

Neoplasias uroteliais papilíferas superficiais da bexiga (pTa e pT1): correlação da expressão do p53, Ki-67 E CK20 com grau histológico, recidiva e progressão tumoral

Superficial papillary urothelial neoplasms of the bladder (PTA E PT1): correlation of expression of P53, Ki-67 and CK20 with histologic grade, recurrence and tumor progression

DANIEL CURY OGATA¹; CARMEN AUSTRÁLIA PAREDES RIBAS MARCONDES²; FELIPE FRANCISCO TUON²; WILSON FRANCISCO SCHREINER BUSATO JÚNIOR³; GABRIELA CAVALLI⁴; LETÍCIA ELIZABETH AUGUSTIN CZECKO⁵

R E S U M O

Objetivo: Investigar a expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, Ki-67, CK20 em neoplasias uroteliais papilíferas superficiais da bexiga e correlacionar com o grau histológico, progressão tumoral e recidiva. **Métodos:** Foram selecionadas amostras de 43 pacientes portadores de carcinoma de células transicionais superficiais da bexiga. Elas foram distribuídas em dois grupos, um denominado recorrente, de 18 indivíduos e outro não recorrente, com 25 casos. Foram confeccionados blocos multiamostrais. A técnica imunoistoquímica empregada foi de imunoperoxidase e os anticorpos foram: p53 (clone DO7), o Ki-67 (clone SP6) e CK20. **Resultados:** A expressão do p53 foi observada em 11 casos, todos tumores de alto grau ($p=0,0001$). A progressão histológica ocorreu em seis indivíduos ($p=0,0076$). Dos 18 casos recorrentes, seis apresentaram imunorreação para o p53 e 12 foram negativos para este anticorpo ($p=0,1715$). O Ki-67 foi positivo em 17 dos 18 casos do grupo recorrente ($p=0,0001$) e dos 20 tumores de alto grau, 18 apresentaram reação para este anticorpo ($p=0,0001$). Dos 18 indivíduos que tiveram recorrência, 13 apresentaram expressão anômala para CK20 ($p=0,0166$). Nos carcinomas de alto grau, dos 20 casos, 16 apresentaram expressão anômala para este anticorpo, enquanto que 18 dos 23 indivíduos com tumores de baixo grau mostraram expressão habitual para a CK20 ($p=0,0002$). **Conclusão:** O p53 mostrou boa correlação com a progressão histológica e grau histológico. O Ki-67 apresentou forte associação com a recidiva e grau histológico, e a CK20 também associou-se com estas variáveis.

Descritores: Bexiga urinária. Neoplasias. Neoplasias da bexiga urinária. Imunoistoquímica. Marcadores biológicos.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células transicionais (CCT) corresponde a 90% de todos os casos de tumores malignos da bexiga, acometendo com mais frequência pacientes do sexo masculino (2,5:1), aumentando sua incidência com a idade. É o segundo tipo mais comum de câncer do trato genitourinário, atrás apenas do carcinoma da próstata. É o quarto mais comum entre os homens e o oitavo entre as mulheres. Alguns fatores de risco estão envolvidos na sua carcinogênese, tais como o tabagismo, cálculos, infecções crônicas, instrumentação das vias urinárias e exposições ocupacionais a derivados do petróleo, tintura e borracha¹.

No momento do diagnóstico, podem apresentar-se como doença avançada, invadindo a camada muscular detrusora, ou como doença limitada, restrita à mucosa ou lâmina própria, também conhecidos como tumores superficiais ou não musculoinvasivos. Esta última forma de apresentação é a mais frequente, observada em aproximadamente 75% dos casos. Os carcinomas "in situ" podem também ser considerados não musculoinvasivos, contudo tendem a ser mais agressivos e costumam estar associados com CCT de alto grau^{2,3}.

Os tumores superficiais da bexiga podem ser manejados utilizando ressecção transuretral. Esta forma de procedimento é tanto diagnóstica como terapêutica, pois permite a visualização direta da neoplasia, possibilitando a

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba/ Instituto de Pesquisas Médicas, Curitiba, PR, Brasil.

1. Mestre do Programa de Pós Graduação em Princípios da Cirurgia do Instituto de Pesquisas Médicas da Faculdade Evangélica do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; 2. Professor permanente do Programa de Pós Graduação em Princípios da Cirurgia do Instituto de Pesquisas Médicas da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; 3. Urologista do Hospital e Maternidade Marieta Konder Bornhausen, Itajaí, SC, Brasil; 4. Aluno de Iniciação Científica da Faculdade Evangélica do Paraná/Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; 5. Médica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.

sua remoção, sendo também factíveis biópsias seriadas da mucosa adjacente, objetivando excluir a associação com carcinomas "in situ"⁴.

