

TRABAJO DE INGRESO

Expresión inmunohistoquímica de ki67 y ck20: valor predictor para recurrencia y progresión tumoral en cáncer de vejiga ta de bajo grado

Predictive value of immunohistochemical expression of ki67 and ck20 for tumoral recurrence and progression in low grade ta bladder cancer

Mario I. Fernández^{1,2*}, Marcela Schultz³, Iris Delgado⁴, Alberto Bustamante¹.

1. Servicio de Urología, Clínica Alemana, Santiago, Chile. 2. Centro de Genética y Genómica, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile. 3. Servicio de Anatomía Patológica, Clínica Alemana, Santiago, Chile. 4. Centro de Epidemiología y Políticas de Salud, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

Autor Corresponsal: mfernandeza@alemana.cl

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los factores pronósticos clínicos disponibles luego de la resección transuretral inicial son insuficientes para predecir el curso clínico en pacientes con cáncer de vejiga no-músculo invasor. Esto conlleva desenlaces clínicos insatisfactorios, además de elevados costos. El objetivo fue determinar el valor predictivo para recurrencia y progresión de un panel de biomarcadores moleculares en 50 pacientes con tumores Ta de bajo grado.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se confeccionó una micromatriz de tejidos previa aprobación del estudio por parte del comité de ética. Todos los especímenes fueron evaluados por una uropatóloga según TNM (2009) y WHO (2004). La expresión inmunohistoquímica de un panel de marcadores (p53, Ki67 y CK20) fue determinada de acuerdo con protocolos estandarizados para luego evaluar su asociación, en forma individual y combinada, con recurrencia y progresión mediante análisis uni- y multivariado.

RESULTADOS: La mediana de seguimiento fue 77 meses. Veinte casos (33%) presentaron una recurrencia, mientras que 6 (10,7%) presentaron progresión. Edad ≥ 65 años ($p=0,034$), expresión alterada de Ki67 ($p<0,001$) y de CK20 ($p=0,004$) mostraron una significativa asociación con recurrencia en el análisis univariado. En el análisis multivariado, la expresión alterada de Ki67 (HR 4,7; IC95%: 1,3–16,5; $p=0,016$) y de CK20 (HR 4,0; IC95%: 1,3–12,6; $p=0,017$) fueron predictores independientes de recurrencia. En términos de progresión tumoral, se constató una significativa asociación de ésta con edad ≥ 65 años ($p=0,031$) y expresión alterada de Ki67 ($p=0,014$). Sin embargo, no se realizó un análisis multivariado dado el bajo número de eventos.

CONCLUSIONES

La expresión alterada de marcadores moleculares, obtenida a partir de una metodología simple y disponible en nuestro país, es potencialmente útil al momento de establecer pronóstico en pacientes con tumores Ta de bajo grado. Sin embargo, se requieren estudios controlados para confirmar estos resultados.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Current prognostic factors after transurethral resection of bladder tumors have a poor predictive value on an individual basis in patients with non-muscle invasive bladder cancer.

As a consequence, clinical management is critical and demanding, in addition to significantly elevated costs. The aim of the study was to assess the predictive value of immunohistochemical expression of a panel of markers on tumoral recurrence and progression in 50 patients with low grade Ta tumors.

MATERIAL AND METHODS: After IRB-approval, we conducted histomorphologic analysis and immunohistochemistry for p53, Ki67 and CK20 according to standard protocols in tissue microarrays. Associations with recurrence- and progression-free survival were evaluated with uni- and multivariate Cox regression models.

RESULTS: At a median follow-up 77 months recurrence occurred in 20 (33 %) cases and progression in 6 (10.7 %). Age ≥ 65 years ($p=0.034$), altered expression of Ki67 ($p<0.001$) and CK20 ($p=0.004$) were significantly correlated with tumor recurrence on univariate analysis. In multivariate analysis, Ki67 (HR 4.7; 95 % CI: 1.3–16.5; $p=0.016$) and CK20 expression (HR 4.0; 95 % CI: 1.3–12.6; $p=0.017$) were independent predictors for recurrence. Regarding progression, there was a significant association with age ≥ 65 years ($p=0.031$) and altered expression of Ki57 ($p=0.014$). However, multivariate analysis for progression was not performed due to low number of events.

CONCLUSIONS: Altered expression of molecular markers, obtained by a simple technique widely available in our country, is potentially useful for assessing prognosis in patients with low grade Ta tumors. However, further prospective, controlled studies are necessary to confirm these results.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de vejiga (CV) es actualmente la cuarta neoplasia más frecuente en el hombre en el mundo occidental después de próstata, pulmón y colon, comprendiendo entre el 5 y 10 % de todas las enfermedades tumorales¹. En nuestro país lamentablemente no se dispone de datos precisos acerca de la incidencia. Existen solamente registros formales en tres regiones con tasas de incidencia variables entre 20,6 y 5,0/100.000 entre 2008 y 2010 (Antofagasta y Biobío respectivamente). La estimación a nivel nacional es similar al último valor (5,1/100.000). La incidencia en mujeres es proporcionalmente menor, estimándose en 2/100.000^{2,3}.

