

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Utilidad de la cuantificación de las proteínas P53, HER2/NEU y EGFR
en la caracterización del carcinoma de células transicionales de vejiga
superficial y en su pronóstico a largo plazo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Enrique Redondo González

Director

Jesús Moreno Sierra

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS P53,
HER2/NEU Y EGFR EN LA CARACTERIZACIÓN DEL CARCINOMA DE
CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA SUPERFICIAL Y EN SU
PRONÓSTICO A LARGO PLAZO**

ENRIQUE REDONDO GONZÁLEZ

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS P53,
HER2/NEU Y EGFR EN LA CARACTERIZACIÓN DEL CARCINOMA DE
CÉLULAS TRANSICIONALES DE VEJIGA SUPERFICIAL Y EN SU
PRONÓSTICO A LARGO PLAZO.**

ENRIQUE REDONDO GONZÁLEZ

**DIRECTOR
JESÚS MORENO SIERRA**

Madrid, 2015

***The more you see the less you know
The less you find out as you go
I knew much more then, than I do now...***

*Paul David Hewson.
City of Blinding Lights*



A mis padres, como una muestra de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, por los valores morales que me inculcaron, y por haber sacrificado su vida por mi formación profesional.

Por haberme hecho la persona que soy, y por todo el tiempo que les robé pensando en mí...

Han sido muchas las personas, tanto relacionadas con el mundo científico como ajenas a él, las que han hecho posible que hoy pueda defender esta tesis. Aunque no pueda nombrarlas expresamente, todas y cada una de ellas han participado en esta faceta de mi vida apoyándome bien profesionalmente o de forma personal con su comprensión y apoyo.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis padres, a quien todo debo, porque sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme, y porque sé que por más que haga, nunca podré pagar todos sus desvelos.

Quisiera dar las gracias al Dr. Jesús Moreno Sierra, no sólo por haber dirigido mi tesis, sino también por su constante apoyo y estímulo para la finalización de la misma, y por no haber perdido la fe en que algún día acabaría este proyecto.

Al Dr. Álvaro Páez Borda, por su inestimable ayuda para la realización de esta tesis, por haber apostado por mí cuando nadie más se atrevió a hacerlo, pero sobre todo por su enorme amistad, demostrada a lo largo de todos estos años y que hacen que tenga en él un hermano más para mí.

Al Prof. Luis Resel Estévez (D.E.P.) quien inició mis pasos en el mundo de la Urología, transmitiéndome su experiencia, conocimientos y habilidades de muchos años, y que incidió de forma definitiva en mi formación como urólogo.

Al Dr. Antonio Berenguer Sánchez, por haber confiado en mí capacidad, y por haberme permitido aprender de su larga experiencia docente, investigadora y asistencial, que han impregnado mi formación urológica.

A Ángel, por sus sabias enseñanzas para conmigo, persistiendo en ellas sin importarle que muchas veces, fruto de mi inmadurez, no pusiera toda la atención que merecían, por su cercanía en todo momento, y por su permanente ánimo durante la realización de este trabajo.

A Marisa y a Victoria, por su dedicación, por su permanente disposición para ayudarme, y por su imprescindible apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A José Antonio y a Pilar por su indispensable ayuda con los estudios anatomopatológicos y con la interpretación de los mismos.

A Cristina y a Javier, por su experimentada orientación y asesoría en los análisis bioestadísticos.

A Pilar Pinilla, por demostrarme que la eficiencia administrativa, puede ir acompañada de amabilidad y una sonrisa.

A mis compañeros de residencia (Juan, Manuel, José Luis, Héctor, Manuel, Carlos, Enrique, Isabel, Francisco José, Luis, Ángel, María Pilar, y Lorena) con los que disfruté y aprendí durante mis años de formación urológica. En especial a Gloria, por ser además de compañera mi amiga, y por haber compartido a lo largo de estos todos estos años, tantos buenos y malos momentos conmigo.

A todos mis compañeros del Servicio de Urología del Hospital de Fuenlabrada, a los del Hospital Clínico San Carlos que están hoy a mi lado, y a todos a los que durante tantos años me han acompañado en la aventura de la Urología. De todos y cada uno de vosotros he aprendido algo.

Quisiera, como no, dar las gracias a Merche, por paciencia, por su apoyo, por el ánimo que me regala cada día, por su amor incondicional y el cariño que me ha demostrado desde hace tantos años, y por ser la persona que mejor sabe cuánto tiempo, trabajo y esfuerzo hay detrás de estas páginas.

A mis hermanos, Charo y Carlos, por haberme ayudado a madurar creciendo juntos, por preocuparse siempre por mí, y por su infinita paciencia para convivir durante tantos años de estudio conmigo sin haberme reprochado nunca el tiempo y el espacio que les he robado para acabar los mismos.

A mi tía Angelines, por todo el tiempo que me dedicó cuando era un niño, y por todo el tiempo que sigue invirtiendo a día de hoy en ayudarnos, y cuando hace falta, en sustituirme.

A mis sobrinos, Javier y Ana, por haberme permitido revivir, con su inocente ilusión, los momentos de felicidad de mi infancia.

A Carlos y a Dani, por ser mi banda, por cada ausencia injustificada, por estar siempre ahí, en cada fracaso, sin pedir nada a cambio, por cada cerveza juntos, y por haberme ayudado a levantar de cada golpe que he recibido.

A Pablo, por su inquebrantable amistad desde el día que inicié mi andadura en el mundo de la Urología, que ni la distancia ni mi constante despiste han acabado echando a perder.

A Sara, por haber estado a mi lado cuando peor lo estaba pasando, y por no haber dejado jamás de ser mi amiga desde que nos conocimos. Detrás de ella, quisiera dar las gracias al resto de mis amigos, a los que aún seguís a mi lado, y a los que el tiempo y la distancia nos han acabado separando. De los buenos ratos pasados con vosotros es fruto el ánimo para haber acabado este proyecto.

A U2, a Foo Fighters, a Oasis, a Smashing Pumpkins, a Nirvana, a Pearl Jam, a The Who, a Led Zeppelin... y en general a todos los grupos de rock que han compuesto la banda sonora de mi vida, por haber hecho más llevaderas las muchas horas empleadas delante del ordenador para acabar esta tesis.

Y para finalizar, han sido tantas las personas que me han ayudado de uno u otro modo en este trabajo, que, sabiendo que mis notas y mi memoria son imperfectas, quiero pedir perdón a aquellos, cuyos nombres debiera haber mencionado y no lo he hecho.

A todos y cada uno de vosotros, gracias.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

- **ABC:** Área Bajo la Curva
- **ACS:** *American Cancer Society*
- **AEV:** Virus de la Eritroblastosis de las Aves
- **AJCC:** *American Joint Committee on Cancer*
- **APC:** *Annual Percent Change* (cambio porcentual anual)
- **AR:** Anfirregulina
- **BC:** Betacelulina
- **BCG:** Bacilo de Calmette y Guerin
- **bFGF:** Factor Fibroblástico de Crecimiento Básico
- **CCAFU:** *Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie*
- **CCT:** Carcinoma de Células Transicionales
- **cdc:** Ciclo de División Celular
- **Cdk:** Quinasa Dependientes de Ciclinas
- **CDKI:** Inhibidores de Kinasa Dependiente de Ciclinas
- **Chk:** Genes de verificación
- **CIS:** Carcinoma "in situ"
- **CTA:** Características Tumorales Adversas
- **CUETO:** Club de Urológico Español de Tratamiento Oncológico
- **CV:** Cáncer Vesical
- **DE:** Desviación estándar
- **DI:** Densidad de Incidencia
- **DNA:** Ácido Desoxirribonucleico
- **E:** Especificidad
- **EAU:** *European Association of Urology*
- **EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético
- **EEUU:** Estados Unidos
- **EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico

- **EGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
- **ELISA:** *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (enzimoinmunoensayo)
- **EORTC:** *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*
- **EPR:** Epirregulina
- **FISH:** Hibridación In Situ Fluorescente
- **FP:** Factor Pronóstico
- **GL:** Grado de Libertad
- **HB-EGF:** EGF de Unión de heparina.
- **HGFs:** Factores de Crecimiento de Unión a la Heparina
- **hMLH1:** Human MutL Homologue 1
- **hMSH2:** Human Mts Homologue 2
- **IC:** Intervalo de Confianza
- **IGF:** Factor de Crecimiento Insulina-like
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **ISUP:** *International Society of Urological Pathology*
- **KM:** Kaplan-Meier
- **LIA:** *Luminescent Immunoassay* (ensayo de inmunoluminiscencia)
- **LR:** Test de Log-Rank
- **LTR:** Long Terminal Repeat
- **MMC:** Mitomicina-C
- **MMP:** Metaloproteinasas
- **mRNA:** Acido Ribonucleico Mensajero
- **MT-MMPs:** Metaloproteinasas de Membrana
- **M-VAC:** Mitomicina, Vinblastina, Adriamicina y Cisplatino
- **NA:** No Alcanzada
- **NAT1:** N-acetiltransferasa 1
- **NAT2:** N-acetiltransferasa 2
- **NCCN:** *National Comprehensive Cancer Network*
- **ND:** No Disponible
- **NGF:** Factor de Crecimiento Neural

- **NMP-22:** Nuclear Matrix Protein 22
- **NRG:** Neuroregulina
- **NS:** No Significativo
- **NUPBPM:** Neoplasia Urotelial Papilar de Bajo Potencial Maligno
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PBS:** *Phosphate Buffered Saline*
- **PCL- γ -1:** Fosfolipasa C Gamma- 1
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PDGF:** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
- **PI3K:** Fosfatidilinositol-3 Kinasa
- **Prev:** Prevalencia.
- **PreOds:** Odds pre-prueba
- **Post Odds +:** Odds Post-prueba Positiva
- **Post Odss -:** Odds Post-prueba Negativa
- **pRb:** Proteína del Retinoblastoma
- **PTEN:** Gen homólogo Fosfatasa y Tensina,
- **RAT:** Región Amino-Terminal.
- **Rb:** Retinoblastoma
- **RCT:** Región Carboxi-Terminal.
- **RIA:** *Radioimmunoassay* (radioinmunoensayo)
- **RNA:** Ácido Ribonucleico
- **RNM:** Resonancia Nuclear Magnética
- **ROC:** Curva Receptor Operador
- **RR:** Riesgo Relativo.
- **RRA:** Razón de riesgo ajustada
- **RRC:** Razón de Riesgo Cruda.
- **RSV:** Virus del Sarcoma de Rous
- **RT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa mediante Transcriptasa Inversa
- **RTU:** Resección Transuretral
- **RTUp:** Resección Transuretral Prostática

- **RTUv:** Resección Transuretral Vesical
- **S:** Sensibilidad
- **SAPK:** Proteín-Kinasa Activada por Stress
- **SEER:** *Surveillance, Epidemiology and End Results*
- **SLE:** Supervivencia Libre de Enfermedad (Recurrencia)
- **SLM:** Supervivencia Libre de Metástasis
- **SLP:** Supervivencia Libre de Progresión
- **STC:** Supervivencia global por Todas las Causas.
- **T:** Tertil
- **T1:** Primer Tertil
- **T2:** Segundo Tertil
- **T3:** Tercer Tertil
- **TAC:** Tomografía Axial Computerizada
- **TGF- β :** Factor- β de crecimiento Transformante β
- **TGF- α :** Factor de crecimiento Transformante α
- **Tis:** Tumor in situ
- **TK:** Tirosina Kinasa.
- **TNF:** Factor de Necrosis Tumoral
- **TVI:** Tumor Vesical Infiltrante
- **TVS:** Tumor Vesical Superficial
- **UE:** Unión Europea
- **UICC:** Unión Internacional Contra el Cáncer
- **UIV:** Urografía Intravenosa
- **VEGF:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
- **VPH:** Papilomavirus Humano
- **VPN:** Valor Predictivo Negativo
- **VPP:** Valor Predictivo Positivo



ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMEN	2
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. PROBLEMÁTICA DEL CÁNCER DE VEJIGA	14
A. EPIDEMIOLOGÍA	14
B. ETIOLOGÍA	25
C. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE VEJIGA	30
D. FACTORES PRONÓSTICO CLÍNICOS DEL TVS	35
D.1. FACTORES PRONÓSTICO BASADOS EN HALLAZGOS CLÍNICOS	35
D.2. FACTORES PRONÓSTICO BASADOS EN HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS.....	37
D.3. FACTORES PRONÓSTICO BASADOS EN HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	38
1.2. AGRUPACIÓN DE LOS TVS EN GRUPOS DE RIESGO Y BÚSQUEDA DE NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO.	45
1.3. BIOLOGÍA TUMORAL	53
A. EL CICLO CELULAR Y SUS MECANISMOS DE REGULACIÓN	54
B. GENES Y CARCINOGENESIS	61
C. ONCOGENES, GENES SUPRESORES Y GENES REPARADORES	62
C.1. ONCOGENES	62
C.2. GENES SUPRESORES.....	69
C.3. GENES REPARADORES	71
1.4. ONCOGENES Y CÁNCER	72
A. ONCOGENES RELACIONADOS CON FACTORES DE CRECIMIENTO	72
A.1. ONCOGÉN <i>C-ERBB-1</i> (EGFR).....	72
A.2. ONCOGÉN <i>C-ERBB-2/HER2/NEU</i>	79
1.5. GENES SUPRESORES Y CÁNCER	81
A. GEN SUPRESOR P53	81
1.6. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS	86



2. HIPÓTESIS	94
3. OBJETIVOS	97
4. MATERIAL Y MÉTODOS	99
4.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL	99
4.2. POBLACIÓN A ESTUDIO	100
4.3. METODOLOGÍA CLÍNICA, ESTUDIOS HISTOLÓGICOS Y CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES	101
A. CONSIDERACIÓN DE FACTORES CLÍNICOS Y TUMORALES	101
B. VALORACIÓN DE LOS HALLAZGOS OPERATORIOS, RASGOS HISTOLÓGICOS Y MARCADORES MOLECULARES	103
B.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	103
B.2. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA.....	103
B.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS TISULARES	104
B.2.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y DE MEMBRANA	107
B.2.2.1. DETERMINACIÓN DE P53.....	107
B.2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA HER2/NEU.	108
B.2.2.3. DETERMINACIÓN DEL EGFR.....	109
B.3. ANÁLISIS DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LAS TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.....	110
C. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD	111
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
4.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	116
5. RESULTADOS	118
5.1. CONSIDERACIÓN DE LOS FACTORES CLÍNICOS Y TUMORALES.	118
5.2. VALORACIÓN DE LOS HALLAZGOS OPERATORIOS, RASGOS HISTOLÓGICOS Y MARCADORES MOLECULARES.	121
A. ESTUDIOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	124
B. ANÁLISIS DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LAS TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.....	131
C. CORRELACION ENTRE LOS DIFERENTES NIVELES DE PROTEINAS OBTENIDOS MEDIANTE TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.	139
5.3. ANÁLISIS DE LA EXACTITUD DIAGNÓSTICA PARA LA PREDICCIÓN DE EVENTOS DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PROTÉICA.	143



5.4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES CON LOS ANTECEDENTES PERSONALES Y LOS FACTORES DE RIESGO CLÁSICOS.	150
5.5. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.	161
5.6. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS DEMOGRÁFICOS Y TUMORALES CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD, LA PROGRESIÓN, EL DESARROLLO DE METÁSTASIS Y LA SUPERVIVENCIA POR TODAS LAS CAUSAS.	162
5.7. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.	176
A. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE).	176
B. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP).	192
C. SUPERVIVENCIA LIBRE DE METÁSTASIS (SLM).	207
D. SUPERVIVENCIA GLOBAL POR TODAS LAS CAUSAS (STC).	222
6. DISCUSIÓN	239
6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.	239
A. JUSTIFICACIÓN	239
A.1. UTILIDAD DEL ESTUDIO DE <i>TP53</i> Y SU PRODUCTO P53 EN EL CÁNCER VESICAL	243
A.2. UTILIDAD DEL ESTUDIO DE C-ERB-2 Y SU PRODUCTO HER2/NEU EN CÁNCER VESICAL	245
A.3. UTILIDAD DEL ESTUDIO DE C-ERB-1 Y SU PRODUCTO EGFR EN EL CÁNCER VESICAL	246
B. DISEÑO	247
6.2. CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS Y ACERCA DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.	255
6.3. CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES.	260
A. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA, ANÁLISIS DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LA TÉCNICA Y ASOCIACIÓN CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE IHQ	260
B. CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES TIPOS DE PROTEÍNAS OBTENIDOS MEDIANTE CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXACTITUD DIAGNÓSTICA PARA LA PREDICCIÓN DE EVENTOS	263
C. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES, ANTECEDENTES PERSONALES Y FACTORES DE RIESGO CLÁSICOS.	268
E. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES, Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.	274
7. CONCLUSIONES	282
8. BIBLIOGRAFÍA	284
10. ANEXOS.	309



ÍNDICE DE FIGURAS QUE APARECEN EN EL TEXTO:

Figura 1: Tasa de incidencia anual del cáncer vesical en EEUU global, y desglosada por sexos (pg.17).

Figura 2: Incidencia del cáncer vesical en EEUU según diferentes grupos etarios, global, y desglosada por sexo (pg.18).

Figura 3: Tasa de incidencia anual del cáncer vesical en EEUU global, y desglosada por raza (pg.20).

Figura 4: Tasa de mortalidad ajustada del cáncer vesical en EEUU global, y desglosada por sexo (pg.24).

Figura 5: Múltiples vías de desarrollo del CCT (pg.33).

Figura 6: Alteraciones genéticas en el desarrollo del CCT (pg.34).

Figura 7: Gradación del carcinoma vesical según la clasificación de Broders (pg.41).

Figura 8: Estadificación del tumor primario según la clasificación TNM (pg.43).

Figura 9: Fases del ciclo celular y acontecimientos que se producen en cada una de ellas (pg.55).

Figura 10: Mecanismos de activación de los oncogenes (pg.68).

Figura 11: Modelo de receptor de la familia c-erb (pg.76).

Figura 12: Familia de receptores c-erbB. Ligandos activadores y porcentaje de homología relativa a EGFR del componente extracelular (%), la región tirosina-kinasa (%) y la región carboxi-terminal (%), respectivamente (pg.76).

Figura 13: Modo de activación de la familia erbB y vías intracitoplasmáticas derivadas de la misma (pg.77).

Figura 14: Ligandos específicos de los dímeros de la familia erbB y sus índices de proliferación relativos (pg.77).

Figura 15: Estructura tridimensional de la proteína p53 (pg.83).

Figura 16: Esquematación de la estructura tetramérica de la proteína p53 ligada a DNA (pg.83).

Figura 17: Efectos de la activación y la inactivación funcional de p53 (pg.85).

Figura 18: Proceso de preparación de las muestras tisulares (pg.106).

Figura 19: Distribución de la serie de TVS en función del sexo (%) (pg.120).



- Figura 20:** Distribución de la serie de TVS en función de la presencia de antecedentes familiares (%) (pg.120).
- Figura 21:** Distribución de la serie de TVS en función del hábito tabáquico (%) (pg.120).
- Figura 22:** Distribución de la serie de TVS en función del hábito enólico (%) (pg.120).
- Figura 23:** Distribución de la serie de TVS en función de la presencia de sintomatología al diagnóstico (%) (pg.120).
- Figura 24:** Distribución de la serie de TVS en función del número de tumores (%) (pg.122).
- Figura 25:** Distribución de la serie de TVS en función del aspecto endoscópico (%) (pg.122).
- Figura 26:** Distribución de la serie de TVS en función del tamaño tumoral (%) (pg.122).
- Figura 27:** Distribución de la serie de TVS en función del grado de diferenciación celular (%) (pg.122).
- Figura 28:** Distribución de la serie de TVS en función del estadio tumoral (%) (pg.122).
- Figura 29:** Representación gráfica de los valores de p53 RIA en TVS frente a Controles Negativos y Controles Positivos (pg.128).
- Figura 30:** Representación gráfica de los valores de HER2/neu ELISA en TVS frente a Controles Negativos y Controles Positivos (pg.129).
- Figura 31:** Representación gráfica de los valores de EGFR RIA en TVS frente a Controles Negativos y Controles Positivos (pg.130).
- Figura 32:** Representación gráfica de los valores de p53 LIA para cada nivel de tinción p53 IHQ (pg.132).
- Figura 33:** Representación gráfica de los valores de HER2/neu ELISA para cada nivel de tinción HER2/neu IHQ (pg.134).
- Figura 34:** Representación gráfica de los valores de EGFR RIA para cada nivel de tinción EGFR IHQ (pg.136).
- Figura 35:** Tinción IHQ para p53 tumor de bajo grado, nivel de tinción 0 (pg.137).
- Figura 36:** Tinción IHQ para p53 tumor de bajo grado, nivel de tinción + (pg.137).
- Figura 37:** Tinción IHQ para p53 tumor de bajo grado, nivel de tinción ++ (pg.137).
- Figura 38:** Tinción IHQ para p53 tumor de alto grado, nivel de tinción + (pg.137).
- Figura 39:** Tinción IHQ para p53 tumor de alto grado, nivel de tinción +++ (pg.138).
- Figura 40:** Tinción IHQ para HER 2/neu en tejido urotelial sano, nivel de tinción 0 (pg.138).
- Figura 41:** Tinción IHQ para HER2/neu en tumor de alto grado, nivel de tinción +++ (pg.138).
- Figura 42:** Tinción IHQ para EGFR en tumor vesical, nivel de tinción +++ (pg.138).



- Figura 43:** Distribución en diagrama de nube de puntos de los valores de p53 LIA y HER2/neu ELISA (pg.140).
- Figura 44:** Recta de regresión calculada para los valores de p53 LIA y HER2/neu ELISA (pg.140).
- Figura 45:** Distribución en diagrama de nube de puntos de los valores de p53 LIA y EGFR RIA (pg.141).
- Figura 46:** Recta de regresión calculada para los valores de p53 LIA y EGFR RIA (pg.141).
- Figura 47:** Distribución en diagrama de nube de puntos de los valores de HER2/neu ELISA y EGFR (pg.142).
- Figura 48:** Recta de regresión calculada para los valores de p53 LIA y EGFR RIA (pg.142).
- Figura 49:** Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de recidiva de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA (pg.144).
- Figura 50:** Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de progresión de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA (pg.145).
- Figura 51:** Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de metástasis de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA (pg.146).
- Figura 52:** Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de muerte de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA (pg.147).
- Figura 53:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE global (pg.178).
- Figura 54:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del género (pg.179).
- Figura 55:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función de la edad (pg.180).
- Figura 56:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del aspecto tumoral (pg.181).
- Figura 57:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del número de tumores (pg.182).
- Figura 58:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tamaño tumoral (pg.183).
- Figura 59:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del grado de diferenciación (pg.184).
- Figura 60:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del estadio tumoral (pg.185).
- Figura 61:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.186).
- Figura 62:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tercil de p53 LIA (pg.187).
- Figura 63:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tercil de HER2/neu (pg.188).
- Figura 64:** Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tercil de EGFR (pg.189).
- Figura 65:** Curva de Kaplan-Meier para la SLP global (pg.193).
- Figura 66:** Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del género (pg.194).



- Figura 67:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función de la edad (pg.195).
- Figura 68:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del aspecto tumoral (pg.196).
- Figura 69:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del número de tumores (pg.197).
- Figura 70:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del tamaño tumoral (pg.198).
- Figura 71:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del grado de diferenciación (pg.199).
- Figura 72:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del estadio tumoral (pg.200).
- Figura 73:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.201).
- Figura 74:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del tercil de p53 LIA (pg.202).
- Figura 75:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del tercil de HER2/neu (pg.203).
- Figura 76:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del tercil de EGFR (pg.204).
- Figura 77:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM global (pg.208).
- Figura 78:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del género (pg.209).
- Figura 79:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función de la edad (pg.210).
- Figura 80:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del aspecto tumoral (pg.211).
- Figura 81:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del número de tumores (pg.212).
- Figura 82:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del tamaño tumoral (pg.213).
- Figura 83:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del grado de diferenciación (pg.214).
- Figura 84:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del estadio tumoral (pg.215).
- Figura 85:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.216).
- Figura 86:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del tercil de p53 LIA (pg.217).
- Figura 87:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del tercil de HER2/neu (pg.218).
- Figura 88:** Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del tercil de EGFR (pg.219).
- Figura 89:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC global (pg.224).
- Figura 90:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del género (pg.225).
- Figura 91:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función de la edad (pg.226).
- Figura 92:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del aspecto tumoral (pg.227).
- Figura 93:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del número de tumores (pg.228).
- Figura 94:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del tamaño tumoral (pg.229).
- Figura 95:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del grado de diferenciación (pg.230).
- Figura 96:** Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del estadio tumoral (pg.231).



Figura 97: Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.232).

Figura 98: Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del tercil de p53 LIA (pg.233).

Figura 99: Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del tercil de HER2/neu (pg.234).

Figura 100: Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del tercil de EGFR (pg.235).

**ÍNDICE DE TABLAS QUE APARECEN EN EL TEXTO:**

Tabla I: Variación en la incidencia porcentual anual (APC) del cáncer vesical según datos de la SEER entre 1975-2012 (pg.21).

Tabla II: Variación en la mortalidad porcentual anual (APC) del cáncer vesical según datos de la SEER entre 1975-2013 (pg.23).

Tabla III: Agentes implicados en la aparición del cáncer vesical (pg.29).

Tabla IV: Clasificación TNM de la UICC (pg.44).

Tabla V: Clasificación en grupos de riesgo de progresión y mortalidad cáncer específica para la CCAFU (pg.50).

Tabla VI: Clasificación en grupos de riesgo según Millán-Rodríguez et al, con porcentajes de recurrencia, progresión y mortalidad, y RR de la misma (pg.50).

Tabla VII: Peso de los factores de riesgo de recurrencia y progresión según EORTC (pg.51).

Tabla VIII: Probabilidad de recurrencia y progresión según la puntuación total de la EORTC (pg.51).

Tabla IX: Peso de los factores de riesgo de recurrencia y progresión según CUETO (pg.52).

Tabla X: Porcentaje de estudios que demuestran asociación estadísticamente significativa entre niveles aumentados de EGFR y disminución de la supervivencia (n = número de estudios publicados) (pg.79).

Tabla XI: Funciones de la proteína p53 y efectos de su inactivación (pg.84).

Tabla XII: Características clínicas e histológicas de los pacientes del grupo de TVS (pg.123).

Tabla XIII: Proporción de muestras con determinaciones de cada uno de los marcadores tumorales (p53, EGFR y HER2/neu) en TVS, Controles Positivos y Controles Negativos (pg.125).

Tabla XIV: Media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en el grupo de control negativo (pg.126).

Tabla XV: Media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en el grupo de TVS (pg.126).

Tabla XVI: Media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en el grupo de control positivo (pg.126).



Tabla XVII: Comparación de media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en TVS frente a Controles Positivos y Controles Negativos (pg.127).

Tabla XVIII: Distribución de tertiles (p33,3) para los diferentes marcadores tumorales (p53, EGFR, HER2/neu) (pg.148).

Tabla XIX: Cálculo de S, E, VPP; VPN, Pre Odds, Post Odds +, Post Odds – y Prev de recidiva, progresión, metástasis y muerte para la agrupación de Tertiles de p53, HER2/neu, y EGFR (pg.149).

Tabla XX: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el género y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.151).

Tabla XXI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el género y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.151).

Tabla XXII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el género y los diferentes tertiles del EGFR (pg.151).

Tabla XXIII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el grupo etario y los diferentes tertiles de la proteína p53

Tabla XXIV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el grupo etario y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.152).