Dependendo das características dos pacientes, a probabilidade de recorrência um ano após a ressecção transuretral (RTU) pode variar de 15 a 70%⁵, e a probabilidade de progressão cinco anos após varia de 7 a 40%⁶. A quimioterapia e/ou imunoterapia intravesical podem ser utilizadas estrategicamente nos tumores superficiais, pois tratam tumores microscópicos persistentes e previnem a reimplantação neoplásica, a neoformação tumoral e, possivelmente, a progressão histológica e clínica^{4,7}. No entanto, nem todas estas neoplasias têm o mesmo risco para recorrência e progressão e a ausência de uma estratificação de risco entre os tumores de comportamento mais agressivos e outros indolentes, acaba resultando em seguimento excessivo ou terapia intravesical desnecessária⁸.

Os fatores prognósticos em pacientes com neoplasias uroteliais papilíferas superficiais da bexiga, têm sido alvo de publicações nos últimos anos^{5,6,9-11}. Os parâmetros clínicos e morfológicos (tamanho, grau, multifocalidade e carcinomas "in situ" na mucosa adjacente) não são eficientes e, eventualmente, acréscimos nestes critérios, poderiam aumentar a sensibilidade e especificidade, levando à condutas clínicas diferentes, conforme o risco de cada carcinoma de células transicionais. Devido a isso, pesquisas recentes têm sido realizadas correlacionando a participação do p53, um gene supressor tumoral, o Ki-67, um marcador de índice de proliferação celular e a citoqueratina (CK) 20, com o grau histológico, a progressão, o estadiamento clínico e recorrência nos tumores de bexiga¹²⁻¹⁷.

Apesar dos esforços em se mostrar a importância da imunoistoquímica na estratificação de riscos nos portadores de neoplasias uroteliais papilíferas da bexiga, pouco se faz uso de biomarcadores na rotina. Em estudo realizado em 335 laboratórios de 15 países, os uropatologistas referiram que raramente, ou algumas vezes, a imunoistoquímica é utilizada por 91,7% destes médicos como adjuvantes no diagnóstico de câncer vesical. Entre os marcadores mais utilizados estão a CK20 (76,9%), a CK7 (66,7%) e o Ki-67 (38,8%). Apenas 24,8% relataram o uso do Ki-67 (84,4%) e do p53 (64,4%) como indicadores prognósticos¹⁸.

Como estudos mostram grupos de tumores vesicais com comportamentos biológicos distintos, esforços vêm sendo realizados, no intuito de dividi-los molecularmente. Visando definir neoplasias com evolução provavelmente desfavorável, podendo-se questionar a atual forma de tratamento para tumores superficiais diagnosticados apenas morfológicamente^{12-17,19}.

O objetivo deste trabalho foi correlacionar a expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, Ki-67 e CK20 nas neoplasias uroteliais papilíferas superficiais da bexiga, com fatores prognósticos de recidiva, progressão tumoral e grau histológico.

MÉTODOS

Após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí, SC (UNIVALI), sob registro 04/11b, foram selecionados 59 pacientes, submetidos à RTU em razão de câncer vesical, durante o período de janeiro de 2005 e dezembro de 2010, oriundos do Ambulatório de Urologia da UNIVALI. Os critérios de inclusão foram: 1) pacientes com diagnóstico inicial de carcinoma de células transicionais superficial da bexiga, submetidos à RTU completa, com ressecção transuretral em 30 a 45 dias, conforme protocolo utilizado pela Unidade de Atendimento Oncológico (UNACON); 2) pacientes com diagnóstico inicial de CCT superficial da bexiga, apresentando recidiva(s), independente do grau histológico e estadiamento; 3) presença de todos os blocos de parafina necessários ao estudo. Foram excluídos: 1) os pacientes que não preencheram os critérios de inclusão; 2) portadores de tumores multifocais; 3) pacientes com carcinomas "in situ" na mucosa adjacente ou outros tipos histológicos não papilíferos ou de origem não urotelial; 4) pacientes com antecedentes de quimioterapia ou radioterapia.

Com a finalidade de minimizar custos, foram feitos blocos multiamostrais, que consiste na confecção de blocos parafinados contendo várias representações de tecido. Estes blocos foram microtomizados com espessura de 4 µm, sendo as lâminas submetidas à coloração de rotina, bem como, dos marcadores p53, Ki-67 e CK20.

Imunoistoquímica

Ela foi realizada segundo a técnica de imunoperoxidase para a pesquisa de antígenos específicos em material parafinado. Os anticorpos utilizados foram o p53 (clone DO7; diluição 1/100), o Ki-67 (clone SP6; diluição 1/100) e a CK20 (clone K20.8; diluição 1/50), todos monoclonais.