El CV es el quinto cáncer más caro desde el punto de vista global en EE. UU. Más allá de ello, y como consecuencia de la sobrevida a largo plazo de pacientes que necesitan seguimiento y tratamiento de por vida debido a la alta tasa de recurrencia tumoral (hasta 70 %), el costo por paciente para los sistemas de salud es el más alto de todas las neoplasias malignas^{4,5}.

Una característica crucial del CV es la existencia de dos grupos distintos de tumores, cada uno de ellos con comportamientos clínicos completamente diferentes. Aproximadamente el 75 % se presentan como tumores no-músculo invasores (Ta-Tis-T1). En contraste, el resto son

músculo invasores (T2-T3-T4) y se caracterizan por poseer un significativo potencial maligno, asociado a significativa progresión tumoral y mortalidad cáncer específica. Una etapificación precisa es de esta manera crucial para las decisiones terapéuticas.

Individuos con CV no-músculo invasor (NMI) tienen un elevado riesgo de desarrollar una recidiva tumoral intravesical (hasta 70 % a los 5 años de tratamiento inicial). Estas recidivas pueden eventualmente progresar a tumores músculo invasores (hasta 50 % en lesiones de alto grado tumoral)⁶. Existen numerosos factores asociados a la ocurrencia de recurrencia tumoral luego de una resección transuretral (RTU) inicial. Resecciones incompletas representan hasta el 60 % de los casos en algunas series⁷. El segundo factor determinante es la eventual implantación de células tumorales durante la RTU en el sitio de resección así como en zonas erosionadas de la mucosa debido a sobredistensión de la vejiga durante la intervención⁸. El tercer factor es la persistencia microscópica de tumor en el sitio de resección. Este fenómeno es el fundamento para el uso de terapia intravesical adyuvante.

Se han analizado numerosas características del CV NMI con el objetivo de predecir el curso clínico de la enfermedad. La

estimación de las probabilidades de recurrencia y progresión se realiza actualmente en sistemas de puntaje basados en factores clínicos e histopatológicos obtenidos luego de la RTU inicial⁶. Estos indicadores otorgan recomendaciones útiles desde un punto de vista poblacional, pero adolecen de valores predictivos pobres desde el punto de vista del individuo. De esta manera, los marcadores moleculares (MM) se han establecido como una alternativa atractiva para la predicción de desenlaces clínicos, tomando además como ejemplo la experiencia en otras neoplasias (ej. Cáncer de Mama), en donde se ha consolidado su uso rutinario⁹. Una de las ventajas de los MM es la de ser una impronta cuantificable en todo el espectro de la carcinogénesis del CV permitiendo de esta manera una monitorización de recurrencia y progresión en todas las etapas de la enfermedad. Por otro lado, constituyen potenciales blancos terapéuticos. Estudios previos han correlacionado una expresión alterada de numerosos biomarcadores con la ocurrencia de los desenlaces clínicos mencionado. Sin embargo, no han logrado incorporarse al manejo clínico de manera rutinaria. Los resultados han sido en parte inconsistentes, probablemente debido a la ausencia de protocolos de estudio y poblaciones homogéneas. Más allá de ello, algunos han adolecido de un deficiente análisis estadístico, sin análisis multivariado para identificar asociaciones significativas. De esta manera, sigue prevaleciendo el uso de los factores clínicos e histopatológicos¹⁰. Esto aplica especialmente para los tumores Ta de bajo grado histológico, que al tener buen pronóstico desde el punto de vista de la progresión tumoral (<18 % a 5 años) no han sido el foco de los estudios, existiendo escasos reportes. Sin embargo, son clínicamente relevantes, considerando que pueden presentar tasas de recurrencia significativas (hasta 78 % a 5 años). A esto se agrega además un considerable costo económico. El objetivo del presente estudio fue evaluar el poder predictor para recurrencia y progresión tumoral de la expresión alterada de una selección de MM representando distintas etapas en la carcinogénesis del CV (Ki67, p53, CK20) en pacientes tratados por tumores Ta de bajo grado histológico, buscando contar con herramientas adicionales en la decisión del manejo clínico en estos pacientes.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES Y VARIABLES

El estudio incluyó 74 pacientes tratados consecutivamente en nuestra institución con RTU por CV Ta de bajo grado histológico entre 2004 y 2009. De estos, 60 cumplieron con los criterios de inclusión: información clínica completa y

factibilidad técnica adecuada para tinción inmunohistoquímica (ej. cantidad de tejido suficiente). Se obtuvo la información de manera retrospectiva desde la ficha clínica electrónica y los informes de Anatomía Patológica. El estudio fue autorizado por el comité de ética (aprobación 2013-101) con prescindencia de consentimiento informado al ser un estudio retrospectivo.

Se consideraron variables demográficas (edad, sexo), ambientales (estatus tabáquico), clínicas (cáncer de urotelio previo), quirúrgicas (número de tumores), histopatológicas (estadío T, grado tumoral según OMS/ISUP 2004, presencia de CIS), inmunohistoquímicas (expresión de anticuerpos) y del tratamiento (instilación inmediata, terapia adyuvante). Los desenlaces evaluados fueron recurrencia (primera evidencia de tumor vesical en el seguimiento) y progresión (desarrollo de un tumor \geq T1 en alguna recurrencia), evaluándose la sobrevida libre de ambos.

EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Todos los especímenes fueron evaluados por una anatomopatóloga (MS) con expertise en el área genitourinaria de acuerdo a las clasificaciones TNM 2009 y OMS/ISUP 2004^{11,12}.

