencial en el proceso de invasión de los tejidos circundantes y el desarrollo de metástasis a distancia en las neoplasias malignas. E-cadherina y CD44 son moléculas de adhesión de superficie, que median la adhesión célula-célula y la adhesión a la matriz extracelular, respectivamente; y Beta-catenina es una proteína intracitoplasmática ligada a E-cadherina, implicada también en la transducción de señales. Las alteraciones en la expresión de estas moléculas se han descrito con frecuencia en cáncer de vejiga, y se ha sugerido que podrían contribuir de una forma significativa a su progresión. Por todo ello, la existencia de alteraciones en la expresión de estas moléculas de adhesión podría poseer implicaciones pronósticas.

Por tanto, los objetivos del primer estudio fueron:

- 1- Estudiar la incidencia de las alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión celular E-cadherina, Beta-catenina y CD44 en cáncer de vejiga.
- 2- Evaluar el valor pronóstico sobre la progresión de la enfermedad y la supervivencia, de la presencia de alteraciones en la expresión de estas moléculas de adhesión en el cáncer de vejiga.

Para ello, el primer estudio se realizó en una serie de pacientes con cáncer de vejiga que incluía tumores superficiales e infiltrantes, de diversos grados y estadios, para permitir detectar potenciales diferencias en la expresión de estas moléculas en los diferentes subgrupos de pacientes.

2.2 ESTUDIO 2º:

La expresión de p53 y p21 predicen la preservación vesical y la supervivencia en el carcinoma infiltrante de vejiga tratado con terapéutica multimodal

p53, p21 y pRB son proteínas implicadas en el control del ciclo celular, que parecen desempeñar un papel crítico en la carcinogénesis y la progresión de diversas neoplasias. En cáncer de vejiga, las alteraciones en su expresión son frecuentes y algunos estudios sugieren que podrían correlacionarse con el pronóstico de esta enfermedad, especialmente en el grupo de pacientes con carcinoma infiltrante. Adicionalmente, diversos datos experimentales indican que estas proteínas pueden influir en la respuesta y la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia.

El tratamiento multimodal con conservación vesical selectiva del cáncer del vejiga infiltrante, incluyendo quimioterapia neoadyuvante y posterior radioterapia o cirugía en función de la respuesta obtenida, constituye una alternativa a la cistectomía radical en pacientes seleccionados. La expresión de p53, p21 y pRB en las células tumorales antes del tratamiento, podría aportar información pronóstica sobre la evolución a largo plazo de los pacientes tratados de forma multimodal con intención conservadora del órgano. Ello podría permitir ofrecer un tratamiento menos mutilante a los pacientes con elevadas probabilidades de responder, y evitar la exposición a toxicidades innecesarias y el retraso en la cirugía en los pacientes con escasas probabilidades de conservar la vejiga.

Por tanto, los objetivos del segundo estudio fueron:

1- Estudiar el valor pronóstico de la expresión de p53, p21 y pRB sobre la supervivencia, en los pacientes con cáncer de infiltrante de vejiga tratados con terapéutica multimodal con conservación vesical selectiva.

2- Estudiar el valor pronóstico de la expresión de p53, p21 y pRB sobre la conservación vesical a largo plazo en dichos pacientes.

Para ello, el segundo estudio incluyó una serie homogénea de pacientes con carcinoma infiltrante de vejiga localizado, con seguimiento prolongado, que habían sido tratados con intención conservadora de la vejiga mediante una terapéutica multimodal que incluía quimioterapia neoadyuvante.

ARTICULOS PUBLICADOS



Prognostic value of the expression of E-cadherin and β -catenin in bladder cancer

X. Garcia del Muro^{a,*}, A. Torregrosa^b, J. Muñoz^c, X. Castellsagué^d, E. Condom^e,
F. Vigués^c, A. Arance^a, A. Fabra^b, J.R. Germà^a

^aDepartment of Medical Oncology, Institut Català d'Oncologia, Avda Gran Via Km 2.7, E-08907 L'Hosp. de Llobregat, Barcelona, Spain

^bInstitut de Recerca Oncològica, Barcelona, Spain

^cDepartment of Urology, Ciutat Sanitària de Bellvitge, Barcelona, Spain

^dDepartment of Epidemiology, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain

^eDepartment of Pathology, Ciutat Sanitària de Bellvitge, Barcelona, Spain

Received 28 May 1999; received in revised form 18 August 1999; accepted 8 October 1999

Abstract

The purpose of this study was to assess the prognostic effect of the expression of E-cadherin, β -catenin and CD44 adhesion molecules in bladder carcinoma. 22 superficial and 18 invasive bladder tumour samples were studied by immunohistochemistry. The median follow-up was 24 months (range: 1–50 months). Loss of E-cadherin and β -catenin immunoreactivity was found in 14 (35%) and 17 (43%) tumours, respectively, and was significantly associated with invasiveness, high grade and p53 overexpression. There was no correlation between CD44 variant expression and clinicopathological findings. Loss of E-cadherin expression was an independent predictor of poor survival in a multivariate analysis, when assessed with age, grade, stage and p53 status (hazards ratio adjusted (HRa) = 4.45 [95% confidence interval (CI), 1.06–18.63]). This effect was particularly augmented in patients with invasive bladder cancer. When expression of E-cadherin and β -catenin were evaluated simultaneously, loss of immunoreactivity of both proteins was a strong predictor of poor survival (HRa = 13.06 [95% CI, 0.95–178.55]). The same pattern was found when progression-free survival in relation to these variables was assessed. In conclusion, assessment of E-cadherin and β -catenin immunoreactivity may be a useful prognostic marker in bladder cancer complementary to established prognostic factors. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: E-cadherin; β -catenin; CD44; Cell adhesion molecules; Bladder cancer; Prognosis

1. Introduction

Transitional cell carcinoma of the bladder is a heterogeneous disease. Most patients present with superficial tumours, and after endoscopic resection, the majority of them will develop further superficial recurrent tumours. However, up to one-third of patients will progress to invasive tumours. Amongst the patients with invasive tumours, only half will develop metastatic disease in subsequent years, after treatment with cystectomy or multimodal therapy. Stage and grade are classical prognostic variables that allowed a certain degree of stratification of tumour biological potential, useful for clinical purposes [1]. However, a considerable

degree of heterogeneity still remains within the various prognostic subgroups, limiting the predictive value of these factors. The identification of new prognostic markers that allow improvements to be made in the biological assessment of bladder tumours could be of great clinical value [2].

Detachment of tumour cells from the primary lesion is considered a main step in the process of invasion of the surrounding tissues and metastases to distant organs [3]. Since E-cadherin and CD44 are cell surface adhesion molecules and β -catenin is an intracytoplasmic E-cadherin binding protein, loss of expression of these adhesion molecules may contribute to cancer progression. The present study was undertaken to investigate the alterations in the expression of E-cadherin, β -catenin, and CD44 in transitional cell carcinoma of the bladder, and their prognostic value.

* Corresponding author. Fax: +34-93-2607741.

E-mail address: garciadelmuro@csub.scs.es (X. Garcia del Muro).

2. Patients and methods

40 patients with primary transitional-cell carcinoma of the bladder were included in this study. Patients were treated from March 1992 through to April 1995. The median age was 69 (range: 57–81 years), with 33 men and 7 women. Frozen tissue samples of the tumours, paraffin-embedded tissue blocks and clinical follow-up data were available in all cases. Tissue samples were obtained by radical cystectomy in patients with invasive tumours and cystoscopic resections in patients with superficial tumours. None of the patients received pelvic irradiation or systemic chemotherapy before surgery. The histological grading was performed according to UICC criteria. Patients were grouped as low grade (I and IIa) or high grade (IIb and III). The pathological staging was done according to the TNM classification. The tumours were grouped as superficial tumours (Ta and T1) and invasive tumours (T2, T3 and T4). Among the 40 tumours, 16 were classified as low grade (2 grade I and 14 grade IIa) and 24 as high grade (2 grade IIb and 22 grade III). 22 were classified as superficial tumours (7 Ta and 15 T1) and 18 as invasive tumours (8 T2, 6 T3 and 4 T4). The median follow-up was 24 months (range: 1–50 months).

2.1. Immunohistochemical evaluation

Four-micron sections from archival paraffin-embedded tissue were placed on poly-L-lysine coated slides (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Cuts were dewaxed and rehydrated. Endogenous peroxidase inhibition was done by incubation in hydrogen peroxide (3% in methanol for 10 min) and rinsed in phosphate-buffered saline (PBS). For β -catenin, p53 and CD44 standard and v6 isoform detection, the microwave antigen retrieval method in sodium citrate (0.01 M, pH 6.0, for 10 min) was used. For E-cadherin detection, sections were pretreated with a solution of Pepsin Reagent (Biomed, Foster City, CA, USA, M77) for 30 min at room temperature. For CD44v3–10 isoform detection, sections were pretreated with Triton X-100 (Sigma, 0.1% in blocking dilution for 90 min). For blocking, tissues were incubated with 3% horse serum in 2% PBS-bovine serum albumin (BSA) (20 min) (Sigma). Incubations were performed in a humidified chamber at 4°C. Washes were done in PBS. A biotinylated goat-antimouse secondary antibody was used at a dilution of 1:5000. Visualisation of the reaction was performed with an avidin–biotin complex immunoperoxidase system (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) using diaminobenzidine (Sigma) as a chromogen and Mayer's haematoxylin as a counterstain. Finally, samples were dehydrated and mounted with xylene mountant DPX (BDH Lab, UK).

Antibodies used were the mouse monoclonal anti-E-cadherin (clone BTA-1) (RD Systems, Minneapolis,

MN, USA) and anti- β -catenin (clone 14) (Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA). CD44 expression was determined using the monoclonal antibody CD44s (SFF-2) that specifically recognises the standard form of CD44, monoclonal anti-CD44v6 (VFF-7) that reacts against an epitope of the human CD44 variant encoded by exon 6 and the polyclonal anti-CD44v3–10 that reacts against epitopes of the human variant transcribed by exons 3–10. p53 protein expression was determined using three different antibodies: anti-p53 DO-1, Pab1801 and anti-p53 MU-195. When p53 was positive for at least one antibody, it was defined as positive.

Evaluation of the staining was carried out by two investigators. CD44, E-cadherin and β -catenin membranous expression was evaluated in the major infiltrating zone of the tumour. Immunostaining for all the proteins showed a membrane pattern, except for the standard form of CD44, where staining was also found in the cytoplasm. The proportion of stained cells and the cellular localisation of immunostaining were used as criteria for the evaluation. Immunostaining was divided into three categories: positive homogeneous, when the pattern of immunoreactivity was membranous, similar to that of normal urothelial cells; positive focally, if tumours showed heterogeneous staining (20–80% positive tumour cells), and negative (less than 20% positive tumour cells or cytoplasmic or nuclear distribution). In the multivariate analysis, the categories 'positive homogeneous' and 'positive focally' were grouped as one.

2.2. Statistical methods

The probabilities of overall survival and progression-free survival were calculated using Kaplan–Meier estimates. Survival probability distributions were compared with the log-rank test (Mantel–Cox). Crude and adjusted hazard ratios were calculated using Cox's proportional hazards regression analysis. All Cox models appeared to appropriately fit the data. Statistical significance was established at the 0.05 α -value and accordingly 95% confidence intervals (CI) around hazard ratios are presented. All *P* values were derived from two-sided tests.

The association of E-cadherin and β -catenin immunoreactivity with grade, stage and p53 status was estimated by the chi-squared test.

3. Results

The expression of E-cadherin was positive homogeneous in 13 (33%) tumours, positive focally in 13 (33%) and negative in 14 (35%) (Fig. 1). Loss of membranous E-cadherin immunoreactivity was significantly associated with invasiveness ($P < 0.001$) and grade ($P < 0.001$) (Table 1). Positive homogeneous membrane

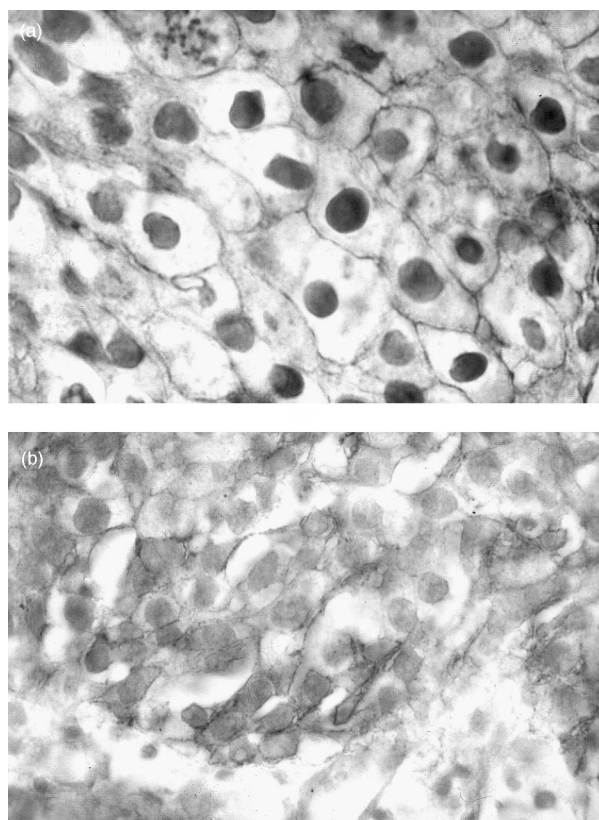


Fig. 1. Expression of E-cadherin and β -catenin in bladder cancer. (a) Grade II transitional-cell carcinoma showing positive membranous immunoreactivity for E-cadherin ($\times 600$). (b) Grade II transitional-cell carcinoma showing positive membranous immunoreactivity for β -catenin in the infiltrating front of the tumour ($\times 400$).

pattern for β -catenin was seen in 12 (30%) tumours. Eleven (28%) tumours were classified as positive focally and 17 (43%) were negative (Fig. 1). Loss of β -catenin immunoreactivity was statistically associated with grade ($P < 0.0001$) and invasiveness ($P = 0.001$) (Table 1). Normal urothelium was classified as positive homogeneous for E-cadherin and β -catenin in all studied patients. Nuclear accumulation of p53 was detected with at least one antibody in 15 (38%) tumours. The

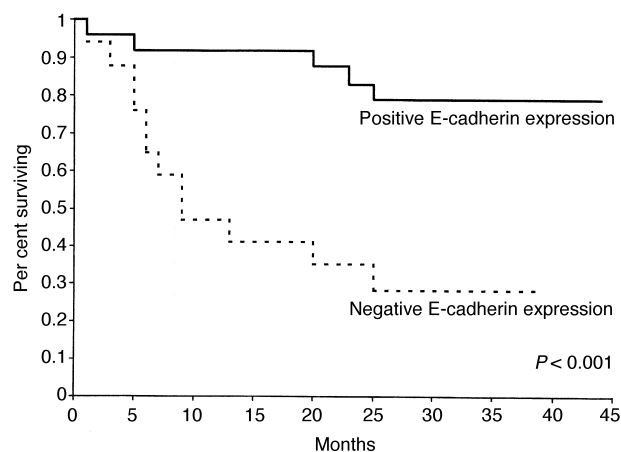


Fig. 2. Survival distribution in patients with bladder cancer according to E-cadherin expression status.

presence of nuclear p53 overexpression was significantly associated with E-cadherin and β -catenin immunoreactivity $P < 0.0001$ and $P = 0.002$, respectively (Table 1).