A incubação dos anticorpos primários foi feita durante o período overnight, sendo mantidas refrigeradas à 5°C. Após esse período, o anticorpo secundário associado ao polímero dextrana foi incubado com o material por 30 minutos em temperatura ambiente. Para revelação, foi adicionado o complexo DAB sobre as lâminas por três minutos, conforme técnicas convencionais. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Mayer por um minuto para a CK20 e 30 segundos para o Ki-67 e o p53. Em seguida, foi realizada a desidratação com banhos de álcool etílico 100% e a clarificação com xilol em temperatura ambiente. Para a montagem das lâminas, utilizou-se bálsamo do Canadá em técnica similar à montagem de rotina.

Em relação à interpretação dos anticorpos p53 e Ki-67, foram definidas positivas as células que obtiveram respectivamente imunorreação nuclear em 10% e 20%. A CK20 foi considerada como tendo expressão anômala, quando todas as camadas do epitélio foram imunomarcadas com padrão membrana citoplasmática, ou quando nenhuma célula apresentou reação ao anticorpo. Foram utiliza-

dos controles externos, sabidamente positivos para todos os anticorpos usados nesta pesquisa. Para o p53, o Ki-67 e a CK20, foram utilizados respectivamente, amostras de carcinoma de mama, centros germinativos de folículos hiperplásicos de apêndice cecal e fragmentos de mucosa colônica. Todos os tecidos que serviram como controles positivos foram obtidos de amostragens extras de peças cirúrgicas radicais.

Análise estatística

O teste não paramétrico de Fisher foi utilizado para avaliar a correlação do grau histológico, recidiva e progressão tumoral com as expressões dos anticorpos p53, Ki-67 e CK20. A correlação entre as variáveis foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Dos 59 pacientes submetidos à RTU de bexiga, 43 preencheram os critérios de inclusão e foram distribuídos em dois grupos. No primeiro, composto por 25 (58%) indivíduos, não houve recorrência e no outro, formado por 18 (42%) pacientes, foi observado pelo menos uma recorrência em seguimento de 12 a 71 meses. As idades variaram de 39 a 85 anos (média de 66,58; mediana de 70), sendo 35 (81,4%) homens e oito (18,6%) mulheres.

A distribuição por sexo entre os grupos revelou que nos casos não recorrentes, 19 (76%) indivíduos eram homens e seis (24%) mulheres. No grupo recorrente, 16 (88,8%) eram homens e duas (11,2%) mulheres.

No grupo de tumores não recorrentes, 16 pacientes (64%) tinham carcinoma de células transitórias de baixo grau e nove (36%), de alto grau. No grupo de tumores recorrentes, dois casos inicialmente diagnosticados como neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial de malignidade foram reclassificados como CCT de baixo grau. Assim, dos 18 casos deste grupo, 13 (72,2%) eram de CCT de baixo grau e cinco (27,8%) de alto grau. Não houve diferença estatística entre os dois grupos ($p=0,2233$).

No grupo dos tumores recorrentes, 14 pacientes (77,7%) apresentaram apenas uma única recidiva. Cinco

tinham carcinoma de células transitórias de baixo grau e nove, de alto grau. Destes, cinco evoluíram a partir de tumores de baixo grau (progressão). Apenas um caso (5,5%) apresentou duas recidivas, todas como CCT de baixo grau. Três pacientes (16,7%) evoluíram com três recidivas cada um e, um, cujo tumor inicial era CCT de baixo grau, apresentou três recidivas, todas como alto grau. Outro paciente apresentou-se desde o início, ou seja, tumor inicial mais os três recorrentes, como CCT de baixo grau. E o último, era CCT de alto grau, inicialmente e também nas suas três recidivas.

O estadiamento patológico nos tumores iniciais no grupo de tumores não recorrentes, mostrou que 24 (96%) encontravam-se limitados à mucosa (pTa) e apenas um (4%) infiltrava a lâmina própria (pT1). No grupo dos tumores recorrentes, 17 (94,4%) eram pTa e apenas um (5,6%) pT1 ($p=0,4983$). A análise estatística não mostrou diferença estatística entre os dois grupos.

O tamanho tumoral entre os não recorrentes, variou de 0,8cm à 4,5cm e os recorrentes de 0,6cm à 8,7cm. Os tamanhos foram convertidos em variáveis qualitativas, cujo ponto de corte foi 3,0cm. Assim, dos 25 casos do grupo não recorrente, 13 tinham mais de 3,0cm e 12, menos. Já no grupo recorrente, dos 18 indivíduos, 11 apresentavam dimensão superior à 3,0cm e sete deles tamanho inferior à 3,0cm (Tabela 1).

Na progressão no estadiamento patológico/grau histológico, dos 18 casos recorrentes, 14 indivíduos apresentaram apenas uma recidiva. Destes, cinco (35,7%) progrediram histologicamente e quatro (22,2%) no estadiamento. Nos cinco casos restantes, não foi constatada progressão tumoral. Apenas um único caso apresentou duas recidivas sem, no entanto, apresentar progressão tumoral. Em três indivíduos houve três recidivas cada. Dois progrediram, um deles histologicamente e o outro no estadiamento; e o terceiro manteve o mesmo grau e estadiamento.