Una vez identificados los bloques de parafina se procedió a la confección de los microarreglos de tejidos (TMA) de acuerdo con protocolos establecidos previamente en nuestra institución. Esta técnica permite el análisis paralelo de un gran número de tumores luego de microbiopsias dirigidas a las zonas tumorales de interés (tres para cada bloque de parafina) y ha logrado mostrar una buena representatividad del grado histológico y proliferación celular en CV^{13,14}.

Las tinciones de los anticuerpos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del respectivo fabricante. A continuación, los patrones de tinción se evaluaron de manera individual por dos investigadores ciegos a la información clínica (MF y MS) de acuerdo con las especificaciones técnicas e información de la literatura, al no existir un consenso para la lectura de estos anticuerpos en CV.

- La expresión de p53 se evaluó en forma semicuantitativa de acuerdo con el porcentaje de reactividad nuclear de acuerdo con el siguiente puntaje: 1 si <10% positivo, 2 si < 25% positivo, 3 si 26-50% positivo y 4 si >50% positivo. Se consideró expresión alterada al menos 10% de reactividad nuclear (Figura 1).

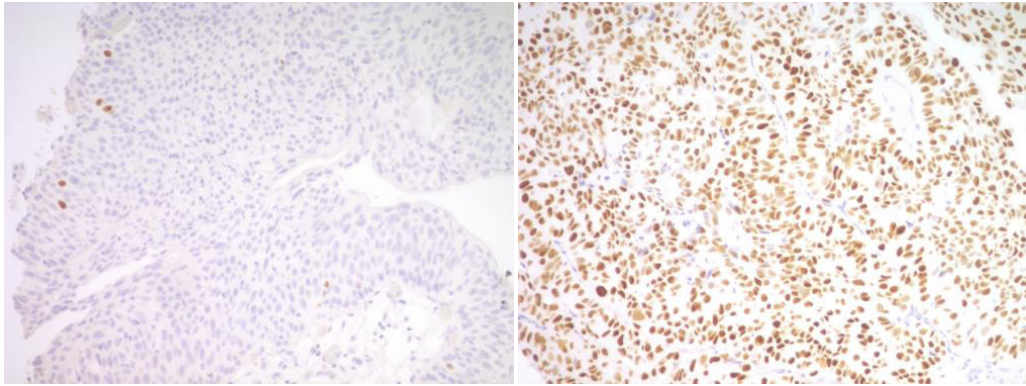


Figura 1. Expresión normal y alterada de p53

Se consideró alterada una reactividad nuclear de Ki67 de $\geq 20\%$ (Figura 2).

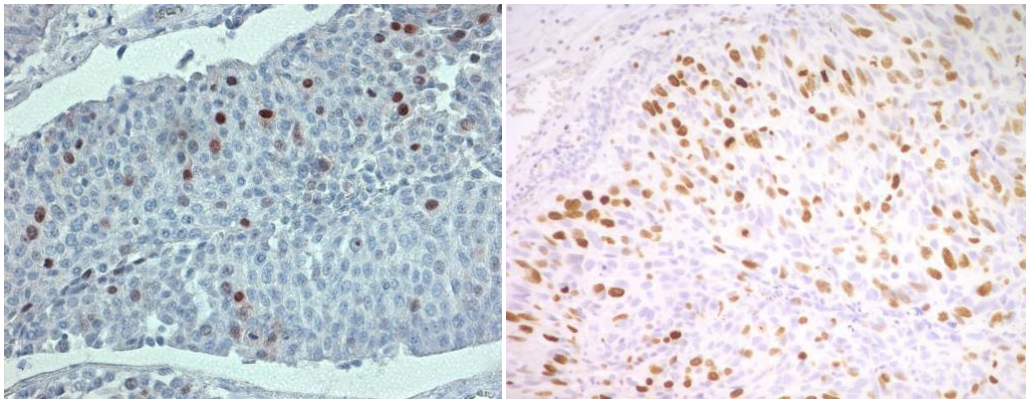


Figura 2. Expresión normal y alterada de Ki67

La expresión de CK-20 se definió como normal en caso de tinción únicamente de las células umbrela. Se consideró alterada la expresión en caso de tinción difusa de todas las capas del epitelio en $\geq 10\%$ o bien la ausencia completa de expresión.