Tabla XXV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el grupo etario y los diferentes tertiles del EGFR (pg.152).

Tabla XXVI: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre los antecedentes familiares y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.152).

Tabla XXVII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre los antecedentes familiares y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.152).

Tabla XXVIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre los antecedentes familiares y los diferentes tertiles del EGFR (pg.153).

Tabla XXIX: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.153).

Tabla XXX: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.153).

Tabla XXXI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles del EGFR (pg.153).

Tabla XXXII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles del EGFR, agrupados T1 y T2 (pg.154).



Tabla XXXIII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.154).

Tabla XXXIV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.154).

Tabla XXXV: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles del HER2/neu agrupados T2 y T3 (pg.154).

Tabla XXXVI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles del EGFR (pg.155).

Tabla XXXVII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el motivo de diagnóstico y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.155).

Tabla XXXVIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el motivo de diagnóstico y los diferentes tertiles de EGFR (pg.155).

Tabla XXXIX: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el aspecto tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.155).

Tabla XXXX: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el aspecto tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.156).

Tabla XLI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el aspecto tumoral y los diferentes tertiles de EGFR (pg.156).

Tabla XLII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre la multiplicidad y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.156).

Tabla XLIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre la multiplicidad y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.156).

Tabla XLIV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre la multiplicidad y los diferentes tertiles del EGFR (pg.157).

Tabla XLV: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el tamaño tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53.

Tabla XLVI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tamaño tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.157).

Tabla XLVII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tamaño tumoral y los diferentes tertiles de EGFR (pg.157).

Tabla XLVIII: Tabla de 2x3 para valorar asociación entre el grado tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.157).



Tabla XLIX: Tabla de 3x3 para valorar asociación entre el grado tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.158).

Tabla XLX: Tabla de 3x3 para valorar asociación entre el grado tumoral y los diferentes tertiles de EGFR (pg.158).

Tabla L: Tabla de 3x3 para valorar asociación entre el grado tumoral y los diferentes tertiles de EGFR (pg.158).

Tabla LI: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el estadio tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.159).

Tabla LII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el estadio tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.159).

Tabla LIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el estadio tumoral y los diferentes tertiles de EGFR (pg.159).

Tabla LIV: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el tratamiento adyuvante y los diferentes tertiles de la proteína p53 (pg.159).

Tabla LV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tratamiento adyuvante y los diferentes tertiles del HER2/neu (pg.160).

Tabla LVI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tratamiento adyuvante y los diferentes tertiles del EGFR (pg.160).

Tabla LVII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del género (pg.164).

Tabla LVIII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del grupo etario (pg.164).

Tabla LIX: Análisis univariante. Número de recidivas en función del aspecto tumoral (pg.164).

Tabla LX: Análisis univariante. Número de recidivas en función del número de tumores (pg.164).

Tabla LXI: Análisis univariante. Número de recidivas en función del tamaño tumoral (pg.165).

Tabla LXII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del grado de diferenciación celular (pg.165).

Tabla LXIII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del estadio tumoral (pg.165).

Tabla LXIV: Análisis univariante. Número de recidivas en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.165).

Tabla LXV: Análisis univariante. Número de recidivas en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles) (pg.166).

Tabla LXVI: Análisis univariante. Número de recidivas en función de los niveles de HER2/neu ELISA (Tertiles) (pg.166).



Tabla LXXVII: Análisis univariante. Número de recidivas en función de los niveles de EGFR RIA (Tertiles) (pg.166).

Tabla LXXVIII: Análisis univariante. Número de progresiones en función del género (pg.167).

Tabla LXXIX: Análisis univariante. Número de progresiones en función del grupo etario (pg.167).

Tabla LXX: Análisis univariante. Número de progresiones en función del aspecto tumoral (pg.167).

Tabla LXXI: Análisis univariante. Número de progresiones en función del número de tumores (pg.167).

Tabla LXXII: Análisis univariante. Número de progresiones en función del tamaño tumoral (pg.168).

Tabla LXXIII: Análisis univariante. Número de progresiones en función del grado de diferenciación celular (pg.168).

Tabla LXXIV: Análisis univariante. Número de progresiones en función del estadio tumoral (pg.168).

Tabla LXXV: Análisis univariante. Número de progresiones en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.168).

Tabla LXXVI: Análisis univariante. Número de progresiones en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles) (pg.169).

Tabla LXXVII: Análisis univariante. Número de progresiones en función de los niveles de HER2/neu ELISA (Tertiles) (pg.169).

Tabla LXXVIII: Análisis univariante. Número de progresiones en función de los niveles de EGFR RIA (Tertiles) (pg.169).

Tabla LXXIX: Análisis univariante. Número de metástasis en función del género (pg.170).

Tabla LXXX: Análisis univariante. Número de metástasis en función del grupo etario (pg.170).

Tabla LXXXI: Análisis univariante. Número de metástasis en función del aspecto tumoral (pg.170).

Tabla LXXXII: Análisis univariante. Número de metástasis en función del número de tumores (pg.170).

Tabla LXXXIII: Análisis univariante. Número de metástasis en función del tamaño tumoral (pg.171).

Tabla LXXXIV: Análisis univariante. Número de metástasis en función del grado de diferenciación celular (pg.171).

Tabla LXXXV: Análisis univariante. Número de metástasis en función del estadio tumoral (pg.171).

Tabla LXXXVI: Análisis univariante. Número de metástasis en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.171).

Tabla LXXXVII: Análisis univariante. Número de metástasis en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles) (pg.172).



- Tabla LXXXVIII:** Análisis univariante. Número de metástasis en función de los niveles de HER2/neu ELISA (Tertiles) (pg.172).
- Tabla LXXXIX:** Análisis univariante. Número de metástasis en función de los niveles de EGFR RIA (Tertiles) (pg.172).
- Tabla XC:** Análisis univariante. Número de muertes en función del género (pg.173).
- Tabla XCI:** Análisis univariante. Número de muertes en función del grupo etario (pg.173).
- Tabla XCII:** Análisis univariante. Número de muertes en función del aspecto tumoral (pg.173).
- Tabla XCIII:** Análisis univariante. Número de muertes en función del número de tumores (pg.173).
- Tabla XCIV:** Análisis univariante. Número de muertes en función del tamaño tumoral (pg.174).
- Tabla XCV:** Análisis univariante. Número de muertes en función del grado de diferenciación celular (pg.174).
- Tabla XCVI:** Análisis univariante. Número de muertes en función del estadio tumoral (pg.174).
- Tabla XCVII:** Análisis univariante. Número de muertes en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.174).
- Tabla XCVIII:** Análisis univariante. Número de muertes en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles) (pg.175).
- Tabla XCIX:** Análisis univariante. Número de muertes en función de los niveles de HER2/neu ELISA (Tertiles) (pg.175).
- Tabla C:** Análisis univariante. Número de muertes en función de los niveles de EGFR RIA (Tertiles) (pg.175).
- Tabla CI:** Tabla de vida para la SLE global (pg.178).
- Tabla CII:** Tabla de vida para la SLE en función del género (pg.179).
- Tabla CIII:** Tabla de vida para la SLE en función de la edad (pg.180).
- Tabla CIV:** Tabla de vida para la SLE en función del aspecto tumoral (pg.181).
- Tabla CV:** Tabla de vida para la SLE en función del número de tumores (pg.182).
- Tabla CVI:** Tabla de vida para la SLE en función del tamaño tumoral (pg.183).
- Tabla CVII:** Tabla de vida para la SLE en función del grado de diferenciación (pg.184).
- Tabla CVIII:** Tabla de vida para la SLE en función del estadio tumoral (pg.185).
- Tabla CIX:** Tabla de vida para la SLE en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.186).
- Tabla CX:** Tabla de vida para la SLE en función del tercil de p53 LIA (pg.187).
- Tabla CXI:** Tabla de vida para la SLE en función del tercil de HER2/neu (pg.188).
- Tabla CXII:** Tabla de vida para la SLE en función del tercil de EGFR (pg.189).



- Tabla CXIII:** Tabla de vida para la SLE (pg.190).
- Tabla CXIV:** SLE en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de LR (pg.191).
- Tabla CXV:** Tabla de vida para la SLP global (pg.193).
- Tabla CXVI:** Tabla de vida para la SLP en función del género (pg.194).
- Tabla CXVII:** Tabla de vida para la SLP en función de la edad (pg.195).
- Tabla CXVIII:** Tabla de vida para la SLP en función del aspecto tumoral (pg.196).
- Tabla CXIX:** Tabla de vida para la SLP en función del número de tumores (pg.197).
- Tabla CXX:** Tabla de vida para la SLP en función del tamaño tumoral (pg.198).
- Tabla CXXI:** Tabla de vida para la SLP en función del grado de diferenciación (pg.199).
- Tabla CXXII:** Tabla de vida para la SLP en función del estadio tumoral (pg.200).
- Tabla CXXIII:** Tabla de vida para la SLP en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.201).
- Tabla CXXIV:** Tabla de vida para la SLP en función del tercil de p53 LIA (pg.202).
- Tabla CXXV:** Tabla de vida para la SLP en función del tercil de HER2/neu (pg.203).
- Tabla CXXVI:** Tabla de vida para la SLP en función del tercil de EGFR (pg.204).
- Tabla CXXVII:** Tabla de vida para la SLP (pg.205).
- Tabla CXXVIII:** SLP en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de LR (pg.206).
- Tabla CXXIX:** Tabla de vida para la SLM global (pg.208).
- Tabla CXXX:** Tabla de vida para la SLM en función del género (pg.209).
- Tabla CXXXI:** Tabla de vida para la SLM en función de la edad (pg.210).
- Tabla CXXXII:** Tabla de vida para la SLM en función del aspecto tumoral (pg.211).
- Tabla CXXXIII:** Tabla de vida para la SLM en función del número de tumores (pg.212).
- Tabla CXXXIV:** Tabla de vida para la SLM en función del tamaño tumoral (pg.213).
- Tabla CXXXV:** Tabla de vida para la SLM en función del grado de diferenciación (pg.214).
- Tabla CXXXVI:** Tabla de vida para la SLM en función del estadio tumoral (pg.215).
- Tabla CXXXVII:** Tabla de vida para la SLM en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.216).
- Tabla CXXXVIII:** Tabla de vida para la SLM en función del tercil de p53 LIA (pg.217).
- Tabla CXXXIX:** Tabla de vida para la SLM en función del tercil de HER2/neu (pg.218).
- Tabla CXL:** Tabla de vida para la SLM en función del tercil de EGFR (pg.219).
- Tabla CXLII:** Tabla de vida para la SLM (pg.220).



Tabla CXLII: SLM en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de LR (pg.221).

Tabla CXLIII: Tabla de vida para la STC global (pg.224).

Tabla CXLIV: Tabla de vida para la STC en función del género (pg.225).

Tabla CXLV: Tabla de vida para la STC en función de la edad (pg.226).

Tabla CXLVI: Tabla de vida para la STC en función del aspecto tumoral (pg.227).

Tabla CXLVII: Tabla de vida para la STC en función del número de tumores (pg.228).

Tabla CXLVIII: Tabla de vida para la STC en función del tamaño tumoral (pg.229).

Tabla CXLIX: Tabla de vida para la STC en función del grado de diferenciación (pg.230).

Tabla CL: Tabla de vida para la STC en función del estadio tumoral (pg.231).

Tabla CLI: Tabla de vida para la STC en función del empleo de tratamiento adyuvante (pg.232).

Tabla CLII: Tabla de vida para la STC en función del tercil de p53 LIA (pg.233).

Tabla CLIII: Tabla de vida para la STC en función del tercil de HER2/neu (pg.234).

Tabla CLIV: Tabla de vida para la STC en función del tercil de EGFR (pg.235).

Tabla CLV: Tabla de vida para la STC (pg.236).

Tabla CLVI: STC en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de LR (pg.237).

Tabla CLVII: FP moleculares emergentes en el TVS (pg.242).



Resumen/Summary



RESUMEN

INTRODUCCION

El 70-80% de los carcinomas de células transicionales (CCT) son superficiales (TVS) en el momento del diagnóstico inicial. La explicación al hecho conocido de que algunos TVS que parecen presentar una histología desfavorable tengan un comportamiento inofensivo, mientras que otros tumores de una histología en principio más favorable muestren un comportamiento más agresivo, sigue siendo a día de hoy una incógnita. Este hecho hace que la búsqueda de nuevos criterios capaces de definir precozmente el potencial biológico de un tumor sea poco menos que una necesidad. Los trabajos realizados sobre las alteraciones de las proteínas p53, HER2/neu y EGFR en distintas neoplasias han aportado datos de gran importancia y han establecido nuevos factores pronóstico (FP) en esos tumores, justificando la realización de estudios que traten de relacionar estas alteraciones moleculares con las características del CCT y con la evolución clínica del mismo.

HIPÓTESIS:

La hipótesis conceptual de este trabajo supone que el nivel de la concentración de las proteínas EGFR, HER2/neu y p53 en el tejido tumoral es distinto en individuos sanos, en pacientes con tumores vesicales infiltrantes (TVI) y en pacientes con TVS, y que dentro del conjunto de estos últimos, su determinación es capaz de mejorar el rendimiento de los criterios clínicos, histológicos tradicionales, y de los análisis semicuantitativos a la hora de establecer un subgrupo de pacientes con alto riesgo de desarrollar recidiva, progresión tumoral, o fallecer por este tipo de neoplasia.

Para este fin, se desarrollaron las siguientes hipótesis operativas:

- Las técnicas de cuantificación proteica son eficaces para determinar la concentración de proteína existente en el tejido analizado.



- El aumento de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR en el CCT expresan el nivel de alteración del ciclo celular de las células que los producen.
- La determinación cuantitativa de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR es concordante con los resultados obtenidos mediante otras determinaciones de fiabilidad ya contrastada.
- El análisis cuantitativo de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR presenta niveles de exactitud diagnóstica suficientes como para ser considerados marcadores moleculares pronósticos del TVS.
- El análisis cuantitativo de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR permite predecir la posibilidad de recidiva, progresión, metástasis y muerte del TVS, dividiendo a éstos en distintos grupos riesgo, y existe un nivel determinable, a partir del cual, la sobreexpresión de p53, HER2/neu y EGFR en el tejido tumoral, conlleva un mayor riesgo de desarrollar dichos eventos.

OBJETIVOS:

Investigar si las diferentes técnicas de cuantificación proteica son de utilidad en la caracterización molecular de los TVS y si esto sucede, tratar de averiguar si dentro de ellos, nos permiten distinguir de entre los TVS aquellos que tendrán un comportamiento biológico distinto.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Determinar por métodos cuantitativos las concentraciones de los marcadores moleculares (proteínas p53, HER2/neu, y EGFR) en el tejido neoplásico de los TVS, en el tejido urotelial sano, y en los TVI, y valorar si existe diferencia alguna entre ellas.
2. Contrastar la fiabilidad de la cuantificación proteica mediante la comparación de las técnicas con otra de fiabilidad ya contrastada (resultados de la tinción IHQ para esas proteínas).



3. Evaluar la exactitud diagnóstica de la determinación de los niveles tisulares de p53, HER2/neu y EGFR usando diferentes métodos de cuantificación, a la hora de predecir recidiva, progresión, diseminación metastásica y muerte en el grupo de los TVS.
4. Conocer la relación existente entre la concentración de los diferentes marcadores moleculares, y los FP clínicos e histopatológicos de los TVS.
5. Analizar el valor pronóstico de los marcadores moleculares en términos de recurrencia, progresión, y supervivencia global de los pacientes afectados de TVS.

MATERIAL Y METODOS

Se analizaron muestras de 45 pacientes sometidos a RTUv por TVS debutante sin presencia de CIS concomitante, llevando a cabo una cuantificación de los niveles de p53, HER2/neu y EGFR (34 con p53, HER2/neu y EGFR y 11 con p53 y HER2/neu exclusivamente). La proteína p53 fue cuantificada en el citosol mediante una técnica de inmunoluminiscencia (LIA), la determinación de la proteína HER2/neu se realizó mediante un ensayo de inmunoenzimas (ELISA) y la cuantificación del EGFR se llevó a cabo mediante radioinmunoensayo (RIA).

Para establecer el potencial biológico de la técnica se utilizaron dos grupos de control: el grupo Control Negativo, con 20 pacientes afectados de hiperplasia prostática benigna (HPB) sometidos a resección transuretral de próstata (RTUp) y el grupo Control Positivo, 14 pacientes sometidos a RTUv por TVI, analizando el rendimiento de la cuantificación molecular frente a la inmunohistoquímica convencional (IHQ), con una determinación IHQ clásica.

El seguimiento postoperatorio de los pacientes con TVS consistió en la recogida periódica de signos y síntomas, estudios radiológicos y endoscópicos, y pruebas citológicas periódicas, y a partir de ello, se analizaron la supervivencia libre de enfermedad (SLE), la supervivencia libre de progresión (SLP), la supervivencia libre de metástasis (SLM) y la supervivencia global (STC).



RESULTADOS:

No se detectó cantidad alguna de p53 en ninguno de los Controles Negativos (0,0 ng/mg, DE 0,0 ng/mg). La concentración media de p53 en los TVS fue de 0,36 ng/mg (DE 0,89 ng/mg), mientras que en los Controles Positivos fue de 2,55 ng/mg (DE 2,21 ng/mg).

La concentración media de HER2/neu en los Controles Negativos fue de 122,08 HNU/mg (DE 84,20 HNU/mg), en los TVS fue de 944,48 HNU/mg (DE 555,05) y para los Controles Positivos fue prácticamente igual que para los TVS (944,64 HNU/mg DE 833,11 HNU/mg)

Para EGFR, la concentración media de los Controles Negativos fue de 2,54 fmol/mg (DE 1,64 fmol/mg), mientras que para los TVS fue de 10,05 fmol/mg (DE 10,86 fmol/mg) y para los Controles Positivos fue de 28,96 fmol/mg (DE 17,83 fmol/mg)

Las diferencias de concentraciones en tejido vesical de pacientes con TVS frente a Controles Negativos fueron estadísticamente significativas en la cuantificación de los 3 marcadores. Las diferencias de concentraciones en pacientes con TVS frente a Controles Positivos fueron estadísticamente significativas para p53 y EGFR, no existiendo diferencias en cuanto a HER2/neu,

Se observó una relación estadísticamente significativa a la asociación entre los niveles de p53-IHQ y de p53-LIA, HER2/neu IHQ y HER2/neu ELISA, y EGFR IHQ y EGFR RIA. El grado de significación hallado, indica que el nivel de las proteínas cuantificadas presenta una tendencia creciente con el nivel de tinción IHQ ($p < 0,001$).

No se detectó correlación significativa entre los niveles de p53 LIA y HER2/neu ELISA ($R=0,421$; $p=0,092$). Se detectó correlación positiva significativa débil ($R=0,327$; $p<0,01$) entre las determinaciones de p53 RIA y EGFR RIA. Se detectó correlación positiva significativa débil ($R=0,267$; $p<0,05$) entre las determinaciones de HER2/neu ELISA y EGFR RIA.

Se evidenció una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$ entre el consumo crónico de tabaco y la expresión disminuida de la proteína EGFR en el estudio de RIA al agrupar los tertiles inferiores (T1 y T2). También mostró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a la asociación entre el consumo crónico de alcohol y la expresión aumentada de la proteína HER2/neu



en el estudio de ELISA al agrupar los tertiles superiores (T2 y T3). Se observó también una tendencia a la asociación de estadística entre el consumo de tabaco y la sobreexpresión de p53 ($p=0,09$).

En el análisis de resto de parámetros tanto a nivel de hábitos tóxicos (consumo de alcohol o tabaco) como de factores de riesgo clásicos (multiplicidad, grado, estadio, tamaño, tratamiento adyuvante) como de otros posibles factores (sexo, edad, antecedentes familiares, sintomatología) no se observó ninguna relación estadísticamente relevante con los niveles de expresión de proteínas aparte del expresado.

Tras un seguimiento promedio de 82 meses, se detectó recidiva en un total de veinte pacientes (44,4%) (Densidad de de Incidencia (DI): 6,45 pacientes recidivados por 100 pacientes/año), progresión en seis pacientes (6/45=13,3%) progresaron (DI: 1,93 progresiones por 100 pacientes/año). En 4 pacientes (8,8%) se detectaron metástasis (DI: 1,3 por 100 pacientes/año). Dieciocho pacientes fallecieron durante el seguimiento (40%). (DI: 5,81 muertes por 100 pacientes/año).

Ninguno de los marcadores estudiados, fue capaz de discernir grupos de riesgo ni para SLE, SLP, SLM o SG. Únicamente el género para la recidiva y la edad para la SG, se mostraron como factores de riesgo independientes.

CONCLUSIONES:

Las técnicas LIA, ELISA, y RIA permiten cuantificar de un modo fiable la cantidad de proteínas p53, HER2/neu y EGFR presentes en las muestras obtenidas mediante RTUv y los resultados obtenidos mediante estas técnicas son concordantes con los obtenidos mediante IHQ.

La concentración de los marcadores p53, EGFR y HER2/neu en el TVS es significativamente mayor a la detectada en el tejido vesical sano y significativamente inferior a la detectada en el TVI (a excepción de la concentración de HER2/neu que es prácticamente igual que en este último).

Existe una correlación positiva significativa débil entre los niveles de p53 y los de EGFR, y entre los niveles de HER2/neu y los niveles de EGFR en los TVS.



Existe asociación significativa entre el consumo crónico de alcohol y la expresión aumentada de la proteína HER2/neu y el consumo crónico de tabaco y la expresión disminuida de EGFR en los pacientes con TVS. Existe también una tendencia estadística ($p = 0,095$) a la asociación entre el consumo crónico de tabaco y expresión aumentada de la proteína p53 en los pacientes con TVS. La cuantificación de p53, EGFR y HER2/neu no parece tener valor clínicamente relevante para la predicción de recidiva, progresión tumoral, metastatización o supervivencia de los pacientes con TVS.



SUMMARY

INTRODUCTION:

Between 70-80% of transitional cell carcinomas (TCC) are non-muscle-invasive (NMIBC) at the moment of initial diagnosis. The explanation of the well known fact that some NMIBC with an a priori unfavorable histology have a harmless behavior, while others NMIBC with a more favorable histology show more aggressive behavior, nowadays remains being unknown. This fact makes the search for new criteria capable of defining the biological potential of a tumor is nothing short of importance. Several studies about the changes of p53 protein, HER2/neu and EGFR in various malignancies have provided data of great importance and have set new prognostic factors (PF) in those tumors, justifying studies to establish relations between these molecular changes with clinical features of TCC and its clinical outcome.

HYPOTHESIS:

The conceptual hypothesis assumes that p53, HER2/neu and EGFR levels in tumor tissue are different in healthy people, in NMIBC patients, and in MIBC patients, and subsequently, p53, HER2/neu and EGFR determinations will be able to improve the performance of clinical, histological traditional criteria, and semiquantitative analysis for establishing a subgroup of patients with NMIBC at high risk for recurrence, tumor progression, or death because this kind of neoplasm.

For this purpose, the following operational hypotheses were developed:

- The protein quantification techniques are effective in determining the protein concentrations in the analyzed tissue.
- The increasing concentrations of p53, HER2/neu and EGFR in TCC express the level of the cell cycle alteration at the cells that produces them.



- The quantitative determinations of p53, HER2/neu and EGFR concentrations are consistent with the results obtained by other determinations with a proven reliability.
- The quantitative analyses of p53, HER2/neu and EGFR concentrations have an adequate diagnostic accuracy for being considered NMIBC molecular markers.
- The quantitative analyses of p53, HER2/neu and EGFR concentrations may predict the possibility of recurrence, progression, metastatic disease or death of NMIBC, dividing them into groups with different risk for developing such events. There is a quantifiable level of p53, HER2/neu and EGFR overexpression in tumor tissue that carries an increased risk for developing those events.

OBJECTIVES:

To investigate whether different protein quantification techniques are useful in the molecular characterization of NMIBC and if this happens, to try to find out if this characterization allows us to distinguish within the NMIBC group, a subgroup of tumors with a different biological behavior.

The specific objectives of this study are:

1. To determine the concentration of molecular markers p53, HER2/neu and EGFR by quantitative methods, in healthy urothelial tissue, in the neoplastic tissue of the NMIBC, and in MIBC tissue, and thus, to assess whether there is any difference between these concentrations.
2. To determinate the reliability of protein quantification by comparing them with other techniques of proven reliability (IHC staining).
3. To evaluate the diagnostic accuracy of determining tissue levels of p53, HER2/neu and EGFR, using diverse quantization methods, for predicting recurrence, progression, metastatic spread and death among NMIBC.
4. To know the relationships between the concentrations of these molecular markers and clinical and histopathological PF of NMIBC.



5. To analyze the prognostic value of these molecular markers in terms of recurrence, progression, and overall survival of patients with NMIBC.

MATERIAL AND METHODS:

There were performed a quantification of p53, HER2/neu and EGFR levels to 45 samples from patients undergoing TURB because of primary NMIBC without concomitant presence of CIS, (34 p53 HER2/neu and EGFR, and 45 and p53 HER2/neu only). p53 protein was quantified by an immunoluminescence technique (LIA), HER2/neu protein determinations were performed using an enzyme immunoassay (ELISA), and EGFR quantification was carried out by radioimmunoassay technique (RIA).

To establish the biological potential of these techniques, two control groups were used, analyzing the molecular quantification performance versus a conventional immunohistochemistry (IHC) classical determination. The negative control group was composed by 20 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) undergoing transurethral resection of the prostate (TURP), and the positive control group was composed by 14 patients undergoing TURB because of MIBC.

Postoperative follow-up of NMIBC subjects consisted on a regular signs and symptoms compilation, radiological and endoscopic studies, and regular urinary cytologies Disease-free survival (DFS), progression-free survival (PFS), metastatic disease free survival (MDFS) and overall survival (OS) were analyzed.

RESULTS:

No amount of p53 was detected in any of the negative controls (0.0 ng/mg; SD 0.0 ng/mg). The mean concentration of p53 in the NMIBC group was 0.36 ng/mg (SD 0.89 ng/mg), whereas in the positive control group was 2.55 ng/mg (SD 2.21 ng/mg).

The average concentration of HER2/neu in the negative control group was 122.08 HNU/mg (SD 84.20 HNU/mg) in the NMIBC group was 944.48 HNU/mg (SD 555.05 HNU/mg) and for the positive control group was virtually unchanged for NMIBC (944.64 HNU/mg; SD 833.11 HNU/mg).



Regarding the EGFR, the average concentration in the negative control group was 2.54 fmol/mg (SD 1.64 fmol/mg), whereas for the NMIBC group was 10.05 fmol/mg (SD 10.86 fmol/mg) and for the positive control group was 28.96 fmol/mg (SD 17.83 fmol/mg).

The concentration differences in the bladder tissue from patients with NMIBC against negative controls were statistically significant for the three quantified markers. The concentration differences between patients with NMIBC versus Positive Controls were statistically significant for p53 and EGFR, with no differences for HER2/neu,

A statistically significant relationship for the association between levels of p53-IHC with p53 LIA, HER2/neu IHC with HER2/neu ELISA; and EGFR IHC with EGFR RIA was observed. The level of significance found indicates that the quantified level of the protein increases on the level of IHC staining increases too ($p < 0.001$).

No significant correlation between the levels of p53 LIA and HER2/neu ELISA ($p = 0.092$ $R = 0.421$) was detected. A weak significant positive correlation ($R = 0.327$; $p < 0.01$) was detected between the determinations of p53 LIA and EGFR RIA. Also a weak significant positive correlation ($R = 0.267$; $p < 0.05$) was detected between HER2/neu ELISA and RIA EGFR determinations.