Imunoistoquímica

A expressão do p53 foi observada em 11 (25,6%) casos, sendo seis (54,5%) do grupo recorrente e cinco (45,5%) do grupo não recorrente. Em relação aos casos que progrediram histologicamente, seis apresentaram mar-

Tabela 1 - Distribuição do estadiamento clínico, grau histológico e tamanho tumoral entre os grupos.

| | Tumores não recorrentes | Tumores recorrentes | |
|------------|-------------------------|---------------------|----------------|
| pTa | 24 | 17 | |
| pT1 | 1 | 1 | ($p=0,4983$) |
| Alto grau | 9 | 5 | |
| Baixo grau | 16 | 13 | ($p=0,2233$) |
| <3,0cm | 13 | 11 | |
| >3,0cm | 12 | 7 | ($p=0,2067$) |

ção para este anticorpo. Entretanto, em todas as situações em que não foi observada a progressão histológica, não houve mutações no p53. Já, a positividade para este anticorpo, nos casos em que houve progressão no estadiamento, aconteceu em apenas um indivíduo. Todos os CCT de alto grau apresentaram imunomarcagem para o p53 e nenhum CCT de baixo grau apresentou positividade para este anticorpo.

Em relação ao Ki-67, a positividade foi observada em 25 (58,1%) casos, sendo oito (32%) não recidivantes e 17 (68%) recidivantes. Apenas um caso do grupo recorrente apresentou negatividade para este anticorpo. A progressão no grau histológico e no estadiamento foram observadas, respectivamente, em seis (35,3%) e cinco (29,4%) casos, todos positivos para o Ki-67. Em relação ao grau histológico, os CCT de alto grau apresentaram maior frequência de positividade para este anticorpo, com 18 (90%) casos. Em apenas dois (10%) indivíduos com tumores de alto grau, o Ki-67 foi negativo.

A CK20, no grupo não recorrente, mostrou expressão anormal em nove (36%) dos 25 casos. Já no grupo recorrente, a expressão anormal foi observada em 13 (72,2%) dos 18 casos. Nos casos em que houve a progressão histológica, quatro indivíduos mostraram alterações na expressão da CK20. A mesma frequência foi observada nos casos em que a progressão histológica não aconteceu. Entre os casos que progrediram no estadiamento, cinco mostraram expressão aberrante para este anticorpo. Esta observação também se fez em outras quatro situações em que não houve a progressão no estadio. Dos 14 tumores classificados como carcinoma de células transitórias de alto grau, 12 (85,7%) apresentaram expressão anômala da CK20 e dois (14,3%) não. Entre os CCT de baixo grau, a proporção dos casos com expressão anômala para este anticorpo e aqueles que não a apresentaram foi, respectivamente, de 10 (34,5%) e 19 (65,5%) casos (Tabela 2). Em todos os casos com expressão anômala da CK20, houve positividade difusa (Figura 1). Nenhum caso apresentou ausência de imunorreação.

Tabela 2 - Distribuição dos marcadores p53, Ki-67 e CK20 em relação à progressão tumoral, recidiva e grau histológico.

| | | p53+ | p53- | Ki-67+ | Ki-67- | CK20* | CK20 |
|--------------------|----------------------------|----------|------|----------|--------|----------|------|
| Progressão tumoral | Com progressão histológica | 6 | 5 | 6 | 0 | 4 | 2 |
| | Sem Progressão histológica | 0 | 7 | 6 | 1 | 4 | 3 |
| | Valor de p | p=0,0076 | | p=0,5385 | | p=0,4079 | |
| | Com Progressão clínica | 1 | 4 | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Recidiva | Sem progressão clínica | 1 | 7 | 6 | 1 | 4 | 3 |
| | Valor de p | p=0,5128 | | p=0,5833 | | p=0,1591 | |
| | Presente | 6 | 12 | 17 | 1 | 13 | 5 |
| | Ausente | 5 | 20 | 8 | 17 | 9 | 16 |
| Grau histológico | Valor de p | p=0,1715 | | p=0,0001 | | p=0,0166 | |
| | Alto grau | 11 | 9 | 18 | 2 | 16 | 4 |
| | Baixo grau | 0 | 23 | 7 | 16 | 5 | 18 |
| | Valor de p | p=0,0001 | | p=0,0001 | | p=0,0002 | |

+ imunorreação nuclear nas células neoplásicas superior a 10% e 20%, respectivamente para os marcadores p53 e Ki-67; * expressão anômala