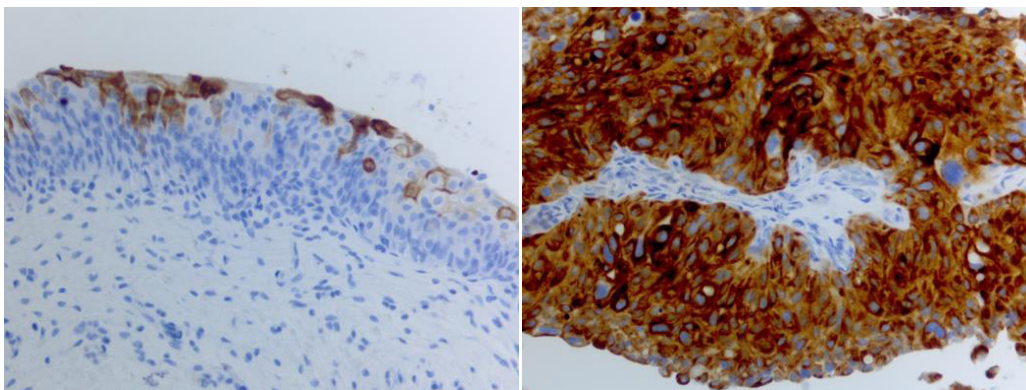


Figura 3. Expresión normal y alterada de CK20

Controles: Se utilizó tejido vesical normal con reacción positiva como control positivo. Para los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Luego del análisis descriptivo de todas las variables se analizaron asociaciones entre todos los parámetros clínicos e histopatológicos con la expresión de los MM mediante tablas de contingencia (chi-cuadrado). Las diferencias con variables con distribución continua fueron evaluadas con la prueba de ANOVA. Los análisis de supervivencia referentes a los desenlaces clínicos fueron realizados con el método de Kaplan-Meier, calculando las diferencias con la prueba de log-rango. Finalmente se confeccionó un análisis multivariado con el modelo de regresión de Cox basado en las asociaciones significativas

del análisis univariado, incluyendo además otras variables si clínicamente indicado. La significancia estadística se verificó con un 95% de confianza ($p < 0.05$). Todos los valores p fueron calculados a dos colas. Los análisis fueron realizados con el software SPSS versión 21.0.0 (Chicago, EE. UU.) en colaboración con nuestra estadística (ID).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se detallan las características de los pacientes analizados.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

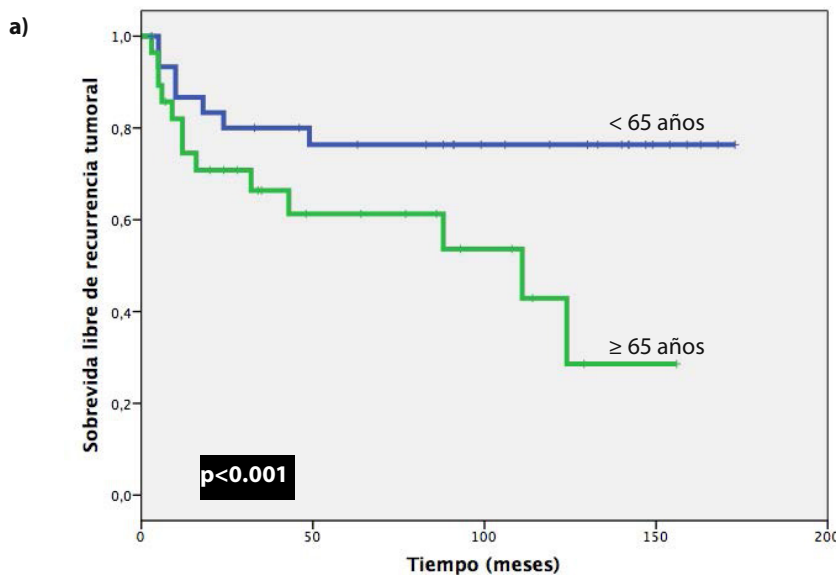
| Variable | N (%) |
|-------------------------|-----------------|
| TOTAL | 60 (100) |
| Edad, mediana (rango) | 64 (29-89) |
| Edad | |
| <65 | 32 (53.3) |
| ≥65 | 28 (46.7) |
| Sexo | |
| Femenino | 13 (21.7) |
| Masculino | 47 (78.3) |
| Tabaquismo | |
| No | 18 (30) |
| Ex - Fumador | 11 (18.3) |
| Fumador activo | 21 (35) |
| Sin datos | 10 (16.7) |
| Cáncer urotelial previo | |
| No | 7 (11.7) |
| Si | 49 (81.7) |
| Sin datos | 4 (6.7) |
| Tumor multifocal | |
| No | 32 (53.3) |
| Si | 18 (30) |
| Sin datos | 10 (16.7) |
| Instilación inmediata | |
| No | 53 (88.3) |
| S | 7 (11.7) |
| Adyuvancia (BCG) | |
| No | 44 (73.3) |
| Si | 11 (18.3) |
| Sin datos | 5 (8.3) |