A statistically significant association ($p < 0.05$) between chronic tobacco smoking and decreased expression of EGFR RIA was found by grouping the lower tertiles (T1 and T2). It also showed a statistically significant association ($p < 0.05$) between chronic alcohol consumption and increased expression of the HER2/neu ELISA by grouping the upper tertiles (T2 and T3). A trend to statistical association was also observed between tobacco smoking and p53 LIA overexpression ($p = 0.09$).

As the remaining possible factors (toxic habits, clinical risk factors and anatomopathologic risk factors) were analyzed, no statistically significant relationship with another protein expression levels were observed.

After an average follow-up of 82 months, recurrence was detected in twenty patients (44.4%) (Incidence Density (ID): 6.45 recurrences per 100 patient patients/year). Disease progression was detected in six patients (13.3%) (DI: 1.93 progressions per 100 patients/year). Metastatic disease



was found in 4 patients (8.8%) (DI 1.3 per 100 patients / year). Eighteen patients died during follow-up (40%). (ID: 5.81 deaths per 100 patients/year).

None of the analyzed markers were able to discern risk groups for DFS, PFS, MDFS or OS. Only gender and age recurrence for OS, were independent risk factors.

CONCLUSIONS:

LIA, ELISA and RIA techniques can reliably quantify the amount of p53 protein, HER2/neu and EGFR present in the samples obtained by TURB. The results obtained by these techniques are consistent with those obtained by IHC.

The p53, EGFR and HER2/neu concentrations in TVS markers are significantly higher than the p53, EGFR and HER2/neu concentrations detected in healthy bladder tissue, and significantly lower than p53, EGFR and HER2/neu concentrations detected in MIBC (except for HER2/neu concentrations, substantially equal between NMIBC and MIBC).

There is a significant weak positive correlation between levels of p53 and EGFR, and between HER2/neu and EGFR levels in TVS.

There is a significant association between chronic alcohol consumption and increased expression of HER2/neu, and between chronic tobacco smoking and decreased EGFR expression in patients with NMIBC. There is also a statistical trend ($p = 0.095$) between chronic tobacco smoking and increased p53 protein expression in patients with NMIBC.

Quantification of p53, EGFR and HER2/neu seems to be not clinically relevant for predicting recurrence, tumor progression, metastasis, or survival for patients with NMIBC.



Introducción



1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMÁTICA DEL CÁNCER DE VEJIGA

Según la base de datos GLOBOCAN¹, en el año 2012 se diagnosticaron en el mundo aproximadamente 14.067.894 nuevos casos de cáncer (7.410.376 hombres y 6.657. 518 mujeres). Considerando ambos sexos, el cáncer más frecuente es el de pulmón (1.824.701 casos), seguido por el de mama (1.671.149 casos) y el de próstata (1.094. 916 casos), siendo el cáncer vesical (CV), la neoplasia maligna más común del tracto urinario, el séptimo cáncer más común en los hombres, y el decimoséptimo en las mujeres².

Aunque el 70% de los tumores vesicales debutan como tumores superficiales (TVS), con un comportamiento relativamente benigno, y solamente un 30% lo hacen como tumor vesical invasivo (TVI), las recurrencias de este tipo de tumores son la norma, y hasta cerca del 15% de los TVS progresan a enfermedad musculoinfiltrante. Lamentablemente, a día de hoy aún no es posible identificar con seguridad aquellos pacientes expuestos a la recurrencia y a la progresión y que serían subsidiarios de un tratamiento preventivo.

A. EPIDEMIOLOGÍA

Según datos de la agencia Americana SEER (Programa de seguimiento, epidemiología y resultados finales) se estima que el riesgo de ser diagnosticado de un cáncer vesical a lo largo de la vida para una persona nacida en la actualidad es del 2,41%³. Este número, también se puede expresar como que una de cada 41 personas será diagnosticada de un cáncer vesical a lo largo de su vida.



En el año 2012 se estimó la aparición de un global mundial de 429.793 nuevos casos de CV durante ese año¹. La tasa de incidencia, o densidad de incidencia (DI) de un tumor, se define como el número de nuevos casos diagnosticados por 100.000 habitantes en un determinado período de tiempo. Para poder comparar poblaciones con distinta distribución etaria, se calcula la llamada tasa de incidencia ajustada, que tiene en cuenta tanto la población general expuesta al riesgo en cada periodo de tiempo, y la ajusta tanto a la edad (pirámide poblacional mundial) como al sexo y raza.

La tasa mundial de incidencia estandarizada por edad es de 9 por cada 100.000 para los hombres y de 2.2 por 100.000 para las mujeres¹. Por regiones, las tasas más elevadas se encuentran en el Sur de Europa (21,0 casos nuevos por 100.000 hombres y 3,3 casos nuevos por 100.000 mujeres) y Norteamérica (20,1 casos nuevos por 100.000 hombres y 5,5 casos nuevos por 100.000 mujeres), y las más bajas en África central (1,5 casos nuevos por 100.000 hombres y 0,3 casos nuevos por 100.000 mujeres)⁴.

Según la Unión Europea (UE-28) en el año 2012 se estimaron 124.188 casos nuevos de cáncer de vejiga. La tasa de incidencia estandarizada por edad es de 19.1 por 100.000 para hombres y 4.0 por 100.000 para las mujeres¹. Dentro de la UE, se observan también importantes diferencias por países, siendo las tasas de incidencia más elevadas para los varones las de Malta (39,8 casos nuevos por 100.000 hombres) y España (39,0 casos nuevos por 100.000 hombres). En las mujeres las tasas más elevadas corresponden a Dinamarca (10,7 casos nuevos por 100.000 mujeres) y Hungría (10,5 casos nuevos por 100.000 mujeres).

En nuestro país se han estimado en 13.789 los casos nuevos en 2012, 11.584 en varones y 2.205 en mujeres. Estas cifras suponen que en nuestro país las tasas de incidencia son de las más elevadas del mundo en lo relativo a los varones, donde es el cuarto tumor más frecuente y representa el 11% del total de tumores y el 5,7% de la mortalidad por cáncer⁵. Los estudios epidemiológicos realizados en España⁶⁻⁹ y los datos disponibles de los registros españoles de cáncer¹⁰ han demostrado en las últimas décadas un incremento en la frecuencia de este tumor.



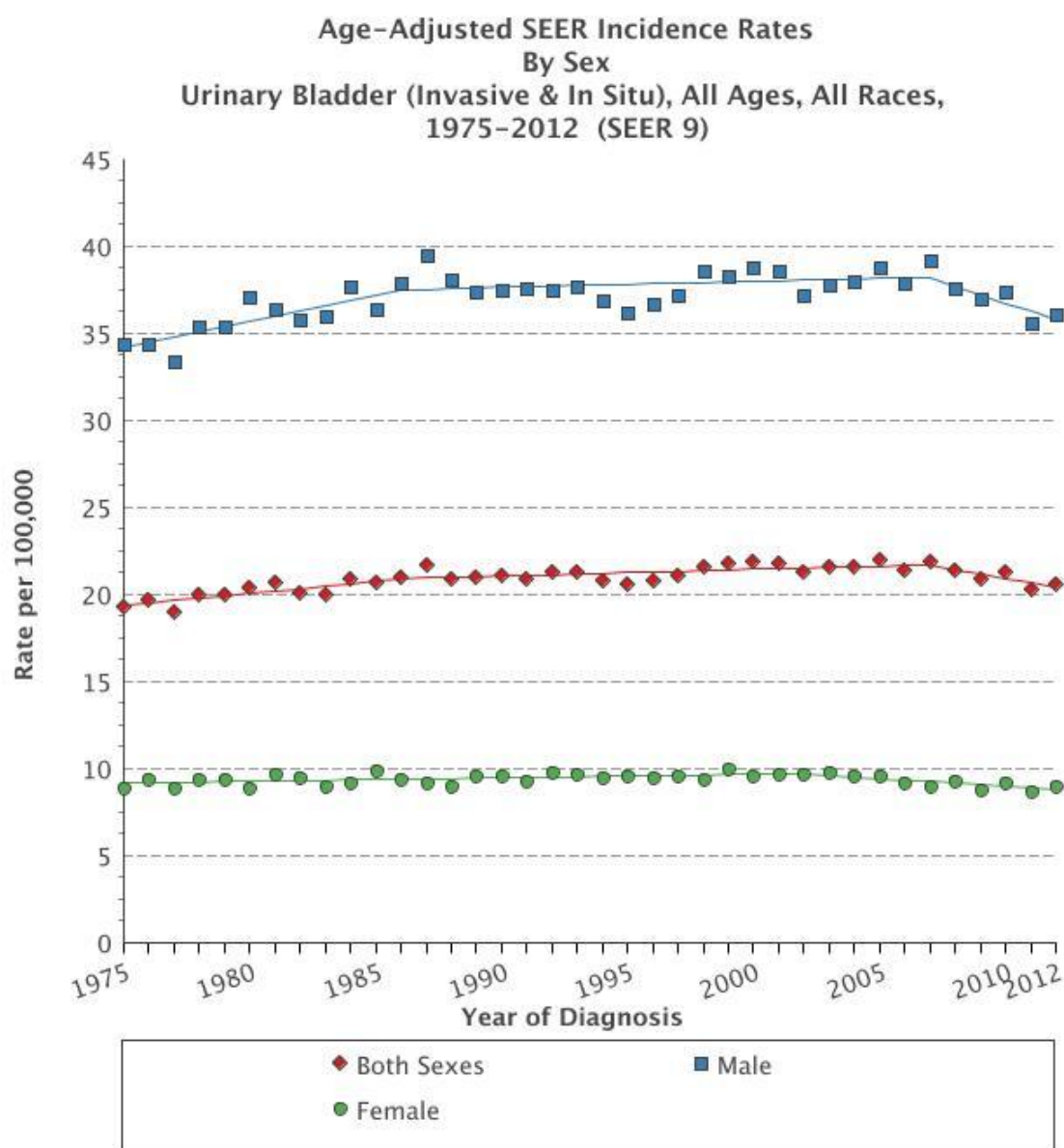
En áreas españolas que disponen de registros poblacionales de cáncer, la vejiga es la segunda o tercera localización tumoral más frecuente¹⁰. Los datos de incidencia son acordes con las cifras americanas variando desde un 21,7 casos por 100,000 habitantes en la provincia de Cuenca¹¹ hasta un 29,6 casos por 100.000 habitantes en el área sanitaria 10 de la Comunidad de Madrid, y 33,1 por 100.000 habitantes en el área sanitaria de León¹², sin grandes diferencias entre diferentes Comunidades¹³.

Esta discreta variabilidad geográfica viene definida fundamentalmente por la prevalencia de fumadores¹⁴, si bien se observan zonas geográficas (Cádiz, Sevilla, Huelva, Almería y Barcelona) donde el exceso de riesgo no es solo achacable al tabaco, y donde la calidad del agua de consumo humano, y en especial su contenido en arsénico, podría estar implicada en ese exceso de riesgo¹⁵.

En cuanto a la distribución por sexos, el cáncer vesical es mucho más frecuente en varones que en mujeres^{16,17}, diferencia que disminuye en los países más desarrollados fundamentalmente como consecuencia de dos hechos: la incorporación de la mujer al trabajo de la industria con el aumento de la exposición femenina a los factores de riesgo, y el incremento del hábito de fumar entre las mujeres. La incidencia estimada de cáncer vesical en EEUU para el año 2009, fue de 70.980 casos, 52.810 de ellos en varones, y 18.170 en mujeres³.

Basado en los porcentajes de 1975 a 2012 y según los datos de la SEER¹⁸, se aprecia una tendencia levemente ascendente en la incidencia de este tumor por sexo en las tres últimas décadas, como se aprecia en la siguiente figura (Figura 1).

En nuestro país, la relación varón/mujer todavía no ha alcanzado los niveles de los países más desarrollados: en el año 2012 de los 13.789 los casos nuevos detectados, 11.584 sucedieron en varones y 2.205 en mujeres¹. Esas diferencias pueden ser debidas al largo periodo de exposición que precisan estos tóxicos para provocar el desarrollo de la enfermedad¹⁹.



Cancer sites include invasive cases only unless otherwise noted.
Rates are per 100,000 and are age-adjusted to the 2000 US Std Population (19 age groups - Census P25-1130). Regression lines are calculated using the Joinpoint Regression Program Version 4.2.0, April 2015, National Cancer Institute.
Incidence source: SEER 9 areas (San Francisco, Connecticut, Detroit, Hawaii, Iowa, New Mexico, Seattle, Utah, and Atlanta).

Figura 1: Tasa de incidencia anual del cáncer vesical en EEUU global, y desglosada por sexos¹⁸.

La relación entre cáncer vesical y edad parece seguir una curva exponencial, con una progresión constante del número de casos a lo largo de la vida y un cénit entre los 60 y 70 años, grupo etario en el que ocurren cerca de la mitad de los casos²⁰ (Figura 2).

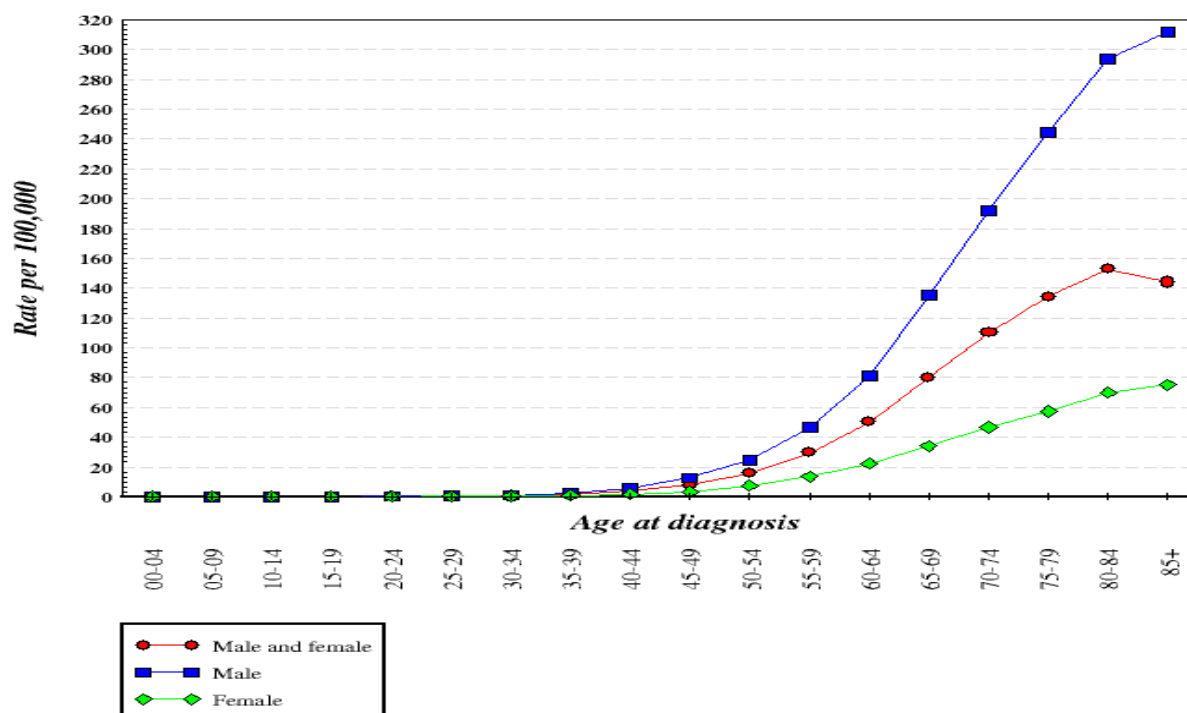


Figura 2: Incidencia del cáncer vesical en EEUU según diferentes grupos etarios, global, y desglosada por sexo¹⁸.

Debido al aumento en la esperanza de vida, en la actualidad el número de individuos expuestos al riesgo de padecer un carcinoma vesical aumenta continuamente, lo que supone uno de los principales motivos del aumento progresivo de incidencia de esta enfermedad.

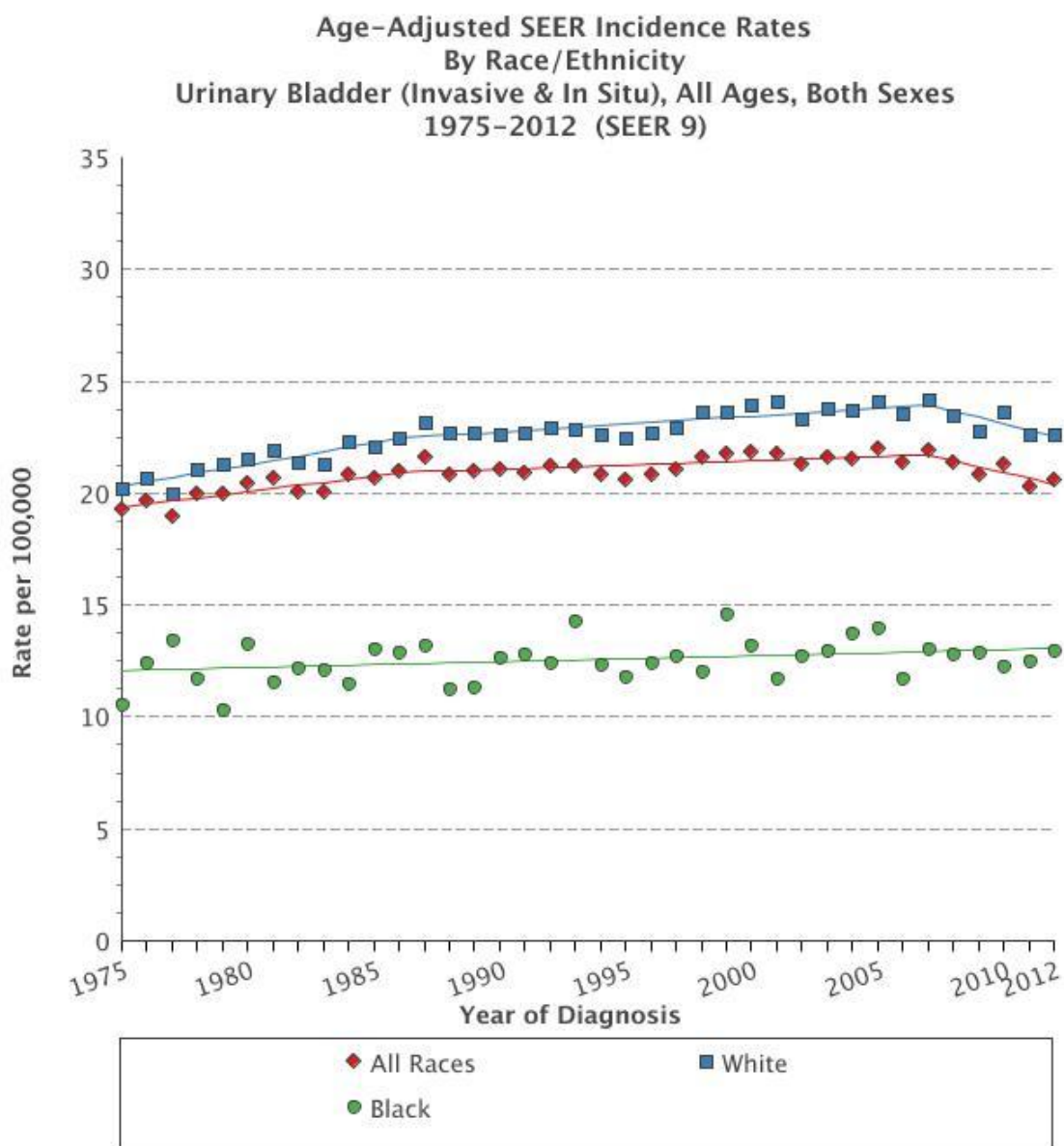
En cuanto a los factores étnicos, en EEUU, y según también datos de la SEER³, el desarrollo de carcinoma vesical es mucho más frecuente en los varones de raza blanca que en los de raza negra, con una incidencia estimada de 40.3 casos por 100.000 habitantes en varones de raza blanca, y de



20.0 casos por 100.000 habitantes en varones de raza negra, y, al igual que con el sexo, se aprecia un leve aumento de la incidencia a lo largo del tiempo¹⁸ (Figura 3).

Se define prevalencia como el total de los pacientes que presentan este tumor en una población dada y en un tiempo en concreto. Los datos del SEER respecto a este tumor, definiendo la prevalencia como el número de pacientes vivos con esta enfermedad en un plazo mayor de 25 años del diagnóstico, señalan que para la raza blanca en este plazo estarán vivos 434.668 pacientes, fundamentalmente varones. En el otro extremo, las mujeres de raza negra solo presentan una prevalencia de 5.224 en ese mismo plazo¹⁸.

Si se compara con otras neoplasias urológicas la prevalencia del cáncer de vejiga es relativamente alta. Respecto al tumor testicular el cáncer de vejiga es 3 veces más prevalente, aunque también lo es 3,5 veces menos que el cáncer de próstata. Pero si se compara con otras neoplasias no urológicas frecuentes debemos señalar que el cáncer de mama es 4,5 veces más prevalente que el cáncer vesical y el colorrectal 2,11 veces, mientras que el cáncer de pulmón es 1,5 veces menos prevalente debido a su alta tasa de mortalidad. Esta relativamente alta prevalencia del cáncer vesical puede estar en gran medida condicionada por la alta tasa de recurrencias que muestra la enfermedad en los tumores superficiales. Es decir, pocos pacientes morirán por esta causa y el número de casos vivos se acumulará en el tiempo. Hasta tal punto es así que a pesar de que el cáncer vesical sea el cuarto en frecuencia en los EEUU, representa el segundo en prevalencia entre los varones de mediana edad después del cáncer de próstata⁴. La mayor prevalencia se alcanza entre los 75 y 79 años para ambos sexos, pero se aprecia una disminución significativa en las mujeres en todos los intervalos de edad con respecto a los varones¹⁸.



Cancer sites include invasive cases only unless otherwise noted.
Rates are per 100,000 and are age-adjusted to the 2000 US Std Population (19 age groups - Census P25-1130). Regression lines are calculated using the Joinpoint Regression Program Version 4.2.0, April 2015, National Cancer Institute.
Incidence source: SEER 9 areas (San Francisco, Connecticut, Detroit, Hawaii, Iowa, New Mexico, Seattle, Utah, and Atlanta).

Figura 3: Tasa de incidencia anual del cáncer vesical en EEUU global, y desglosada por raza¹⁸.



Para poder comparar correctamente desde el punto de vista epidemiológico la tendencia de una patología a lo largo del tiempo hay que tener en cuenta la población general de cada periodo de tiempo y ajustarla tanto a la edad (pirámide poblacional mundial), como al sexo y a la raza. De esta manera, mediante una fórmula matemática se halla el cambio porcentual anual (APC) (*anual percent change*), y mediante este índice se pueden comparar las tendencias a lo largo del tiempo. Esta media es muy empleada para medir tendencias en tasas de enfermedad y mortalidad y se calcula usando un modelo lineal sobre las tasas ajustadas por edad²¹.

Mediante el APC se evidencia que persiste una tendencia general global en los últimos 30 años al discreto aumento de la incidencia del cáncer vesical³ que parece haber empezado a revertir en los últimos años (Tabla I). Llama la atención la disminución en mujeres en el periodo de 2002 al 2012, aunque a este hecho no se le ha encontrado una clara explicación. Aún con todo, permanece una tendencia general global en los últimos 30 años a seguir aumentando su incidencia

Tabla I: Variación en la incidencia porcentual anual (APC) del cáncer vesical según datos de la SEER entre 1975-2012³.

Todas las Razas					
Total		Varones		Mujeres	
APC	Periodo	APC	Periodo	APC	Periodo
0,7	1975-1986		1975-1986	0,2	1975-2002
0,2	1986-2007		1986-2007	-1.0	2002-2012
1,2	2007-2012	1.3	2007-2012		



Según los datos de la SEER³, el riesgo de morir por cáncer vesical, es del 0,76% para el sexo masculino, y del 0,32% para el femenino. Así, el cáncer de vejiga representa la novena causa de muerte por cáncer en el varón (en total produce el 3% de las muertes en varones) y la decimosexta en la mujer.

La tasa de mortalidad se define como el número de fallecimientos por 100.000 habitantes/año. Durante el año 2012 se produjeron en el mundo 165.084 muertes por cáncer vesical (123.051 varones y 42.033 mujeres), con una tasa de mortalidad de 3.2/100.000 varones/año y 0.9/100.000 mujeres/año¹.

La tasa mundial de mortalidad estandarizada por edad es 3 por 100.000 para los hombres frente a 1 por 100.000 para las mujeres. En la UE, la tasa de mortalidad estandarizada por edad es de 8 por 100.000 para los hombres y un 3 por 100.000 para las mujeres, respectivamente¹. En 2012, el CV fue la octava causa más común de mortalidad específica por cáncer en Europa¹.

Si bien, la incidencia de CV ha disminuido en algunos registros, posiblemente reflejando el impacto de la disminución de los agentes causales, el tabaco principalmente y la exposición ocupacional²², la mortalidad por CV también ha disminuido, posiblemente reflejando un mayor nivel de atención sanitaria²³.

En cuanto a la tendencia en las últimas décadas, se aprecia un descenso en la tasa de mortalidad global en los últimos 30 años, que se objetiva en ambos sexos (Tabla II) (Figura 4)¹⁸.

En España, en el año 2012, se registraron 5.007 muertes por CV, 4.102 de ellas en varones y 915 en mujeres ¹ con una tasa cruda de mortalidad variable entre provincias, y que oscila entre el 8,0 en Las Palmas de Gran Canaria y el 18,7 de Cantabria. En el sexo femenino varían entre el 1,8 de Álava y el 7,8 de Soria⁶.

Dado que la incidencia de esta enfermedad sigue aumentando en las últimas décadas, tal y como hemos visto anteriormente, y que existe una tendencia a disminuir la mortalidad es previsible que se produzca un aumento en la prevalencia de este tumor, con lo que cada vez queda de manifiesto el importante problema de salud que representa y su impacto en la esperanza de vida^{1,15}.