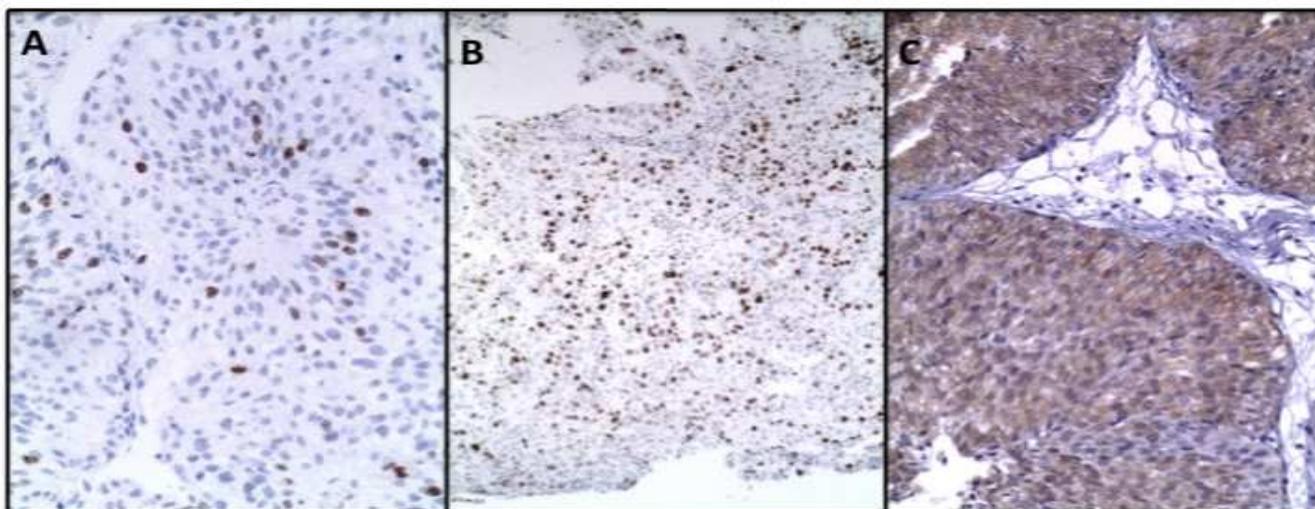


Figura 1 - Fotomicrografia (400x), mostrando em A e B, respectivamente, positividade nuclear para os marcadores p53 e Ki-67; em C expressão anômala da CK20 revelando padrão de membrana celular em toda espessura do urotélio.

DISCUSSÃO

De acordo com as últimas estimativas mundiais, em 2008, ocorreram aproximadamente 386 mil novos casos de câncer da bexiga, além de 150 mil óbitos decorrentes desta neoplasia. Este tumor tem maior incidência em Porto Alegre, com 15,6/100 mil homens. Estima-se que em 2012, surjam 6210 novos casos de câncer da bexiga em homens e 2690 em mulheres. Em Santa Catarina, a incidência estimada de câncer vesical para 2012 é de 8,02/100 mil homens e 2,24/100 mil mulheres²⁰.

O carcinoma de células transicionais acomete predominantemente homens, na proporção de três a quatro vezes mais neste grupo⁴, refletindo os resultados no grupo não recorrente desta pesquisa, cuja proporção homens/mulheres foi 3,16/1. Já no grupo recorrente, ela foi maior, com relação homens/mulheres, de 8/1. Neste estudo, a média de idade foi 66,58 anos, sendo muito similar à observada nas demais pesquisas.

Aproximadamente 80% dos carcinomas vesicais são superficiais e 70% recidivam após a sua remoção¹³. A multifocalidade também é relativamente comum nestas neoplasias²¹ e a sua presença é um dos fatores de risco associados à recidiva²². Segundo Garcia Rodriguez *et al.*, as mulheres tiveram risco maior de multifocalidade e recorrência em período de seis meses¹⁷. Neste trabalho, o baixo número de mulheres não foi estatisticamente suficiente para tal correlação.

O estadiamento patológico constitui importante preditor de recorrência e, principalmente, progressão tumoral^{23,24}. Para Lee *et al.*, a recorrência não se associou ao estágio inicial dos tumores²⁴. Entretanto, a progressão foi maior nos indivíduos que apresentaram lesão inicial com invasão profunda da lâmina própria. Neste estudo, tal comparação não foi possível, pois havia apenas um caso pT1 em cada grupo.

Biomarcadores em neoplasias uroteliais papilíferas

Os biomarcadores são substâncias que objetivamente mensuram e avaliam, indicando processo biológico normal, patológico ou resposta farmacológica à alguma intervenção terapêutica²⁵. Poucos estudos têm sido realizados associando marcadores imunoistoquímicos, entre eles o bcl-2, o p53, o Ki-67 e a CK20, com fatores prognósticos clássicos e a recorrência. Entretanto, os resultados são contraditórios e as séries são difíceis de comparar devido à heterogenicidade nos estágios clínicos dos diferentes trabalhos¹³. Teoricamente, estes biomarcadores poderiam ser uma alternativa para auxílio na divisão dos pacientes com carcinoma de células transicionais em grupos de risco.