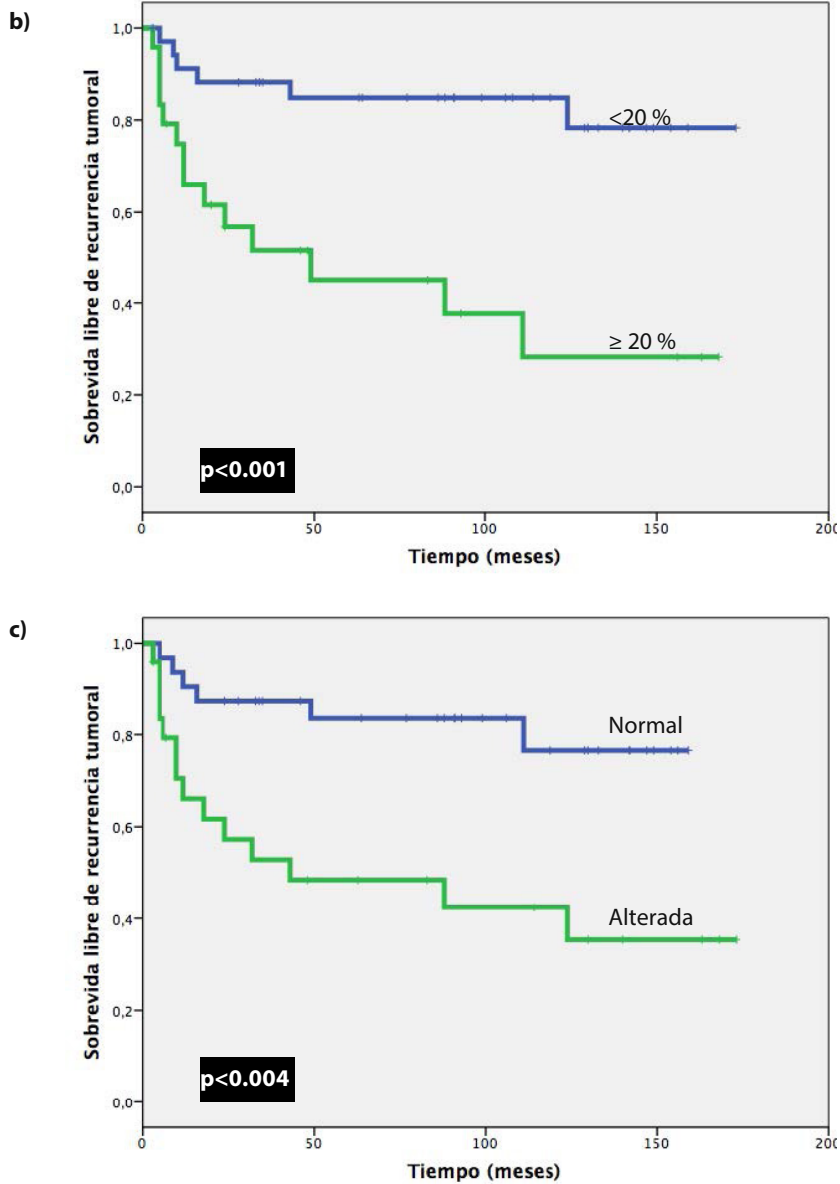
Luego de una mediana de seguimiento de 77 meses se constató recurrencia tumoral en 20 pacientes (33 %) y progresión en 6 (10.7 %). El análisis univariado reveló asociaciones significativas de la edad (< 65 años) y la expresión alterada de Ki67 y CK20 con la ocurrencia de recurrencia tumoral (Tabla 2 y Figuras 4 a-c). En el caso de progresión tumoral se constató una asociación significativa con edad y expresión alterada de Ki67 (Tabla 2).

TABLA 2. RIESGO RELATIVO DE RECURRENCIA Y PROGRESIÓN DE ACUERDO CON VARIABLES CLÍNICAS Y EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES (REGRESIÓN DE COX UNIVARIADA)

| Variable | Recurrencia | | | Progresión | | |
|---|-------------|------------|---------|------------|-------------|---------|
| | HR | IC 95 % | Valor p | HR | IC 95 % | Valor p |
| Edad (≥65 vs. <65) | 2.75 | 1.1 – 7.0 | 0.034 | 11.08 | 1.2 – 98.1 | 0.031 |
| Sexo (Femenino vs. Masculino) | 0.66 | 0.2 – 2.2 | 0.50 | 0.74 | 0.9 – 6.3 | 0.78 |
| Tabaquismo (Ex/Activo vs. No Fumador) | 1.78 | 0.6 – 5.0 | 0.28 | 1.63 | 0.3 – 9.1 | 0.58 |
| Cáncer urotelial previo (Si vs. No) | 0.84 | 0.2 – 3.67 | 0.82 | 1.35 | 0.2 – 1.6 | 0.78 |
| Tumor Multifocal (Si vs. No) | 0.99 | 0.3 – 2.98 | 0.99 | 1.35 | 0.3 – 7.7 | 0.74 |
| Instilación Inmediata (Si vs. No) | 2.23 | 0.6 – 8.1 | 0.22 | 0.04 | 0 – 2013 | 0.56 |
| Adyuvancia (Si vs. No) | 1.55 | 0.5 – 4.4 | 0.41 | 1.62 | 0.3 – 8.9 | 0.58 |
| Expresión de p53 (Alterada vs. Normal) | 0.44 | 0 – 77.1 | 0.41 | 0.43 | 0 – 15357 | 0.63 |
| Expresión de Ki67 (Alterada vs. normal) | 4.98 | 1.9 – 13.1 | <0.001 | 14.88 | 1.7 – 129.6 | 0.014 |
| Expresión de CK20 (Alterada vs. normal) | 4.03 | 1.5 – 10.5 | 0.004 | 1.83 | 0.4 – 9.2 | 0.46 |

Figura 1. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida libre de recurrencia tumoral de acuerdo con edad (a), expresión de Ki67 (b) y CK20 (c).





El análisis multivariado reveló un valor predictivo positivo de las expresiones alteradas de Ki67 y CK20 para la ocurrencia de recurrencia. Debido al bajo número de eventos para progresión, no se realizó un análisis multivariado para este desenlace.