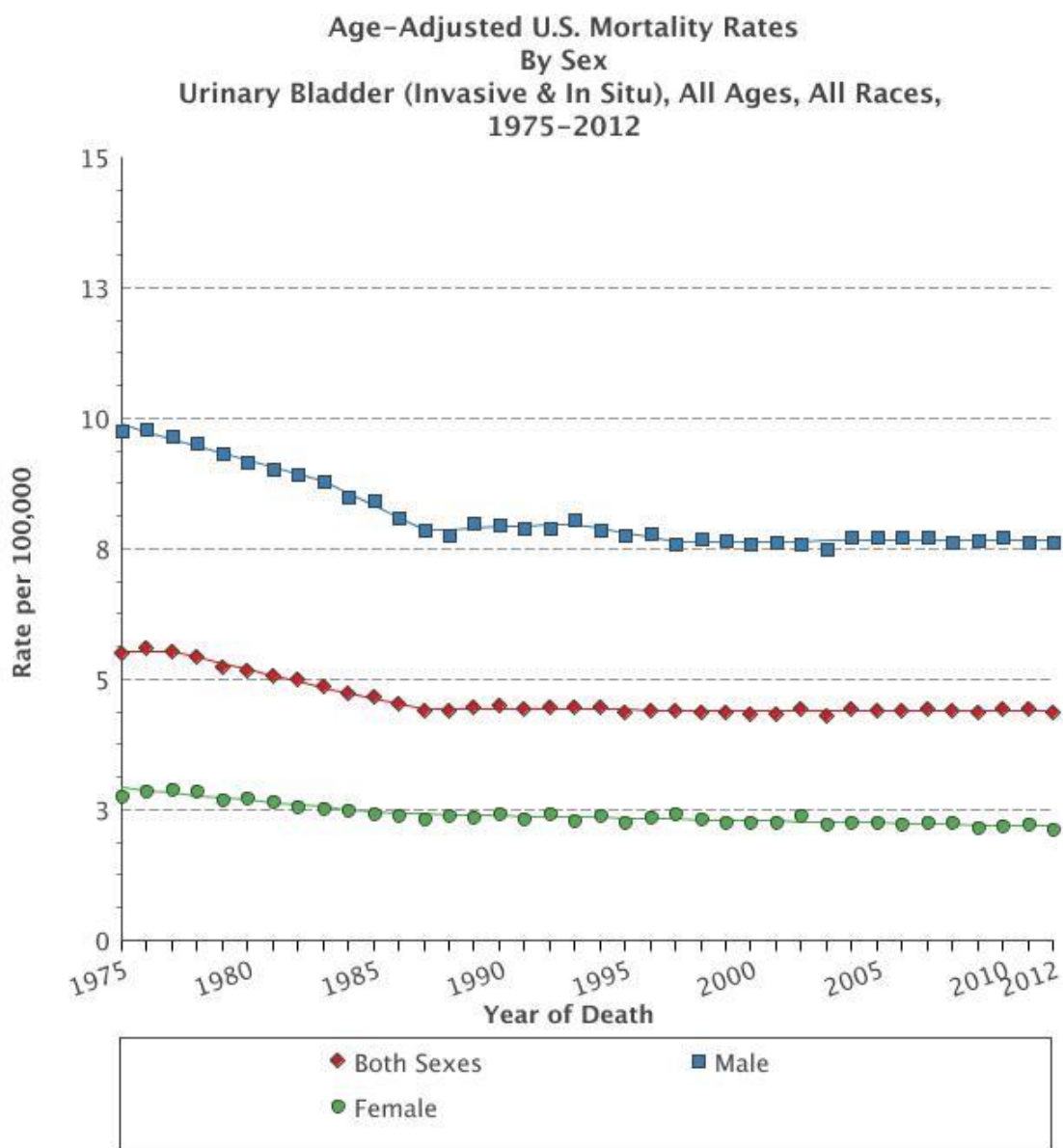


La expectativa de vida se ha incrementado sustancialmente a lo largo del último siglo. Al comienzo del siglo XX sólo el 25% de los americanos vivían hasta los 65 años de edad; actualmente, el 70% alcanzan esa edad, y el 30 % incluso la octava década de la vida. Hoy en día, en muchos países occidentales la expectativa de un niño al nacer se acerca a los 80 años⁷ y para el año 2.020 se espera un incremento mayor del 200% para la población con más de 65 años de edad⁸.

El carcinoma de células transicionales (CCT), al que también se le da el nombre de carcinoma urotelial, es con mucho el subtipo histológico más frecuente, si bien la distribución de tipos histológicos varía entre poblaciones diferentes. En la población blanca norteamericana, el CCT representa el 93% de todos los cánceres, mientras que este tipo histológico representa el 85% de todos los cánceres en afroamericanos, y menos del 40% en Egipto²⁴. En los países europeos el CCT representa el 90-95% de los cánceres de vejiga en ambos sexos^{10,25}.

Tabla II: Variación en la mortalidad porcentual anual (APC) del cáncer vesical según datos de la SEER entre 1975-2012³.

Todas las Razas					
Total		Varones		Mujeres	
APC	Periodo	APC	Periodo	ACP	eriodo
0,2	1975-1977	-1,4	1975-1983	-1,7	1975-1986
-2,2	1977-1987	2,8	1983-1987	-0,4	1986-2012
	1987-20126	0,2	1987-1993		
		-1.1	1993-2007		
		0,0	2007-2012		



Cancer sites include invasive cases only unless otherwise noted.
Mortality source: US Mortality Files, National Center for Health Statistics, CDC.
Rates are per 100,000 and are age-adjusted to the 2000 US Std Population (19 age groups - Census P25-1130). Regression lines are calculated using the Joinpoint Regression Program Version 4.2.0, April 2015, National Cancer Institute.

Figura 4: Tasa de mortalidad ajustada del cáncer vesical en EEUU global, y desglosada por sexo¹⁸.



B. ETIOLOGÍA

El cáncer vesical destaca entre todas las neoplasias humanas por la gran cantidad de factores etiológicos identificados que se relacionan con su patogenia. Para todos estos factores, el proceso de carcinogénesis abarca desde la inducción de una alteración en el DNA, a la interferencia de los mediadores de la apoptosis, pasando por la alteración de los controles de la replicación celular, lo que finalmente da lugar a una célula transformada capaz de escapar a los controles locales de proliferación y de vigilancia inmunológica⁹.

En global, muchos factores epigenéticos han sido involucrados en el origen del cáncer vesical (Tabla III)^{26,27}. Muchos de estos factores son ocupacionales, pero otros se asocian a hábitos como el tabaquismo y a la dieta, siendo aún objeto de discusión el papel que los metabolitos endógenos del triptófano pueden tener en la génesis del carcinoma vesical. Describimos a continuación los factores que se consideran más influyentes en el inicio y desarrollo del cáncer vesical.

La exposición ocupacional se considera responsable de casi el 20-25% de los cánceres vesicales que se registran en los EEUU. Esta exposición presenta periodos de latencia característicamente largos, de 20 a 30 años, que se pueden acortar aumentando la intensidad a dicha exposición¹⁸. Se conoce gran variedad de profesiones con riesgo a padecer la enfermedad, generalmente debido al contacto con productos químicos¹. La mayoría de los carcinógenos vesicales son aminas aromáticas. Ahora bien, también se han identificados factores nutricionales como la ingestión de nitratos y nitritos que la flora bacteriana intestinal metaboliza en otros productos con capacidad carcinogénica²².

En 1895, Rhen²⁸ describió por primera vez cáncer de vejiga en trabajadores de la industria del tinte. Posteriores trabajos demostraron que se debía a la producción de beta-naftilamina, un carcinógeno que dejó de producirse en Reino Unido en 1950, aunque la producción mundial no cesó hasta 1972. La producción de otros productos relacionados como la bencidina y otros derivados, que también fueron relacionados directamente con el cáncer adquirido ocupacional de la vejiga urinaria, cesó a



nivel mundial en torno a 1956. Numerosos estudios de caso control llevados a cabo en diversos lugares del mundo han reflejado aumento del riesgo relativo en al menos veintitrés ocupaciones en las industrias^{23,24}.

El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante para el CV, y que representa aproximadamente el 50% de los casos^{29,30}. Los fumadores de cigarrillos tienen de dos a cuatro veces mayor riesgo de CV en comparación con los no fumadores^{26,29,31}, y el riesgo aumenta con el aumento de la intensidad y la duración del hábito de fumar^{27,32}. Al dejar de fumar, el riesgo de CV cae más de un 30% después de 1-4 años y más de un 60% después de 25 años, pero nunca vuelve al nivel de riesgo de los no fumadores^{30,33}.

No se conoce cuáles de los carcinógenos contenidos en los cigarrillos son responsables de la aparición o desarrollo del cáncer vesical. Aparte de las aminas aromáticas, se cree que los hidrocarburos del tabaco y el alquitrán, pueden ser también carcinogénicos para la vejiga³⁴. Aunque Thompson et al³¹ demostraran una correlación entre el tabaco y el grado histológico, el estadio, número y tamaño de los tumores vesicales, otros autores no han podido corroborar estos hallazgos³². Las diferencias encontradas en los diferentes trabajos pueden ser explicadas por los diferentes tipos de degradación de las aminas aromáticas. Las dos vías principales de degradación son la vía de la N-acetilación y la de la N-hidroxilación. Los productos de la primera vía no son carcinógenos mientras que los productos de la segunda sí lo son. La enzima clave en la primera vía es la N-acetiltransferasa 2 (NAT2), principal enzima acetiladora del urotelio, y existen dos genotipos para esta enzima, que resultan en dos tipos de sujetos, los “acetiladores lentos” y los “acetiladores rápidos”. Como los compuestos acetilados son menos carcinogénicos, los sujetos acetiladores rápidos serán menos sensibles a la exposición al humo del tabaco^{9,33}.

El café también ha sido clásicamente relacionado con la génesis de los tumores vesicales^{30,35}, si bien parece que este riesgo sólo se encuentra presente en los trabajadores de la industria del torrefactado, y no con los consumidores habituales. En los estudios epidemiológicos, el aumento de riesgo de los bebedores de café es muy moderado, no parece dosis-dependiente ni duración-dependiente, y no es descartable que pudiera estar asociado a algún factor de confusión, como el consumo asociado de cigarrillos que habitualmente acompaña a los bebedores habituales de café³⁶, dado que el riesgo estimado para esta asociación, decrece tras controlar el uso de tabaco



concomitante²⁶. De modo similar, los edulcorantes artificiales que contienen sacarina han demostrado provocar cáncer de vejiga en un modelo diseñado en ratas³⁷, si bien estudios previos en humanos habían fracasado al tratar de establecer esta relación^{38,39}. Más recientemente, un estudio de casos-control ha demostrado que puede existir una asociación dosis dependiente. Así, los consumidores severos de edulcorantes (más de 1680 mg/día) demostraron un incremento del riesgo relativo de cáncer vesical frente a los consumidores moderados (< 1680 mg/día)³⁵

La exposición ocupacional a aminas aromáticas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y los hidrocarburos clorados es el segundo factor de riesgo más importante para el CV, que representa alrededor del 10% de todos los casos. Este tipo de exposición en el trabajo se presenta principalmente en las plantas industriales de transformación de productos de pintura, tintes, metales y petróleo^{29,35,37}.

La asociación entre el uso de tinte para cabello y el riesgo de CV sigue siendo incierta; se ha sugerido un aumento del riesgo en los usuarios de los tintes para el cabello permanentes con un fenotipo de acetilación lenta NAT2^{38,39}. El impacto de la dieta y la contaminación del medio ambiente son menos evidentes.

La exposición a la radiación ionizante está asociada con un mayor riesgo de CV. Se sugiere que la ciclofosfamida y la pioglitazona están débilmente asociados con el riesgo CV²⁹.

La esquistosomiasis, una cistitis crónica endémica es otra causa de CV²⁹. La cistitis causada por *Schistosoma haematobium* se relaciona con la aparición de carcinoma epidermoide de vejiga. En Egipto y otras regiones donde este parásito es endémico, el carcinoma epidermoide de la vejiga urinaria supone uno de los tumores más frecuentes de este órgano^{22,40}. En nuestro medio la esquistosomiasis es una enfermedad excepcional, aunque con los flujos migratorios en ascenso desde países endémicos es de esperar un aumento progresivo de su incidencia. Por otro lado, siguiendo un mecanismo patogénico similar, la infección de orina crónica, la sonda permanente y la litiasis vesical pueden producir también cambios metaplásicos vesicales y una mayor incidencia de carcinoma escamoso de la vejiga urinaria. Varios trabajos han demostrado la presencia de algunos serotipos de papilomavirus humano (VPH) en el cáncer de vejiga urinaria, aunque con resultados muy dispares^{41 22,42}. A día de hoy no se conoce bien el mecanismo patogénico de la carcinogénesis



asociada a esta infección vírica, aunque se asume que podría estar relacionada con la incorporación de material génico vírico a las células huésped, puesto que se han detectado oncogenes formando parte del genoma viral.

En cuanto a la dieta, son muchos los agentes causales de cáncer vesical a los que podemos exponernos en un contexto de hábitos o de dieta. Entre ellos destaca el consumo abusivo de analgésicos y edulcorantes artificiales⁴³. Aunque la importancia de la cantidad de ingesta de líquidos es incierta, la cloración de agua potable y los niveles subsiguientes de trihalometanos son potencialmente cancerígenos, mientras que la exposición al arsénico en el agua potable también aumenta el riesgo de CV²⁹.

Pacientes tratados con ciclofosfamida, un potente quimioterápico para el tratamiento de neoplasias hematológicas, presentan un riesgo elevado de padecer cistitis hemorrágica y cáncer de vejiga⁴⁴. Se cree que un metabolito de la ciclofosfamida, la acroleína, es el factor responsable tanto del desarrollo de estos tumores como de cistitis hemorrágica⁴⁵. El periodo de latencia del cáncer vesical asociado a ciclofosfamida es relativamente corto, aproximadamente 10 años⁴⁶. También la radioterapia pélvica previa aumenta el riesgo de sufrir cáncer de vejiga⁴⁷.

Aunque se han comunicado familias con cáncer vesical⁴⁸ no se ha evidenciado realmente la existencia de una asociación fuerte epidemiológica entre esta enfermedad y su factor hereditario. Se cree que quizá cierta predisposición genética puede influir en la incidencia de la TCC de la vejiga^{29,41}, especialmente a través de su impacto en la susceptibilidad a otros factores de riesgo^{29,40}. En este sentido, en las últimas décadas, se han comenzado a implicar factores genéticos en la carcinogénesis del CCT. En este aspecto han sido especialmente investigadas las diferencias entre los acetiladores “lentos” y los acetiladores “rápidos” como factor de riesgo para el CCT. Parece ser que los homocigotos para el gen NAT-2 que produce acetilación rápida, son menos sensibles a los efectos neoplásicos de las aminas aromáticas que aquellos que presentan genotipo homocigoto para los alelos de NAT-2 de acetilación lenta⁴⁹. No obstante, los datos de los que se dispone a día de hoy no son todavía concluyentes al respecto⁵⁰.



Tabla III: Agentes implicados en la aparición del cáncer vesical.

<p>Productos industriales</p> <ul style="list-style-type: none">• 2-Naftilamina• Benzidina• 4-Aminodifenilo• Auramina• O-Toluidina• Hidrocarburos policíclicos• Nitropirenos <p>Productos farmacéuticos</p> <ul style="list-style-type: none">• Cloramfenicol• Ciclofosfamida• Fenacetina• Acetaminofeno <p>Sustancias naturales</p> <ul style="list-style-type: none">• Metabolitos del triptófano• 3-Hidroxiantranílico• Quirureína• Nitrosaminas• B-Glucuronidasa <p>Radiaciones ionizantes</p> <ul style="list-style-type: none">• Irradiación por cáncer ginecológico <p>Irritación mecánica crónica</p> <ul style="list-style-type: none">• Catéteres• Litiasis• Extrofia vesical <p>Infecciones parasitarias</p> <ul style="list-style-type: none">• Schistosoma haematobium
--



C. HISTORIA NATURAL DEL CANCER DE VEJIGA

La vejiga se halla tapizada por un epitelio de células transicionales (urotelio) con un espesor de hasta 7 capas celulares que asientan sobre una membrana basal. La proliferación incontrolada de este tipo células es la que va a dar lugar al CCT que constituye el 90% de todos los carcinomas vesicales. Dicha proliferación va a evolucionar desde la hiperplasia celular hacia la displasia, hasta el carcinoma in situ (CIS) y el desarrollo del CCT, si bien, en la mayoría de los casos, no tiene por qué seguir esta evolución linealmente ordenada (Figura 5).

Como ya se ha señalado, en el momento del diagnóstico inicial el 70-80% de los CCT son superficiales. De éstos, entre un 30 y un 90% recidivarán antes de los 5 años⁵¹, manteniendo el 70% su grado de invasividad, con una supervivencia a los 5 años del 80%. El 30% restante evolucionará a tumores infiltrantes con un severo empeoramiento del pronóstico^{51,52}. En general, podemos decir que un 10% de todos los pacientes con TVS, sufrirán progresión hacia TVI⁵³. Esta heterogeneidad de comportamiento en los TVS puede atribuirse a la existencia de dos variedades distintas dentro de los denominados “tumores papilares superficiales”.

El primer tipo, compuesto por tumores de bajo grado y que no invaden más allá del epitelio, se asocia con una tasa de recurrencia elevada (50-75%) pero con una baja probabilidad de progresión (< 5%). Es el tipo más frecuente de CCT, y la proliferación de células neoplásicas continúa con el desarrollo de múltiples capas de células que no invaden más allá del epitelio, e inducen para su crecimiento una neoformación vascular en el interior de una matriz fibrosa, y que forma frondas papilares alrededor de un eje fibrovascular central. Este tipo de tumor representan el 70-80% de los TVS⁵⁴.

En la segunda variedad, formada por tumores papilares de mayor grado la proliferación continua de células produce una gruesa capa epitelial que se extiende a lo largo del plano de la pared vesical, manteniendo el perfil aplanado del revestimiento urotelial e infiltrando precozmente la lámina propia. La mayoría de los TVS de este ámbito (el 30% de todos los TVS) al diagnóstico ya han penetrado la membrana basal e infiltran la lámina propia, y se pueden asociar a CIS hasta en un 20-30% de los casos⁵⁵. Este CIS aplanado suele constar de células más indiferenciadas cuya cohesión y



adherencia intercelular suele ser defectuosa. Este hallazgo presagia un mal pronóstico, con unas tasas finales de progresión entre el 30 y el 50%⁵⁶.

Las diferencias en cuanto a la evolución clínica entre los tumores confinados a la mucosa y los que invaden la lámina propia, y las implicaciones del CIS en el desarrollo de un TVI en lugar de un TVS, indican que pueden formarse variantes diferentes del CCT a través de distintas vías. Los tumores limitados a la mucosa inducen neovascularización, secretan factores de crecimiento que actúan de manera autocrina y paracrina, y producen papilas proliferantes rodeadas de un tallo vascular central, cuyas células parece que carecen de la capacidad de atravesar la membrana basal e invadir la lámina propia. Esta conducta contrasta notablemente con la de los tumores que invaden la lámina propia, que presentan un elevado riesgo de progresión. Estos tumores son frecuentemente de alto grado y, como se ha visto, se pueden asociar a un CIS plano y, pese a que pueden tener aspecto papilar, no es infrecuente observar también un aspecto más nodular. Aunque teóricamente estos tumores podrían surgir de tumores de bajo grado, es más probable que exista una vía diferente para su desarrollo que refleje diferentes alteraciones genéticas de los anteriores.

El CIS parece representar una vía de desarrollo completamente diferente, en la que un mecanismo de displasia conduce a la aparición de células malignas poco diferenciadas que sustituyen o socavan el urotelio normal, y que se extienden a lo largo del plano de la pared vesical, observándose de modo no infrecuente la penetración de la membrana basal y de la lámina propia subyacente.

El 30% restante de los pacientes debutan inicialmente con TVI; de ellos, el 50% presentará una enfermedad metastásica. La diseminación por vía linfática originará la afectación inicial de ganglios regionales, invadiendo más adelante las estructuras linfáticas yuxtarrregionales. Las metástasis a distancia se producen a través de los capilares sanguíneos, localizándose principalmente en pulmón, hígado y huesos. Estos pacientes presentan una mortalidad del 52% a los 2 años aún sin evidencia de invasión ganglionar en el momento de realizar el tratamiento, probablemente debida a la presencia de micrometástasis que, con los medios de los que disponemos en la actualidad, no se pueden detectar. La supervivencia de pacientes con metástasis detectadas en el momento del diagnóstico es muy baja, y se cifra en el 10-20% a los 5 años⁵⁷. No obstante, existe un 5% de pacientes con invasión ganglionar comprobada que tienen una supervivencia mayor de 5 años sin



evidencia de recidiva tras la cistectomía y linfadenectomía pelviana⁵⁷. A la diferente historia natural de estos tumores frente a los TVS se le han dado dos explicaciones distintas; una primera hipótesis sugiere que el desarrollo de estos tumores sigue un proceso secuencial muy rápido desde tumor superficial a invasor; mientras que otra hipótesis, más factible, postula que la mayoría de tumores infiltrantes presentan una vía de crecimiento diferente, desarrollando una invasión rápida de la capa muscular y tardía de la luz vesical, de manera que el componente exofítico, que es el que origina la sintomatología clínica, aparece de modo tardío⁵⁴. Lo único cierto es que los pacientes con CCT invasor de inicio tienen una historia sintomática muy corta, y que la progresión y la metastatización tienen lugar de modo muy temprano.

El descubrimiento de alteraciones genéticas diferentes en los diversos estadios tumorales sustenta la hipotética existencia de múltiples vías de carcinogénesis (Figuras 5 y 6), lo que explicaría la aparición clínica de diferentes formas histológicas del CCT.

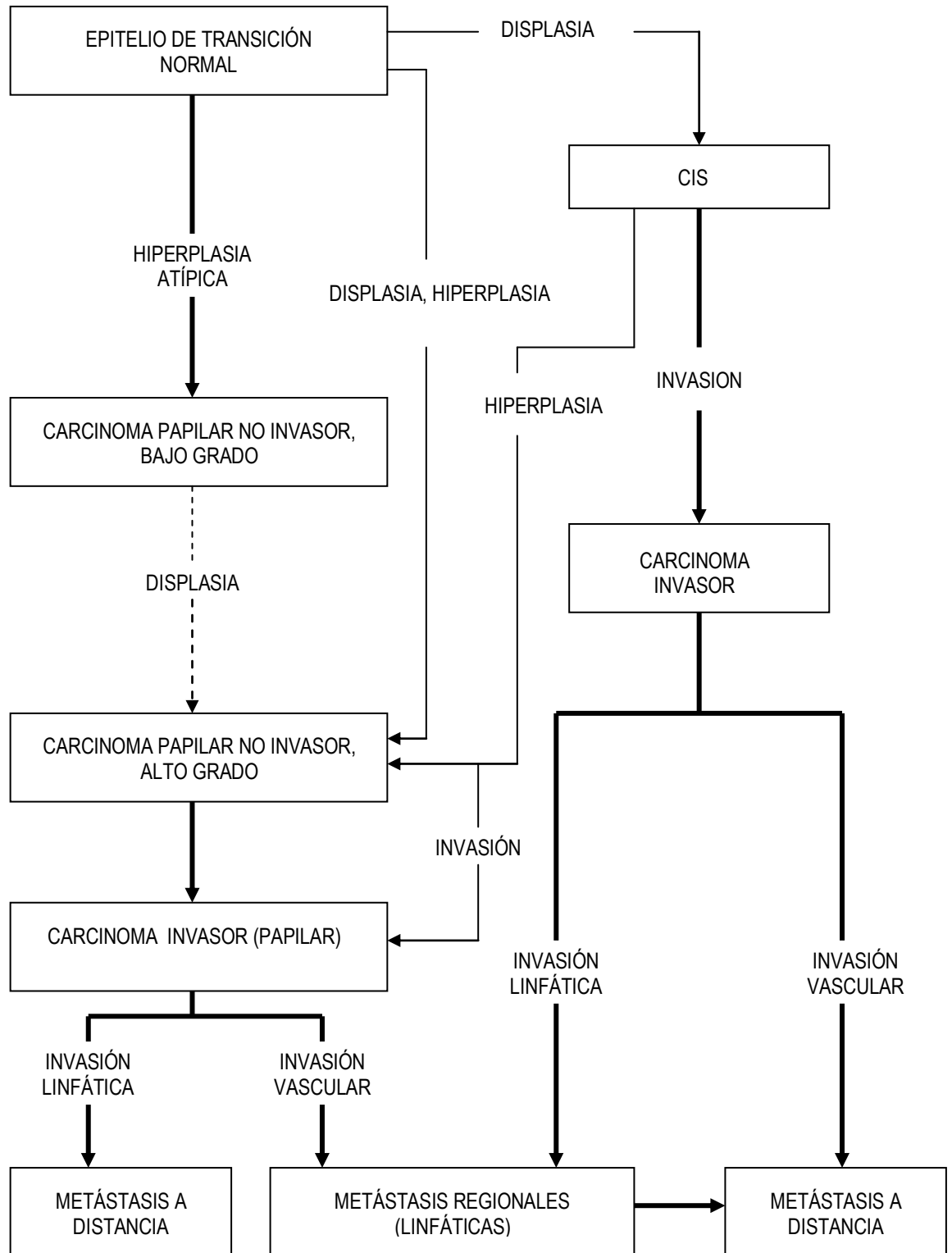


Figura 5: Múltiples vías de desarrollo del CCT. La probabilidad de que se siga cada una de estas vías está representada por el grosor de las flechas⁵⁹.

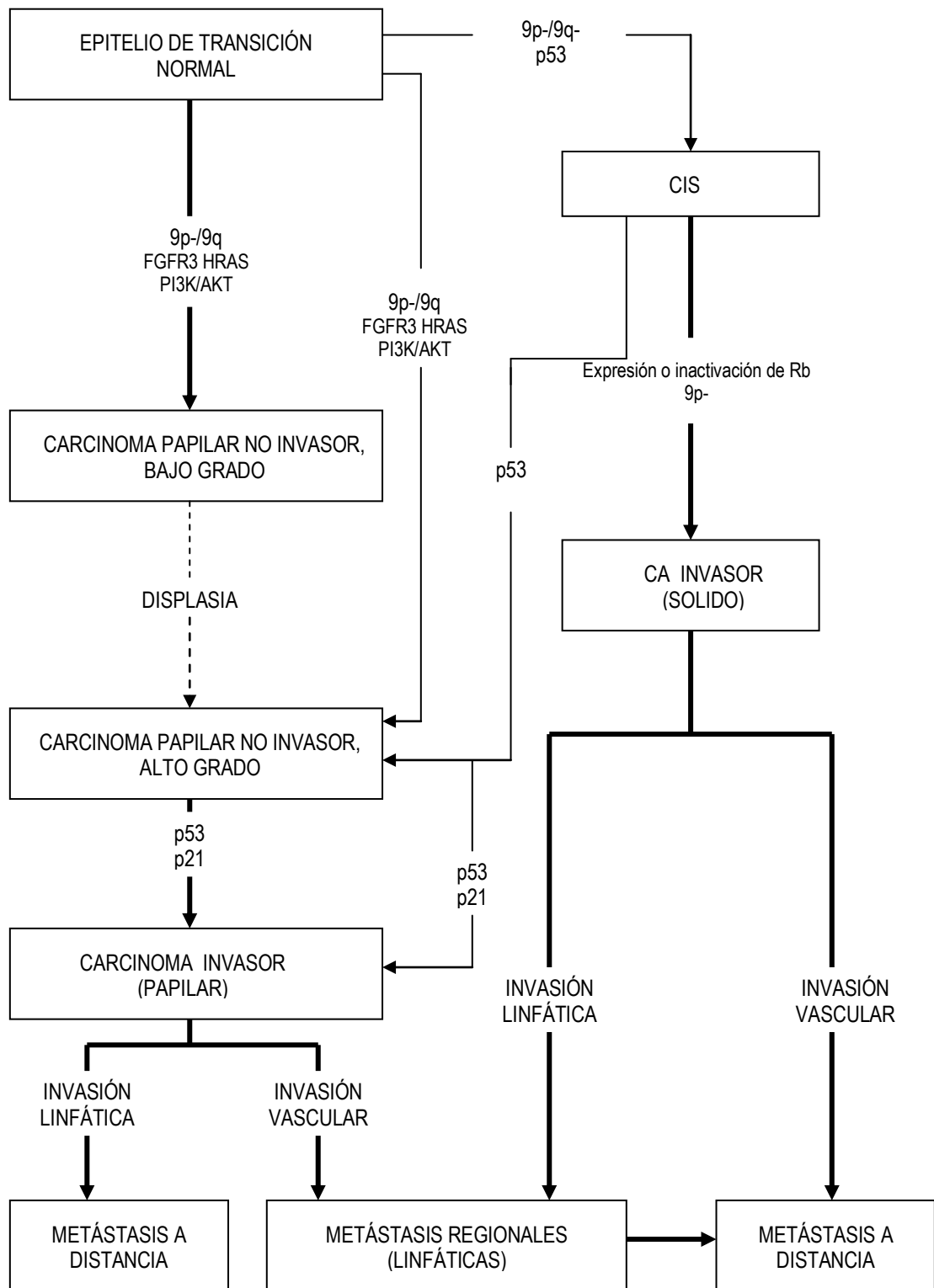


Figura 6: Alteraciones genéticas en el desarrollo del CCT. La probabilidad de que se siga cada una de estas vías está representada por el grosor de las flechas ⁵⁹.