Standard CD44 was expressed on normal urothelium and by all but one transitional cell carcinoma. Variant forms of CD44 tested were positive in 33 (83%) and in 34 (85%) tumours for v6 and for v3–10, respectively. Variant forms were also seen in normal urothelium samples, especially when inflammatory changes were present. There was no association between CD44 variant expression and stage, grade, tumour progression and survival (data not shown).

Patients with loss of E-cadherin expression had a statistically significant decreased probability of overall survival ($P < 0.001$) (Fig. 2), as compared with patients with positive E-cadherin immunoreactivity. As shown in Table 2, in addition to E-cadherin status, tumour stage and grade were significantly associated with survival in the univariate analysis. In the multivariate analysis, E-cadherin expression was a significant independent predictor of survival, when simultaneously assessed with age, grade, stage and p53 status (Table 2). The subgroup of patients with invasive tumours was separately analysed in a multivariate analysis, and the prognostic

Table 1

Association of E-cadherin and β -catenin immunoreactivity with grade, stage and p53 status in 40 patients with bladder cancer

	E-cadherin		<i>P</i> value	β -catenin		<i>P</i> value
	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)		Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	
All patients	26 (65)	14 (35)		23 (58)	17 (43)	
Grade						
Low	16 (40)	0 (0)		15 (38)	1 (3)	
High	10 (25)	14 (35)	< 0.0001	8 (20)	16 (40)	< 0.0001
Stage						
Superficial	21 (53)	1 (3)		18 (45)	4 (10)	
Invasive	5 (13)	13 (33)	< 0.0001	5 (13)	13 (33)	= 0.001
p53						
Negative	22 (55)	3 (8)		19 (48)	6 (15)	
Positive	4 (10)	11 (28)	< 0.0001	4 (10)	11 (28)	= 0.002

Table 2
Risk of death of bladder cancer in relation to clinical, pathological and molecular characteristics

Characteristic	Patients (%)	No. of deaths	HRc (95% CI)	HRa (95% CI)
Age, years				
< 70	20 (50)	5	1	1
≥ 70	20 (50)	12	2.59 (0.91–7.41)	2.13 (0.70–6.47)
Stage				
Superficial	22 (55)	4	1	1
Invasive	18 (45)	13	6.35 (2.03–19.92)	2.84 (0.79–10.23)
Grade				
Low (I–IIa)	16 (40)	1	1	1
High (IIb–III)	24 (60)	16	12.79 (1.66–98.23)	7.51 (0.70–80.32)
p53				
Negative	25 (63)	7	1	1
Positive	15 (38)	10	2.16 (0.78–6.01)	0.70 (0.24–2.07)
E-cadherin				
Positive	26 (65)	5	1	1
Negative	14 (35)	12	6.62 (2.22–19.7)	4.45 (1.06–18.63)
β-catenin				
Positive	23 (58)	5	1	1
Negative	17 (43)	12	4.62 (1.61–13.26)	1.75 (0.55–5.64)
E-cadherin and β-catenin				
Both positive	19 (48)	2	1	1
Either positive	11 (28)	6	6.44 (1.30–31.91)	3.80 (0.52–28.02)
Both negative	10 (25)	9	16.92 (3.50–81.75)	13.06 (0.95–178.55)

HRc, crude hazards ratio adjusted by age only; HRa, hazard ratio adjusted for age, stage, grade and p53 status; CI, confidence interval. Based on Cox proportional hazards model in univariate and multivariable analysis. CI that does not include the value of 1.00 indicates a significant association with overall survival at the $P=0.05$ level (two-sided).

impact of E-cadherin on survival approached statistical significance in spite of a low number of patients (hazards ratio (HR) = 5.83 [95% CI, 1.03–32.81]). Loss of expression of β-catenin was also associated with poor survival ($P=0.016$) (Fig. 3). However, in a multivariate analysis, β-catenin failed to show a correlation with survival, when factors such as stage, grade and p53 were entered into the model (Table 2).

When the combined expression of both variables E-cadherin and β-catenin was assessed, patients were classified into three categories: loss of expression of

both variables, positivity of one of them with negativity of the other one and positivity of both variables. These categories were predictive of overall survival ($P < 0.001$) (Fig. 4). In a multivariate analysis, negative expression of both E-cadherin and β-catenin was a predictor of decreased survival of borderline statistical significance (Table 2), after adjusting for age, tumour grade, stage and p53 status.

When progression-free survival was evaluated, the same pattern was found. Loss of expression of E-cadherin was significantly associated with tumour progression in

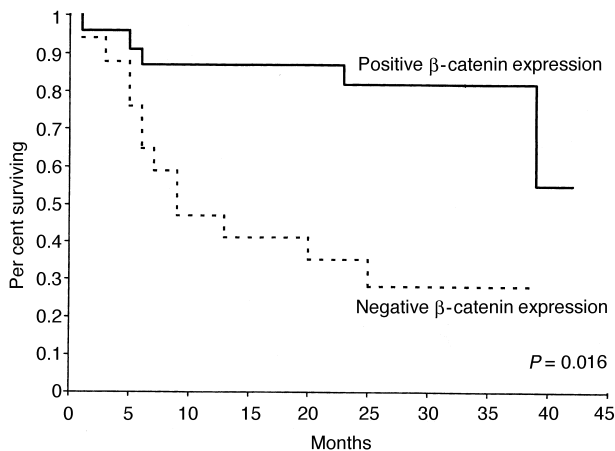


Fig. 3. Survival distribution in patients with bladder cancer according to β-catenin expression status.

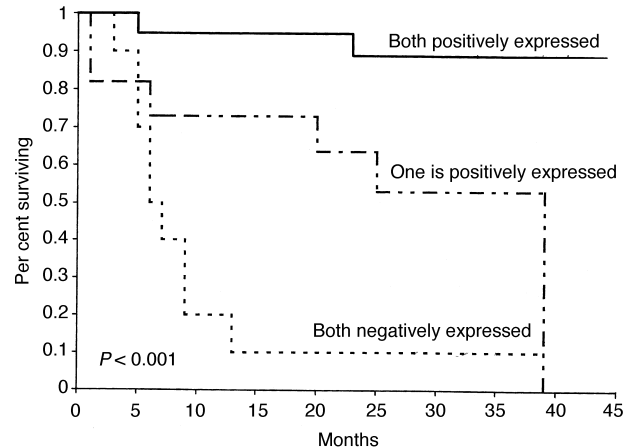


Fig. 4. Survival distribution in patients with bladder cancer according to E-cadherin and β-catenin expression status.

the univariate (HR = 10.21 [95% CI, 3.13–33.31]) and multivariate analyses (HR = 5.17 [95% CI, 1.13–23.53]). In contrast, β -catenin did not show any correlation with progression-free survival in the multivariate analysis (HR = 2.28 [95% CI, 0.64–8.06]). The association of loss of expression of both E-cadherin and β -catenin was also a marginally significant independent predictor of progression-free survival (HR = 8.04 [95% CI, 0.99–64.78]) in the multivariate analysis.

4. Discussion

E-cadherin is a calcium-dependent transmembrane glycoprotein mediating cell–cell adhesion in epithelial tissues. Tumour invasion of the surrounding tissues by cancerous cells and their metastatic spread requires their detachment from the primary lesion, which can be favoured by the reduction of membranous E-cadherin [4,5]. A decreased immunoreactivity of E-cadherin has been observed in a variety of carcinomas, usually associated with advanced stage and progression [6]. Several studies have examined the role of E-cadherin in transitional bladder carcinoma, showing a high incidence of alterations in its expression [7–12]. These studies have uniformly revealed clear associations of decreased E-cadherin expression, with high grade and advanced stage tumours. Decreased E-cadherin expression has also been correlated with poor survival [7] and recurrence [9]. These findings have been supported by additional studies in bladder [8,10,11,13,14] and upper urinary tract [15] transitional cell carcinomas.

Our study confirms these data, showing a significant prognostic impact of E-cadherin expression in patients with carcinoma of the bladder. Loss of E-cadherin expression was associated with high grade and invasive stage. Moreover, loss of E-cadherin expression was a significant prognostic indicator of decreased survival, independent of known prognostic factors such as grade, invasiveness and p53 status, and of reduced progression-free survival, in the multivariate analysis. These findings suggest that the expression of E-cadherin might be a useful prognostic marker for the clinical assessment of bladder cancer, independent of and, consequently, complementary to other established prognostic factors. This prognostic effect seems to be particularly accentuated in patients with invasive bladder cancer. In these patients, the detection of E-cadherin loss might be useful in selecting those patients who would benefit most from early aggressive therapy. Nevertheless, this should be interpreted cautiously and needs to be confirmed in large-scale studies.

β -catenin is an E-cadherin-associated protein that links the cytoplasmic tail of E-cadherin to the actin cytoskeleton of the cell, and is necessary for E-cadherin function [16]. In one study, decreased β -catenin immuno-

reactivity was associated with poor outcome in bladder cancer [17]. Two recent studies explored the prognostic value of alpha-, beta- and gamma-catenin expression in bladder cancer. Their results suggested that alpha-catenin [18] and gamma-catenin [19] expression correlated with prognosis. It must be taken into account that immunodetection of a given protein does not necessarily mean that is functional. The results of our study showed a significant association between loss of β -catenin expression and grade, stage, tumour progression and decreased survival. However, when a multivariate analysis was done, their prognostic effect appeared to be of limited value. Interestingly, when expression of β -catenin and E-cadherin was analysed, simultaneous loss of expression for the two proteins was a strong and marginally significant predictor for poor survival.

CD44 is a cell surface glycoprotein implicated in extracellular matrix adhesion and cellular migration. Primary transcripts of the CD44 gene can be alternatively spliced to produce a variety of messenger RNA species. Variant mRNA contain sequences from one or more additional exons (v1–10) [20]. Expression of CD44 variants has been associated with progression in colorectal cancer and other carcinomas [21]. Several studies have shown an altered expression pattern in transitional cell carcinoma, without a clear prognostic effect [22–24]. In our study, there was no association between variant CD44 expression and clinico-pathological variables or prognosis. Recent reports suggest that CD44v8–10 expression, detected by competitive reverse transcription–polymerase chain reaction analysis, may be useful in early diagnosis of bladder cancer [25].

In conclusion, the results of this study suggest that loss of E-cadherin, and to a lesser extent, loss of β -catenin, as determined by immunohistochemistry, are important prognostic markers in patients with bladder carcinoma. Furthermore, the combined assessment of both E-cadherin and β -catenin immunoreactivities appears to improve its prognostic value. These effects appear to be independent of other established prognostic factors used in clinical practice. Thus, assessment of E-cadherin and β -catenin expression may predict the potential behaviour of bladder tumours, and accordingly dictate appropriate therapeutic strategies. However, this retrospective study, with a limited number of cases, does not allow definite conclusions to be drawn, and the results should be cautiously interpreted. Large, prospective and well designed clinico-pathological studies to validate the prognostic value of E-cadherin and β -catenin immunoreactivity should be performed.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, 98/663) and Fundació La

Marató de TV3 (60/95). The authors thank M.A. Izquierdo, A. Coma and M. Diaz for their contributions to this study.