TABLA 3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE FACTORES ASOCIADOS A RECURRENCIA TUMORAL

| Variable | Modelo Completo | | Modelo Reducido | |
|---|------------------|---------|-----------------|---------|
| | HR (IC 95 %) | Valor p | HR (IC 95 %) | Valor p |
| Recurrencia tumoral (30 Eventos) | | | | |
| Edad (≥65 vs. <65) | 1.9 (0.6 – 5.9) | 0.28 | 2.7 (1.0 – 6.8) | 0.044 |
| Cáncer urotelial previo (Si vs. No) | 2.0 (0.4 – 10.9) | 0.42 | | |
| Tumor Multifocal (Si vs. No) | 0.49 (0.1 – 1.8) | 0.29 | | |
| Expresión de Ki67 (Alterada vs. Normal) | 4.7 (1.3 – 16.5) | 0.016 | 3.2 (1.2 – 8.6) | 0.025 |
| Expresión de CK20 (Alterada vs. Normal) | 4.0 (1.3 – 12.6) | 0.017 | 3.1 (1.1 – 8.2) | 0.027 |

DISCUSION

La medicina avanza hacia una era en la cual el diagnóstico y tratamiento estará determinado por riesgos estimados en forma individual con herramientas moleculares además de las clínicas. En el caso del CV existe una intensa actividad en búsqueda de biomarcadores que optimicen la estratificación de riesgo existente (EORTC, CUETO, etc.). De manera lógica, estos esfuerzos se han centrado en aquellos casos con mayor riesgo de desenlaces adversos, en el caso del CV NMI en tumores T1 de alto grado, con el objetivo de hacer más oportuna y/o precisa la implementación de una terapia adyuvante intravesical o la realización de una cistectomía precoz. Así, los tumores Ta de bajo grado, que comprenden el 50-60% del CV NMI, no han recibido una atención adecuada. Si bien es cierto que se encuentran en la zona más 'benigna' del espectro, pueden presentar recurrencias de hasta un 78% a 5 años en el caso de ser tumores recurrentes, multifocales o de gran tamaño. Más aún, pueden progresar hasta un 17% a 5 años^{6,15}. Existen escasos reportes de factores pronósticos en este grupo de pacientes. Estudios recientes han confirmado la relevancia de la multifocalidad y el tamaño tumoral como factores de riesgo para recurrencia^{16,17} y se ha agregado la implementación de una instilación intravesical inmediata con Mitomicina como un factor protector^{17,18}. En este contexto, evaluamos el valor clínico de una selección de biomarcadores en pacientes con tumores Ta de bajo grado histológico, encontrando correlaciones significativas de ellos con la ocurrencia de recurrencia tumoral.

Las alteraciones más frecuentes en el CV son las mutaciones en genes reguladores de ciclo celular (ej.

p53, pRb, p21, p27, Ciclina D1 y E1). El gen supresor de tumores p53 juega un rol importante la progresión del ciclo celular bajo condiciones genotóxicas, activando apoptosis en estas situaciones¹⁹. Su mutación es una de las alteraciones genéticas más comunes en el cáncer en humanos y resulta en una vida media prolongada de esta proteína, acumulándose de esta manera en el núcleo celular²⁰. El valor pronóstico de la sobreexpresión de p53 ha sido evaluado en numerosos estudios en CV NMI presentando resultados inconsistentes, con numerosos estudios descartando un rol pronóstico. La mayoría de ellos sin embargo ha sido realizada en pacientes con tumores T1. Un reciente metanálisis de 12 estudios con 712 pacientes con tumores T1 reveló una significativa asociación de la sobreexpresión de p53 con progresión tumoral (RR 2,74; IC 95%: 2,05–3,65) y no recurrencia²¹. Por otro lado, en otro metanálisis de 1049 pacientes tratados con BCG, incluyendo también pacientes con tumores Ta, se estableció una correlación significativa con recurrencia (HR: 1,38; IC95%: 1,08–1,77) y no con progresión tumoral²². En nuestra serie con tumores Ta de bajo grado, no se encontró ninguna asociación con factores de riesgo ni desenlaces clínicos, sumándose de esta manera numerosos estudios con hallazgos similares.

El antígeno Ki67 es una proteína codificada por el gen MKI67 que se acumula en el núcleo celular en células en estado de proliferación, desde la fase G1 hasta la mitosis. No se expresa en G0²³. Es fácilmente detectable mediante inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales como Ki67 o MIB-1 y refleja la capacidad de la célula en términos de proliferación. De hecho, un estudio