D. FACTORES PRONÓSTICO CLÍNICOS DEL TVS

Como se ha visto, los TVS constituyen un grupo heterogéneo de tumores cuyo pronóstico e indicaciones terapéuticas son muy difíciles de establecer al diagnóstico. Como ya se ha mencionado, cerca del 80% de los tumores vesicales son superficiales en el momento de su diagnóstico. A grandes rasgos, al diagnóstico un 40% de los tumores se encuentran en estadio Ta, un 30% en estadio T1, mientras que un 2-5% debutan como CIS o lesiones aplanadas⁶⁰. Dos son los riesgos fundamentales atribuidos a los TVS: el riesgo de recurrencia sin empeoramiento del grado o estadio, y el riesgo de progresión, con invasión del músculo vesical y desarrollo de enfermedad metastásica. El deseo de predecir qué TVS se convertirán en invasivos, y cuáles desarrollarán enfermedad diseminada ha estimulado el estudio de factores con posible valor pronóstico.

Desde la introducción por Mac Dowell en 1.809 de la cirugía electiva para los tumores viscerales, han sido muchos los intentos de clasificación individual de pacientes afectados de enfermedades neoplásicas. En el carcinoma vesical, a partir de Broders y Jewett⁶¹, los criterios histológicos (grado y estadio tumoral) junto con factores clínicos tales como la edad, la sintomatología, y el aspecto han sido las variables pronósticas más utilizadas a la hora de decidir actitudes terapéuticas y establecer posibilidades de supervivencia^{41,57}. En la actualidad, los factores pronósticos (FP) clínicos de mayor utilidad antes de instaurar ningún tipo de tratamiento adyuvante se pueden dividir en factores basados en hallazgos clínicos, endoscópicos, y en hallazgos patológicos.

D.1. Factores pronóstico basados en hallazgos clínicos

Primario o recidiva:

El aumento de frecuencia de ulteriores recidivas en los TVS recidivados en comparación con los primarios, es un hecho bien documentado. Los pacientes con un foco único de CCT primario presentan una recurrencia tras la primera resección transuretral vesical (RTUv) de



aproximadamente el 45%, mientras que en los que desarrollan un segundo tumor, esta cifra asciende hasta el 84%⁶².

Así Kwak et al⁶³ evalúan sobre 75 pacientes tratados por tumores T1 G3 el riesgo de recurrencia y progresión según se trate de G3 primario o no primario, con un seguimiento medio de 100 meses, y concluye la existencia de un mayor potencial para recurrencia y progresión en el caso de tratarse de un tumor primario y de alto grado.

Tasa de recidiva previa

En el año 2004 Oosterlinck et al⁶⁴ realizaron un estudio para la Asociación Europea de Urología (EAU) donde analizaron los factores de riesgo con mayor peso en la aparición de recidivas, de ellos, en segundo lugar, el factor con mayor peso para la aparición de recidivas, fue la tasa de recurrencia previa, calculada por la recurrencia a los 3 meses postRTU.

Un trabajo realizado por Ali-El- Dein et al⁶⁵, demuestra que la recurrencia en la primera cistoscopia a los 3 meses, junto al grado histológico y la ploidía del DNA, son los únicos predictores de progresión del tumor⁶⁵.

Asimismo para la EAU la alta frecuencia de recurrencias implica que el tumor se incluya dentro de los de alto riesgo⁶⁴.

Respecto a este punto, en una revisión de siete estudios en fase III de la European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) se encontró una gran variabilidad en cuanto a la recidiva en la primera cistoscopia de control a los tres meses en distintos centros, concluyendo la posibilidad de que la calidad de la resección realizada por distintos cirujanos podría explicar estas distintas tasas de recurrencia⁶⁶.

Empleo de terapia endovesical

El empleo de terapia endovesical como tratamiento adyuvante está ampliamente descrito en la literatura. Se han publicado diversos estudios y metaanálisis a este respecto, pero destacamos el



realizado sobre 1.476 pacientes por la EORTC, donde se compara RTUv sola frente a RTUv más una instilación inmediata de un quimioterápico endovesical. Concluye que con la resección sola se producía una recurrencia del 48,4% frente a un 36,7% en los pacientes que recibían una instilación posterior a la cirugía⁶⁷.

D.2. Factores pronóstico basados en hallazgos endoscópicos

Número de tumores

La influencia del número de tumores en la recurrencia tumoral ha sido motivo de debate en numerosos estudios. Mientras que para algunos autores no tiene influencia^{68,69}, para otros sí la presenta⁷⁰. En la citada revisión de Oosterlinck⁶⁴, para la EAU, en primer lugar destaca la presencia de multifocalidad como factor pronóstico más importante para la recidiva, observando que los pacientes con mayor número de tumores tenían mayor frecuencia de recidivas, y si existían más de 6 tumores, la recurrencia llegaba prácticamente al 100%.

En todo caso, no se ha establecido un número de tumores a partir del cual aumente el riesgo de recurrencia o de progresión del TVS, por lo que clásicamente se ha utilizado únicamente la multiplicidad tumoral (único frente a múltiple) como posible factor pronóstico.

En un estudio reciente de Millán et al⁷¹, la presencia de tumor múltiple multiplicó por 2,2 el riesgo (entendido como probabilidad) de recurrencia, y por 1,9 el riesgo de progresión. En cuanto a este último, son escasos los estudios que valoran el papel que desempeña la multiplicidad tumoral, pero parecen ser concordantes en que la multiplicidad incrementa el riesgo de progresión, teniendo un papel más incierto en cuanto a la mortalidad^{71,72}.

Tamaño tumoral

Existe una gran variabilidad en los resultados de los distintos autores en cuanto a la valoración de la utilidad del tamaño tumoral a la hora de predecir recurrencias. Varios autores no han encontrado



utilidad del tamaño tumoral para la predicción del riesgo de recurrencia ^{69,70}, si bien para otros, es uno de los FP de recidiva y progresión más importantes para el TVS⁷³. Entre los autores que encuentran que el tamaño tumoral es un factor predictivo de recurrencias^{71,74}, se ha llegado a afirmar que existe un menor riesgo de recurrencia entre los tumores de mayor tamaño⁷⁵. En la experiencia de Millán et al⁷¹, el tamaño tumoral mayor de 3 cm supuso un aumento del riesgo (RR) para la recidiva de 1,65 veces en relación a los tumores de menor tamaño, y de 1,7 veces para la progresión.

D.3. Factores pronóstico basados en hallazgos anatomopatológicos

Grado tumoral

Múltiples clasificaciones han intentado cuantificar el grado de diferenciación celular para el CCT, pero no existe un sistema de gradación uniformemente aceptado. Todos los sistemas de gradación tumoral son subjetivos, y el grado de reproductibilidad de los mismos es limitado. Se estima que para algunas clasificaciones, el porcentaje de reproductibilidad intrapersonal es del 79% y el interpersonal del 50%, siendo de casi el 90% para los tumores más indiferenciados⁷⁶. A pesar de estos inconvenientes, parece existir una buena correlación entre el grado y el estadio tumoral, siendo los tumores de bajo grado generalmente superficiales y los tumores de alto grado, de modo habitual, infiltrantes.

La clasificación que sigue siendo más aceptada en la actualidad es la de la OMS ⁴², que divide al CCT en 3 grados de diferenciación (Figura 7):

- **Grado 1:** se observa un tamaño nuclear normal con polaridad conservada en prácticamente todo su espesor. No existen prácticamente mitosis (0-3 /10 campos). Las células de superficie suelen estar preservadas. Los núcleos son de cromatina fina sin nucléolos y sin refuerzo de la membrana nuclear.



- **Grado 2:** El tamaño nuclear suele ser mayor que en el grado I, la polaridad puede estar conservada, levemente alterada o perdida. Las mitosis oscilan entre 0 y 33 /10 campos: Suelen faltar células de superficie (en forma de paraguas): La diferenciación celular está perdida. La cromatina presenta algunos gránulos gruesos y puede visualizarse más fácilmente algún nucléolo.
- **Grado 3:** El tamaño nuclear es mucho mayor por incremento de ambos ejes. La polaridad y la diferenciación celular está totalmente perdida. Se detecta fácilmente polimorfismo nuclear con características aberrantes. Existen abundantes mitosis (hasta 56 /10 campos).

En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad internacional de patología urológica (*International Society of Urological Pathology*, ISUP) propusieron una nueva clasificación de los tumores uroteliales no invasores⁷⁷. Fue publicada por la OMS en 2004^{77,78}, y su principal contribución es una descripción histológica detallada de los diversos grados, aplicando criterios citológicos y estructurales específicos. La actual graduación de la OMS de 2004, diferencia entre papiloma, neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno (NUPBPM) y carcinoma urotelial de bajo y alto grado. El papiloma está compuesto por un núcleo fibrovascular delicado recubierto de urotelio normal. Una NUPBPM se define como un tumor fibrovascular papilar recubierto de urotelio proliferado que supera el espesor normal. Aunque las NUPBPM presentan un riesgo insignificante de progresión, no son completamente benignas y tienen tendencia a recidivar. El grupo del carcinoma urotelial papilar de bajo grado comprende todos los casos anteriores de grado 1 (OMS 1973) y algunos casos anteriores de grado 2 (en caso de existir una variación de las características estructurales y citológicas con un aumento alto⁷⁷).

El grupo de histopatólogos de la CCAFU (Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie)⁷⁹ también ha recomendado, respecto al TVS, el uso del término Ta para las lesiones basales de carácter dudoso, y la subdivisión de los tumores T1 en 2 subgrupos: T1a y T1b, dependiendo de si el tumor se extiende o no a la muscularis mucosae.

La actual graduación de la OMS de 2004, diferencia entre papiloma, NUPBPM y carcinoma urotelial de bajo y alto grado. El papiloma está compuesto por un núcleo fibrovascular delicado recubierto de urotelio normal. Una NUPBPM se define como un tumor fibrovascular papilar recubierto de urotelio



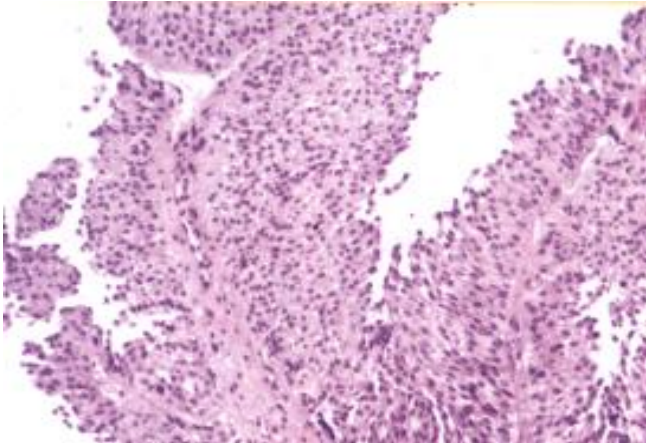
proliferado que supera el espesor normal. Aunque las NUPBPM presentan un riesgo insignificante de progresión, no son completamente benignas y tienen tendencia a recidivar. El grupo del carcinoma urotelial papilar de bajo grado comprende todos los casos anteriores de grado 1 (OMS 1973) y algunos casos anteriores de grado 2 (en caso de existir una escasa variación de las características estructurales y citológicas que las hace fácilmente reconocibles a bajo aumento). El grupo del carcinoma urotelial papilar de alto grado comprende todos los casos anteriores de grado 3 (OMS 1973) y algunos casos anteriores de grado 2 (cuando existe una marcada alteración de las características arquitecturales y citológicas evidentes a bajo aumento).

Pese a propugnarse en las guías de la EAU la utilidad de esta clasificación, estas mismas reconocen que, debido a su extensión, se sigue utilizando el sistema de gradación de la OMS de 1973¹¹. Actualmente, muchos patólogos utilizan ambos sistemas de clasificación de modo conjunto (p. ej.: OMS 1973 carcinoma urotelial papilar no invasor grado 2, OMS/ISUP 1998, carcinoma de bajo grado).

En general se ha visto que el grado tumoral es un factor muy importante de progresión y mortalidad⁷², pero no tanto de recurrencia⁷⁰. En cuanto a la progresión, se estima que el grado tumoral es que los tumores de Grado 1 progresan 5 veces menos que los tumores de Grado 3 (6% vs 30%, respectivamente)⁶⁶.

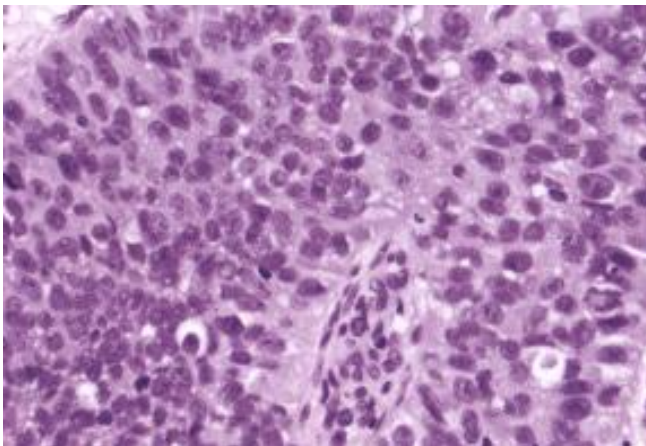
En uno de los primeros estudios realizados a este respecto, Bergkvist et al⁸⁰ observaron a 300 pacientes, 64 de los cuales (21%) presentaban tumores de bajo grado. Solo uno de ellos murió de CCT. Un total de 172 de los 236 pacientes con tumores de alto grado, murieron de CCT en el mismo periodo.

En el estudio de Millán-Rodríguez et al⁷¹, tomando como referencia el Grado 1, un tumor de Grado 2 presenta un RR de 3 para la progresión (riesgo 3 veces superior) y de 1,7 para la mortalidad, mientras que para el Grado 3 el riesgo de progresión es 20 veces mayor (RR 20), y el de mortalidad 14 veces superior (RR 14).



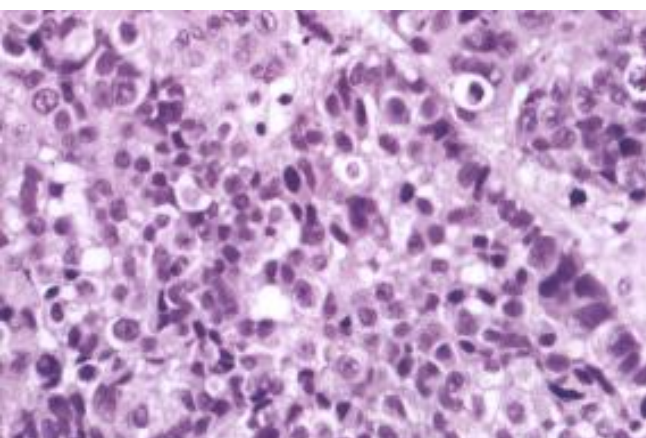
Carcinoma urotelial de Grado 1:

Tamaño nuclear normal. Polaridad conservada. No existen prácticamente mitosis (0-3/10 campos). Las células de superficie suelen estar preservadas. Los núcleos son de cromatina fina sin nucléolos y sin refuerzo de la membrana nuclear.



Carcinoma urotelial de Grado 2:

Tamaño nuclear mayor que en el grado I. Mitosis entre 0 y 33/10 campos. Faltan células de superficie. La diferenciación celular está perdida. La cromatina presenta algunos gránulos gruesos y pueden visualizarse más fácilmente algún nucléolo.



Carcinoma urotelial de Grado 3:

El tamaño nuclear es mucho mayor. Polaridad y diferenciación celular totalmente perdidas. Se detecta fácilmente polimorfismo nuclear con características aberrantes. Abundantes mitosis (hasta 56/10 campos).

Figura 7. Gradación del carcinoma vesical según la clasificación de Broders.



Estadio tumoral

Hace escasas décadas, Hugh Jewett evaluó la supervivencia de los pacientes a quienes se les extirpó la vejiga por padecer cáncer vesical y descubrió que la profundidad de la invasión en la pared vesical fue el factor determinante más importante para la supervivencia de estos pacientes. En 1944, Jewett y Strong llevaron a cabo la primera clasificación formal para la estadificación de los pacientes con cáncer de vejiga. Dividieron a los pacientes en tres grupos (A, B y C), que identificaban respectivamente a los pacientes con afectación submucosa, muscular y perivesical (Figura 3), respectivamente⁶¹.

A finales de los años 40 estas descripciones constituyeron la base para la clasificación TNM de los tumores de la vejiga urinaria. Actualmente se emplea la edición de 2009 de la clasificación TNM de la *American Joint Committee / Union Internationale Contre le Cancer* (TNM) (Tabla IV, Figura 8)⁸¹. Se trata de una mezcla mejorada que ha nacido tanto de la clasificación de Jewett-Marshall como de la TNM clásica de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC, 1997)⁸². Este sistema se basa en la evaluación de tres componentes: extensión del tumor primario (T), presencia o ausencia de enfermedad ganglionar regional (N), y presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). Las numeraciones de dichas categorías pueden agruparse posteriormente en estadios, que intentan estandarizar la investigación clínica.

Son bastantes los estudios que sugieren que el estadio tumoral es un FP independiente para la recurrencia^{69,75}, si bien no existe consenso^{70,71,83}. A este respecto, en donde parece haber mayor unanimidad de resultados es en la progresión y en la mortalidad tumoral, donde casi todos los estudios demuestran que el estadio tumoral es un FP de mortalidad⁷⁵; en los TVS (Ta vs T1), es un factor inequívoco de progresión⁷², con cifras que varían desde el 6% para los tumores en estadio Ta hasta el 46% para los tumores superficiales que afectan a la submucosa^{69,84} según series, si bien, se acepta que globalmente, el riesgo de invasión muscular es dos veces más bajo para los tumores Ta (9%) que para los tumores T1 (18%)⁶⁶.

El grupo de histopatólogos de la CCAFU⁷⁹ también ha recomendado, respecto al TVS, el uso del término Ta para las lesiones basales de carácter dudoso, y la subdivisión de los tumores T1 en 2 subgrupos: T1a y T1b, dependiendo de si el tumor se extiende o no a la muscularis mucosae.

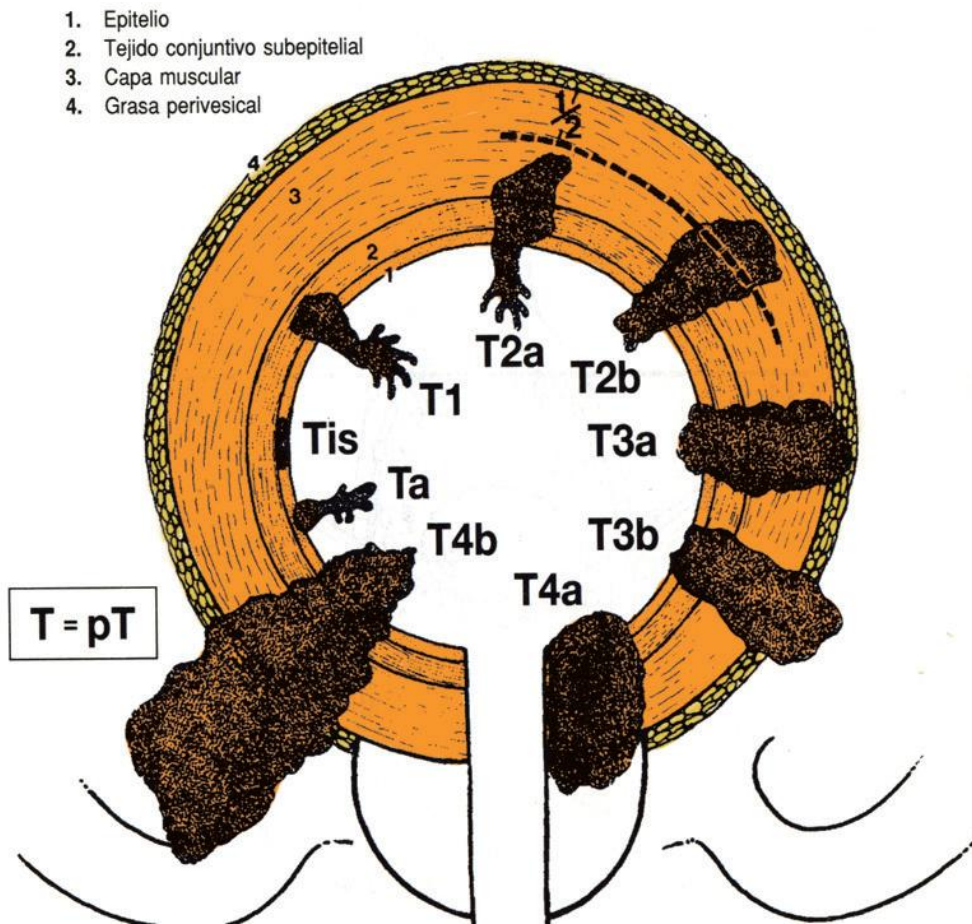


Figura 8: Estadificación del tumor primario según la clasificación TNM.



Tabla IV: Clasificación TNM de la UICC de 1997⁸².

T: Tumor primario

Tx: No se puede evaluar el tumor primario.

T0: No se evidencian signos de tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ.

Ta: Carcinoma papilar no invasivo.

T1: Tumor que invade el tejido conjuntivo subepitelial.

T2: Tumor que invade el músculo.

- **T2a:** Tumor que invade la capa muscular superficial.
- **T2b:** Tumor que invade la capa muscular profunda.

T3: Tumor que invade el tejido perivesical.

- **T3a:** Microscópicamente.
- **T3b:** Macroscópicamente.

T4: Tumor que invade alguna de las siguientes estructuras: próstata, útero, vagina, pared pélvica o pared abdominal.

- **T4a:** Tumor que invade la próstata, el útero o la vagina.
- **T4b:** Tumor que invade las paredes pélvica o abdominal.

Se añadirá el sufijo (m) a la categoría T para indicar que el tumor es múltiple.

Se puede añadir el sufijo (is) a cualquier categoría T para indicar la presencia de carcinoma in situ asociado

N: Ganglios linfáticos regionales

Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.

N0: No se demuestran metástasis linfáticas regionales.

N1: Metástasis en un solo ganglio de diámetro menor o igual a 2 cm.

N2: Metástasis en un solo ganglio linfático de diámetro máximo mayor de 2 cm, pero menor o igual a 5 cm; o en varios ganglios linfáticos, ninguno de ellos mayor de 5 cm de diámetro máximo.

N3: Metástasis en un ganglio linfático de diámetro máximo mayor de 5 cm.

M: Metástasis

Mx: No se puede evaluar la presencia de metástasis.

M0: Ausencia de metástasis.

M+: Presencia de metástasis.



Asociación con carcinoma in situ

Los CIS aislados suponen menos del 5% de todos los tumores vesicales. Lamm⁸⁵ ha descrito 3 tipos de CIS. El tipo I no es muy agresivo, es unifocal, y representa un estadio precoz del cáncer vesical. El tipo II es multifocal y suele causar síntomas vesicales irritativos. El tipo III se asocia a uno o más tumores y, como se ha comentado previamente, incrementa el riesgo de recurrencia, progresión, y mortalidad cáncer-específica⁸⁶. El riesgo de progresión del CIS multifocal (Tipo II) tratado mediante resección endoscópica aislada es cercano al 55%. La quimioterapia intravesical apenas reduce el riesgo (30-52%), mientras que la inmunoterapia con BCG reduce ese riesgo hasta por debajo del 30%⁸⁵.

Entre el 19 y el 50% de los CCT presentan focos de CIS asociados. Esta asociación es tanto más significativa cuanto mayor es el grado del tumor primario. Así, en algunas series⁸⁷, se pueden ver focos de CIS en el 8,1% de los tumores G1, en el 22% de los tumores G2 y en el 49% de los tumores G3. Esta presencia se asocia con un pronóstico desfavorable en cuanto a progresión y mortalidad se refiere, pues, tras un periodo de latencia variable, el 40-83% de estas neoplasias evolucionan a infiltración vesical⁴³, presentando estos pacientes un RR 3 veces superior de mortalidad⁷¹.

1.2. AGRUPACIÓN DE LOS TVS EN GRUPOS DE RIESGO Y BÚSQUEDA DE NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO.

Varios autores han tratado de clasificar los TVS en grupos de riesgo que ayuden a predecir la posible evolución del tumor, con el fin de diseñar estrategias de tratamiento y de seguimiento.



Los actuales enfoques de pronóstico basados en factores clinicopatológicos para predecir la recurrencia y la progresión en el TVS dividen estos factores en tres grupos: FP basado en la clínica, FP basados en la endoscopia y FP basados en hallazgos anatomopatológicos^{44-48,71,83,86}.

Para Parmar et al⁸³ los únicos FP de recurrencia fueron la multiplicidad tumoral, y la presencia de una cistoscopia de control positiva a los tres meses de la resección, mientras que ni el grado tumoral, ni el tamaño, ni el estadio, ni la localización, demostraron su utilidad como FP. De este modo, establecieron 3 grupos de riesgo de recurrencia: Grupo 1 (tumor único y cistoscopia negativa a los 3 meses), Grupo 2 (tumor múltiple, o cistoscopia positiva a los 3 meses) y Grupo 3 (tumor múltiple y cistoscopia positiva a los 3 meses). El porcentaje de pacientes libres de recurrencia a los 2 años fue del 74% en el Grupo 1, 44% en el Grupo 2, y 21% en el Grupo 3. En esta clasificación, interesante por su simplicidad, la introducción de la positividad cistoscópica a los 3 meses como factor de riesgo proporciona un alto grado de discriminación de la recurrencia tumoral; sin embargo, no es adecuada para valorar la progresión o la mortalidad por tumor, que no fueron valoradas por este autor.

Fradet et al⁸⁸, estudiando 382 pacientes con TVS iniciales, evidenciaron que los principales FP de recurrencia en su serie eran la multiplicidad tumoral, el tamaño, el estadio y el grado tumoral, definiendo lo que denominó "*características tumorales adversas*" (CTA): tumor múltiple, tamaño > 3 cm, estadio T1 y grado 2 ó 3. Mediante el sumatorio de estas CTA definieron tres grupos de riesgo: bajo riesgo (0 CTA), riesgo intermedio (1 o 2 CTA), y alto riesgo (3 o 4 CTA). Con esta clasificación, la recurrencia y la progresión a 1 año fueron, respectivamente, del 21 y 0% en el grupo de bajo riesgo, del 36 y 1% en el grupo de riesgo intermedio, y del 66 y 9% en el grupo de alto riesgo.

Posteriormente, la CCAFU⁷⁹, también clasificó los TVS en tres categorías de acuerdo al riesgo de progresión (grupos de riesgo bajo, intermedio y elevado), con los riesgos de progresión a enfermedad infiltrante y mortalidad cáncer específica señalados en la Tabla V. El problema es que cuando se utilizan estos grupos de riesgo, no se suele distinguir entre el riesgo de recurrencia de la enfermedad y el riesgo de progresión de la enfermedad.