References

- Bane BL, Rao JY, Hemstreet GP. Pathology and staging of bladder cancer. *Semin Oncol* 1996, **23**, 546–570.
- Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 1998, **160**, 645–659.
- Cohen MB, Griebing TL, Ahaghotu CA, et al. Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. *Am J Clin Pathol* 1997, **107**, 56–63.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell–cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991, **113**, 173–176.
- Shiozaki H, Oka H, Inoue M, et al. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996, **77**, 1605–1613.
- Dorudi S, Sheffield JP, Poulosom R, et al. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and *in situ* hybridization study. *Am J Pathol* 1993, **142**, 981–986.
- Bringuiet PP, Umbas R, Schaafsma E, et al. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 1993, **53**, 3241–3245.
- Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, et al. E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumour stage and survival. *Int J Cancer* 1995, **64**, 367–370.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ. Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995, **121**, 303–308.
- Ross JS, Del Rosario AD, Figge HL, et al. E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1995, **26**, 940–944.
- Otto T, Bex A, Schmidt U, et al. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol* 1997, **150**, 1919–1923.
- Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, et al. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 1994, **54**, 3120–3123.
- Syrigos NK, Karayiannakis A, Syrigou EI, et al. Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *Eur J Cancer* 1998, **34**, 2037–2040.
- Imao T, Koshida K, Endo Y, et al. Dominant role of E-cadherin in the progression of bladder cancer. *J Urol* 1999, **161**, 692–696.
- Nakanishi K, Kawai T, Toritaka C, et al. E-cadherin expression in upper-urinary-tract carcinoma. *Int J Cancer* 1997, **74**, 446–449.
- Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, et al. Beta-catenin expression in human cancers. *Am J Pathol* 1996, **48**, 39–46.
- Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (α -, β - and γ -catenins and p120) in bladder tumors. *Cancer Res* 1996, **56**, 4154–4158.
- Mialhe A, Louis J, Montlevier S, et al. Expression of E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? *Invas Metastas* 1997, **17**, 124–137.
- Syrigos KN, Harrington K, Waxman J, et al. Altered gamma-catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *J Urol* 1998, **160**, 1889–1893.
- Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994, **54**, 4539–4546.
- Yamaguchi A, Urano T, Goi T, et al. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1996, **14**, 1122–1127.
- Hong RL, Pu YS, Hsieh TS, et al. Expressions of E-cadherin and exon v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell carcinoma. *J Urol* 1996, **153**, 2025–2028.
- Sugino T, Gorham H, Yoshida K, et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol* 1996, **149**, 873–882.
- Ross JS, Del Rosario AD, Bui HX, et al. Expression of the CD44 cell adhesion molecule in urinary bladder transitional cell carcinoma. *Mod Pathol* 1996, **9**, 854–860.
- Okamoto I, Morisaki T, Sasaki J, et al. Molecular detection of cancer cells by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of specific CD44 variant RNAs. *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**, 307–315.

p53 and p21 Expression Levels Predict Organ Preservation and Survival in Invasive Bladder Carcinoma Treated with a Combined-Modality Approach

Xavier Garcia del Muro, M.D.¹

Enric Condom, M.D., Ph.D.²

Francesc Vigués, M.D., Ph.D.³

Xavier Castellsagué, M.D., Ph.D.⁴

Agnès Figueras, B.S.⁵

Josep Muñoz, M.D.³

Judit Solà, B.S.⁴

Teresa Soler, M.D.²

Gabriel Capellà, M.D., Ph.D.⁵

Josep R. Germà, M.D., Ph.D.¹

¹ Department of Medical Oncology, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain.

² Department of Pathology, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

³ Department of Urology, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

⁴ Department of Epidemiology, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain.

⁵ Laboratory of Translational Research, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain.

Presented in part at the 38th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Orlando, FL, May 18–21, 2002.

Supported by Grant FIS 98/663 from the Fondo de Investigación Sanitaria.

The authors thank Salvador Villà, Ron Clapp, and Mercedes Martínez Villacampa for their contributions to the study.

Address for reprints: Xavier Garcia del Muro, M.D., Department of Medical Oncology, Institut Català d'Oncologia, Avenida Gran Via Km 2.7, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain; Fax: (011) 34 93 2607741; E-mail: garciadelmuro@csub.scs.es

Received September 29, 2003; revision received January 30, 2004; accepted February 9, 2004.

BACKGROUND. The purpose of the current study was to evaluate the expression levels of p53, p21 and pRB as predictors of for long-term organ preservation and survival in patients with bladder carcinoma who were treated with bladder-sparing intent using a combined-modality approach.

METHODS. Tumor samples from 82 consecutive patients with localized invasive bladder carcinoma treated on 3 different bladder-sparing studies were examined for p53, p21, and pRB expression by immunohistochemical methods. Treatment consisted of transurethral resection, platinum-based neoadjuvant chemotherapy, and, according to response, either radiotherapy or radical cystectomy. The median follow-up duration was 55 months.

RESULTS. Positive immunoreactivity for p53, p21, and pRB was observed in 47%, 52%, and 67% of patients, respectively. Positive p53 immunoreactivity and positive p21 immunoreactivity were independent predictors of decreased survival with bladder preservation ($P = 0.02$ and $P = 0.02$, respectively) and disease-free survival (DFS; $P = 0.005$ and $P = 0.009$, respectively) in a multivariate analysis adjusting for clinical stage, ureteral obstruction, and age. Regarding overall survival (OS), p53 overexpression was associated with poor outcome ($P = 0.03$), whereas the association of poor outcome with p21 expression did not reach statistical significance ($P = 0.07$). No association between pRB immunoreactivity and outcome was found. When the combined expression of p53 and p21 was assessed, the positive expression of both markers was a strong and unfavorable prognostic factor for survival with bladder preservation ($P = 0.006$), DFS ($P = 0.003$), and OS ($P = 0.02$).

CONCLUSIONS. Expression levels of p53 and p21, especially when simultaneously assessed, exhibit independent predictive value for long-term bladder preservation and survival in patients with bladder carcinoma treated with combined-modality therapy. These determinations could be useful in the selection of candidates for bladder-preserving treatment. *Cancer* 2004;100:1859–67.

© 2004 American Cancer Society.

KEYWORDS: bladder carcinoma, bladder preservation, p53, p21, pRB.

Radical cystectomy has long been considered the standard treatment for patients with muscle-invasive bladder carcinoma. Because of the morbidity and decreased quality of life associated with this procedure, organ-preserving alternatives to cystectomy have been explored. Several studies have shown that long-term bladder preservation can be achieved in a significant proportion of patients with the combination of transurethral resection of the bladder tumor (TUR), neoadjuvant chemotherapy, and radiotherapy.^{1–4} In these

studies, the survival rates observed were comparable to those expected with aggressive surgery.

Unfortunately, the available clinicopathologic prognostic features (primarily bladder-confined tumor stage and absence of ureteral obstruction) are of limited use as pretreatment predictors of success in a bladder-sparing approach.^{1,3} Identification of novel reliable predictors of treatment outcome would provide clinicians with a tool for offering bladder-sparing treatment to patients who had a high probability of long-term organ preservation. This would also result in avoidance of unnecessary chemotherapy and delay in cystectomy in patients for whom conservative treatment probably would not be successful.

In recent years, several genes and protein products involved in cell cycle regulation have been assessed for prognostic significance with respect to bladder carcinoma progression. Nuclear overexpression of the p53 tumor suppressor gene product as detected by immunohistochemistry was associated with poor outcome in patients with invasive bladder carcinoma treated with cystectomy.⁵ Lack of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} (p21) proved to be an independent prognostic marker for progression in patients treated with cystectomy.⁶ Similarly, altered expression of the tumor suppressor gene product pRB was a predictor of progression in patients with invasive bladder carcinoma.^{7,8}

The p53, p21, and pRB proteins also may influence tumor responsiveness to chemotherapy and radiotherapy.^{9,10} Tumor cells harboring p53 alterations exhibited less growth inhibition than did cells with wild-type p53 when treated with most anticancer agents that were evaluated.¹¹ In addition, there is substantial experimental evidence that increased expression of p21 may be associated with resistance to DNA alkylating agents and radiotherapy.^{12,13}

The purpose of the current study was to investigate the potential predictive and prognostic value of immunoreactivity toward three molecular markers (i.e., p53, p21, and pRB) for long-term bladder preservation and survival in patients with invasive bladder carcinoma treated with platinum-based neoadjuvant chemotherapy using a selective, combined-modality, bladder-sparing approach.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection

Eighty-two consecutive patients with invasive bladder carcinoma were retrospectively studied. These patients were treated with neoadjuvant chemotherapy according to one of three bladder-sparing protocols at the Institut Català d'Oncologia (Barcelona, Spain) and the Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona,

Spain) between November 1988 and July 1998. Entry criteria were similar in all three studies: histologically confirmed muscle-infiltrating urothelial carcinoma; clinical Stage T2–T4a disease; no clinical evidence of lymph node or distant metastases; absence of diffuse carcinoma in situ; Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 0–2; and adequate hematologic, cardiac, and hepatic function. Creatinine clearance was required to be ≥ 60 mL/min in the first and second studies and ≥ 40 mL/min in the third study. In the first study, all patients with bladder carcinoma who were treated at our institutions and who fulfilled these criteria were included (with their consent) in the protocol. In the second and third studies, all patients with T2 disease were included, whereas radical surgery was recommended for patients with more advanced tumors, according to various practices that were in use at the time of study. Either oral or written informed consent was obtained from all patients according to the standard recommendations of the institutional review board during the time of the study. Tumor tissue samples were obtained by TUR performed before chemotherapy. Histologic grading was performed according to the 1973 World Health Organization criteria, and tumors were staged according to the 1997 TNM classification. A single investigator (E.C.) confirmed histologic grading and staging for all tumors.

Treatment Schedule

The treatment schedule was similar in all three studies and consisted of initial TUR of the tumor followed by neoadjuvant chemotherapy. After chemotherapy, a urologic evaluation of response was performed. Response was defined as an absence of invasive malignancy as determined on postchemotherapy biopsy (\leq T1). Patients with response to chemotherapy received external-beam radiotherapy with high-energy photons. Patients received 46 Gy to the minor pelvis and 64–66 Gy to the bladder. Patients with postchemotherapy residual invasive tumor underwent radical cystectomy. Follow-up procedures in patients who experienced bladder preservation consisted of urinary cytology with alternating ultrasonography or abdominopelvic computed tomographic scanning every 3 months for 2 years and every 6 months thereafter. In addition, cystoscopy and biopsy of the tumor site were performed annually. Patients who developed an isolated bladder-invasive recurrence during follow-up underwent salvage cystectomy, whereas patients who developed superficial disease recurrence in the preserved bladder were managed with TUR and intravesical bacillus Calmette–Guerin.

All patients received platinum-based neoadjuvant

chemotherapy that included methotrexate and vinca alkaloids. The regimens used were slightly different for each study. In the first study, performed between November 1988 and March 1993, patients received four cycles of methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin. In the second study, performed between June 1994 and July 1998, patients received an accelerated regimen to increase the dose intensity of chemotherapy and reduce the duration of treatment to avoid delay in surgery for nonresponding patients. This regimen consisted of 6 cycles of 30 mg/m² methotrexate and 60 mg/m² cisplatin administered weekly and 2 mg vincristine administered biweekly. In the third study, performed between November 1994 and September 1996, patients with poor renal function received a carboplatin-containing regimen. The regimen consisted of 4 cycles of 30 mg/m² methotrexate on Days 1 and 8, 4 mg/m² vinblastine on Days 1 and 8, and carboplatin administered at an area under the concentration-time curve of 5 mg/mL × min on Day 1.

Immunohistochemistry

Three-micron-thick sections from paraffin-embedded tissue samples were placed on polylysine-coated slides. Deparaffination was accomplished with xylene, and tissue samples were rehydrated with 96% ethanol. Endogenous peroxidase activity was quenched with 3% hydrogen peroxide. To unmask the protein epitopes, slides were boiled for 2 minutes in a pressure cooker with sodium citrate buffer (8.2 mM tri-sodium citrate dihydrate and 1.98 mM citric acid, Ph 6.0). Tissue samples were then incubated for 1 hour at room temperature with the corresponding primary antibody dilution. The following monoclonal antibodies and final dilutions were used for the current study: anti-p53 clone PAB1801 (Ab-2; Oncogene Science, Boston, MA; diluted 1:500 with 1X phosphate-buffered saline [PBS] and 0.1% bovine serum albumin [BSA]); anti-p21 clone EA10 (Oncogene Science; 1:100 dilution); and anti-pRB clone G3-245 (PharMingen, San Diego, CA; diluted 1:250 with 1X PBS and 0.1% BSA). Immunostaining was performed using the Envision anti-mouse antibody (Dako, Copenhagen, Denmark), and the reaction was developed using the DAB-Plus kit (Dako). Slides were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated, and mounted with DPX (dibutyl phthalate).

Positive tissue samples were used as controls for p53 and p21 staining. For the pRB technique, endothelial nuclear staining was used as an internal control. Results were assessed according to the percentage of tumor cells that showed nuclear staining. For p53 and p21, immunostaining was positive when > 20% of tumor cells were stained and negative when

≤ 20% of tumor cells were stained. p21 expression levels were also grouped into 3 categories: negative, 0–20% positive cells; moderately positive, 20+–60% positive cells; and highly positive, > 60% positive cells. pRB immunostaining was positive when > 10% of tumor cells were stained and negative when ≤ 10% of tumor cells were stained. Slides were evaluated independently by two pathologists (E.C. and T.S.). Discordant results were discussed by the two pathologists until a consensus was reached. Due to the limited amount of tissue obtained by TUR, one patient and five patients were considered unevaluable for p53 and p21 staining, respectively.

Statistical Methods

The outcomes selected for study were disease-free survival (DFS), defined as the time from the start of chemotherapy to the date of recurrence of muscle-invasive bladder carcinoma or metastases; overall survival (OS), defined as the time from the start of chemotherapy to the date of death due to any cause; and survival with bladder preserved free of tumor. Due to our interest in assessing long-term bladder preservation, we defined survival with bladder preservation as the time from the start of chemotherapy to either the date of cystectomy or the date of recurrence of muscle-invasive bladder carcinoma or metastasis. The correlation of immunoreactivity results with clinicopathologic variables and response to chemotherapy was assessed using the chi-square test. The probabilities of OS, DFS, and survival with bladder preserved were calculated using Kaplan–Meier estimates. Survival probability distributions were compared using the log-rank test (Mantel–Cox). Crude and adjusted hazard ratios (HRa) were calculated using Cox proportional hazards regression analysis. All Cox models appropriately fit the data. Statistical significance was established at $\alpha = 0.05$. Accordingly, 95% confidence intervals (CIs) around hazard ratios are presented. All *P* values were derived from two-sided tests.