O p53 tem sido associado a parâmetros prognósticos, tais como recidiva, progressão tumoral e intervalo livre de metástases. A expressão deste anticorpo mostrou associação com a progressão tumoral em alguns estudos^{3,12,14,19}. Ao contrário de outros resultados, Moyano Cal-

vo *et al.*, não observaram a associação do p53 com a progressão, justificando tal situação pela baixa taxa de positividade deste anticorpo²⁶. Este estudo revelou dados muito próximos aos da literatura mundial, mostrando forte associação do p53 com a progressão histológica ($p=0,0076$). O grau histológico também tem sido relacionado ao p53, uma vez que pesquisas têm mostrado maior expressão deste marcador em tumores de maior grau^{12,15,27}. Neste trabalho isto também foi observado ($p=0,0001$). Aqui, o p53 não apresentou correlação com os casos recidivantes ($p=0,1715$). Na literatura, esta associação apresentou resultados contraditórios entre algumas séries. Enquanto que para alguns autores, o p53 mostrou-se associado à recorrência^{13,22}, para outros não obteve significância estatística neste quesito^{12,19}.

A expressão do Ki-67 no urotélio é baixa e limitada às camadas mais basais. A grande parte dos autores concorda que ele varia consideravelmente com o grau histológico e estágio clínico^{3,13,16,26,28}. Neste estudo, a expressão do Ki-67 foi significativamente maior nos tumores de alto grau ($p=0,0001$), coincidindo com grande parte da literatura. Finalmente, esta série encontrou associação significativa do Ki-67 e recorrência ($p=0,0001$). No entanto, esta correlação também mostra resultados contraditórios em diferentes estudos. Segundo Rodríguez-Alonso *et al.*, a correlação da recidiva com o Ki-67 não foi significativa em um de seus trabalhos¹⁴. Entretanto, estes mesmos autores realizaram um estudo posterior que mostrou significância estatística entre a recidiva e o Ki-67, quando a expressão deste anticorpo era superior a 27%²². Analisando os resultados destes pesquisadores, pode-se perceber que, no trabalho realizado em 2002, em que o Ki-67 não foi correlacionado com a recidiva, a maior parte das amostras era constituída por tumores de alto grau. A literatura mostra que os CCT de alto grau apresentam com maior frequência elevados índices proliferativos^{3,13,15,26,29}. Então, uma das justificativas para a falta de associação, neste estudo entre o Ki-67 e a recidiva, seja um viés de seleção da amostragem. Isto porque não existe proporção aceitável de tumores de baixo grau para estabelecer correlação entre estas duas variáveis. Em outros trabalhos, esta discrepância nos resultados persiste. Enquanto que para alguns autores, existe associação do Ki-67 com a recidiva^{16,26,28}, para outros ela ainda permanece frágil^{13,29}. Talvez esta diferença possa ser decorrente dos diferentes sistemas de classificação, pontos de corte empregados e aos diferentes anticorpos monoclonais.

No urotélio, a CK20 é normalmente expressa apenas nas células superficiais. Alguns pesquisadores têm relatado a dediferenciação da CK20 nas doenças recorrentes, principalmente carcinoma de células transicionais pTa/pT1^{15,30-32}. Em contrapartida muitos estudos também têm demonstrado resultados contraditórios ou pouco consistentes^{3,13,28,33}. Em relação à expressão anômala da CK20, estes resultados revelaram associação estatística com as recidivas ($p=0,0166$) e o grau histológico ($p=0,0002$). Alguns

estudos publicados concluíram que a expressão anômala da CK20 pode ser útil em distinguir as neoplasias uroteliais papilíferas de baixo potencial de malignidade dos CCT de baixo grau. Além disso, as diferenças entre os CCT de baixo e de alto graus foram estatisticamente significantes^{15,30,33}. Estes resultados refletem os resultados desta pesquisa.

A utilização de marcadores imunoistoquímicos, baseado nos dados desta pesquisa, pode ser útil como critério adicional na estratificação de riscos nos pacientes

portadores de CCT não invasivos. Entretanto, diante das diferentes conclusões na literatura mundial, torna-se necessária a continuidade dos estudos para uma maior sedimentação relacionada ao uso de biomarcadores nos pacientes com câncer vesical.

O p53 mostrou boa correlação com a progressão histológica e grau histológico. O Ki-67 apresentou forte associação com a recidiva e grau histológico e a CK20 também associou-se com estas variáveis.