Con el fin de predecir por separado los efectos a corto y largo plazo los riesgos de recurrencia de la enfermedad y de progresión en un medio similar al nuestro, el grupo de Millán-Rodríguez et al⁷¹



diseñó su propia clasificación de riesgo de los TVS basándose en los FP expuestos anteriormente, con la novedad de haber asignado a cada FP un peso específico en la recurrencia, progresión y mortalidad, estratificando las diferentes variables en función del grado, estadio y la asociación a CIS. De acuerdo con ello, y analizando 1.529 pacientes con TVS, establecieron 3 grupos con diferentes riesgos de recurrencia, progresión y mortalidad (Tabla VI). Los grupos de bajo riesgo y de riesgo intermedio demostraron un riesgo de recurrencia del 37% y 45%, respectivamente, sin riesgo significativo para la progresión o la muerte por cáncer de la vejiga. Por el contrario, en la categoría de alto riesgo, la incidencia de recurrencia, la progresión, y la mortalidad fue del 54%, 15%, y 9,5% respectivamente.

Más recientemente, el grupo de la EORTC, a través del análisis de 2.596 pacientes incluidos en 7 ensayos prospectivos aleatorizados, obtuvieron unas tablas con puntuación, asignando un determinado peso a cada uno de los factores de riesgo de recidiva o progresión (Tabla VII) a partir de la suma de los cuales, se obtenía una puntuación total que agrupa a los pacientes en cuatro grupos de riesgo para recidiva y progresión⁶⁷ basándose en los seis factores clínicos y patológicos más significativos:

- Número de tumores.
- Tamaño del tumor.
- Tasa de recurrencia previa.
- Categoría de T.
- Presencia de CIS concomitante.
- Grado del tumor.

La base de las tablas de riesgo de la EORTC son un análisis combinado de los datos de pacientes individuales de 2.596 pacientes con TVS incluido en siete ensayos aleatorizados⁶⁷. La Tabla VIII muestra la ponderación de peso aplicadas a los factores de riesgo basados en coeficientes de estas variables obtenidos en un análisis multivariante. La puntuación total en la recurrencia oscila entre 0 (mejor pronóstico) y 17 y la progresión entre 0 a 23. Según dicha puntuación, los pacientes finalmente son divididos en cuatro grupos según la puntuación obtenida, y finalmente agrupados en una clasificación de riesgo (bajo, intermedio y de alto riesgo) según la misma.



Posteriormente y a partir de este estudio, la EORTC ha desarrollado un software que permite calcular introduciendo cada uno de los parámetros, el riesgo asociado de recidiva y progresión para ese paciente. Este software calculador, se encuentran disponible en la página web de dicha organización: <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/>.

En base a los FP disponibles y en particular a los datos de las tablas de riesgo de la EORTC, las guías de la EAU recomiendan la estratificación de los pacientes en tres grupos de riesgo que faciliten las recomendaciones de tratamiento⁷⁸. Aún así, los datos fueron limitados por el escaso número de pacientes tratados con BCG (7%) o con instilaciones postoperatorias inmediatas de quimioterapia (10%) y el hecho de que no se llevaron a cabo re-RTUs vesicales.

El Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO) detectó estas debilidades y desarrolló un modelo de puntuación para la predicción de recurrencia y progresión basado en 1.062 pacientes con TVS y tratados con BCG de cuatro ensayos clínicos (que comparaban la eficacia de distintos esquemas de BCG)⁸⁹. El sistema de puntuación está basado en siete factores: edad, género, recurrencia previa, grado, estadio y presencia de CIS concomitante (Tabla IX).

Tanto las tablas de riesgo de la EORTC como el sistema de puntuación del CUETO han sido validados externamente en estudios de seguimiento a largo plazo en una población independiente de pacientes^{58,81,90-96} y están recomendados por las guías internacionales^{97,98}. A pesar de estos esfuerzos, Xylinas et al⁹⁶ han evaluado la capacidad de discriminación y calibración de las tablas de la EORTC y el sistema de puntuación del CUETO en una cohorte multicéntrica de 4689 TVS mediante un modelo de regresión de Cox para la predicción de recurrencia y progresión, y han encontrado que ambas muestran una capacidad de discriminación escasa tanto para la recurrencia (índices c de 0,597 y 0,52 respectivamente) como para la progresión (índices c de 0,662 y 0,616 respectivamente), especialmente en los grupos de alto riesgo.

En este contexto, actualmente la evaluación morfológica, la estadificación clínica, el estudio endoscópico y el estudio histológico, si bien tiene una utilidad clínica importante, no es un factor discriminante lo suficientemente eficaz como para determinar el potencial biológico de un cáncer determinado. Este hecho hace que la búsqueda de nuevos criterios capaces de definir precozmente el potencial biológico de un TVS sea poco menos que una necesidad con el fin de proporcionar las



bases para un mejor manejo de estos tumores, orientándonos en la adopción de la actitud terapéutica inicial, en el seguimiento postoperatorio y en la detección de recidivas y progresiones tumorales.

A lo largo de todos estos años, múltiples determinaciones biológicas han intentado solventar esta situación de incertidumbre evolutiva. Una de las líneas principales en la investigación uro-oncológica actual ha sido tratar de identificar factores biomoleculares de valor pronóstico, relacionados directamente con la enfermedad neoplásica, y capaces de ofrecer una información objetiva y cuantificable sobre la evolución y respuesta al tratamiento. Los estudios realizados sobre las alteraciones genéticas de distintas neoplasias (pulmón, mama...) han aportado datos de gran importancia y han establecido nuevos FP en estos tumores y nuevas vías de tratamiento, justificando cada vez más la realización de estudios que relacionen las alteraciones moleculares con el tipo de tumor y la evolución clínica.

Es de esperar que también en el TVS, el análisis de estas alteraciones y de su relación con las características clínicas y anatomopatológicas, mejore el conocimiento de la biología de las células neoplásicas y pueda aportar información relevante acerca del diagnóstico, evolución y FP de este tipo de tumores.



Tabla V: Clasificación en grupos de riesgo de progresión y mortalidad cáncer específica para la CCAFU⁷⁹.

	Tipo Tumoral	Progresión a 5 años	Muerte cáncer-específica a 10 años
Bajo riesgo	TaG1 único Ta G1-G2 (no recurrente en < 3 meses)	7,1%	4,3%
Riesgo intermedio	TaG2 multifocal Ta con recurrencias múltiples TaG3, T1G2 único	17,4%	12,8%
Alto riesgo	T1G3 Tis difuso T1 multifocal T1 recurrente en < 6 meses	41,6%	36,1%

Tabla VI: Clasificación en grupos de riesgo según Millán-Rodríguez et al⁷¹, con porcentajes de recurrencia, progresión y mortalidad, y RR de la misma.

	Tumores	Recurrencia (RR)	Progresión (RR)	Mortalidad (RR)
Bajo riesgo	G1 Ta G1 T1 único	37% (1)	0% (1)	0% (1)
Riesgo medio	G1 T1 múltiple G2 Ta G2 T1 único	45% (1,37)	1,8% (2,84)	0,73% (1)
Alto riesgo	G2 T1 múltiple G3 Ta o G3 T1 Cualquier Cis	54% (1,87)	15% (24,76)	9,5% (14,69)
Total		48%	7,5%	4,57%
Kaplan Meier (log-rank)		p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05



Tabla VII: Peso de los factores de riesgo de recurrencia y progresión según EORTC⁶⁷.

	Recurrencia	Progresión
Número de Tumores:		
Único	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
Tamaño del tumor		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Frecuencia de Recurrencia previa		
Primario	0	0
≤ 1 año	2	2
> 1 año	4	2
Categoría T		
Ta	0	0
T1	1	4
Cis		
No	0	0
Sí	1	6
Grado		
G1	0	0
G2	1	1
G3	2	5

Tabla IX: Probabilidad de recurrencia y progresión según la puntuación total de la EORTC⁶⁷.

	Probabilidad a 1 año (IC 95%)	a 5 años (IC 95%)
Puntuación Recurrencia		
0	15% (10-19%)	31% (24-37%)
1-4	24% (21-26%)	46% (42-49%)
5-9	38% (35-41%)	62% (58-65%)
10-17	61% (55-67%)	78% (73-84%)
Puntuación Progresión		
0	0.2% (0-0.7%)	0.8% (0-1.7%)
1-6	1% (0.4-1.6%)	6% (5-86%)
7-13	5% (4-7%)	17% (14-20%)
14-23	17% (10-24%)	45% (35-55%)



Tabla IX: Peso de los factores de riesgo de recurrencia y progresión según CUETO.

	Recurrencia	Progresión
Sexo:		
Varón	0	0
Mujer	3	0
Edad		
< 60 años	0	0
60-70 años	1	0
≥ 70 años	2	2
Recurrencia previa		
No	0	0
Si	4	2
Número de tumores		
Menor o igual a 3	0	0
Mayor de 3	2	1
Categoría T		
Ta	0	0
T1	0	2
Cis		
No	0	0
Sí	2	1
Grado		
G1	0	0
G2	1	2
G3	3	6



1.3. BIOLOGÍA TUMORAL

La vida media de una célula es el periodo de tiempo transcurrido desde su formación hasta su destrucción. Este periodo es muy variable entre los distintos tipos de células, y puede variar desde horas hasta meses. Las células mantienen esa capacidad intrínseca de crecimiento tanto en las embriogénesis y el desarrollo, como a lo largo de la vida del individuo adulto. Algunas células de vida media muy corta, como las epiteliales o las hematopoyéticas, experimentan una proliferación constante para dar lugar a un gran número de células descendientes; otras, como las neuronas, dejan de dividirse una vez diferenciadas. Salvo estas últimas, todas las células se renuevan continuamente en un proceso de “recambio celular”. En condiciones fisiológicas, se requiere una estricta regulación genética para mantener la homeostasis o equilibrio celular de forma adecuada a las necesidades de cada tejido mediante la contraposición de dos procesos:

- La formación por mitosis de nuevas células hijas, determina la tasa de proliferación. Este proceso, se asocia además a un proceso de diferenciación celular, particular para cada tejido o estado de desarrollo. El control de la proliferación comprende dos grandes aspectos relacionados: la producción de señales extracelulares capaces de iniciar el ciclo celular, y la regulación del ciclo celular.
- La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico de eliminación de células al final de su vida activa, como parte del recambio celular necesario para contrarrestar la producción continua por división celular. Igualmente, interviene en la formación de tejidos, en la morfogénesis y en la eliminación de las células con daño genético. Son ejemplos típicos del proceso apoptótico las muertes celulares que acompañan a la formación del tracto urogenital masculino, la muerte neuronal, la menstruación y la selección de células linfocíticas.



La alteración de este equilibrio en condiciones patológicas da lugar a un crecimiento descontrolado, que bien puede deberse a una excesiva proliferación, a una reducida apoptosis, o bien a ambas. Esto último, parece ser el origen del desarrollo neoplásico.

A. EL CICLO CELULAR Y SUS MECANISMOS DE REGULACIÓN

El ciclo celular es un proceso cuya finalidad es la de producir dos células hijas de idénticas características. Su duración total viene a ser de 18 a 25 horas. Aunque una vez iniciado el proceso de división celular, éste transcurre en un continuo, el global del ciclo, de un modo muy simplificado, se puede dividir en dos fases (Figura 13), en cada una de las cuales tienen lugar una serie de acontecimientos específicos fundamentales para la continuación del proceso (Figura 9). Estas fases están separadas por dos (realmente tres) intervalos, “gaps” en inglés, lo que ha dado lugar a su designación abreviada como G⁹⁹.

- **Fase G1:** Es la primera fase de la división celular. En ella, la célula evalúa su propia masa celular y su entorno, y si los encuentra propicios para la división, sintetizará todas las proteínas necesarias para la nueva síntesis de DNA. Suele tener una duración de 6 a 12 horas.
- **Fase S:** La fase de síntesis de DNA, se conoce como fase S, tiene una duración de 6 a 8 horas, y en ella se produce una duplicación completa del material genético.
- **Fase G2:** Es la fase de revisión, en la que se comprueba que la duplicación del DNA sea correcta. Una vez sucedida la duplicación del material genético, la célula la comprueba, y repara los posibles errores durante un periodo que dura unas 3-4 horas; una vez que la secuencia de DNA no muestra anomalías, pasa a la fase final.
- **Fase M:** En esta fase, cuya duración aproximada es de una hora, se produce la duplicación celular, y dará lugar a dos células hijas. En ella tiene lugar la condensación de los cromosomas, la rotura de la membrana nuclear, y la separación de las cromátides de cada

cromosoma que se dispersarán y se agruparán en cada polo celular para, tras la formación de nuevas membranas nucleares, producirse la división citoplasmática.

- **Fase G₀:** Una vez dividida una célula, ésta entra en una fase de reposo denominada G₀. En ella, la célula no recibe ningún estímulo, y puede permanecer en este estado desde horas hasta años. En esta fase también se encuentran las células que no se van a dividir en la vida postnatal (por ejemplo las células nerviosas). Desde esta fase, la célula puede entrar en un periodo de diferenciación, que le haga especializarse, y que le puede llevar a perder la capacidad de división, o bien puede volver a pasar a la fase de replicación. Si esto último sucede, la célula entra en el ciclo a través de la primera fase verdadera, la fase G₁.

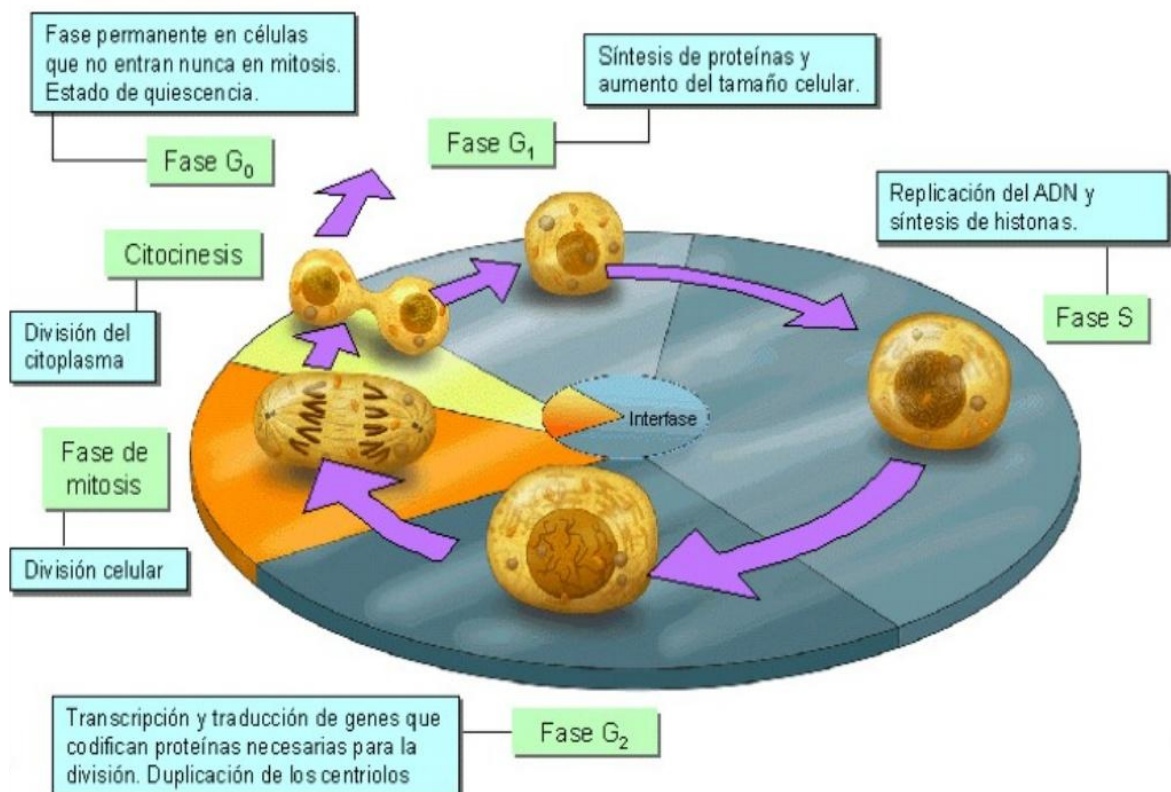


Figura 9: Fases del ciclo celular y acontecimientos que se producen en cada una de ellas.



El ciclo celular está regulado en todas sus fases mediante mecanismos estrictos a nivel de determinados puntos de control que impiden iniciar una fase sin que se haya completado la fase previa, o si ésta se ha realizado de modo defectuoso. La serie de productos que favorecen o inhiben el paso de una determinada fase a la siguiente son los llamados factores de activación o de inhibición celulares, y están controlados por un grupo de genes denominados genes del ciclo de división celular (cdc). En líneas generales, estos genes pueden dividirse en dos grandes grupos:

- Genes que codifican proteínas necesarias para la progresión del ciclo (enzimas y precursores de la síntesis de DNA, enzimas para la síntesis y ensamblaje de las tubulinas del huso.).
- Genes que codifican proteínas que regulan positiva o negativamente el ciclo celular
 - Genes que regulan positivamente el ciclo celular: corresponden a los denominados protooncogenes en mamíferos. Sus productos pueden activar la proliferación celular consiguiendo que células quiescentes (en reposo divisional) salgan de este estado para pasar a la fase S y entren en división. Entre estos genes están los que codifican las proteínas que forman el sistema de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Se suelen clasificar en dos tipos:
 - Genes de respuesta temprana, que son inducidos tras unos 15 minutos de tratamiento con factores de crecimiento y su inducción no requiere síntesis proteica.
 - Genes de respuesta tardía, que son inducidos tras al menos una hora de tratamiento con dichos factores. Su inducción requiere síntesis proteica y parece estar causada por las proteínas producidas por los genes de respuesta temprana. A su vez, algunos de estos genes de respuesta tardía pueden actuar como proteínas reguladoras de genes.
 - Genes que regulan negativamente el ciclo celular: reciben en conjunto el nombre de genes de verificación (*chk*) o, en mamíferos, genes supresores.



El paso de la fase G0 a G1 es la única fase del ciclo que está regulada por factores extrínsecos a la célula, fundamentalmente por los llamados factores de crecimiento¹⁰⁰, si bien, hay otros factores capaces de desencadenar este proceso¹⁰¹⁻¹⁰³: factores hormonales (hormonas tiroideas, hormonas adrenales...), neurotransmisores, nucleótidos, retinoides, ácidos grasos, óxido nítrico y monóxido de carbono. Todos estos factores son capaces de actuar sobre receptores proteicos presentes en la membrana celular, cuyo dominio transmembrana hidrofóbico está insertado en la bicapa lipídica de la membrana celular¹⁰⁴. Los receptores, a través de los cuales los factores de crecimiento ejercen su acción, son también producto de la activación de protooncogenes específicos. En la inmensa mayoría de los casos, estos receptores desarrollan su acción comportándose como tirosina-kinasas, es decir, como enzimas que modifican el comportamiento de las proteínas mediante la fosforilación de la tirosina¹⁰⁵. Después de la exposición a estos factores de crecimiento, se produce la expresión transitoria de un grupo de unos 100 genes, algunos de los cuales son los llamados genes de acción inmediata o “immediate early genes”, que determinarán la expresión de otros genes, parte de los cuales van a producir la proliferación celular. El resto actúan a través de la producción de ciclinas, que como ya se ha mencionado anteriormente, son proteínas fundamentales para la progresión del ciclo celular.

Dentro del grupo de los genes de acción inmediata, existen tres familias principales:

- Familia *fos*: Incluye tres genes, *c-fos*, *fos-B* y *fra-1*, que son componentes de un factor de transcripción complejo, y responden rápidamente a la exposición al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento neural (NGF). Las proteínas derivadas de estos genes aparecen de modo muy precoz, y desaparecen en 2-3 horas.
- Familia *jun* (*c-jun*, *jun-B* y *jun-D*): Aparecen al cabo de una hora y desaparecen en unas 8 horas.
- Familia *myc* (*c-myc*, *L-myc*, *N-myc*, *R-myc* y *B-myc*): Dentro de la cual, sólo el *c-myc* interviene en el paso a célula en duplicación, y cuya presencia se mantiene constante a lo largo del ciclo celular.



Por otra parte, en los puntos de control G_1/S y G_2/M intervienen las ciclinas y las CDKs, que se asocian formando complejos Cdk-ciclina para controlar la actividad del ciclo celular⁹⁹.

El nombre de ciclinas se debe a que la concentración de estas proteínas fluctúa a lo largo del ciclo celular. Existen numerosas ciclinas que se pueden agrupar en 2 grandes grupos, las ciclinas de inicio, que ejercen su acción fundamentalmente a nivel de G_1 , regulando el paso G_1/S (ciclinas tipo D y E) y las ciclinas mitóticas, o de la fase G_2 , que regulan el punto de control G_2/M (ciclinas A, B1 y B2)¹⁰⁶. Las Cdk, constituyen una familia de proteínas con gran homología de secuencia con las ciclinas, de acción serina/treonina quinasas y que sólo pueden ejercer su acción cuando se encuentran asociadas a una ciclina y que, a diferencia de éstas, actúan promoviendo todo el ciclo celular y su concentración no varía de modo importante a lo largo del mismo¹⁰⁷. El punto principal en el que inciden para ejercer su acción es la proteína codificada por el gen del retinoblastoma (*Rb*)¹⁰⁶. El *Rb* codifica una proteína denominada pRb, que no está fosforilada durante la fase G_1 y que se une al factor de transcripción E2F¹⁰⁸. Esta proteína se fosforila en el primer punto de restricción (paso G_1/S) por acción de las ciclinas CDK2 y CDK4, lo que provoca la liberación del factor E2F y se produce la transcripción, iniciándose la siguiente fase del ciclo celular, la fase S. El hecho de que a partir de este paso, la célula no necesite más estímulos para proseguir su camino en el ciclo celular, impone la necesidad de una serie de controles muy estrictos, para que todo el proceso se desarrolle normalmente, y el punto donde el control es mayor, es precisamente éste, la transición G_1/S , también denominada punto "start". Este paso se puede bloquear impidiendo la fosforilación de la proteína pRb, y a este nivel actúan la proteína p16, codificada por el gen *TP16*, la proteína p21, codificada por el protooncogén *Ras*, y la proteína p27, pero el factor fundamental parece ser la proteína p53.

El gen supresor *TP53*, codifica la proteína p53, que actúa a nivel de la transcripción y de la traslación, revisando la correcta secuencia de DNA antes de replicarse⁹⁹. Este gen está controlado por otro gen inactivador, el *MDM2*, que codifica la proteína p90. La proteína p53 actúa sobre la proteína p21, que inhibe la fosforilación de la pRb, y con este mecanismo, el gen p53 permite la reparación del DNA anómalo (a través de múltiples genes reparadores como *MLH1* y *MLH2*, entre otros)¹⁰⁹ y, en caso contrario, se provoca la detención del ciclo celular y provoca la entrada de la célula en G_0 , o bien su muerte por apoptosis¹¹⁰.



En la transición S/G2 y G2/M, parece que la proteína de control es la p34, ayudada de la Cdc10 (que activa a un factor de transcripción) y un homólogo de Cdc25 que monitoriza que el DNA se haya duplicado en su totalidad, así como que la célula haya alcanzado el volumen suficiente¹¹¹.

El segundo punto de restricción, en el paso G2/M lo determina, el gen regulador de la p34, el gen *rum1*, de características similares al *suc1*, ya que ambos actúan sobre el Cdc2¹¹².

Como ya se ha mencionado, la apoptosis es un proceso fisiológico, controlado genéticamente, mediante el cual, las células dañadas o las que han cumplido su ciclo vital, activan mecanismos que conducen a su propia destrucción. La apoptosis es un fenómeno activo, que supone la muerte celular con la menor respuesta inflamatoria posible, a través de la condensación de las estructuras celulares, sin citolisis, y con la eliminación de los restos mediante su expulsión al lumen de los sistemas orgánicos ductales o tubulares, o la fagocitosis de los restos por los macrófagos del entorno. Para completar este proceso, se han de sintetizar diversas sustancias, se ha de producir la fragmentación de DNA por los sitios vulnerables de las endonucleasas, y otra serie de complejas reacciones que completan el proceso. Las células normales son capaces de sufrir apoptosis, pero la producción de sustancias antiapoptóticas les impide activar este proceso. In vivo existe un equilibrio entre la producción de sustancias pro y antiapoptóticas, que regula la decisión de si una célula debe sufrir una muerte programada, y es por tanto una barrera para la proliferación neoplásica¹¹³.

Desde un punto de vista celular y molecular, los cambios en la apoptosis parecen transcurrir en tres etapas relativamente definidas: la primera fase o fase de inducción, apenas se conoce, y se sabe que se produce la reacción ante un estímulo o señal que puede ser tanto extra como intracelular. Una vez producida la inducción, comienza el verdadero proceso apoptótico, que consta de alteraciones diversas que conducirán a la muerte celular: cambios morfológicos y de la membrana, con disminución de la adhesión a otras células y a la matriz extracelular, contracción del citoplasma, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA, disminución del volumen nuclear seguido de su desintegración.

Las caspasas (Cytosolic-Aspartate-Specific Proteases: CASPasa) son los efectores finales de la vía apoptótica, en el sentido de que, una vez activadas, el proceso de muerte celular recibe su impulso final¹¹⁴. Todas las caspasas comparten zonas limitadas de homología secuencial, y tienen una



actividad proteolítica muy restringida. Existen 14 tipos descritos, que difieren en su longitud y en la secuencia de su prodominio N-terminal. Pueden dividirse en dos grupos:

- Caspasas de predominio largo (1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 y 14): contienen moléculas para el reclutamiento de otras caspasas o para interacción con receptores fas/TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). Se pueden autoactivar.
- Caspasas de predominio corto (3, 6, 7, 11, 13): se activan por escisión por otra caspasa o mediante granzima B.

Todas las caspasas actúan, por tanto, en un sistema de cascada, degradando proteínas celulares y sus antagonistas, conduciendo finalmente a la muerte celular.

Entre los genes que regulan la apoptosis se encuentran el *bcl-2*, el *fas*, el *p53* y el *c-myc*.

- Familia de genes *bcl-2* (*bcl-2*, *bcl-X1*, *bcl-Xs*, *bcl-1*, *bax*, *bak*, *bag*, *bad*): codifican una proteína de 24 Kd que se asocia a las membranas internas del núcleo y las mitocondrias, protegiendo contra una gran cantidad de señales que conducen a la apoptosis. Parece que estos efectos antiapoptóticos tienen lugar mediante la fijación de una proteína, la proteína Bax, que es promotora de la apoptosis si se acumula en el interior celular como homodímeros, que provocan la formación de poros en la membrana mitocondrial, a través de los cuales se produce la pérdida del citocromo C mitocondrial y consecuentemente, la muerte celular¹¹⁵.
- Gen *fas*: codifica la proteína Fas (Apo-1/CD95), que comparte una secuencia parcial con diversas proteínas de membrana capaces de traducir una respuesta de muerte celular (TNF β , FCNBA, p75). La proteína Fas es una proteína transmembrana con una zona externa y dominios citosólicos internos. Al fijarse el dominio externo de la proteína Fas, el anticuerpo anti Apo-1 provoca un agrupamiento de la proteína Fas sobre la superficie celular, que provoca una reacción en cascada en la que otras proteínas citosólicas (TRADD, FADD/Mort, RIP) se adhieren al dominio interno de la proteína activándose la cascada de las caspasas¹¹⁶.