RESULTS

Patient Characteristics

The median duration of follow-up in surviving patients was 55 months. The clinical characteristics of the 82 patients included in the study are shown in Table 1. The median patient age was 61 years (range, 30–74 years). Seventy-nine patients were male, and three were female. Performance status was 0 or 1 in 91% of patients. The response rate after TUR and neoadjuvant chemotherapy was 69.5%. There were no significant differences in response and survival when results were stratified by chemotherapy regimen used. The estimated 5-year DFS and OS rates were 54% and

TABLE 1
Patient Characteristics in Association with Outcome

Characteristic	No. of patients (%)	No. of tumor recurrences	<i>P</i> ^a	No. of deaths	<i>P</i> ^a	No. of cystectomies + tumor recurrences	<i>P</i> ^a
Age (yrs)							
< 62	37 (45)	18		21		24	
≥ 62	45 (55)	15	NS	21	NS	23	NS
Clinical stage							
Bladder-confined disease (T2)	71 (87)	29		35		38	
Extravesical disease (T3–4a)	11 (13)	4	NS	7	NS	9	0.01
Grade (WHO)							
2	12 (15)	2		4		5	
3	70 (85)	31	NS	38	NS	42	NS
Ureteral obstruction							
No	56 (68)	17		25		27	
Yes	26 (32)	16	0.02	17	NS	20	0.03
Chemotherapy regimen							
MVAC	41 (50)	19		23		25	
Weekly CMV	32 (39)	12		18		19	
Carboplatin, methotrexate, vinblastine	9 (11)	2	NS	1	NS	3	NS
Response to chemotherapy							
Yes (≤ T1)	57 (69.5)	17		20		23	
No	25 (30.5)	16	< 0.0001	22	< 0.0001	24	< 0.0001
p53 expression							
Negative	43 (53)	12		17		20	
Positive	38 (47)	21	0.01	25	0.07	27	0.07
p21 expression							
Negative	37 (48)	11		16		18	
Positive	40 (52)	20	0.06	22	NS	25	NS
pRB expression							
Negative	27 (33)	14		16		18	
Positive	55 (67)	19	NS	26	NS	29	NS

WHO: World Health Organization/; MVAC: methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin; CMV: cisplatin/methotrexate/vinblastine; NS: not significant.

^a Log-rank test.

47.5%, respectively. The 5-year survival rate with bladder preserved was 40%. Of the 40 currently surviving patients, 31 (77.5%) have preserved, intact, functional bladders.

Association of p53, p21, and pRB Expression with Clinical Prognostic Features

Nuclear overexpression of p53 was observed in 38 of 81 (47%) tumor samples. p21-positive immunoreactivity was observed in 40 of 77 (52%) tumor samples. Loss of pRB expression was found in 27 of 82 (33%) tumor samples. Overexpression of p53 was associated with loss of expression of pRB ($P = 0.04$). No association between p53 and p21 immunostaining was observed.

High histologic grade was associated with p53 overexpression ($P = 0.007$) and pRB loss of expression ($P = 0.009$). No other association was observed between p53, p21, and pRB expression and the clinical prognostic variables (i.e., clinical stage and presence of ureteral obstruction). When expression of p21 was stratified into three groups, no association with stage

was evident. No association was found between the expression of any of these biologic markers and response to chemotherapy.

Association of p53, p21, and pRB Expression with Disease Recurrence and Overall Survival

Figure 1A shows the survival distributions analyzed according to p53 status. Patients with p53 overexpression had a significantly decreased probability of DFS compared with patients with p53-negative immunostaining (univariate $P = 0.01$). A difference in OS between groups also was observed, but it did not reach statistical significance (univariate $P = 0.07$). A multivariate analysis was performed simultaneously to assess p53 status, age, known clinical prognostic factors, tumor stage (bladder-confined vs. extravesical disease), ureteral obstruction, and p21 expression. Response to neoadjuvant chemotherapy was not included in the model, because it is not a pretreatment predictive factor but rather a consequence of treatment. Seventy-seven patients had complete informa-

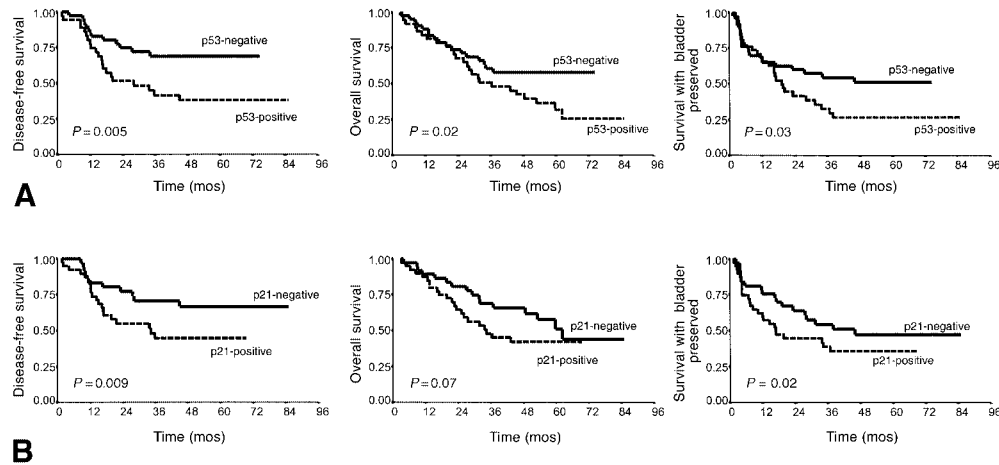


FIGURE 1. Survival distributions in patients with bladder carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy, stratified according to (A) p53 status and (B) p21 status. *P* values were obtained using a Cox multivariate analysis model adjusting for age, disease stage, ureteral obstruction, and p53 and p21 status.

TABLE 2

Multivariate Analysis of Disease-Free Survival, Overall Survival, and Survival with Bladder preservation in Patients with Bladder Carcinoma in Relation to p53 and p21 Status and Clinical Prognostic Features^a

Characteristic	Disease-free survival		Overall survival		Survival with bladder preservation	
	HRa (95% CI)	<i>P</i>	HRa (95% CI)	<i>P</i>	HRa (95% CI)	<i>P</i>
Age (yrs)						
< 62	1		1		1	
≥ 62	0.40 (0.18–0.85)	0.02	0.53 (0.26–1.06)	0.08	0.45 (0.23–0.86)	0.01
Stage						
T2	1		1		1	
T3–4a	1.93 (0.58–6.37)	0.3	2.00 (0.73–5.50)	0.2	3.02 (1.26–7.19)	0.01
Ureteral obstruction						
No	1		1		1	
Yes	1.97 (0.92–4.18)	0.07	1.33 (0.65–2.74)	0.4	1.75 (0.91–3.35)	0.09
p53 expression						
Negative	1		1		1	
Positive	3.08 (1.41–6.74)	0.005	2.16 (1.08–4.34)	0.03	2.10 (1.10–3.99)	0.02
p21 expression						
Negative	1		1		1	
Positive	2.80 (1.28–6.12)	0.009	1.88 (0.94–3.74)	0.07	2.10 (1.10–4.04)	0.02
> 20–60%	1.50 (0.49–4.55)		1.03 (0.38–2.75)		1.49 (0.49–4.55)	
> 60–100%	3.7 (1.65–8.37)		2.59 (1.25–5.35)		3.71 (1.65–8.36)	
<i>P</i> value for Trend		0.002		0.01		0.003

HRa: adjusted hazard ratio; CI: confidence interval.

^a Based on Cox proportional hazards model adjusted for age, stage, ureteral obstruction, p53 status, and p21 status. Confidence intervals that do not include 1.00 indicate a significant association with outcome at *P* = 0.05 (two-sided).

tion available on all of these variables and were included in the analysis. p53 overexpression was a significant and independent predictor of decreased DFS (HRa, 3.08; 95% CI, 1.41–6.74) and OS (HRa, 2.16; 95% CI, 1.08–4.34; Table 2).

Figure 1B shows survival distributions according to p21 immunoreactivity. A near-significant tendency toward decreased probability of DFS (univariate *P* = 0.06) was observed in patients with p21-positive

immunoreactivity, whereas the difference between the p21-positive and p21-negative groups was weaker when OS was analyzed (univariate *P* = 0.2). When p21 expression was evaluated in the multivariate analysis, after adjusting for age, clinical stage, ureteral obstruction, and p53 status, p21-positive immunoreactivity was found to be a significant and independent predictor of poor DFS (HRa, 2.80; 95% CI, 1.28–6.12). Regarding OS, the association approached but did not

reach statistical significance (HRa, 1.88; 95% CI, 0.94–3.74; Table 2). As shown in Table 2, the associations of p21 with DFS and OS followed a statistically significant dose-response relation (P for trend test = 0.002 and 0.01, respectively). No statistical association between pRB expression and DFS or OS was observed. The expression of pRB was also analyzed after combining patients with negative expression (0% positive cells) and patients with high expression (> 50% positive cells) and comparing their results with the results for patients with moderate expression (1–50% positive cells). No significant difference between groups was observed for either of the two survival outcomes selected.

Association of p53, p21, and pRB Expression with Long-Term Bladder Preservation

There was a tendency toward decreased probability of survival with bladder preserved free of tumor that did not reach statistical significance for patients with p53 overexpression (univariate $P = 0.07$; Fig.1A); the corresponding trend was less significant for patients with p21-positive reactivity (univariate $P = 0.17$; Fig.1B). No association was found between pRB expression and survival with bladder preserved. When assessed in a multivariate analysis, adjusting for the same clinical variables, overexpression of p53 (HRa, 2.10; 95% CI, 1.10–3.99), positive immunoreactivity for p21 (HRa, 2.10; 95% CI, 1.10–4.04), and extravesical disease stage (HRa, 3.02; 95% CI, 1.26–7.19) were significant and independent prognostic factors of poor survival with bladder preserved (Table 2). The association of p21 with survival with bladder preservation followed a significant dose-response relation (P for trend test = 0.003; Table 2).

Combined Expression of p53 and p21 and Disease Recurrence, Overall Survival, and Long-Term Bladder Preservation

Further analysis of the prognostic value of p53 immunoreactivity and p21 immunoreactivity taken together was undertaken (Fig. 2). Expression of both markers was negative in 19 patients, expression was positive for p21 and negative for p53 in 23 patients, expression was positive for p53 and negative for p21 in 18 patients, and expression of both markers was positive in 17 patients. In the multivariate analysis, after adjusting for age, stage, and ureteral obstruction, the predictive value of the expression of these markers was weak when one was positive and the other was negative. However, when the expression of both markers was positive, there were strong associations with decreased DFS (HRa, 5.47; 95% CI, 1.78–16.81) and OS (HRa, 4.12; 95% CI, 1.30–13.04), as well as with de-

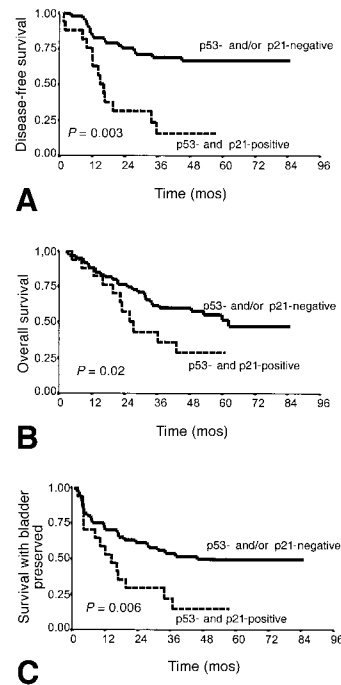


FIGURE 2. (A) Disease-free survival, (B) overall survival, and (C) survival with bladder preservation stratified according to combined p53/p21 status (negative expression of one or both markers [$n = 60$] or positive expression of both markers [$n = 17$]). P values were obtained using a Cox multivariate analysis model adjusting for age, disease stage, and ureteral obstruction.

creased survival with bladder preserved (HRa, 3.86; 95% CI, 1.47–10.15; Table 3). Figure 2 shows survival distributions after stratification of patients into those with negative expression of one or both markers and those with positive expression of both markers, for whom the three selected survival rates were dramatically decreased.

The presence of a statistical interaction between p53 and p21 status was also explored on multivariate analysis. A synergistic effect between p53 and p21 was found for DFS ($P = 0.05$), but not for OS or survival with bladder preserved (Table 3).

DISCUSSION

The current study shows that pretreatment p53 and p21 expression provides important prognostic information on treatment outcome and survival in patients with invasive bladder carcinoma who were treated with bladder-sparing intent using neoadjuvant chemotherapy. The prognostic effect of the expression of these markers was moderate when only one of them was positive. However, when both were positive, this effect was strong and consistent across the three survival outcomes selected. It is noteworthy that the expression of these markers was predictive of long-term

TABLE 3
Multivariate Analysis of Disease-Free Survival, Overall Survival, and Survival with Bladder Preservation in Patients with Bladder Carcinoma in Relation to Combined p53 and p21 Expression and Clinical Prognostic Features^a

Characteristic	Disease-free survival		Overall survival		Survival with bladder preservation	
	HRa (95% CI)	P	HRa (95% CI)	P	HRa (95% CI)	P
Age (yrs)						
< 62	1		1		1	
≥ 62	0.41 (0.19–0.85)	0.02	0.54 (0.27–1.07)	0.08	0.46 (0.24–0.86)	0.02
Stage						
T2	1		1		1	
T3–4a	1.93 (0.60–6.18)	0.3	2.01 (0.73–5.53)	0.2	2.81 (1.18–6.68)	0.02
Ureteral obstruction						
No	1		1		1	
Yes	2.42 (1.11–5.27)	0.03	1.33 (0.64–2.78)	0.4	1.94 (0.99–3.80)	0.055
p53/p21 expression						
Negative/negative	1		1		1	
Negative/positive	1.04 (0.32–3.45)	0.9	1.93 (0.64–5.84)	0.2	1.40 (0.53–3.72)	0.5
Positive/negative	1.08 (0.31–3.80)	0.9	2.22 (0.72–6.81)	0.1	1.37 (0.50–3.74)	0.5
Positive/positive	5.47 (1.78–16.81)	0.003	4.12 (1.30–13.04)	0.02	3.86 (1.47–10.15)	0.006
P value for interaction between p53 and p21		0.05		0.96		0.29

HRa: adjusted hazard ratio; CI: confidence interval.