experimental en líneas celulares humanas demostró una potente acción antiproliferativa de un siRNA (ARN de silenciamiento) anti Ki67, confirmando su importancia en este crucial paso en la carcinogénesis²⁴. La expresión de Ki67 ha sido correlacionada con pronóstico desfavorable en numerosos tipos de cáncer, incluyendo algunas neoplasias urológicas²⁵⁻²⁷. En el caso del cáncer de vejiga, el Ki67 ha sido evaluado en numerosos estudios, estableciéndose como un factor independiente de desenlaces clínicos en CV. Una reciente revisión sistemática de 5147 casos de 31 estudios confirmó su valor en términos de asociación significativa con recurrencia (HR 1,69; IC 95% CI: 1,33-2,14), progresión (HR 1,89; IC 95%: 1,43-2,51) y mortalidad cáncer específica (HR 1,69; IC 95%: 1,47-1,95)²⁸. El valor pronóstico de Ki67 ha sido además confirmado en series de pacientes con CV NMI tratados con Mitomicina y BCG^{29,30} y en combinación con los puntajes de riesgo del EORTC³¹. En el presente estudio, la expresión alterada de Ki67 fue el factor predictor más importante, tanto para recurrencia como para progresión tumoral, confirmándose de esta manera los hallazgos en la mayoría de los estudios previos. El análisis rutinario de Ki67 podría establecerse de esta manera como un atractivo biomarcador en el medio nacional, teniendo la ventaja de su amplia disponibilidad y familiaridad con el anatomopatólogo, que lo utiliza de rutina en el proceso diagnóstico de otras neoplasias malignas. El proceso de tinción es reproducible al estar estandarizado y la lectura no es un proceso complejo. Es importante recalcar que la inmunohistoquímica se realiza de manera rutinaria en la mayoría de los servicios de Anatomía Patológica en nuestro país. En términos de costo, el frasco de 1 mL de anticuerpo monoclonal tiene un costo de aproximadamente 400.000 pesos y es suficiente para alrededor de 50 casos, resultando en un costo adicional de aproximadamente 8.000 pesos por paciente, lo cual es razonable.

La Citoqueratina 20 se expresa en las células umbrela del urotelio normal y ha sido descrito como un marcador de diferenciación celular, siendo su desregulación manifestación de la desdiferenciación del urotelio, un evento temprano en la carcinogénesis del CV. Su expresión anormal (<10% en todo el espesor del urotelio) se ha asociado a una elevada recurrencia tumoral en tumores Ta de bajo grado³². Por otro lado, se ha correlacionado también a una elevada recurrencia además de mayor

mortalidad específica en tumores T1^{33,34}. De manera interesante, esta asociación se potencia al combinarse con la expresión alterada de Ki67, logrando también una asociación significativa con la ocurrencia de recurrencia y progresión tumoral³⁴. Esto pudo ser reproducido en nuestro estudio, mostrando ambos valor predictor independiente en forma individual y también en combinación (datos no mostrados en tabla). El análisis simultáneo de la expresión de múltiples biomarcadores de distintas etapas de la carcinogénesis se consolida de esta manera como una propuesta razonable, tomando en cuenta el carácter multifactorial de este proceso biológico. Este concepto ya ha sido evaluado en forma prospectiva en CV, con resultados promisorios, mejorando el valor predictivo del modelo clásico con factores clínicos³⁵.

Nuestro estudio presenta numerosas limitaciones, la mayoría de ellas inherentes a su carácter retrospectivo y monocéntrico, con una muestra relativamente pequeña. Debido a lo mismo, el número de eventos es bajo, lo que de hecho no permitió realizar un análisis multivariado para la progresión tumoral. Por otro lado, el tamaño tumoral, factor de riesgo relevante en tumores Ta de bajo grado, no pudo ser evaluado al no existir datos precisos en la mayoría de los pacientes. Por último, existe una potencial variabilidad de la representación del tumor en los TMA, lo cual puede llevar a una subrepresentación del caso. Sin embargo, como ya se mencionó en los métodos, esto es un problema menor en CV.

Todo lo anterior es posible de minimizar con un diseño prospectivo, y es a ello lo que se debe apuntar para poder incorporar estas herramientas en la rutina clínica, considerando también que las entidades previsionales van a exigir resultados con buen nivel de evidencia para hacerlo.

CONCLUSIONES

La expresión alterada de Ki67 y CK20, obtenida a partir de una metodología simple y disponible en nuestro país, presentó una asociación significativa e independiente con la ocurrencia de recurrencia en tumores Ta de bajo grado en nuestra serie. La identificación de pacientes de mayor riesgo puede permitir la implementación de medidas adicionales, tales como terapia intravesical adyuvante, de manera más oportuna. Sin embargo, estudios prospectivos tendrán que confirmar y consolidar estos hallazgos.