- Gen supresor *p53*: del que nos ocuparemos más adelante de un modo más detallado. Es un gen que codifica una proteína que actúa como factor de transcripción que controla la expresión de productos de genes que bloquean el avance del ciclo celular en fase G1. La función de la proteína *p53* en la apoptosis sigue sin resolverse, si bien parece más que probable que su papel como activador transcripcional de la expresión de *bax* y *fas* tenga que ver con ese efecto¹¹⁷.
- Se ha visto que la expresión del *c-myc* (a veces precedida por la expresión del *c-fos*) puede estar involucrada en las primeras fases de la apoptosis, del mismo modo que el TNFR-1 (receptor del TNF- α), que se activaría por la unión del TNF- α en la superficie celular con unión al dominio asociado al TNF (TRADD) provocando la activación de caspasas¹¹⁸.

B. GENES Y CARCINOGENESIS

Un gen es un segmento corto de DNA, que contiene las instrucciones necesarias para producir una proteína específica. Hay aproximadamente 30.000 genes en cada célula del cuerpo humano y la combinación de todos los genes constituye el material genético o genoma. Las neoplasias son el resultado de alteraciones inducidas en el material genético de las células por diferentes procesos. Durante la carcinogénesis se producen incrementos, pérdidas de material genómico o mutaciones, que afectan a la secuencia o la expresión de los genes. Los cambios que experimenta el DNA alteran el funcionamiento normal de los genes en lo referente a alteraciones de la estructura original, función, formación de nuevas proteínas o en la regulación anómala de los genes. Las proteínas alteradas por estos cambios son factores de crecimiento, sus receptores, los inhibidores de las quinasas, los transmisores de señales y los factores de transcripción que regulan el ciclo celular, y como consecuencia de su alteración las células adquieren la información necesaria para la modificación de su crecimiento.



Las alteraciones genéticas se pueden producir en los protooncogenes, genes supresores y genes reparadores. Los protooncogenes son genes normales con un papel fundamental en la división y proliferación celular, que si se alteran pueden convertirse en oncogenes y provocar que la célula se transforme en una célula cancerosa. Los genes supresores son los encargados de controlar e impedir la división celular en condiciones anormales. Cuando se inactivan, inducen un aumento de la división celular. Los genes reparadores del DNA actúan durante la replicación celular corrigiendo los errores de la DNA polimerasa; fallos en la función de estos genes ocasionan una acumulación de alteraciones genéticas que conllevan. De todos ellos, hablaremos con más detalle en la siguiente sección.

C. ONCOGENES, GENES SUPRESORES Y GENES REPARADORES

C.1. Oncogenes

La investigación biológica básica sobre el cáncer se remonta a los comienzos del siglo XX, cuando en 1911 Francis Peyton Rous descubrió un virus causante de sarcoma en aves. El virus, perteneciente a la familia de los retrovirus, fue denominado Rous Sarcoma Virus (RSV), y permitió el estudio en el laboratorio de la transformación celular¹¹⁹. Sin embargo, no fue hasta la década de los setenta cuando se consiguió identificar el gen *v-src*, constituyente del genoma del RSV, como agente causante de la transformación. Posteriormente, y gracias a las técnicas de manejo de material genético, se pudo comprobar que existía una versión normal, no activada, del gen *v-src* en todas las células de pollo, y se le denominó *c-src*¹²⁰.

La similitud funcional entre ambas versiones quedó probada cuando el grupo de Hanafusa consiguió que un mutante del RSV, parcialmente defectivo en el gen *v-scr* y, por tanto, incapaz de transformar células, recuperara su capacidad transformante por recombinación con el *c-scr* presente en las células normales¹²¹. En muchas especies animales, incluido el hombre, se han hallado homólogos del gen *c-src* con un alto nivel de conservación. Este resultado alertó sobre la gran importancia de



este gen en la regulación de la proliferación celular. Establecida la semejanza estructural y funcional de las versiones *c-* y *v-* de los oncogenes, parecía razonable considerar que estas últimas se habían originado en las primeras, y así, se propuso denominar protooncogenes a las versiones celulares¹²².

Por extensión, se comprobó que prácticamente todos los oncogenes víricos tienen un homólogo celular, del cual aparentemente habrían derivado, al ser sus homologías, tanto a nivel de nucleótidos como de productos codificados, muy significativas y conseguirse experimentalmente la transducción, la producción de oncogenes retrovíricos a partir de cultivos celulares y animales¹²³⁻¹²⁶. Se han elaborado modelos de los mecanismos por los que ciertos retrovirus han incorporado protooncogenes, que, como consecuencia de su inserción en el genoma vírico y de los eventuales procesos de recombinación y otras alteraciones que ello conlleve, han adquirido capacidad transformante¹²⁷. No se trata pues de que las versiones celulares de los oncogenes pertenezcan a virus endógenos, como proponían las primeras teorías de Huebner¹²⁸, sino de genes celulares que en su momento fueron capturados por retrovirus e incorporados a su genoma. Así, para distinguir las distintas versiones de un mismo oncogén se acordó anteponerles letras, de este modo el *c-src* es la versión celular y el *v-src* la versión presente en el RSV.

La posibilidad de transformar in vitro células normales en tumorales por la incorporación de DNA libre extraído de células tumorales, y las técnicas de ingeniería genética, permitieron clonar oncogenes dominantes procedentes de tumores. Así, del DNA de células del carcinoma de vejiga humano se clonó el oncogén denominado *c-H-ras*^{129,130}. Hay que recordar que hasta entonces solo se habían clonado oncogenes virales. Los grupos dirigidos por Robert A. Weinberg, Mariano Barbacid, y Michael Weigler usaron el *c-H-ras* como sonda para detectar su correspondiente protooncogén en el genoma de las células humanas normales mediante técnicas de hibridación de DNA; cuando ambos genes se compararon, se observó que poseían idéntica secuencia de bases excepto una mutación puntual (una guanina del protooncogén está sustituida por una timina en el oncogén); por consiguiente se estableció que una simple mutación puntual puede conferir capacidad transformante al gen¹³¹.

Durante los últimos 20 años se han descubierto una gran cantidad de retrovirus capaces de inducir tumores en animales experimentales y que son portadores de genes adquiridos de las células huésped activados por diferentes tipos de alteraciones.



Como ya ha sido mencionado, los protooncogenes son genes normales con un papel fundamental en la división y proliferación celular. Toda célula contiene un gran número de protooncogenes y un protooncogén puede estar bien conservado entre distintas especies, mientras que distintos protooncogenes de una misma especie no tienen por qué ser particularmente similares.

El protooncogén codifica una proteína, generalmente relacionada con la proliferación celular o la apoptosis, que actúa sólo cuando recibe señales reguladoras específicas. Muchos de ellos están intensamente expresados durante ciertas etapas del ciclo celular y especialmente relacionados con fases definidas de la embriogénesis, fundamentalmente son factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, receptores hormonales, o factores de transmisión intracelulares (2º mensajeros).

Tipos de protooncogenes¹³²:

Se han identificado protooncogenes que codifican proteínas muy diversas:

- Factores estimuladores del crecimiento celular. La alteración del protooncogén origina una producción excesiva del factor proteico o una mayor actividad de éste.
 - Ejemplo: el protooncogén *sis*, que codifica la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF),

- Receptores de factores de crecimiento o de hormonas, presentes en la membrana o en el interior celular. Para el caso de un factor de crecimiento u hormona estimuladores de la proliferación, la forma oncoproteica del receptor puede ser aquella con una conformación que la mantiene activa aunque no se le una el ligando. Si se trata del receptor de un factor u hormona inhibidores del crecimiento, la oncoproteína es aquella que no responde a la unión del ligando.
 - Ejemplo: el protooncogén *erbB*, que codifica el receptor de membrana para el EGF.



- Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales. Su alteración hace que el oncogén exprese una proteína que se mantiene activa sin necesidad de que le llegue la señal.
 - Ejemplo: el protooncogén *ras*, que codifica una proteína G monomérica.

- Factores de transcripción que controlen la expresión de genes que codifican a su vez proteínas implicadas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis.
 - Ejemplos: los protooncogenes *fos*, *jun* y *myc*, y el protooncogén *erbA* que codifica el receptor intracelular para hormonas tiroideas, que es un factor de transcripción.

- Finalmente, proteínas responsables de la activación directa del ciclo celular (tales como las ciclinas o las quinasas y fosfatasas activadoras de las Cdk) o de la inhibición de la apoptosis. Los oncogenes respectivos expresan proteínas en mayor cantidad o con función aumentada.
 - Ejemplos: el protooncogén *bcl-1*, que codifica la ciclina D1, el protooncogén *cdk1* codifica la quinasa dependiente de ciclina Cdk1, el protooncogén *mdm-2*, que codifica un antagonista de la proteína p53, el protooncogén *bcl-2*, que codifica una proteína mitocondrial que bloquea la apoptosis al inhibir las caspasas.

Para que un protooncogén pierda su función, basta la sola alteración de uno de los dos alelos del gen. Las alteraciones genéticas responsables de la transformación oncogénica son múltiples (Figura 10), y pueden producirse por dos tipos de mecanismos: cualitativos y cuantitativos¹³²:

Entre los mecanismos cuantitativos, los principales son:

- Mutación puntual: en la que se produce un cambio cualitativo al sustituirse una base del DNA normal de un protooncogén por otra. Si ésta se produce en una región codificante, ocasiona una alteración en la producción de la proteína codificada, bien una alteración en el aminoácido sintetizado (con la consiguiente alteración de la proteína final), o bien el truncado del mensaje y la interrupción de la secuencia de aminoácidos (lo que dará como resultado una proteína incompleta). Cualquiera de estas alteraciones puede tener efecto



carcinogénico, y la causa de las mismas pueden ser sustancias químicas, influencia de radiaciones, o bien ocurrir espontáneamente¹³³.

- Delección: o pérdida de una secuencia de DNA del cromosoma completo. Dicha pérdida puede variar desde una sola base a una parte importante del cromosoma^{134,135}. Las consecuencias de la pérdida pueden ser:
 - Que el gen adquiera una nueva posición próxima a una secuencia promotora la cual va a inducir sobreexpresión de dicho gen.
 - Que el material perdido corresponda a una secuencia inhibitoria de un gen, lo que se traducirá en sobreexpresión del mismo.
 - Que la pérdida de material genético se pueda asociar con la inactivación de genes supresores tumorales, tales como el del retinoblastoma.

Dentro de los cuantitativos, también existen varios tipos diferentes:

- Amplificación: Consiste en la multiplicación del número de copias del gen presentes en el cariotipo¹³⁶.
- Reordenación cromosómica (traslocación): El desplazamiento de un gen hacia una nueva ubicación en el propio cromosoma o en el alelo correspondiente¹³⁷.
- Inserción de un promotor viral: Los virus contienen secuencias promotoras llamadas LTR (Long Terminal Repeat), que cuando se incorpora a una célula en una región adyacente a las secuencias reguladoras del gen, éste queda bajo el control del LTR produciéndose alteraciones del crecimiento y diferenciación celular¹³⁸.
- Hipometilación: Cuando la secuencia promotora de un gen presenta sus residuos de citosina metilados, la iniciación de la transcripción se encuentra mecánicamente interrumpida, cuando la metilación desciende por debajo de sus niveles habituales aumenta el grado de transcripción¹³⁹.



La acción de los protooncogenes y sus correspondientes oncogenes se realiza por medio de tres mecanismos básicos¹³²:

- Fosforilación de proteínas: que acontece en los aminoácidos serina, treonina y tirosina. Con este mecanismo actúan las familias de las proteína-tirosín- kinasas asociadas a receptor (*erbB-1*, *fms*, *kit* y *sis*), proteínas que no se asocian a ningún receptor (*src*, *atk*, *blk*, *c-fgr*, *c-fyn*, *hck*, *lck*, *lyn* y *c-yes*) y serín-treonín-kinasas o proteínas capaces de fosforilar a otras en los aminoácidos serina y treonina (*c-mos* y *c-raf*).
- Transducción de señales: mediada por proteínas G (*c-ras*).
- Control de la tasa de transcripción: los genes que constituyen esta familia codifican proteínas que se fijan específicamente a ciertas secuencias del DNA, afectando a la velocidad con que se transcriben otros genes (*c-erbA*, *fos*, *jun* y *myc*).

Según el lugar de acción de las proteínas sintetizadas por los oncogenes, estos pueden ser clasificados como citoplasmáticos o nucleares. Los citoplasmáticos codifican proteínas que afectan al reconocimiento y traducción de señales externas recibidas en la superficie celular, e incluyen factores de crecimiento, sus receptores y segundos mensajeros con actividad tirosín-kinasa. Los oncogenes nucleares ejercen su acción modulando la transcripción del DNA.

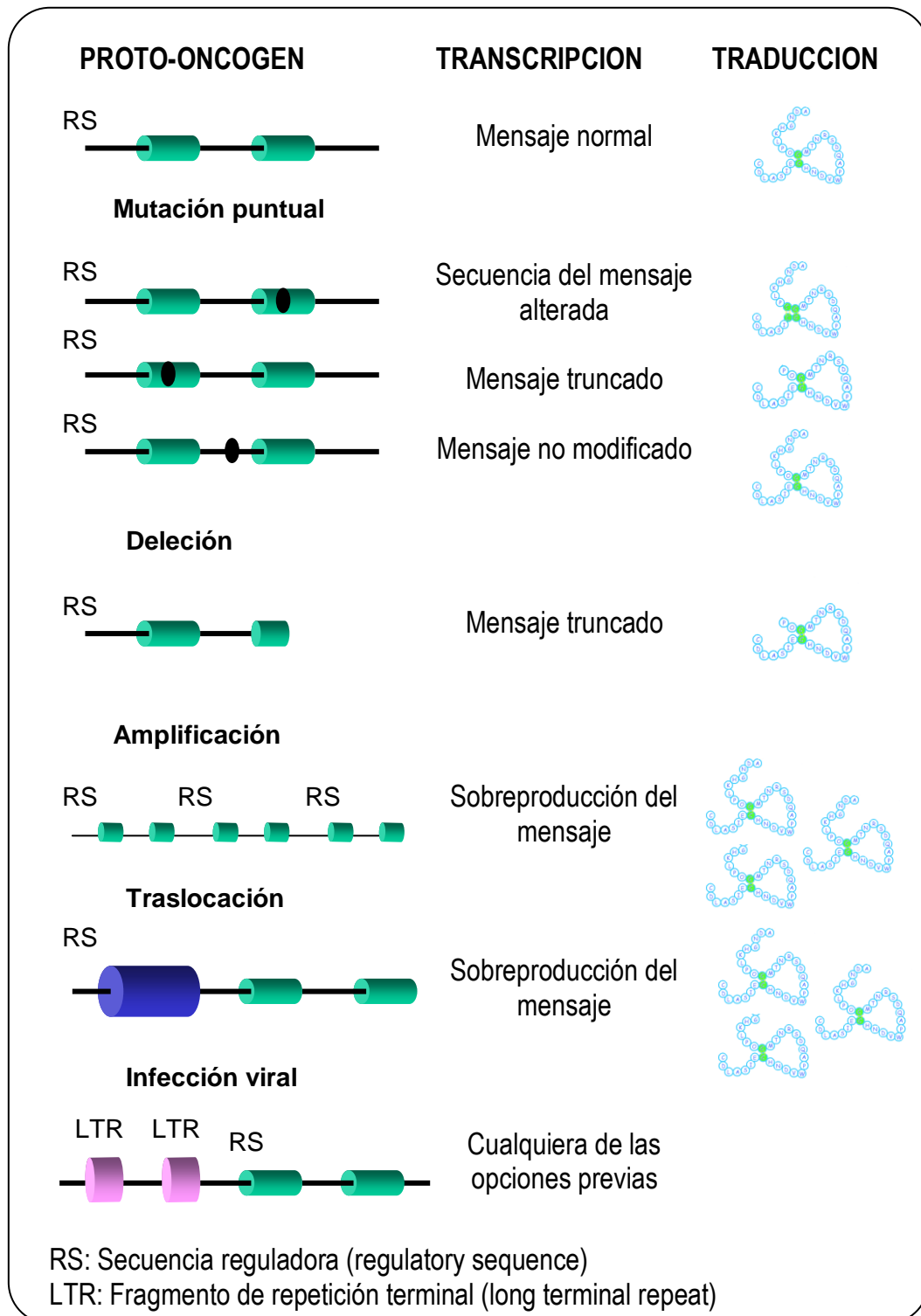


Figura 15: Mecanismos de activación de los oncogenes.



C.2. Genes supresores

Los genes supresores son genes cuyos productos son necesarios para el funcionamiento celular normal, y cuya pérdida da lugar al desarrollo de tumores. Al igual que los protooncogenes, los genes supresores codifican proteínas que actúan en distintos puntos de las rutas de señalización, del control del ciclo celular y de la apoptosis. Pertenecen a un grupo de genes cuyos productos están involucrados en la regulación negativa del ciclo celular. La pérdida en la célula de uno de estos genes supone la proliferación de modo incontrolada de la misma.

Cuando una alteración del gen supresor conduce a la síntesis de una proteína no funcional o impide esa síntesis ("pérdida de función"), la proliferación deja de estar controlada o la apoptosis nunca tiene lugar, por lo que aparece una proliferación excesiva, a menudo con acumulación de daños genéticos en las células.

A diferencia de los oncogenes, donde un solo alelo alterado afecta al fenotipo de la célula, la pérdida de la función de un gen supresor sólo se produce cuando han mutado los dos alelos. Es decir, la forma mutada de un gen supresor se expresa con carácter recesivo. Esto quiere decir que la alteración de un solo alelo no produce pérdida de función, porque las moléculas de proteína sintetizadas a partir del alelo normal pueden suplir esa carencia, al menos parcialmente.

Según la hipótesis propuesta por Knudson, en el cáncer hereditario son necesarias dos alteraciones genéticas, una en cada uno de los dos alelos del gen supresor, para que éste pierda su función. Una familia que tiene una alteración en un gen supresor lo transmitirá de padre a hijo de forma dominante, precisando tan sólo de otra alteración en el otro alelo para que aparezca el proceso tumoral. Ésta es la razón de la aparición casi dominante de los tumores en las familias en las que se heredan, y también es la razón de que su aparición sea más temprana (sólo se precisa tiempo para la segunda alteración genética).

El reconocimiento de la importancia de los genes supresores tumorales en la carcinogénesis humana deriva de los estudios genéticos del retinoblastoma y del tumor de Wilms. Estos tumores frecuentemente presentan un patrón familiar, e inspiraron la "hipótesis de Knudson"¹⁴⁰. Según esta



propuesta, una de las dos lesiones genéticas requerida es heredada y por tanto se presenta constitucionalmente en los casos familiares.

Tipos de genes oncosupresores¹³²:

- Factores inhibidores del crecimiento celular: la alteración del gen supresor correspondiente anula la funcionalidad de la proteína sintetizada.
 - Ejemplo: el gen supresor *dcc*, que codifica una proteína de adhesión celular, ausente en el carcinoma de colon.

- Receptores de esos factores inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular: la forma mutada del gen supresor codifica un receptor insensible a su ligando o que no transmite la señal al interior de la célula.
 - Ejemplo: el gen supresor que codifica el receptor de membrana para el factor- β de crecimiento transformante (TGF- β).

- Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores anteriores: la situación varía según sea la función concreta de la proteína.
 - Ejemplo: el gen supresor *nf1*, que codifica la neurofibromina, proteína que estimula la actividad GTPasa de Ras, lo que se traduce en la inactivación de la proteína. En la enfermedad de Recklinghausen el gen *nf1* está mutado, por lo que la neurofibromina es defectuosa, la proteína Ras no libera el GTP y queda en forma activa más tiempo de lo normal, aumentando la proliferación.

- Factores de transcripción que dirigen la expresión de genes cuyos productos proteicos frenan el ciclo celular o conducen a la apoptosis: la forma mutada del gen supresor expresa una proteína no funcional.
 - Ejemplos: los genes supresores *Rb* y *p53*.



- Proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis: el gen mutado no expresa la proteína o da lugar a una forma no funcional.

C.3. Genes Reparadores

A pesar de la gran cantidad de carcinógenos ambientales con capacidad comprobada para desarrollar daños del DNA, y de los errores que frecuentemente se producen en la replicación del DNA de las células en división, la cantidad de tumores desarrollada es relativamente pequeña. Esto se debe a que existen mecanismos moleculares que favorecen la reparación de los daños en el DNA. Las células con errores en el DNA expresan un genotipo de error de replicación que se comprueba examinando las secuencias de microsatélites. En el genoma humano, existen secuencias repetitivas de DNA (usualmente de 1 a 4 bases de longitud), que se denominan secuencias de microsatélites. Estas secuencias varían mucho de unos individuos a otros, pero son idénticas en todas las células del mismo individuo. Cuando las células muestran errores de reparación del DNA, aparecen contracciones o expansiones de estas repeticiones que van a dar lugar a alelos no parejos en las células normales del mismo paciente. Este fenómeno se denomina inestabilidad de microsatélites. Se han encontrado algunas mutaciones o alteraciones en genes implicados en controlar o reparar los errores que ocurren en la replicación y transcripción, por un lado, y en genes que se encargan de detectar los daños que provocan los agentes endógenos y exógenos a la molécula de DNA, por otro.

La alteración de estos genes en el proceso de la carcinogénesis puede deberse a dos tipos de mecanismo: por un lado, a cambios epigenéticos, aún no bien conocidos, que afectan a la expresión de los mismos y pueden permanecer en estado latente durante toda la vida de la célula (por ejemplo, son abundantes los agentes mutágenos que modifican la expresión génica alterando la secuencia del DNA mediante metilación). Sin embargo, la mayor parte de estos cambios son alteraciones en la estructura de los genes que ocurren sucesivamente en las células somáticas (mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones,...). Diferentes agentes ambientales, físicos o químicos tienen la capacidad de interactuar con el DNA provocando alteraciones inespecíficas que, si son suficientemente numerosas, pueden llegar a provocar la transformación neoplásica. La



acumulación de alteraciones genéticas desempeña, por tanto, un papel decisivo en la tumorigénesis. Estas alteraciones conducen a la pérdida del equilibrio que define el balance entre la activación del crecimiento y diferenciación celular por parte de los protooncogenes, y la inactivación de genes supresores que normalmente frenan esta proliferación; de esta forma, se produce un crecimiento descontrolado.

Los genes reparadores descritos más importantes son los llamados *hMSH2* (*human mtS homologue 2*) y *hMLH1* (*human mutL homologue 1*). Se localizan en el brazo corto de los cromosomas 2 y 3, respectivamente. Otros genes reparadores son *hPMS1* y *hPMS2* (*human postmeiotic segregation 1* y *2*). Se han descrito mutaciones de estos genes en línea germinal en cánceres familiares y otras mutaciones en cánceres esporádicos.

Los síndromes de inestabilidad cromosómica se caracterizan porque los individuos no reparan eficientemente el daño o errores que se acumulan en el DNA a lo largo de la vida celular. Entre los síndromes asociados a inestabilidad cromosómica más conocidos se encuentra los genes *XP* (xeroderma pigmentosa), *ATM* (ataxia telangiectasia) y *BLM* (síndrome de Bloom).

1.4. ONCOGENES Y CÁNCER

Los principales oncogenes estudiados en el cáncer de vejiga han sido los relacionados con factores de crecimiento (oncogén *erbB-2/neu* y oncogén *erbB-1*), proteínas transductoras de señales (oncogén *Ras*) y proteínas reguladoras nucleares (oncogén *c-myc* y oncogén *MDM2*).

A. ONCOGENES RELACIONADOS CON FACTORES DE CRECIMIENTO

A.1. Oncogén *c-erbB-1* (EGFR)

El EGF (Epidermal Growth Factor ó Factor de Crecimiento Epidérmico) pertenece a un grupo de proteínas englobadas dentro de la familia del EGF. Esta familia incluye el EGF, el Factor de



Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Transformante Alfa (TGF- α), el Factor de Crecimiento Insulina-like (IGF-I e IGF-II) y el Factor de Crecimiento Neural (NGF), como miembros más importantes. Se trata de polipéptidos cuya misión es estimular la proliferación celular a través de su unión a receptores específicos de alta afinidad localizados en la membrana celular y codificados por el protooncogén *c-erbB*¹⁴¹.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia de receptores de membrana tipo tirosín-kinasa, un grupo de receptores codificado por los protooncogenes *c-erbB*. Dentro de la familia de protooncogenes *c-erbB* existen cuatro miembros conocidos: *c-erbB-1* (HER), *c-erbB-2* (HER-2, neu), *c-erbB-3* (HER-3) y *c-erbB-4* (HER-4), cuya transcripción produce una variedad de productos proteicos fundamentales para el crecimiento celular coordinado y la reparación tisular. Los 4 miembros de la familia HER comparten una estructura global de dos regiones ricas en cisteína en el dominio extracelular y una región citoplasmática con actividad kinasa seguida de una cola carboxiterminal rica en tirosina, con un porcentaje de homología variable entre sí (Figura 11) y son de suma importancia, no sólo por su papel esencial en los procesos fisiológicos normales que suceden durante el desarrollo, sino también por el hecho de que su transformación en oncogenes desencadena la pérdida de coordinación del crecimiento celular que desemboca en la transformación maligna de la célula¹⁴².

Existen varios ligandos específicos para la familia *erbB*, cada uno de los cuales contiene un dominio EGF-like que confiere especificidad de unión, dividiéndolos en tres grupos (Figura 17). El primer grupo con unión específica al *erbB-1* incluye el EGF, la anfirregulina (AR) y el factor transformante alfa (TGF- α). El segundo grupo, que muestra actividad dual específica *erbB-1* y *erbB-4*, está compuesto por betacelulina (BTC), EGF ligante de heparina (HB-EGF) y epirregulina (EPR). El tercer grupo se compone de neurorregulinas (NRG), y se subdivide en dos subgrupos basados en la capacidad de unirse a *erbB-3* y a *erbB-4* (NRG-1 y NRG-2) o solamente a *erbB-4* (NRG-3 y NRG-4)¹⁴³. A pesar del gran número de ligandos descubiertos para el grupo de receptores *erbB*, aún no ha sido identificado el ligando directo para el HER2, hecho que se cree relacionado con las diferencias con respecto al resto de receptores a nivel del dominio extracelular^{144,145} (Figura 12).

La activación de cada miembro de la familia *erbB* por sus respectivos ligandos conduce a la formación tanto de homodímeros (con otros factores iguales) como de heterodímeros (con otros



miembros de la familia erbB) (Figuras 13 y 14), lo que provoca un cambio conformacional a nivel del dominio intracelular, y provoca la fosforilación de los residuos de tirosina situados junto al dominio de autofosforilación. Estas fosfotirosinas una vez activadas, sirven como puentes de unión para un gran número de transductores de señales y moléculas adaptadoras que inician una cascada de vías intracitoplasmáticas cuyo resultado final es la proliferación, la diferenciación, la migración, la protección de la apoptosis y la transformación celular¹⁴⁶. Esta serie de vías incluye la de fosfolipasa C gamma- 1 (PCL- γ -1), la de ras-raf-MEK-MAPKs, la de fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3K), la de las proteínas-kinasas activadas por stress (SAPKs), y otras múltiples vías relacionadas con la proliferación celular¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Se sabe que el HER3 carece de actividad kinasa intrínseca^{146,150}, hecho que se cree debido a sustituciones críticas en el dominio tirosina-kinasa¹⁵¹. De ese modo, erbB-3 sólo llega a fosforilarse y a ser funcional como una entidad productora de señales intracelulares cuando se dimeriza con otro receptor distinto de esta familia¹⁵² (Figura 14).