^a Based on Cox proportional hazards model adjusted for age, stage, ureteral obstruction, and combined p53 and p21 status. Confidence intervals that do not include 1.00 indicate a significant association with outcome at $P = 0.05$ (two-sided).

organ preservation. This finding was independent of the recognized clinical prognostic factors for bladder preservation, such as clinical stage and presence of secondary ureteral obstruction.^{1,3}

The unfavorable prognostic effect associated with p53 overexpression has been well documented in patients with advanced bladder carcinoma treated with radical cystectomy.⁵ Nonetheless, this tumor suppressor protein, which is strongly implicated in human malignancies, is a key factor in the cellular response to DNA damage–inducing cell cycle arrest and apoptosis.^{14–16} Many DNA-damaging anticancer agents, such as cisplatin and irradiation, induce apoptosis, indicating that tumor cell chemosensitivity may be influenced by the efficiency of the activation of apoptotic programs.^{9,17–20} This has led to the assumption that p53 alterations are associated with poor response to chemotherapy and radiotherapy, although this link remains debatable. Our results add to the controversial data reported so far in invasive bladder carcinoma studies. They are consistent with the findings of a previous study involving patients with advanced bladder carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy, most of whom underwent surgery.²¹ In that study, overexpression of p53 was found to be an independent prognostic factor for poor survival. Nevertheless, these results were not reproduced in another study that evaluated patients treated with neoadjuvant chemo-

therapy.²² In contrast, a Phase III trial of adjuvant chemotherapy versus observation for patients who had undergone cystectomy for advanced bladder carcinoma showed that adjuvant chemotherapy only benefited patients with altered p53 expression, resulting in a significant improvement in survival compared with patients with altered p53 expression who were managed with observation only.²³ There are several possible explanations for the apparent discrepancies in the results of these studies. These include limitations associated with the patient populations examined (e.g., heterogeneity, limited size), retrospective study design, diverse tumor types, the types of drugs administered, and differences in methods of assessment of p53 alterations.

p21 is a cyclin kinase inhibitor that induces growth arrest by preventing phosphorylation of pRB in the G_1/S phase transition. Initially, p21 was identified as an effector of p53 response that provoked cell cycle arrest. Recently, it has become evident that control of p21 expression is more complex and can be mediated by p53-independent pathways.²⁴ A previous study of patients with advanced bladder carcinoma undergoing radical surgery showed that patients with tumors that maintained p21 expression had increased survival relative to patients with loss of p21 expression.⁶ In sharp contrast to this observation, our study shows that maintenance of p21 expression is correlated with

poor survival and poor long-term bladder preservation when platinum-based chemotherapy is administered. The finding that these associations followed a statistically significant dose-response relation further strengthens our conclusion that p21 is a predictor of poor outcome. This finding is in agreement with most previous experimental evidence suggesting that p21 expression can protect cells from drug-induced apoptosis by arresting growth in G₁ and enhancing DNA repair. Thus, p21 could cause loss of sensitivity to DNA alkylating agents and radiotherapy,^{10,12,13,25-29} limiting the efficiency of combined-modality approaches.

Our study shows that the combined p53 and p21 analysis offers a better prediction of the success of the combined-modality bladder-sparing treatment. The poor prognosis for patients expressing both proteins in our study is consistent with several *in vitro* observations: for example, p21 is required to maintain cell cycle arrest at G₂ in p53-deficient cells after DNA damage³⁰; p53 alterations may result in an increased sensitivity to chemotherapy in cells lacking p21³¹; and wild-type p53 can overcome p21-mediated G₁ arrest and induce tumor cell apoptosis.³²

To our knowledge, only one previous study has explored the relation between a molecular marker (namely, p53) and bladder preservation using neoadjuvant chemotherapy.³³ In that study, patients with localized bladder carcinoma who had complete responses to neoadjuvant chemotherapy underwent partial or radical cystectomy, or only TUR, depending on the patient's preference. Patients with p53-negative tumors and T2 disease were found to have favorable long-term survival results, and these results held true even for those treated with bladder-sparing surgery. Although the original intent of the treatment was not bladder conservation, this observation appears to agree with our findings.

We used immunohistochemical methods to evaluate p53 and p21 status because of its affordability and feasibility in the routine clinical setting. However, some limitations are associated with this technique. It is well known that tissue handling and processing may affect immunostaining. This limitation probably did not affect our results, because patients in the current study were recruited from a single institution. Interpretation of results usually is semiquantitative and is based on appropriate cutoff values that may be controversial.³⁴ We used previously reported cutoff points that had demonstrated usefulness in our population. Another potential limitation is that immunohistochemical assessment of p21 is less established than p53 immunostaining; in our experience, only one of the two antibodies initially selected for p21 immunostaining yielded reproducible and specific staining

that could be adequately scored. Nonetheless, we observed no difference in the frequency of positive staining for p21 or p53 between patients in the current study and more recent patients (data not shown), disregarding differences in staining that were associated with long-term storage.³⁵

Bladder preservation via combined-modality treatment provides a considerable improvement in the quality of life of selected patients with bladder carcinoma by allowing these patients to avoid radical cystectomy. However, the bladder-sparing approach is not successful for all patients, and a significant number of patients eventually require radical surgery. The availability of reliable predictors of treatment outcome would allow a better selection of patients to be treated with the bladder-sparing strategy. We have shown that the pretreatment expression of p53 and p21 is correlated with OS, as well as with long-term bladder preservation. The results of the current study are meaningful, because the series examined was homogeneous from the perspective of organ preservation intent and because follow-up was long enough to allow evaluation of bladder preservation. However, caution should be exercised in drawing definite conclusions, as the study was retrospective and the number of patients included was limited. Patients with superficial recurrence in the preserved bladder constitute a particular subgroup of patients for whom longer follow-up would permit a more accurate analysis of the predictive value of these markers.

In summary, the current study demonstrates that positive expression of p53 and p21, especially when simultaneously assessed, has independent prognostic value with respect to poor long-term bladder preservation and survival in patients with bladder carcinoma treated with platinum-based neoadjuvant chemotherapy. These results suggest that assessment of the expression of these molecular markers would improve the selection of patients for whom combined-modality bladder-sparing approaches were appropriate. Further studies are warranted to confirm this noteworthy observation.

REFERENCES

1. Kaufman DS, Shipley WU, Griffin PP, Heney NM, Althausen AF, Efrid JT. Selective bladder preservation by combination treatment of invasive bladder cancer. *N Engl J Med*. 1993; 329:1377-1382.
2. Vogelzang NJ, Moormeier JA, Awan AM, et al. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin followed by radiotherapy or surgery for muscle invasive bladder cancer: the University of Chicago experience. *J Urol*. 1993;149:753-757.
3. Tester W, Caplan R, Heaney J, et al. Neoadjuvant combined modality program with selective organ preservation for invasive bladder cancer: results of Radiation Therapy Oncology Group Phase II trial 8802. *J Clin Oncol*. 1997;14:119-126.

4. Rödel C, Grabenbauer GG, Kühn R, et al. Combined-modality treatment and selective organ preservation in invasive bladder cancer: long-term results. *J Clin Oncol.* 2002;20:3061–3071.
5. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med.* 1994;331:1259–1264.
6. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, et al. Effect of p21 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1072–1079.
7. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, 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.
8. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, et al. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84:1256–1261.
9. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* 1994;266:807–810.
10. Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, et al. Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat Med.* 1997;3:1034–1036.
11. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 1997;57:4285–4300.
12. Fan S, Chang JK, Smith ML, Duba D, Fornace AJ Jr., O'Connor PM. Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene.* 1997;14:2127–2136.
13. Wang YA, Bladino G, Givol D. Induced p21^{waf} expression in HI299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. *Oncogene.* 1999;18:2643–2649.
14. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991;51:6304–6311.
15. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993;74:957–967.
16. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 1997;389:300–305.
17. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to chemotherapeutic agents. *J Clin Invest.* 1999;104:263–269.
18. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 2001;61:6185–6193.
19. Piovesan B, Pennell N, Berinstein NL. Human lymphoblastoid cell lines expressing mutant p53 exhibit decreased sensitivity to cisplatin-induced cytotoxicity. *Oncogene.* 1998;17:2339–2350.
20. McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res.* 1994;54:3718–3722.
21. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, et al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1995;13:1384–1390.
22. Qureshi KN, Griffiths TR, Robinson MC, 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.
23. Cote RJ, Esrig D, Groshen S, Jones PA, Skinner DG. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature.* 1997;385:123–125.
24. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* 1994;54:3391–3395.
25. Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.* 1996;10:1945–1952.
26. McDonald ER, Wu GS, Waldman T, El-Deiry WS. Repair defect in p21 WAF1/CIP1 $-/-$ human cancer cells. *Cancer Res.* 1996;56:2250–2255.
27. Ruan S, Okcu MF, Pong RC, et al. Attenuation of WAF1/Cip1 expression by an antisense adenovirus expression vector sensitizes glioblastoma cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin. *Clin Cancer Res.* 1999;5:197–202.
28. Schmidt M, Fan Z. Protection against chemotherapy-induced cytotoxicity by cyclin-dependent kinase inhibitors in CKI-responsive cells compared with CKI-unresponsive cells. *Oncogene.* 2001;20:6164–6171.
29. Tian H, Wittmack EK, Jorgensen TJ. p21^{WAF1/CIP1} antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res.* 2000;60:679–684.
30. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene.* 1998;16:311–320.
31. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature.* 1996;381:713–716.
32. Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, et al. p53 overexpression overcomes p21^{WAF1/CIP1}-mediated G₁ arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene.* 1997;15:1903–1909.
33. 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.
34. McShane LM, Aamodt R, Cordon-Cardo C, et al. Reproducibility of p53 immunohistochemistry in bladder tumors. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1854–1864.
35. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1054–1059.

DISCUSSION

La presente tesis doctoral pretende profundizar en el análisis del valor pronóstico que posee la expresión de dos grupos de moléculas implicadas en procesos relevantes de la carcinogénesis y la progresión tumoral en el cáncer de vejiga urinaria. En primer lugar se estudiaron las moléculas de adhesión, seleccionándose aquellas que parecían desempeñar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad: E-cadherina, beta-catenina y CD44. Estas moléculas han sido implicadas en los fenómenos de invasión de los tejidos vecinos y la diseminación a distancia propios de las neoplasias malignas. En una segunda fase, se estudiaron varias proteínas reguladoras del ciclo celular que han demostrado, en estudios previos, poseer un papel crítico en la progresión del cáncer vesical, como son p53, p21 y pRB. La presencia de alteraciones en estas moléculas se ha relacionado con una mayor agresividad tumoral y algunos datos experimentales sugieren que su estado podría influir en la respuesta a la quimioterapia y la radioterapia.

Los dos estudios se realizaron en series retrospectivas de pacientes con seguimiento prolongado, tratados en un mismo centro y, por tanto, con una evaluación clínica y un manejo terapéutico homogéneos. Las series seleccionadas para la evaluación del efecto pronóstico de estos dos grupos de marcadores, sin embargo, difieren entre sí desde el punto de vista clínico. Exploran situaciones clínicas distintas, en las que los diferentes marcadores biológicos podrían aportar información pronóstica útil en la práctica clínica diaria.

Los resultados obtenidos en los estudios que constituyen la presente tesis muestran que la expresión de determinadas moléculas implicadas en la adhesión celular y la regulación del ciclo celular, poseen un efecto pronóstico significativo, que es independiente de los factores pronósticos clinicopatológicos establecidos. En el primer estudio, la pérdida de la expresión de E-cadherina, especialmente cuando se asociaba a pérdida también en la expresión de beta-catenina, poseyó valor pronóstico sobre la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en una serie de pacientes

consecutivos que incluía todo tipo de carcinomas uroteliales de vejiga, tanto superficiales como infiltrantes. En el segundo estudio, la expresión de p53 y p21 tuvo valor predictivo sobre el resultado del tratamiento a largo plazo y la supervivencia en un subgrupo bien definido de pacientes. Se trata de pacientes con carcinoma infiltrante de vejiga, diagnosticado en estadio localizado, candidatos a tratamiento con quimioterapia neoadyuvante y posterior cirugía o radioterapia, con intención conservadora de vejiga.

En ambos estudios, el hecho de que el valor pronóstico de los marcadores moleculares analizados sea independiente de los factores clásicos establecidos, sugiere que la información que aportan podría complementar a la procedente de los factores clásicos, permitiendo una evaluación pronóstica más precisa. Otro aspecto importante, común a los dos estudios, es la evidencia de que la evaluación combinada de varios marcadores aporta una información pronóstica superior a la de un marcador aislado. Este hallazgo se encuentra en la línea de algunas observaciones relevantes actuales en este sentido (26,27,77,78,89), y sugiere que en el futuro la evaluación simultánea de varias moléculas podría ser una vía para obtener una mejor información pronóstica. La utilización de técnicas modernas como micromatrices (microarrays) de ADN, que permiten evaluar la expresión de múltiples genes simultáneamente es prometedora en este sentido (22,23).

En los dos estudios que constituyen esta tesis, se optó por la inmunohistoquímica para la evaluación del estado de los marcadores pronósticos evaluados. Esto es debido a que estos estudios poseen un enfoque práctico, encaminado a detectar efectos pronósticos que puedan tener una aplicabilidad en la práctica clínica. No se pretende conocer la importancia real de una determinada alteración genética, detectada con las técnicas más precisas, sino más bien detectar un efecto pronóstico significativo desde el punto de vista clínico, mediante una técnica que sea fácilmente utilizable en la clínica diaria. La inmunohistoquímica posee esta característica, ya que es una técnica rápida y

relativamente sencilla, que no precisa una sofisticación técnica especial ni comporta un incremento excesivo del coste, y además permite la determinación en muestras conservadas en parafina y no requiere tejido en fresco para su realización. Además, varios estudios han demostrado que existe una buena correlación entre la detección de alteraciones por inmunohistoquímica de algunas de estas proteínas, y la presencia de mutaciones determinada por métodos moleculares más complejos (48,49,71).

4.1 Moléculas de adhesión y pronóstico en cáncer de vejiga

Puede deducirse de diversos estudios realizados en diferentes tipos de tumores, que la pérdida de expresión de E-cadherina se asocia con frecuencia a fenotipo agresivo. Este fenómeno ha sido particularmente estudiado en carcinoma gástrico y cáncer de mama (177). En ellos, la pérdida de E-cadherina parece jugar un papel importante en la progresión tumoral. En el carcinoma urotelial los datos disponibles son más reducidos, si bien los estudios iniciales coinciden en poner de manifiesto de forma uniforme, una asociación de la pérdida de expresión de E-cadherina con alto grado y estadio avanzado (101- 106). En algunos de ellos, además, la pérdida de expresión de E-cadherina se asoció a un mayor riesgo de recidiva y una supervivencia reducida (101,103). Sin embargo, este efecto pronóstico, en dichos estudios con frecuencia no fue independiente de los factores pronósticos clinicopatológicos clásicos en el análisis multivariado. No obstante, debe tenerse en cuenta que, en ocasiones, limitaciones en las series seleccionadas para un estudio (principalmente número de casos reducido, heterogeneidad y corto seguimiento) pueden dificultar el poner de manifiesto de una forma clara efectos pronósticos moderados o débiles.