BIBLIOGRAFIA

1. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2013 [cited 24/07/2017]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Galaz J, Moya J, Vallebuena C, Soto F. Registro Poblacional de Cáncer Antofagasta. Secretaría Regional Ministerial de Salud Antofagasta; 2016. p. 28-9.
3. Espinoza C, Umaña M, Sanhueza J, Sandoval M. Registro Poblacional de Cáncer Provincia de Concepción 2006-2010. Secretaría Regional Ministerial de Salud Región del Biobío; 2017. p. 88-9.
4. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(18):1315-30.
5. Sangar VK, Ragavan N, Matanhelia SS, Watson MW, Blades RA. The economic consequences of prostate and bladder cancer in the UK. *BJU international*. 2005;95(1):59-63.
6. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology*. 2006;49(3):466-5; discussion 75-7.
7. Herr HW, Donat SM. A re-staging transurethral resection predicts early progression of superficial bladder cancer. *BJU international*. 2006;97(6):1194-8.
8. Solsona E, Iborra I, Ricos JV, Monros JL, Casanova J, Dumont R. Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term followup. *The Journal of urology*. 1999;161(4):1120-3.
9. Matutino A, Joy AA, Brezden-Masley C, Chia S, Verma S. Hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer: redrawing the lines. *Current oncology (Toronto, Ont)*. 2018;25(Suppl 1):S131-s41.
10. Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, Clark PE, Svatek RS, Hegarty N, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *European urology*. 2013;63(1):4-15.
11. Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I, editors. WHO classification of classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon 2004. p. 29-34.
12. UICC. TNM classification of malignant tumors. 7th ed: Wiley-Blackwell; 2009.
13. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(12):962-72.
14. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *The Journal of pathology*. 2001;194(3):349-57.
15. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Pineiro L, Gonzalez M, et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *The Journal of urology*. 2009;182(5):2195-203.
16. Akitake M, Kiyoshima K, Yokomizo A, Shiga K, Koga H, Takeuchi A, et al. A rational risk assessment for intravesical recurrence in primary low-grade Ta bladder cancer: A retrospective analysis of 245 cases. *Molecular and clinical oncology*. 2018;8(6):785-90.
17. Kobayashi H, Kikuchi E, Mikami S, Maeda T, Tanaka N, Miyajima A, et al. Long term follow-up in patients with initially diagnosed low grade Ta non-muscle invasive bladder tumors: tumor recurrence and worsening progression. *BMC urology*. 2014;14:5.
18. Molina Escudero R, Alvarez Ardura M, Ripalda Ferretti E, Crespo Martinez L, Gonzalez Avila N, Dorado Valentin M, et al. Predicting factors for recurrence in low-grade Ta primary bladder tumours. *Archivos españoles de urologia*. 2014;67(6):541-8.
19. Da Silva GN, Evangelista AF, Magalhaes DA, Macedo C, Bufalo MC, Sakamoto-Hojo ET, et al. Expression of genes related to apoptosis, cell cycle and signaling pathways are independent of TP53 status in urinary bladder cancer cells. *Molecular biology reports*. 2011;38(6):4159-70.
20. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and cellular biology*. 1988;8(2):531-9.
21. Du J, Wang SH, Yang Q, Chen QQ, Yao X. p53 status correlates with the risk of progression in stage T1 bladder cancer: a meta-analysis. *World journal of surgical oncology*. 2016;14:137.
22. Zhou X, Zhang G, Tian Y. p53 Status correlates with the risk of recurrence in non-muscle invasive bladder cancers treated with Bacillus Calmette-Guerin: a meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(3):e0119476.
23. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The Journal of cell biology*. 1993;123(3):513-22.
24. Pichu S, Krishnamoorthy S, Shishkov A, Zhang B, McCue P, Ponnappa BC. Knockdown of Ki-67 by dicer-substrate small interfering RNA sensitizes bladder cancer cells to curcumin-induced tumor inhibition. *PloS one*. 2012;7(11):e48567.
25. Krabbe LM, Bagrodia A, Haddad AQ, Kapur P, Khalil D, Hynan LS, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 in patients with high grade urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *The Journal of urology*. 2015;193(5):1486-93.
26. Shui R, Yu B, Bi R, Yang F, Yang W. An interobserver reproducibility

- analysis of Ki67 visual assessment in breast cancer. *PloS one*. 2015;10(5):e0125131.
27. Gayed BA, Youssef RF, Bagrodia A, Darwish OM, Kapur P, Sagalowsky A, et al. Ki67 is an independent predictor of oncological outcomes in patients with localized clear-cell renal cell carcinoma. *BJU international*. 2014;113(4):668-73.
 28. Tian Y, Ma Z, Chen Z, Li M, Wu Z, Hong M, et al. Clinicopathological and Prognostic Value of Ki-67 Expression in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*. 2016;11(7):e0158891.
 29. Seo HK, Cho KS, Chung J, Joung JY, Park WS, Chung MK, et al. Prognostic value of p53 and Ki-67 expression in intermediate-risk patients with nonmuscle-invasive bladder cancer receiving adjuvant intravesical mitomycin C therapy. *Urology*. 2010;76(2):512 e1-7.
 30. He Y, Wang N, Zhou X, Wang J, Ding Z, Chen X, et al. Prognostic value of ki67 in BCG-treated non-muscle invasive bladder cancer: a meta-analysis and systematic review. *BMJ open*. 2018;8(4):e019635.
 31. Ding W, Gou Y, Sun C, Xia G, Wang H, Chen Z, et al. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urologic oncology*. 2014;32(1):42.e13-9.
 32. Van Oers JM, Wild PJ, Burger M, Denzinger S, Stoehr R, Rosskopf E, et al. FGFR3 mutations and a normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumours. *European urology*. 2007;52(3):760-8.
 33. Otto W, Denzinger S, Fritsche HM, Burger M, Rossler W, Bertz S, et al. Introduction and first clinical application of a simplified immunohistochemical validation system confirms prognostic impact of KI-67 and CK20 for stage T1 urothelial bladder carcinoma: single-center analysis of eight biomarkers in a series of three hundred six patients. *Clinical genitourinary cancer*. 2013;11(4):537-44.
 34. Bertz S, Otto W, Denzinger S, Wieland WF, Burger M, Stohr R, et al. Combination of CK20 and Ki-67 Immunostaining Analysis Predicts Recurrence, Progression, and Cancer-Specific Survival in pT1 Urothelial Bladder Cancer. *European urology*. 2012.
 35. Lotan Y, Bagrodia A, Passoni N, Rachakonda V, Kapur P, Arriaga Y, et al. Prospective Evaluation of a Molecular Marker Panel for Prediction of Recurrence and Cancer-specific Survival After Radical Cystectomy. *European urology*. 2013.