A B S T R A C T

Objective: To investigate the immunohistochemical expressions of p53, ki67, CK20 in superficial papillary urothelial neoplasms of the bladder and correlate them with histological grade, tumor progression and recurrence. **Methods:** We selected samples of 43 patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder. They were divided into two groups, one called Recurrent (R), with 18 individuals, and other Non-Recurrent (NR), with 25. Multi-sampling blocks were prepared. The immunohistochemical technique employed was immunoperoxidase, and the antibodies were: p53: Novocastra (clone DO7) at a dilution of 1/100; Ki67: Spring (clone SP6) at a dilution of 1/100; and CK20: Dako (clone K20 .8) at a dilution of 1/50. **Results:** The expression of p53 was observed in 11 cases, six in the Recurrent group and five in the Non-Recurrent, all high-grade tumors ($p = 0.0001$). The histological progression occurred in six patients ($p = 0.0076$). Of the 18 Recurrent cases, six showed immunoreactivity for p53 and 12 were negative for this antibody ($p = 0.1715$). Ki67 was positive in 17 of the 18 cases from the Recurrent group ($p = 0.0001$) and, from 20 high-grade tumors, 18 showed reaction to this antibody ($p = 0.0001$). Of the 18 individuals who had recurrence, 13 showed anomalous expression for CK20 ($p = 0.0166$). In high-grade carcinomas, of the 20 cases, 16 showed anomalous expression for this antibody, while 18 of the 23 patients with low-grade tumors showed normal expression for CK20 ($p = 0.0002$). **Conclusion:** The p53 showed good correlation with histological progression and histologic grade. Ki67 was strongly associated with recurrence and histological grade, and CK20 was also associated with these variables.

Key words: Urinary bladder. Neoplasms. Urinary bladder neoplasms. Immunohistochemistry. Biological makers.

REFERÊNCIAS

1. Tiraboschi RB, Dias-Neto JA, Martins ACP, Cologna AJ, Suad HJ, Tucci Júnior S. Fatores de risco em carcinomas de células transicionais da bexiga. *Acta cir bras.* 2002;17(Supl. 3):20-3.
2. Mallofré C, Castillo M, Morente V, Solé M. Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia. *Mod Pathol.* 2003;16(3):187-91.
3. Shim JW, Cho KS, Choi YD, Park YW, Lee DW, Han WS, et al. Diagnostic algorithm for papillary urothelial tumors in the urinary bladder. *Virchows Arch.* 2008;452(4):353-62.
4. Sexton WJ, Wiegand LR, Correa JJ, Politis C, Dickinson SI, Kang LC. Bladder cancer: a review of non-muscle invasive disease. *Cancer Control.* 2009;17(4):256-68.
5. Allard P, Bernard P, Fradet Y, Têtu B. The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol.* 1998;81(5):692-8.
6. Kurth KH, Denis L, Bouffieux C, Sylvester R, Debruyne FM, Pavone-Macaluso M, et al. Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumors. *Eur J Cancer.* 1995;31A(11):1840-6.
7. Alkhateeb SS, Neill M, Bar-Moshe S, Rhijn BV, Kakiashvili DM, Fleshner N, et al. Long-term prognostic value of the combination of EORTC risk group calculator and molecular markers in non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical Bacille Calmette-Guérin. *Urol Ann.* 2011;3(3):119-26.
8. Hong SJ, Cho KS, Han M, Rhew HY, Kim CS, Ryu SB, et al. Nomograms for prediction of disease recurrence in patients with primary Ta, T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Korean Med Sci.* 2008;23(3):428-33.
9. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol.* 2000;163(1):73-8.
10. Kaasinen E, Rintala E, Hellström P, Viitanen J, Juusela H, Rajala P, et al. Factors explaining recurrence in patients undergoing chemoimmunotherapy regimens for frequently recurring superficial bladder cancer. *Eur Urol.* 2002;42(2):167-74.
11. 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. *Eur Urol.* 2006;49(3):466-75; discussion 475-7.
12. Dias Neto JA, Martins ACP, Pastorello MT, Suaid HJ, Tucci Júnior S, Cologna AJ. Expressão nuclear do P53 em carcinoma de células transicionais da bexiga. *Acta cir bras.* 2002;17(Supl. 3):29-33.
13. San Miguel Fraile P, Antón Badiola I, Ortiz Rey JA, Álvarez Álvarez C, Fernández Costas A, Lago Fernández M, et al. Estudio comparativo de la expresión de p53, Ki67, bcl-2 y CK20 en el carcinoma transicional superficial de vejiga: correlación con la recurrencia, grado histológico y estadio clínico. *Actas Urol Esp.* 2003;27(8):587-93.
14. Rodríguez-Alonso A, Pita-Fernández S, Gonzalez-Carrero J, Nogueira-March JL. Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. *Cancer.* 2002;94(6):1677-84.
15. Yin H, Leong AS. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial tumors: validation of the 1998 WHO/ISUP system by immunophenotyping and follow-up. *Am J Clin Pathol.* 2004;121(5):679-87.
16. Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Gonzalez-Campora R, Requena MJ, Montironi R, et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the

- prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol.* 2006;59(1):83-8.
17. García-Rodríguez J, Fernández Gómez JÁ, Escaf Barmadah S, González Álvarez RC, Rodríguez Robles L, Miranda Aranzubia O. Factores pronósticos en la recidiva y progresión del cáncer superficial vesical: Gurpos de riesgo (Parte I). *Actas Urol Esp.* 2006;30(10):998-1008.
 18. Lopez-Beltran A, Algaba F, Berney DM, Boccon-Gibod L, Camparo P, Griffiths D, et al. Handling and reporting of transurethral resection specimens of the bladder in Europe: a web-based survey by the European Network of Uropathology (ENUP). *Histopathology.* 2011;58(4):579-85.
 19. Hitchings AW, Kumar M, Jordan S, Nargund V, Martin J, Berney DM. Prediction of progression in pTa and pT1 bladder carcinomas with p53, p16 and pRb. *Br J Cancer.* 2004;91(3):552-7.
 20. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil [internet]. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: Inca, 2011. [acessado: jan 2012]. 118p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>
 21. Cheng L, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R, Bostwick DG. Neoplasms of the urinary bladder. In: Cheng L, Bostwick DG, editors. *Urologic surgical pathology.* 2nd ed, London: Elsevier; 2008. p.260-351.
 22. Rodríguez Alonso A, Pita Fernández S, Gonzalez Carreró J, Nogueira March JL. Análisis multivariado de recidiva y progresión en el carcinoma de células transicionales de vejiga en estadio T1: Valor pronóstico de p53 y ki67. *Actas Urol Esp.* 2003;27(2):132-41.
 23. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J; European Association of Urology (EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2008;54(2):303-14.
 24. Lee JY, Joo HJ, Cho DS, Kim SI, Ahn HS, Kim SJ. Prognostic significance of substaging according to the depth of lamina propria invasion in primary T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Korean J Urol.* 2012;53(5):317-23.
 25. Proctor I, Stoeber K, Williams GH. Biomarkers in bladder cancer. *Histopathology.* 2010;57(1):1-13.
 26. Moyano Calvo JL, Blanco Palenciano E, Beato Moreno A, Gutiérrez González M, Pérez-Lanzac Lorca A, Samaniego Torres A, et al. Cadherina E, catenina beta, antígeno ki-67 y proteína p53 en el pronóstico de la recidiva tumoral en los tumores superficiales de vejiga T1. *Actas Urol Esp.* 2006;30(9):871-8.
 27. Halimi M, Salehi A, Baybordi H, Nazami N. Immunohistochemical positive stained p53 protein in bladder transitional cell carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52(2):155-8.
 28. Burger M, Denzinger S, Hartmann A, Wieland WF, Stoehr R, Obermann EC. Mcm2 predicts recurrence hazard in stage Ta/T1 bladder cancer more accurately than CK20, Ki67 and histological grade. *Br J Cancer.* 2007;96(11):1711-5.
 29. Pfister C, Lacombe L, Vezina MC, Moore L, Larue H, Têtu B, et al. Prognostic value of the proliferative index determined by ki-67 immunostaining in superficial bladder tumors. *Hum Pathol.* 1999;30(11):1350-5.
 30. Alsheikh A, Mohamedali Z, Jones E, Masterson J, Gilks CB. Comparison of the WHO/ISUP Classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. *World Health Organization / International Society of Urologic Pathology. Mod Pathol.* 2001;14(4):267-72.
 31. Ramos D, Navarro S, Villamón R, Gil-Salom M, Llombart-Bosch A. Cytokeratin expression patterns in low-grade papillary urothelial neoplasms of the urinary bladder. *Cancer.* 2003;97(8):1876-83.
 32. Barbisan F, Santinelli A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, et al. Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer.* 2008;112(3):636-44.
 33. Desai S, Lim SD, Jimenez RE, Chun T, Keane TE, McKenney JK, et al. Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. *Mod Pathol.* 2000;13(12):1315-23.
- Recebido em 04/05/2012
 Aceito para publicação em 05/07/2012
 Conflito de interesse: nenhum
 Fonte de financiamento: nenhum
- Como citar este artigo:**
 Ogata DC, Marcondes CAPR, Malafaia O, Busato Júnior WFS, Boldt ABW, Cavalli G, Czeckzo LEA. Neoplasias uroteliais papilíferas superficiais da bexiga (pTa e pT1): correlação da expressão do p53, Ki-67 e CK20 com grau histológico, recidiva e progressão tumoral. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2012; 39(5). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>
- Endereço para correspondência:**
 Daniel Cury Ogata
 E-mail: daniel.ogata@gmail.com