Nuestro estudio confirmó, en primer lugar, que las alteraciones en la expresión de E-cadherina en cáncer de vejiga son frecuentes, con un 35% de tumores negativos, frente a un 32.5% que presentaban una expresión positiva focal y 32.5% con expresión positiva homogénea; mientras que la tinción fue positiva en las muestras de urotelio normal de

todos los pacientes. En consonancia con los estudios previos, la pérdida de inmunoreactividad de E-caderina se asoció significativamente con los factores pronósticos adversos establecidos: estadio infiltrante y alto grado; y con la presencia de sobreexpresión nuclear de p53, el factor pronóstico molecular más aceptado en cáncer de vejiga; así como a peor supervivencia global y supervivencia libre de progresión.

Un dato a destacar es que el efecto pronóstico de la expresión de E-caderina fue significativo e independiente del resto de factores en el análisis multivariado, ajustando por los factores pronósticos conocidos: grado, estadio, edad y estado de p53. Este hallazgo sugiere que la expresión de E-caderina puede ser un marcador pronóstico útil en la evaluación clínica del cáncer de vejiga, independiente y, en consecuencia, complementario a los factores pronósticos establecidos.

Los datos disponibles en la literatura acerca del valor pronóstico de Beta-catenina en cáncer de vejiga, son mucho más escasos. Un estudio mostró que la pérdida de expresión de Beta-catenina evaluada por inmunohistoquímica se asoció a una peor supervivencia (109), mientras que dos estudios adicionales no encontraron impacto sobre la supervivencia, que en cambio, sí fue aparente para la expresión de otras cateninas (110,111). Sin embargo, numerosos datos experimentales apuntan a que esta molécula posee un papel importante en el complejo caderina-catenina, y el deterioro de su regulación puede desensamblar la unión celular (178), y también afectar de forma significativa al sistema de transducción de señales (98). Por todo ello, se le ha atribuido un papel potencial importante en la progresión tumoral, y por este motivo decidimos incorporar su determinación al presente estudio.

Nuestros resultados revelan una elevada incidencia de alteraciones en la expresión de Beta-catenina en cáncer de vejiga, con pérdida de la expresión de membrana en 42.5% de los tumores, mientras que en un 30% la tinción fue positiva homogénea y en un 27.5% positiva focal. Al igual que la expresión de E-caderina, la pérdida de beta-catenina se asoció de forma significativa a grado alto, estadio infiltrante y

sobreexpresión de p53. Se asoció también a una peor supervivencia y progresión. Sin embargo, en el análisis multivariado estos efectos perdieron su significación estadística, sugiriendo que su efecto pronóstico podría ser más débil que el de E-caderina y podría encontrarse relacionado con el de otros factores pronósticos clásicos.

La contribución más importante de nuestro estudio consiste en mostrar el valor pronóstico de la evaluación combinada de la expresión de E-caderina y Beta-catenina. En el análisis combinado de la expresión de ambas moléculas se establecieron tres categorías: pérdida de expresión de ambas variables, positividad de una de ellas con negatividad de la otra y, finalmente, positividad de ambas. En el análisis multivariado, la pérdida de expresión simultánea de los dos marcadores fue un predictor potente e independiente de pobre supervivencia global y supervivencia libre de progresión. De este modo, la evaluación simultánea de Beta-catenina parece aumentar de forma importante el valor pronóstico de la expresión de E-caderina sola en el cáncer de vejiga. Posibles explicaciones a este fenómeno podrían encontrarse en relación con que la alteración del complejo caderina-catenina a dos niveles diferentes cause la disrupción de la adhesión celular, y por tanto, facilite la progresión tumoral de forma mucho más definitiva que cuando sólo un elemento está alterado; y también, con que la alteración de Beta-catenina refleje una alteración simultánea de la transducción señales y la transcripción, que comporte un peor pronóstico al estar asociada a la alteración de la adhesión celular (98,99).

La determinación de la expresión combinada de E-caderina y Beta-catenina por inmunohistoquímica es un procedimiento que fácilmente podría ser aplicable a la práctica clínica, con objeto de conseguir una evaluación pronóstica más precisa. Sin embargo, estos resultados debe ser interpretados con una cierta precaución, debido a que se trata por el momento de un solo estudio, y además, a que la serie analizada es reducida. Es necesaria la realización de estudios amplios y bien diseñados, para validar la utilidad pronóstica de la expresión combinada de E-caderina y Beta-catenina. Asimismo, es de

interés la realización de estudios adicionales que exploren más profundamente las posibilidades pronósticas de las alteraciones en esta vía, incluyendo el estudio simultáneo de otros componentes, y también su aplicación en diferentes poblaciones específicas de tumores vesicales.

En nuestro estudio se analizó también el valor pronóstico de otra molécula de adhesión de características muy diferentes a las caderinas, CD44. Se trata de una proteína implicada en la adhesión de la célula a la matriz extracelular y en la migración celular. La selección de la expresión de esta molécula para nuestro estudio, se basó en que la expresión de variantes de CD44 se ha asociado a progresión en cáncer colorrectal y otros carcinomas (179), y sobre todo, a que algunos estudios previos habían descrito la presencia frecuente de un patrón alterado de expresión de CD44 en cáncer de vejiga (118-120). Dichos estudios, sin embargo, fallaron a la hora de evidenciar un efecto pronóstico definido.

Nuestro estudio mostró que, tanto la forma estándar de CD44 como las variantes estudiadas v6 y v3-10 estaban expresadas en la mayoría de pacientes. No se apreció la existencia de asociación alguna entre la expresión de formas variantes de CD44 y las variables clinicopatológicas o la supervivencia. Estos resultados confirman los de los estudios previos citados. Únicamente un estudio entre todos los publicados ha sugerido que la expresión de la variante CD44v6 podría asociarse a un mejor pronóstico en los tumores infiltrantes (121). Aunque el papel pronóstico de la expresión de CD44 parece escaso, un artículo reciente sugiere que la expresión de CD44v8-10 detectada mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa podría ser útil en otro campo de gran interés clínico, el del diagnóstico precoz del cáncer de vejiga (180).

4.2 Proteínas reguladoras del ciclo celular y pronóstico del cáncer de vejiga tratado con quimioterapia neoadyuvante

La presencia de mutaciones del gen p53 es un hecho frecuente en el cáncer de vejiga, y numerosos datos indican que podría desempeñar un papel importante en su desarrollo y progresión (182). La literatura acerca del valor pronóstico de las alteraciones de p53 en cáncer de vejiga es también abundante. Tal como ha sido expuesto en la introducción, sus efectos pueden evidenciarse en tumores superficiales, en carcinoma en situ, y también en tumores infiltrantes. Por otro lado, se conoce cada vez mejor que las funciones que ejerce p53 se encuentran reguladas a múltiples niveles por diversos factores, que pueden interactuar con ella. Las mutaciones o los patrones alterados de expresión que afectan a estos componentes regulatorios, denominados vía de p53, son capaces de causar también una disrupción del crecimiento celular y la apoptosis, que podría conducir a la progresión neoplásica. En nuestro estudio se incluyó, además del estudio de la expresión de p53, el análisis de p21, una proteína cuya expresión es regulada por p53 y por medio de la cual ésta ejerce parte de su control sobre el ciclo celular. Asimismo, se estudió la expresión pRB, proteína que ejerce también un papel fundamental en el control del ciclo celular, hasta el punto que su alteración ha sido sugerida como una vía alternativa a la de p53 en el desarrollo del cáncer de vejiga (89). De hecho, estudios recientes han señalado la existencia de una posible interacción a nivel pronóstico entre p53 y pRB en este tumor (77,78).

Varios estudios han coincidido en señalar que la sobreexpresión de p53 detectada por inmunohistoquímica se correlaciona bien con la presencia de mutaciones detectada por métodos moleculares (48,49). Asimismo, la presencia de alteraciones en la expresión de pRB en la inmunotinción se correlacionó con la pérdida de heterocigosidad (71). Sin embargo, la expresión inmunohistoquímica de p21 posee una muy pobre correlación con la presencia de mutaciones en el gen de p21, ya que éstas son muy raras en humanos. Se acepta habitualmente que la expresión inmunohistoquímica de p21 concuerda mejor con la funcionalidad de la proteína que no la detección de mutaciones (182).

Las ventajas de la inmunohistoquímica han sido expuestas al inicio de la discusión. Esta técnica, sin embargo, posee algunas limitaciones conocidas (50) que es importante discutir en relación con nuestro estudio. Es conocido que el manejo del tejido y su procesamiento pueden afectar la inmunotinción. Esto probablemente no haya afectado a nuestros resultados puesto que todos los pacientes proceden de una misma institución y las muestras han sido tratadas de igual forma. En segundo lugar, la interpretación de los resultados usualmente está basada en valores de corte que pueden ser controvertidos (50). En nuestro estudio se han utilizado valores de corte previamente reportados que han probado ser útiles en nuestra población. Además, la evaluación inmunohistoquímica de p21 se encuentra menos establecida que la de p53. En nuestra experiencia, solamente uno de los dos anticuerpos inicialmente seleccionados para la inmunotinción de p21 produjo una tinción específica y reproducible que pudiera ser fácilmente sometida a graduación. Finalmente, con objeto de descartar la posibilidad de existencia de diferencias en la inmunotinción relacionadas con la conservación prolongada de las muestras (21), se comparó la frecuencia en la positividad de estos marcadores entre los pacientes más antiguos y los más recientes, no se observándose diferencias entre ellas.

En nuestro estudio se halló una incidencia elevada de alteraciones en la expresión de estas proteínas, que confirman los resultados de estudios previos en pacientes con carcinoma infiltrante. Así, se encontró sobreexpresión de p53 en un 47% de los casos, ausencia de expresión de p21 en un 48%, y pérdida de expresión de pRB en un 33%.

Nuestro estudio se centra en una serie muy específica de pacientes con carcinoma infiltrante de vejiga localizado, tratados con quimioterapia neoadyuvante inicial con intención conservadora de la vejiga. Constituye una alternativa conservadora del órgano al tratamiento clásico que es la cistectomía radical. Este esquema terapéutico consigue resultados similares a la cirugía radical en términos de supervivencia, con unas cifras entorno al 40-45% de conservación vesical a largo plazo. En nuestra serie, por

ejemplo, conservan la vejiga a 5 años un 40% del total de pacientes tratados. Sin embargo, es revelador destacar que ello supone un 77.5% de los supervivientes a largo plazo. Este resultado, similar al de otros estudios de las mismas características, indica un hecho muy importante: la probabilidad de conservar la vejiga a largo plazo se da sobre todo en los pacientes que tienen supervivencias prolongadas.

La selección adecuada de la población a tratar con esta estrategia, permitiría beneficiar a un máximo de pacientes con probabilidades de conservación vesical, y evitaría toxicidades innecesarias y retrasos en la cirugía en el resto de pacientes. El valor predictivo de los factores clinicopatológicos actualmente disponibles es muy limitado, aunque en la práctica se tiende a utilizar el estadio y la presencia de uropatía obstructiva secundaria como criterios de selección. A pesar del gran interés práctico que supondría la identificación de nuevos factores pronósticos en esta población, hasta la fecha sólo existe un estudio previo que haya explorado la relación entre un marcador molecular, p53, y la preservación vesical con quimioterapia neoadyuvante (184). El protocolo terapéutico utilizado en el estudio no iba destinado a conseguir la conservación vesical, sino a la administración de quimioterapia neoadyuvante MVAC antes de la cirugía definitiva. No obstante, los pacientes fueron sometidos a diferentes tipos de cirugía posterior, admitiéndose opciones tan diversas como la cistectomía radical, la cistectomía parcial y, por último, la RTU sola. La elección de este tratamiento quirúrgico se realizó de acuerdo con las preferencias del paciente y no según un protocolo previamente establecido. Se analizaron en el estudio únicamente los pacientes con carcinoma localizado de vejiga que habían presentado una respuesta completa a la quimioterapia neoadyuvante. El estudio mostró que los pacientes con tumores con tinción para p53 negativa y estadio T2 consiguieron una supervivencia favorable, incluyendo aquellos tratados con cirugía conservadora de la vejiga. Por las razones anteriormente citadas, las conclusiones que pueden desprenderse de este estudio son muy limitadas.

La aportación más relevante de nuestro estudio consiste en mostrar que la expresión pretratamiento de p53 y de p21 en las células tumorales, son predictores significativos de conservación vesical a largo plazo tras tratamiento combinado multimodal. Este efecto fue independiente de los factores pronósticos clinicopatológicos reconocidos de conservación vesical, como el estadio clínico y la presencia de obstrucción ureteral secundaria (10,17). Nuestro estudio muestra que, aunque tanto p53 como p21 poseen aisladamente valor pronóstico significativo e independiente, el efecto pronóstico de su expresión fue moderado cuando sólo uno de ellos fue positivo y el otro negativo, pero fue muy potente cuando ambos fueron positivos. Este hecho indica que la evaluación combinada de ambos marcadores puede permitir una valoración pronóstica más precisa que su utilización aislada.

Un aspecto a destacar de nuestro estudio es que el parámetro utilizado en la evaluación de la conservación vesical, no se limita a tener en cuenta la respuesta inicial al tratamiento combinado, y la consiguiente conservación vesical tras la quimioterapia, sino que utiliza una estimación de tipo actuarial de la supervivencia libre de tumor con vejiga conservada. Con ello, permite evaluar la conservación vesical a largo plazo, teniendo en cuenta que el paciente con recidiva infiltrante vesical pura durante el seguimiento, requerirá cistectomía diferida de rescate, y por ello debe ser considerado como un mal candidato al tratamiento conservador.

Nuestros resultados muestran también que la expresión de p53 y de p21 poseen valor pronóstico significativo e independiente sobre la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, aunque la expresión de p21 no llegó a alcanzar el nivel de significación estadística en el caso de la supervivencia global, si bien mostraba una marcada tendencia. Al igual que ocurría con la supervivencia con vejiga conservada, la evaluación combinada de ambos marcadores mostró poseer un efecto pronóstico muy potente. El efecto pronóstico desfavorable sobre la supervivencia global asociado con la sobreexpresión de p53 ha sido bien documentado en pacientes con carcinoma de vejiga

tratados con cistectomía radical (55), y también en una serie en pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante, en la que la mayoría de los pacientes fueron sometidos a posterior cirugía (58). Nuestros resultados son consistentes con los hallazgos de este estudio. No obstante, en contraste con ellos, un estudio llevado a cabo en pacientes cistectomizados por carcinoma avanzado de vejiga, que fueron incluidos en un ensayo fase III randomizado que comparaba la administración de quimioterapia adyuvante con observación tras la cirugía, mostró que la quimioterapia adyuvante únicamente beneficiaba a los pacientes con alteraciones en la expresión de p53 (60). Existen varias posibles explicaciones a estas aparentes discrepancias en los resultados de los diferentes estudios como pueden ser la heterogeneidad de las series clínicas analizadas y su pequeño tamaño, diferencias en la metodología utilizada para valorar las alteraciones de p53, y también la utilización de diferentes esquemas terapéuticos.

Un aspecto relevante que podría haber incidido de forma importante en los resultados obtenidos, es la posible interacción de estos marcadores con la respuesta a la quimioterapia. Como ha sido expuesto en la introducción, existen numerosos datos experimentales que indican que p53 (151-160), p21 (152,161-168) y pRB (169-171) pueden desarrollar un papel importante en la respuesta celular al daño en el ADN infringido por la quimioterapia. La inducción de apoptosis que conduciría a la muerte celular, o alternativamente, la detención del ciclo celular que permitiría la reparación del daño genómico, son dos tipos de respuesta celular a la quimioterapia, en las que la influencia de estas proteínas podría ser decisiva.

En aparente contraste con nuestros resultados, un estudio realizado en una serie amplia de pacientes con carcinoma avanzado de vejiga tratados con cistectomía radical, mostró que los pacientes que mantenían la expresión de p21 tuvieron una supervivencia superior a la de aquellos pacientes con pérdida de la expresión de p21 (67). En nuestro estudio, en cambio, la positividad de p21 se asoció con una pobre supervivencia y pobre conservación vesical en una serie de pacientes tratados de forma diferente, con

quimioterapia basada en platino. Y en este hecho precisamente se encuentra una posible explicación a esta divergencia en los resultados. De hecho, nuestra observación se encuentra de acuerdo con la mayor parte de la evidencia experimental, que sugiere que la expresión de p21 puede proteger a las células de la apoptosis inducida por drogas, mediante la detención del crecimiento en G1, y permitiendo así la reparación del DNA. De este modo, p21 podría estar implicado en la resistencia a la quimioterapia con agentes alquilantes del ADN (161-168).

Recientemente, tres pequeños estudios han explorado la potencial utilidad de la inmunotinción de p21 y p53 en la predicción de la evolución de los pacientes con cáncer de vejiga tratados con quimioterapia, con resultados diversos (185-187). Sin embargo, el limitado número de pacientes incluidos, la heterogeneidad de las series estudiadas y el reducido seguimiento de los pacientes, impiden establecer comparaciones entre los resultados y no permiten extraer conclusiones definitivas. En los pacientes tratados con radioterapia radical exclusiva, sin embargo, la positividad combinada de p53 y p21 se asoció a una mejor supervivencia en un estudio (188).

En cuanto al valor del análisis combinado de p53 y p21 puesto de manifiesto en nuestro estudio, el peor pronóstico encontrado en los pacientes que expresaban las dos proteínas tratados con quimioterapia, podría encontrarse en relación con algunas importantes observaciones experimentales recientes: p21 es necesaria para mantener la detención del ciclo celular en G2 en células deficientes en p53 tras el daño del ADN (189); las alteraciones de p53 pueden resultar en una sensibilidad aumentada a la quimioterapia en las células que carecen de p21 (161); y por último, una p53 normal puede superar la parada celular en G1 mediada por p21 e inducir apoptosis de las células tumorales (190).

A diferencia de otros estudios previos, en nuestro estudio la expresión de pRB no poseyó efecto pronóstico alguno sobre ninguno de los parámetros de supervivencia estudiados, y tampoco contribuyó a mejorar el valor pronóstico de p53 en el análisis

combinado de ambos marcadores. Estos datos contrastan con los de algunos estudios reportados, que mostraron que su expresión poseía valor pronóstico en pacientes con cáncer avanzado de vejiga tratados con cirugía (75,77,78). Estas diferencias en el efecto pronóstico encontradas en nuestro estudio, podrían ser atribuibles, al menos en parte, a la influencia potencial de pRB en la respuesta celular a la quimioterapia (169-171).

La determinación inmunohistoquímica de la expresión combinada de p53 y p21 es un procedimiento que resulta aplicable en la práctica asistencial sin comportar una excesiva complejidad. Atendiendo a los resultados de nuestro estudio, su determinación en los pacientes con carcinoma infiltrante localizado podría aportar una valiosa información, útil en la selección de los candidatos más adecuados para intentar la conservación vesical mediante tratamiento multimodal, permitiendo así evitar la agresiva cirugía radical que se considera tratamiento estándar. No obstante, nuestros resultados requieren una cierta precaución a la hora de extraer conclusiones definitivas. Si bien el estudio ha sido realizado en una serie amplia de pacientes, homogénea desde el punto de vista de estadiaje y, sobre todo, del tratamiento, y con un seguimiento suficientemente prolongado; se trata solamente de una serie y el número de pacientes es limitado. Creemos que es importante la confirmación de sus resultados en series más amplias, y en estudios que incluyan el uso prospectivo de estos marcadores en la selección de pacientes candidatos a estrategias terapéuticas con intención conservadora de la vejiga. El presente estudio deja abierto un campo cuya exploración puede ser de gran interés. Posibles aspectos a desarrollar podrían ser la incorporación del análisis de otros marcadores moleculares y componentes de la vía de p53, y su evaluación de forma combinada. Asimismo, la utilización de nuevas técnicas, como los *microarrays* de ADN, que pueden permitir una evaluación en profundidad del perfil de expresión de los tumores, poseyendo posibilidades pronósticas prometedoras.

CONCLUSIONES

1. Proteínas reguladoras del ciclo celular:

- La sobreexpresión de p53 y la expresión de p21 positiva, determinadas por inmunohistoquímica, poseen valor pronóstico independiente desfavorable sobre la conservación vesical y la supervivencia, en el carcinoma infiltrante de vejiga tratado de forma multimodal con intención conservadora del órgano. La expresión de pRB carece de efecto pronóstico en esta situación.
- La expresión positiva de p21, que en estudios previos se asocia a evolución favorable en el cáncer de vejiga tratado con cirugía, se asocia, sin embargo, a evolución desfavorable cuando los pacientes son tratados con quimioterapia. Este hecho podría estar en relación con el papel que juega p21 en la respuesta al daño del ADN inducido por quimioterapia.
- La valoración combinada de la expresión de p53 y p21 en cáncer de vejiga tratado con quimioterapia neoadyuvante, proporciona una información pronóstica superior a la que aporta uno de estos marcadores aislado.
- Nuestros resultados sugieren que la determinación de la expresión de p53 y p21 en cáncer infiltrante de vejiga localizado, podría ser útil en la selección de candidatos a tratamiento multimodal con intención de conservadora de vejiga. No obstante, es precisa la confirmación en estudios adicionales.

2. Moléculas de adhesión:

- La pérdida de expresión de E-caderina y de Beta-catenina, determinadas por inmunohistoquímica, son alteraciones frecuentes en cáncer de vejiga y se asocian a alto grado, estadio invasivo y sobreexpresión de p53.
- La pérdida de expresión de E-caderina y, en menor medida, la de Beta-catenina poseen valor pronóstico desfavorable sobre la supervivencia en los pacientes con cáncer de vejiga. En el caso de E-caderina, este efecto es independiente de los factores clinicopatológicos establecidos. La expresión de CD44 no poseyó valor pronóstico significativo.
- La evaluación combinada de la expresión de E-caderina y Beta-catenina en cáncer de vejiga, permite una valoración pronóstica más precisa que la de uno de los marcadores

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Bray F, Sankila R, et al. Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union. Lyon: IARC Press 1999.
2. J M Borràs, J Borràs, P Viladiu, FX Bosch . Epidemiologia i prevenció del càncer a Catalunya 1975-1992. Barcelona, ed. Institut Català d'Oncologia, 1997.
3. Lòpez Abente G, Gonzalez CA, Errezola M, et al. Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type, and bladder cancer in Spain. *Am J Epidemiol* 1991;134: 830-835.
4. Braud F, Maffezzini M, Vitale V, et al. Bladder cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002; 41:89-106.
5. Knowles MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* 2001; 54:215-221.
6. Orlow I, Lianes P, Lacombe L, et al. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer res* 1994; 54:2848-2851.
7. Theodorescu D. Molecular pathogenesis of urothelial bladder cancer. *Histol Histopathol* 2003; 18:259-274.
8. Kausch I, Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol.* 2002;41:15-29.
9. Berrino F, Capocaccia R, Esteve J et al. Survival of cancer patients in Europe. The Eurocare-II study. Lyon: IARC press, 1999.
10. Kaufman DS, Shipley WU, Griffin PP, et al. Selective bladder preservation by combination treatment of invasive bladder cancer. *N Engl J Med* 1993; 329:1377-1382.
11. H.W. Herr, Natural history of superficial bladder tumors: 10- to 20-year follow-up of treated patients. *World J. Urol.* 1997; 15: 84-89.
12. Mulders PF, Hoekstra WJ, Heybroek RP, Schapers ER, Verbeek AL, Oosterhof GO, Debruyne FM. Prognosis and treatment of T1G3 bladder tumours. A prognostic factor

analysis of 121 patients. Dutch South Eastern Bladder Cancer Study Group. Eur J Cancer 1994;30A:914-7.

13. L.A. Kiemeny, J.A. Witjes, R.P. Heijbroek et al., Dysplasia in normal-looking urothelium increases the risk of tumour progression in primary superficial bladder cancer. Eur J. Cancer 1994; 11: 1621.

14. Dominique K. Chopina and Bernard Gattegno Superficial Bladder Tumors. Eur Urol 2002; 42: 533-541

15. Vieweg J, Whitmore W, Herr HW et al. The role of pelvic lymphadenectomy and radical cystectomy for lymph node positive bladder cancer. The MSKCC experience. Cancer 1994; 73:3020-3028.

16. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. J Clin Oncol 2001 ;19:666-75.

17. Tester W, Caplan R, Heaney J, et al. Neoadjuvant combined modality program with selective organ preservation for invasive bladder cancer: results of Radiation Therapy Oncology Group phase II trial 8802. J Clin Oncol 1997; 14:119-126.

18. Rödel C, Grabenbauer GG, Kühn R, et al. Combined-modality treatment and selective organ preservation in invasive bladder cancer: long-term results. J Clin Oncol 2002; 20 :3061-71.

19. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. J Urol 1998 ;160 :645-59.

20. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. J Urol 1998; 160:645-659.

21. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, et al. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. J Natl Cancer Inst 1996; 88:1054-1059.

-
22. Sánchez-Carbayo M, Cordon-Cardo C Applications of array technology: identification of molecular targets in bladder cancer. *Br J Cancer* 2003 ;89:2172-2177.
23. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E, et al. Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res* 2002 ;62:6973-80.
24. D. Hanahan and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
25. C. Cordon-Cardo, Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am. J. Pathol.* 1995; 147: 545–560.
26. Osman I, Sherman E, Singh B, et al. Alteration of p53 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck: impact on treatment outcome in patients treated with larynx preservation intent. *J Clin Oncol* 2002 ;20 :2980-7.
27. Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, et al. Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res* 2002; 8 :171-9.
28. D.P. Lane, p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358 :15–16.
29. Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, et al. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol* 2003; 169:1219-28.
30. Halevy O, Michalovitz D, Oren M Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science* 1990;250:113-6.
31. Chang F, Syrjänen S, Syrjänen K Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13:1009-22.
32. Balint E, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumour supresor protein. *Br J Cancer* 2001; 85:1813-1823.
33. Gottlieb TM, Oren M p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:77-102.

34. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and división. *Cell* 1997; 88:323-328.
35. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, et al. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;36 :847-9.
36. Vousden KH. p53: The death star. *Cell* 200; 101:691-694.
37. Miyashita T, Reed JC Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-9.
38. Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-8.
39. Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 1999;284:156-9.
40. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 1995;15:3032-40.
41. Lin Y, Ma W, Benchimol S Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* 2000;26:122-7.
42. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, et al. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 1996; 271:1744-7.
43. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994 ;265:1582-4
44. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, et al. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000;404:42-9.
45. Offer H, Zurer I, Banfalvi G, et al. p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* 2001;61:88-96.

46. Wu X, Bayle JH, Olson D, et al. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993;7:1126-32.
47. Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17:5001-14.
48. Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, et al. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994;56 :347-53.
49. Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, et al. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 1993; 143:1389-97.
50. McShane LM, Aamodt R, Cordon-Cardo C, et al. Reproducibility of p53 immunohistochemistry in bladder tumors. National Cancer Institute, Bladder Tumor Marker Network. *Clin Cancer Res* 2000; 6 :1854-64.
51. Holmäng S, Andius P, Hedelin H, et al. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol* 2001;165 :1124-8
52. 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;159:91-4.
53. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994;152:388-92.
54. Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF, 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;14:2646-52.
55. . Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331:1259-1264.

56. Tiguert R, Bianco FJ, Oskanian P, et al. Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol* 2001;166 :2155-60.
57. Fleshner N, Kapusta L, Ezer D, et al. p53 nuclear accumulation is not associated with decreased disease-free survival in patients with node positive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2000;164:1177-82.
58. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter Veet al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1995; 13:1384-1390
59. Qureshi KN, Griffiths TR, Robinson MC, 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
60. . Cote RJ, Esrig D, Groshen S, et al. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 1997; 385:123-124
61. Wu CS, Pollack A, Czerniak B, et al. Prognostic value of p53 in muscle-invasive bladder cancer treated with preoperative radiotherapy. *Urology* 1996;47:305-10.
62. Ong F, Moonen LM, Gallee MP, et al. Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for Bcl-2 and p53. *Radiother Oncol* 2001;61:169-75.
63. Ribeiro JC, Barnetson AR, Fisher RJ, et al. Relationship between radiation response and p53 status in human bladder cancer cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72:11-20.
64. Cordon-Cardo C Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995;147:545-60.
65. Cao L, Yao Y, Lee V, et al. Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion. *J Cell Biochem* 2000; 77:569-83.

-
66. Malkowicz SB, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, et al. Novel p21WAF1/CIP1 mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas. *Oncogene* 1996;13:1831-7
67. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, et al. Effect of p21 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1072-1079
68. Migaldi M., Sgambato A., Garagnani L., et al. Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6 : 3131–3138.
69. Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, et al. Expression of p21(waf1/cip1) protein in transitional cell bladder tumours and its prognostic value. *Eur Urol* 1998;34:237-43.
70. Pfister C, Larue H, Moore L, et al. Tumorigenic pathways in low-stage bladder cancer based on p53, MDM2 and p21 phenotypes. *Int J Cancer* 2000;89:100-4.
71. Xu H.J., Cairns P., Hu S.X., et al. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int. J. Cancer* 1993; 53 :781–784.
72. Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, et al. Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:5736-43.
73. Logothetis C.J, Xu H.J., Ro J.Y., et al. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992; 84:1256–1261.
74. . C. Cordon-Cardo, D. Wartinger, D. Petrylak, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992; 84 :1251–1256.
75. H.B. Grossman, M. Liebert, M. Antelo, et al. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4 :829–834.

76. Agerbaek M, Alsner J, Marcussen N, et al. Retinoblastoma protein expression is an independent predictor of both radiation response and survival in muscle-invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 2003;89:298-304.
77. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, 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
78. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, et al. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res* 1997;57:1217-1221.
79. Habuchi, T., Kinoshita, H., Yamada, H., et al. Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994; 86: 1331-1335
80. Lianes, P., Orlow, I., Zhang, Z. F., et al. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994; 86: 1325-1328, 1994.
81. Shiina H, Igawa M, Shigeno K, et al. Clinical significance of mdm2 and p53 expression in bladder cancer. A comparison with cell proliferation and apoptosis. *Oncology* 1999;56:239-47.
82. P. Korkolopoulou, P. Christodoulou, A.E. Konstantinidou, et al. Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. *Hum. Pathol.* 2000; 31:751–760.
83. Burton PB, Anderson CJ, Corbishly CM Caspase 3 and p27 as predictors of invasive bladder cancer. *N Engl J Med* 2000; 343:1418-20.
84. Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC, et al. Loss of cell cycle regulators p27(Kip1) and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. *Am J Pathol* 1999;155:1129-36.
85. Richter J, Wagner U, Kononen J, et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 2000;157:787-94.

86. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, et al. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 2002;97:671-8.
87. Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, et al. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *Br J Cancer* 2001;84:270-5.
88. Orlow I, Lianes P, Lacombe L, et al. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res* 1994;54:2848-51.
89. Cote RJ, Datar RH Therapeutic approaches to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;46 Suppl :S67-83.
90. Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, et al. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1524-9.
91. Cohen MB, Griebing TL, Ahaghotu CA, et al. Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. *Am J Clin Pathol* 1997;107:56-63.
92. Takeichi M Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251:1451-5.
93. Okegawa T, Li Y, Pong RC, et al. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* 2002;167:1836-43.
94. Birchmeier W, Behrens J Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:11-26.
95. Jou TS, Stewart DB, Stappert J, et al. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5067-71.
96. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993;262:1731-4.

97. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638-42.
98. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:255-68.
99. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 2002 109:987-91.
100. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113:173-85.
101. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma E, et al. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 1993; 53:3241-3245.
102. Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, et al. E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumour stage and survival. *Int J Cancer* 1995; 64:367-370.
103. Lipponen PK, and Eskelinen MJ. Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121:303-308.
104. Ross JS, Del Rosario AD, Figge HL, et al. E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1995; 26:940-944.
105. Otto T, Bex A, Schmidt U, et al. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150:1919-1923.
106. Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, et al. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 3120-3123.

-
107. Syrigos NK, Karayiannakis A, Syrigou EI, et al. Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34: 2037-2040.
108. Imao T, Koshida K, Endo Y, et al. Dominant role of E-cadherin in the progression of bladder cancer. *J Urol* 1999; 161: 692-696.
109. Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (α -, β - and γ -catenins and p120) in bladder tumors. *Cancer Res* 1996; 56:4154-4158.
110. Mialhe A, Louis J, Montlevier S, et al. Expression of E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors?. *Invasion & Metastasis* 1997; 17: 124-137.
111. Syrigos KN, Harrington K, Waxman J, et al. Altered gamma-catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *J Urol* 1998; 160: 1889-1893.
112. Banks RE, Porter WH, Whelan P, et al. Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine. *J Clin Pathol* 1995; 48:179-80.
113. Griffiths TR, Brothrick I, Bishop RI, et al. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer* 1996;74:579-84.
114. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:33-45.
115. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994; 54: 4539-4546.
116. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 199;65:13-24.
117. Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993;53 :4754-6.

118. . Hong RL, Pu YS, Hsieh TS, et al. Expressions of E-cadherin and exon v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell carcinoma. *J Urol.* 1995;153:2025-2028.
119. Sugino T, Gorham H, Yoshida K, et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol.* 1996; 149:873-882.
120. Ross JS, del Rosario AD, Bui HX, et al. Expression of the CD44 cell adhesion molecule in urinary bladder transitional cell carcinoma. *Mod Pathol.* 1996 9:854-860.
121. Lipponen P., Aaltoma S., Kosma V.M., et al. Expression of CD44 standard and variant-v6 proteins in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up. *J. Pathol.* 1998; 186:157–164.
122. Cohen M B, Waldman F. M., Carroll P. R., et al. Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum. Pathol.* 1993; 24: 772-778.
123. Bush C., Price P., Norten, J., et al. Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: its potential clinical importance. *Brit. J. Cancer* 1991, 64: 357-361,.
- 124 Popov Z., Hoznek A., Colombel M., et al. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997; 80:1472–1481.
125. Pfister C, Moore L., Allard P., et al. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 4079–4084.
126. Wu T.T., Chen J.H., Lee Y.H. et al. The role of bcl-2, p53 and ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J. Urol.* 2000; 163 : 758–760.

-
127. Blasco-Olaetxea E., Belloso L., Garcia-Tamayo J. Superficial bladder cancer: study of the proliferative nuclear fraction as a prognostic factor. *Eur. J. Cancer* 1996; 32: 444–446.
128. Neal, D. E., Marsh, C., Bennett, M. K., et al. Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet*, 1985; 1: 366-369
129. Messing EM. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 1990; 50:2530-2537.
130. Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis.. *Am J Clin Pathol.* 1994; 101:166-176.
131. Miyamoto H, Kubota Y, Noguchi S, et al. C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology.* 2000; 55:679-683.
132. Sato K., Moriyama M., Mori S. Et al. An immunohistologic evaluation of c-erb-B2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* 1992; 70:2493–2498.
133. Krüger S, Weitsch G, Büttner H, et al. HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer* 2002;102:514-8.
134. Underwood M., Bartlett J., Reeves J., et al C-erb-B2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors?. *Cancer Res.* 1995; 55:2422–2430.
135. Nagata, Y., Abe, M., Kobayashi, K., et al. Point mutation of c-gras gene in human bladder cancer and kidney cancer. *Jap. J. Cancer Res.*, 1990; 81: 22-26
136. Czerniak, B., Deitch, D., Simmons, H., et al. Ha-ras gene condon 12 mutation and DNA ploidy in urinary bladder carcinoma. *Brit. J. Cancer*, 1990; 62: 762-765
137. Kotake T., Saiki S., Kinouchi T., et al. Detection of c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 1990; 81:1198–1201.

-
138. Lipponen P.K., Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *J. Pathol.* 1995; 175:203–210.
139. Shiina H, Igawa M, Urakami S, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol.* 1996; 49:395-399.
140. Hussain SA, Ganesan R, Hiller L, et al. Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2003;88:586-92.
141. Swana H.S., Grossman D., Anthony J.N., et al. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *New Engl. J. Med.* 1999; 341: 452–453.
142. Lee S.H., Shin M.S., Park W.S., et al. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res.* 1999; 59:3068–3072.
143. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, et al. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol.* 1995; 154:69-71.
- 144.Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:1603-1612.
145. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, et al. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1995;55:510-513.
146. Crew JP, Fuggle S, Bicknell R, et al. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br J Cancer.* 2000; 82:161-166.
147. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res.* 1997;57: 5281-5.

148. Grossfeld G.D., Ginsberg D.A., Stein J.P., 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.
149. Mizutani Y, Okada Y, Yoshida O. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder carcinoma. *Cancer.* 1997;79:1190-1194.
150. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, et al. Two mechanisms of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res.* 1997;57:136-140.
151. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266:807-810.
152. Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, et al. Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat Med* 1997; 3:1034-1036.
153. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; 57:4285-4300,
154. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-6311.
155. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74:957-967.
156. Polyak K, Xia Y, Zweier, et al. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389:237-238.
157. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to chemotherapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104:263-269.
158. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 2001; 61:6185-6193.

159. Piovesan B, Pennell N, Berinstein NL. Human lymphoblastoid cell lines expressing mutant p53 exhibit decreased sensitivity to cisplatin-induced cytotoxicity. *Oncogene* 1998; 17:2339-2350.
160. McIlwrath, Vasey PA, Ross GM, et al. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994; 54:3718-3722.
161. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, et al. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996 381:713-716.
162. Fan S, Chang JK, Smith ML, et al. Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene* 1997; 14:2127-2136.
163. Wang YA, Bladino G and Givol D: Induced p21^{WAF} expression in HI299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. *Oncogene* 1999; 18:2643-2649.
164. Polyak K, Waldman T, He TC, et al. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 1996; 10:1945-1952.
165. McDonald ER, Wu GS, Waldman T, et al. Repair defect in p21 WAF1/CIP1 -/- human cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56:2250-2255.
166. Ruan S, Okcu MF, Pong RC, et al. Attenuation of WAF1/Cip1 expression by an antisense adenovirus expression vector sensitizes glioblastoma cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents 1,3-bis(2-chloroethyl) nitrosourea and cisplatin. *Clin Cancer Res* 1999; 5:197-202.
167. Schmidt M, Fan Z. Protection against chemotherapy-induced cytotoxicity by cyclin-dependent kinase inhibitors in CKI-responsive cells compared with CKI-unresponsive cells. *Oncogene* 2001; 20:6164-6171.
168. Tian H, Wittmack EK, Jogensen TJ. p21^{WAF1/CIP1} antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res* 60:679-684, 2000

169. Kondo T, Higashi H, Nishizawa H, et al. Involvement of pRB-related p107 protein in the inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* 2001;276 :17559-67.
170. Knudsen KE, Booth D, Naderi S, et al. RB-dependent S-phase response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2000;20 :7751-63.
171. Lan Z, Sever-Chroneos Z, Strobeck MW, et al. DNA damage invokes mismatch repair-dependent cyclin D1 attenuation and retinoblastoma signaling pathways to inhibit CDK2. *J Biol Chem* 2002;277 :8372-81.
172. Nakagawa M, Emoto A, Nasu N, et al. Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer. *J Urol* 1997;157:1260-4
173. Siu LL, Banerjee D, Khurana RJ, et al. The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4 :559-65.
174. Petrylak DP, Scher HI, Reuter V, et al. P-glycoprotein expression in primary and metastatic transitional cell carcinoma of the bladder. *Ann Oncol* 1994 ;5 :835-40.
175. Diestra JE, Condom E, Garcia del Muro X, et al. Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications. *J Urol* 2003;170:1383-7.
176. Borràs JM, Borràs J, Bosch FX, et al. Càncer a Catalunya 2001. L'Hospitalet: Institut Català d'Oncologia, Departament de Sanitat i Segiritat Social; 2001.
177. Chan AO, Chu KM, Lam SK, et al. Soluble E-cadherin is an independent pretherapeutic factor for long-term survival in gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003 15;21:2288-93

178. Sommers CL, Gelman EP, Kemler R, et al. Alterations in beta-catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54:3544-3549.
179. Yamaguchi A, Urano T, Goi T, et al. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1122-1127
180. Okamoto I, Morisaki T, Sasaki J, et al. Molecular detection of cancer cells by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of specific CD44 variant RNAs. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 307-315.
181. Slaton JW, Benedict WF, Dinney CP P53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value, and target for therapy. *Urology* 2001 May;57 :852-9.
182. Malkowicz SB, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, et al. Novel p21WAF1/CIP1 mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas. *Oncogene* 1996;13:1831-7.
183. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, et al. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1054-1059.
184. Herr HW, Bajorin DF, Scher HI, et al. Can p53 help select patients with invasive bladder cancer for bladder preservation? *J Urol* 1999; 161:20-23.
185. Koga F, Kitahara S, Arai K, et al. Negative p53/positive p21 immunostaining is a predictor of favorable response to chemotherapy in patients with locally advanced bladder cancer. *Jpn J Cancer Res* 91:416-423, 2000
186. Jankevicius F, Goebell P, Kushima M, et al. p21 and p53 immunostaining and survival following systemic chemotherapy for urothelial cancer. *Urol Int* 69:174-180, 2002
187. Flamm M, Brodowicz T, Haitel A, et al. Correlation of clinical outcome with p53 and p21 status in patients with advanced transitional cell carcinoma treated with paclitaxel and carboplatin. *Anticancer Res* 22:1295-1300, 2002

188. Qureshi KN, Griffiths TRL, Robinson MC, et al. Combined p21^{WAF1/CIP1} and p53 overexpression predict improved survival in muscle-invasive bladder cancer treated by radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:1234-1240, 2001
189. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B: p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16:311-320, 1998
190. Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, et al. p53 overexpression overcomes p21^{WAF1/CIP1} – mediated G₁ arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 15:1903-1909, 1997