La primera evidencia del papel del protooncogén *c-erbB-1* en la transformación maligna fue la demostración de que este gen era el homólogo celular del virus de la eritroblastosis de las aves (AEV), el oncogén *v-erbB*. El AEV codifica una forma truncada a nivel carboxiterminal del erbB-1 capaz de autoactivarse de modo independiente a la presencia de ligando^{153,154}. Posteriormente se ha comprobado que la activación oncogénica del *c-erbB-1* puede ocurrir como resultado de una mutación, amplificación, reordenamiento estructural y/o pérdida de la capacidad regulatoria y autoinhibitoria del gen¹⁵⁵; por ejemplo, por la inserción de un promotor viral (como el VHC y virus de Epstein-Barr) capaz de activar la transcripción del promotor del EGFR y producir sobreexpresión del producto¹⁵⁶, sin alteraciones a nivel del gen *c-erbB-1*.

El EGFR fue aislado originariamente por Cohen¹⁵⁷ a partir de la glándula submaxilar de ratón cuando buscaba factores estimulantes del crecimiento nervioso. Es conocido que el protooncogén que lo codifica desempeña un papel fundamental en el desarrollo epitelial, la proliferación y la organogénesis. Este hecho fue demostrado mediante la creación de ratones mutados con carencia de este gen en los que se observó que, aunque el fenotipo de los ratones era variable dependiendo de sus antecedentes genéticos, todos ellos presentaron defectos severos del desarrollo epitelial en múltiples órganos y sistemas, incluyendo el tracto gastrointestinal, pulmones, riñones, cerebro, hígado, piel y ojos¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Se trata de un péptido de 1186 aminoácidos que tiene un peso molecular



aproximado de 175.000 daltons y, como el resto de miembros de la familia erbB, está integrado por tres partes¹⁶¹ (Figura 11).

- Dominio extracelular (EC): es la región amino-terminal situada en la parte externa, y es la región ligante de dominio. Capaz de unirse al EGF y, en menor medida, a otros activadores como TGF- α , anfirregulina, betacelulina, factor ligante de heparina EGF-like (HB-EGF) y epirregulina.
- Dominio transmembrana: extensión de una cadena sencilla de 27 aminoácidos, hidrófoba, que atraviesa la membrana celular y une el dominio extracelular con el componente intracelular del receptor.
- Dominio intracelular: parte citoplasmática que contiene dos diferentes sub-dominios, uno adyacente a la membrana que es el dominio catalítico con actividad tirosina-kinasa, y otro contiguo en la región carboxiterminal, rico en residuos de tirosina y que es el dominio de autofosforilación.

Los estudios estructura-función del c-erbB demuestran que la alteración de los intrones que codifican el dominio extracelular es fundamental para que el gen se transforme en oncogén, pero muestran también que la pérdida proteica del extremo terminal contribuye a esta transformación, lo que indica que esta región, cuando está intacta, ejerce su función en el control negativo de la actividad del receptor.

Como ya se mencionó con anterioridad, el EGFR ha sido detectado en diferentes tejidos normales y neoplásicos, no debiendo ser considerado un antígeno tumoral organoespecífico. Está presente de modo muy amplio en el organismo, y se encuentra en grandes cantidades en la orina¹⁶², probablemente por secreción tubular.

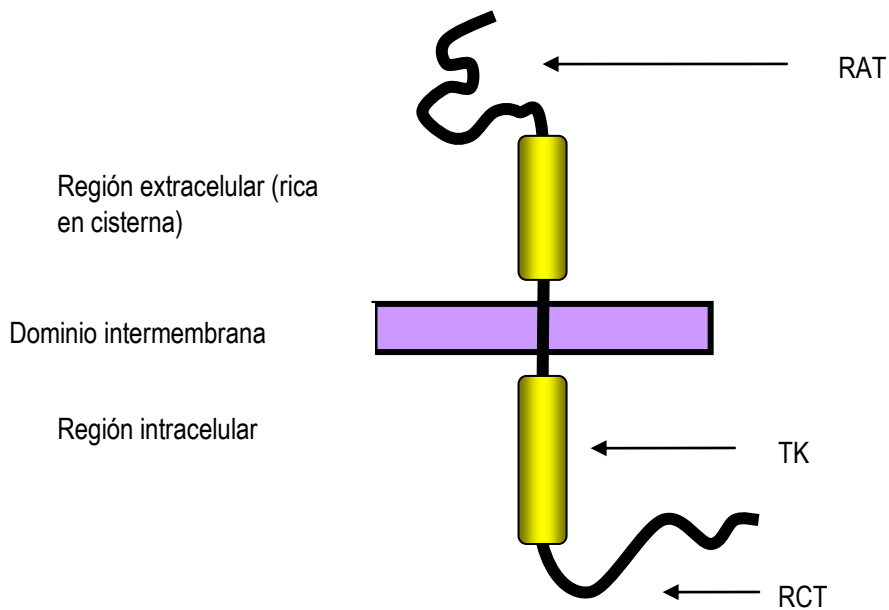


Figura 11: Modelo de receptor de la familia c-erb. TK: Región Tirosina kinasa. RAT: Región amino-terminal. RCT: Región carboxi-terminal rica en residuos de tirosina.

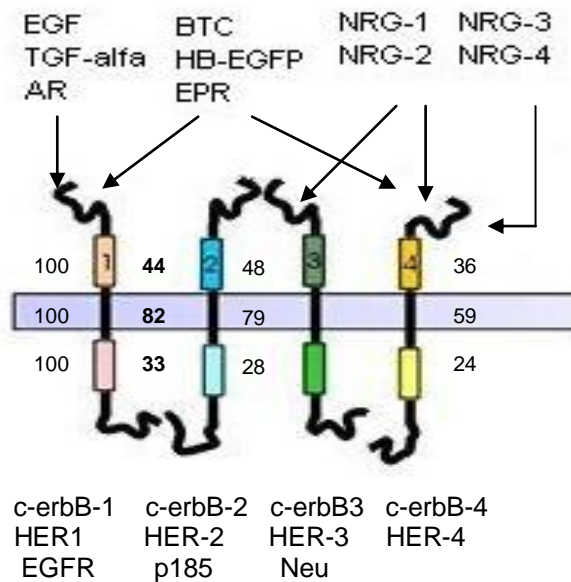


Figura 12: Familia de receptores c-erbB. Ligandos activadores y porcentaje de homología relativa a EGFR del componente extracelular (%), la región tirosina-kinasa (%) y la región carboxi-terminal (%), respectivamente.

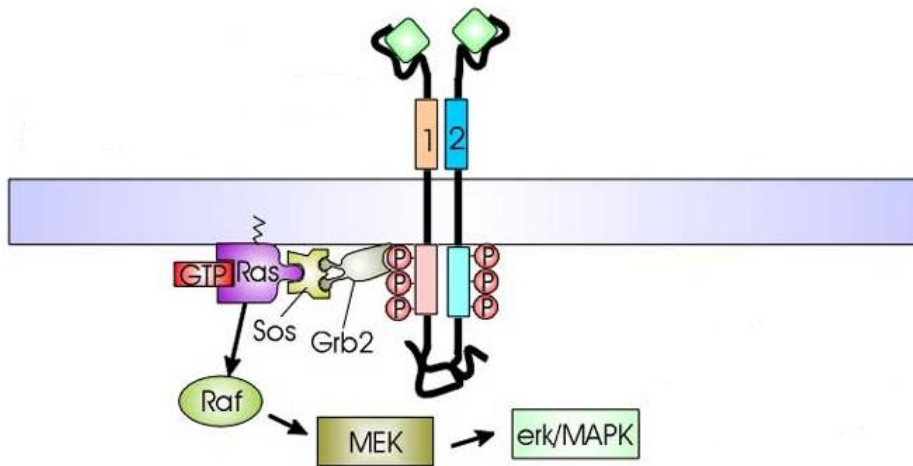


Figura 13: Modo de activación de la familia erbB y vías intracitoplasmáticas derivadas de la misma.

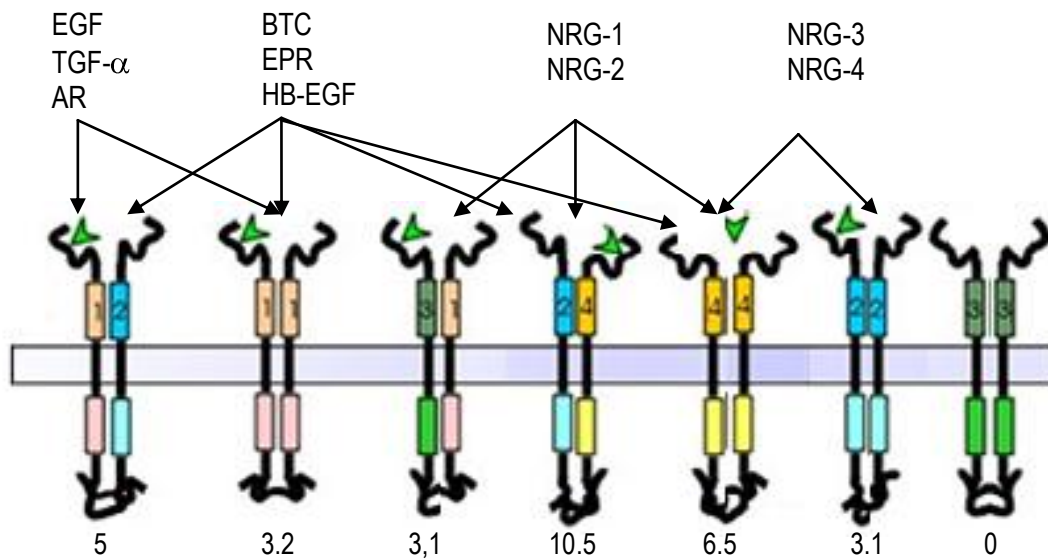


Figura 14: Ligandos específicos de los dímeros de la familia erbB y sus índices de proliferación relativos.



La expresión aumentada de EGFR puede deberse a amplificación génica, que es la alteración genética más frecuentemente observada en tumores humanos, o a mutaciones que aumenten la transcripción y/o estabilidad del mRNA. El gen *erbB-1* se ha observado amplificado en el 40% de los glioblastomas multiformes humanos, y en algunos de ellos se encuentra además reordenado, dando lugar a mRNAs anormales, que codifican probablemente receptores truncados semejantes al codificado por *v-erbB*. La sobreexpresión del EGFR puede contribuir al proceso tumoral de varias formas: En primer lugar, el aumento del número de receptores hace que, aún en presencia de bajas concentraciones de ligando, se favorezca la formación de complejos ligando-receptor activos. Esto podría conferir a estas células una mayor capacidad de responder a EGF y a TGF-alfa dándoles una ventaja proliferativa en condiciones en que los ligandos son limitantes, in vivo. En segundo lugar, algunos de los carcinomas que sobreexpresan EGFR también expresan sus ligandos EGF y/o TGF-alfa, por lo que se podría crear un mecanismo autocrino. Y por otra parte, se ha comprobado que líneas celulares de gliomas humanos así como células tumorales de glioblastoma multiforme, secretan in situ el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que induce la angiogénesis activa del tumor. Muchos de esos glioblastomas poseen un número elevado de receptores de EGF, cuya activación por EGF o TGF-alfa causa un gran incremento de la producción de VEGF por estas células. Se produce así una activación secuencial en la cual el EGF del plasma y/o el TGF-alfa producido por las células de glioblastoma estimulan los EGFR en estas células, las cuales secretan VEGF que, a su vez, induce neovascularización del tumor.

Diferentes estudios clásicos han demostrado una sobreexpresión de EGFR en diferentes tumores malignos^{163,164} (hasta en un 80% de melanomas humanos en estadios avanzados y en un 15% de carcinomas gástricos) habiéndose encontrado relación con un comportamiento biológico tumoral más agresivo y con peor pronóstico¹⁶⁵. A este respecto, un reciente estudio revisó la literatura publicada en PubMed acerca de la importancia pronóstica del EGFR en los diferentes tumores con respecto a la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, observando que en determinados tipos de tumores (Tabla X) el incremento de la expresión de EGFR se asocia con una disminución de la supervivencia¹⁶⁶. En lo que respecta al CCT, se ha descrito sobreexpresión del EGFR en tumores vesicales de diferente grado y estadio^{150,167}.



Tabla X: Porcentaje de estudios que demuestran asociación estadísticamente significativa entre niveles aumentados de EGFR y disminución de la supervivencia (n = número de estudios publicados).

Tipo de cáncer	Asociación con SLE %	Asociación con STC %
EGFR como buen indicador pronóstico <ul style="list-style-type: none">• Vejiga• Cervical• Esófago• Cabeza y cuello• Ovario Total	60 (n = 5) 75 (n = 4) 0 (n = 1) 75 (n = 8) 80 (n = 5)	63 (n = 11) 71 (n = 7) 69 (n = 13) 82 (n = 11) 67 (n = 9) 70 (n = 51)
EGFR como regular indicador pronóstico <ul style="list-style-type: none">• Mama• Colon y recto• Estómago• Endometrio Total	N D N D N D N D	55 (n = 11) 67 (n = 3) 50 (n = 6) 40 (n = 5) 52 (n = 25)
EGFR como mal indicador pronóstico <ul style="list-style-type: none">• Pulmón (células no pequeñas)	20 (n = 10)	10 (n = 10)

A.2. Oncogén *c-erbB-2/HER2/neu*

El protooncogén *c-erbB-2* es un gen de la familia *erbB* relacionado con el gen del EGFR (*c-erbB-1*). Se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17q12) y codifica una proteína transmembrana de 185.000 daltons llamada HER2/neu, que presenta estructura clásica de factor de crecimiento vista en el apartado anterior.



Cuando se transforma en oncogén presenta un dominio interior con actividad tirosina-kinasa que ha perdido un residuo de tirosina responsable de su regulación negativa, y un dominio exterior parcialmente truncado, que se cree actúa como receptor de superficie celular para un factor de crecimiento, si bien éste aún no ha sido identificado^{146,150}. En condiciones normales, la proteína sólo se activa después de su heterodimerización con otro factor distinto de la familia *erbB*, pero desempeña un papel fundamental en el desarrollo y la tumorigénesis por el hecho de que es la pareja preferida para la dimerización del resto de la familia¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Más aún, debido a la pérdida del residuo regulador, los heterodímeros que contienen la proteína HER2/neu son los responsables de una activación mayor y más prolongada de la cascada de señales intracelulares^{171,172} por lo que se le ha llegado a considerar como un expansor de señales para el resto de la familia de receptores¹⁷³.

Las alteraciones genéticas más frecuentes de este oncogén son la amplificación y la traslocación (17q11.2-q12). Se ha visto que en determinados tumores inducidos, el oncogén *c-erbB-2* presenta una mutación puntual que da lugar a la sustitución de un residuo de valina (V664) por otro de ácido glutámico en el dominio transmembrana. La región transmembrana alterada posee actividad tirosina-kinasa constitutiva porque forma agregados diméricos de forma espontánea, sin unión previa del ligando. Dependiendo del grado de sobreexpresión proteica, esta activación espontánea puede ser suficiente para causar transformación celular.

La importancia pronóstica de este oncogén ha sido ampliamente observada en diferentes tumores (mama, estómago, ovario, vejiga, etc.)^{174,175}. En pacientes con adenocarcinoma de próstata se ha relacionado de modo significativo la amplificación y la sobreexpresión de *erbB-2* con el contenido de DNA, el grado de Gleason y el estadio TNM¹⁷⁶.



1.5. GENES SUPRESORES Y CÁNCER

Los principales genes supresores implicados en el CCT son p53, p21 y Rb, mientras que en el caso de p16 y PTEN su papel es más discutido.

A. GEN SUPRESOR p53

El gen supresor *p53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), tiene 20 Kb y presenta 11 exones¹⁷⁷. Codifica la expresión de una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos y 53 Kda que regula el paso de G1 a S en el ciclo celular por acción sobre el complejo de iniciación de la replicación del DNA o por activación de los genes de paso de G1 a S. La falta de p53 favorece el mantenimiento indefinido del ciclo celular.

La proteína p53 se describió en 1979 en relación con su sobreexpresión en células tumorales y en células infectadas por el virus SV40¹⁷⁸ y por ello se consideró inicialmente como un antígeno tumoral codificado por un oncogén^{179,180}. Fue en 1989 cuando se descubrió que se trataba de un gen supresor¹⁸¹ y se desarrollaron trabajos para analizar su estructura y función.

Hoy se sabe que la proteína p53 es una proteína tetramérica constituida por cuatro subunidades, cada una de ellas de 393 aa, y tiene la típica estructura de un factor de transcripción: un dominio N-terminal (aa 1- 43) de activación transcripcional, un dominio ligante de DNA (aa 110-286), un dominio de oligomerización (aa 326-355) responsable de la oligomerización de tetrámeros, y otro carboxiterminal (aa 363-393) más inespecífico (Figuras 15 y 16).

Los trabajos de algunos grupos de investigación¹⁸²⁻¹⁸⁵ sugieren que la proteína p53 debe unirse a un receptor nuclear para, a través de diferentes mecanismos, ejercer sus acciones, entre las cuales



destacan el control del ciclo celular, la reparación del DNA, la senescencia celular, la apoptosis, y la angiogénesis (Tabla XI).

La proteína p53 nativa tiene una vida media muy corta (entre 15 y 20 minutos) y se halla en cantidades muy pequeñas en las células normales. Las alteraciones en el gen p53 inducen una proteína con una conformación más estable que la proteína normal, lo cual implica un aumento de su vida media y su acúmulo en el citoplasma y núcleo celular. Es este hecho lo que permite su detección y su cuantificación¹⁸⁶. Dicha proteína es incapaz de realizar su función de reparación de los daños producidos en el DNA por lo que se reduce la actividad transcripcional de modo parcial o completo y se impide el control de la proliferación y la muerte celular programada, convirtiéndola en una célula de crecimiento incontrolado.

Las alteraciones genéticas que se observan más frecuentemente en *p53* son las mutaciones puntuales. La mayor parte de ellas (más del 90%) están situadas en el dominio ligante de DNA¹⁸⁷, y concretamente entre los residuos aminoácidos 130 a 286; principalmente en cuatro regiones: los residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286, y Aunque relativamente infrecuentes, las mutaciones en el dominio de oligomerización (4%) impiden la unión al DNA, y por este otro mecanismo, promueven la proliferación de la célula tumoral¹⁸⁷.

A este respecto, los estudios realizados en el carcinoma de colon han encontrado que un 75-80% de los mismos muestra una alteración en ambos alelos del gen *p53*, y se han visto alteraciones genéticas similares en cánceres de pulmón, endometrio, mama, riñón, próstata y vejiga^{188,189}.

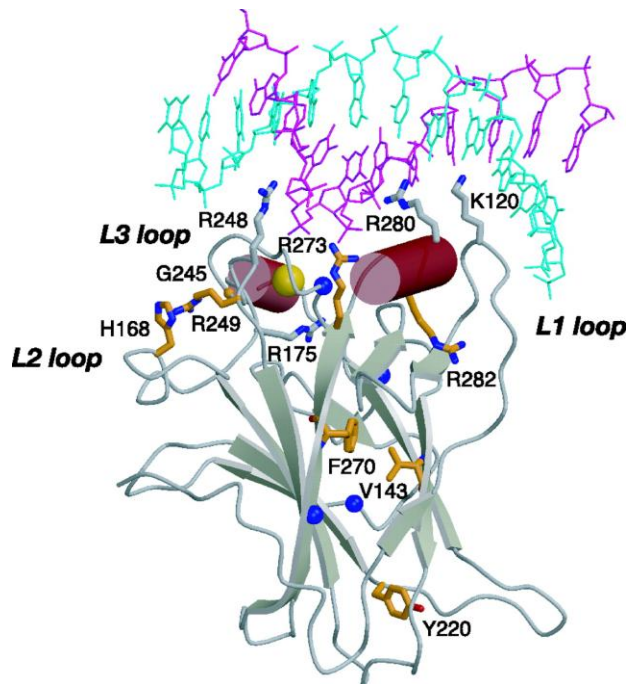


Figura 15: Estructura tridimensional de la proteína p53.



Figura 16: Esquemización de la estructura tetramérica de la proteína p53 ligada a DNA.



Tabla XI: Funciones de la proteína p53 y efectos de su inactivación.

p53 normal	p53 inactiva
Control de la proliferación Apoptosis fisiológica Estabilidad del genoma Inhibición del crecimiento tumoral	Aumento de la proliferación Inhibición de la apoptosis Inestabilidad genómica Potenciación de la angiogénesis Incremento de la resistencia a citostáticos

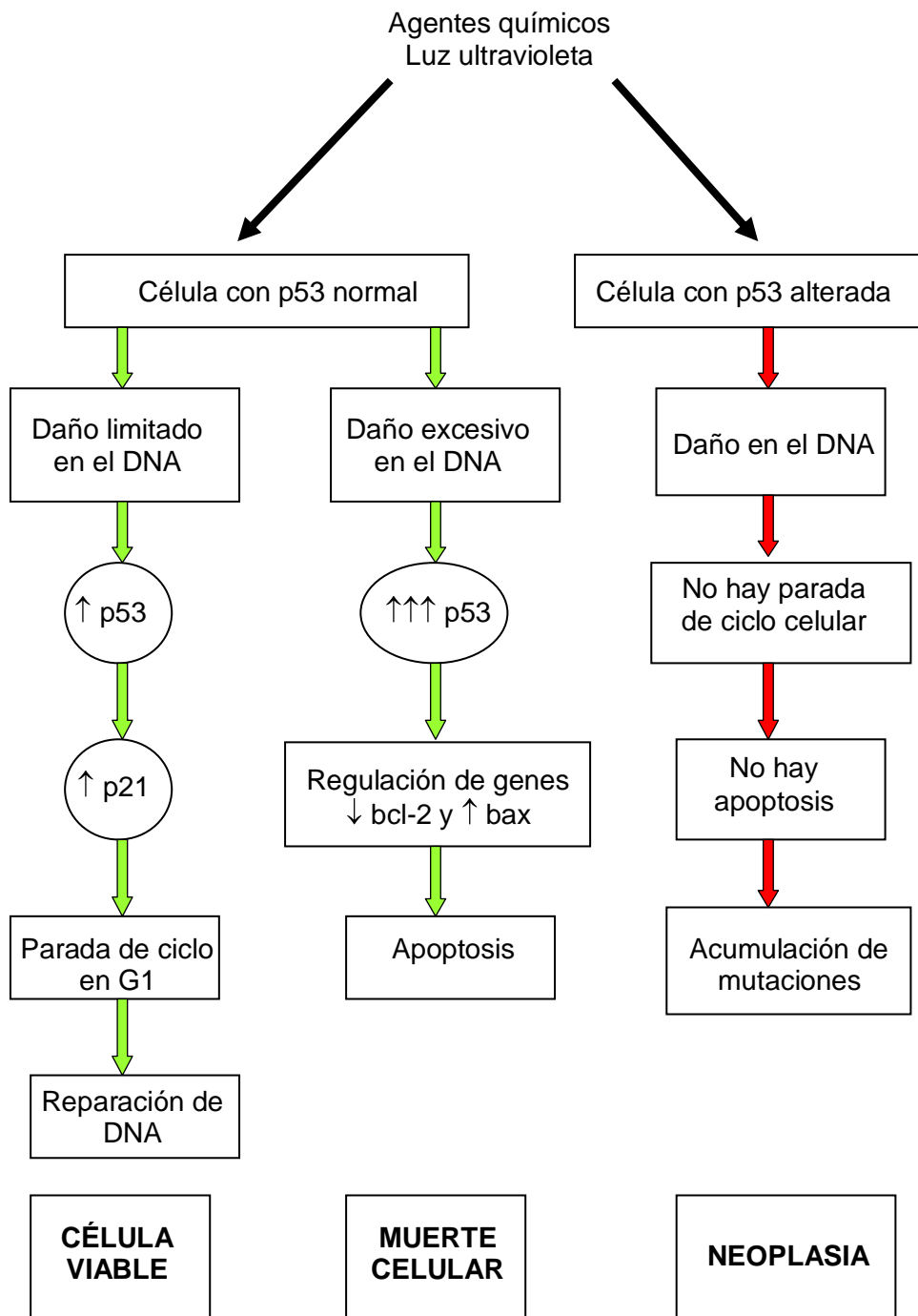


Figura 17: Efectos de la activación y la inactivación funcional de p53. En verde la vía fisiológica y en rojo, la vía patológica.



1.6 TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS

Paralelamente al mayor conocimiento de las bases moleculares del cáncer han ido progresando las técnicas de laboratorio que han facilitado el estudio de estas alteraciones genéticas. El estudio genético debe contemplarse, desde los diferentes niveles a los cuales la célula neoplásica puede alterarse, y puede realizarse desde el estudio grosero a nivel de celular, hasta las alteraciones producidas en los genes que controlan el ciclo o en las proteínas que estos codifican.

La citometría constituye el nivel básico del estudio genético. Consiste en el análisis de las características de las células, ya sea mediante inspección al microscopio, o midiendo de manera automatizada propiedades particulares de las células. Los estudios de citometría, tanto de flujo como estática permiten la valoración de la cantidad de DNA que contienen las células neoplásicas, realizando estudios de ploidía, de proliferación celular u otras medidas, y de esta forma permite catalogar los tumores como diploides (cuyas células tienen una cantidad normal de DNA), tetraploides (al presentar un porcentaje importante de células con doble carga de DNA) o aneuploides (al tener clones celulares con una cantidad de DNA anormal). Los valores aneuploides indican por regla general, mayor malignidad y peor pronóstico.

El siguiente nivel de estudio lo constituye el llamado análisis citogenético. El análisis citogenético convencional consiste en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células neoplásicas obtenidas tras el cultivo "in vitro", a corto plazo y sin mitógenos de células. Este tipo de análisis permite detectar los cromosomas que se encuentran alterados, bien sea en número o en estructura (inversiones, deleciones o traslocaciones) y que contribuyen a modificar la cantidad de DNA cuantificado mediante citometría, pero por otra parte proporcionan la evidencia física de pérdidas de genes supresores, alteración de protooncogenes o presencia de cromosomas supranumerarios.



El estudio de la morfología de los cromosomas, teñidos fundamentalmente con bandas G (Tripsina-Giemsa), permite detectar en un único experimento las alteraciones numéricas (monosomías, trisomías....), y las estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones, etc.) presentes en todo el genoma, pero su mayor inconveniente es que se necesita estimular la célula hasta la metafase, lo cual no siempre es posible y en los casos que lo es, puede dar lugar a alteraciones no presentes en la célula estudiada antes de estimular artificialmente su división.

La Hibridación in situ fluorescente (FISH) permite solucionar este problema. La FISH es una técnica de recombinación de DNA que permite reconocer una determinada secuencia de DNA y marcarla con un flurocromo fijado a una cadena complementaria de DNA, bien en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase. Esta técnica posibilita el estudio de células en reposo (interfase), incluso conservadas en parafina, y su utilización en preparaciones histológicas, lo cual permite superar muchos de los problemas que plantea la heterogeneidad tumoral. Entre las técnicas derivadas del FISH convencional cabe destacar la hibridación genómica comparada, de enorme utilidad en tumores sólidos, y el cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH).

El siguiente nivel de estudio lo constituyen las técnicas denominadas de forma genérica como moleculares, en las que se estudian regiones genómicas concretas. Debemos recordar que un determinado gen está compuesto por un fragmento bicatenario de DNA con una secuencia de nucleótidos constante que para expresar su función tiene que formar una cadena de mRNA (transcripción) que servirá, a nivel de los ribosomas (que actúan como lectores de la información de la cadena de RNA), para formar una proteína que expresa la función de ese determinado gen. Las técnicas moleculares detectan alteraciones en cualquiera de los diferentes niveles: DNA, RNA y proteína.

Las técnicas de estudio de DNA y RNA se basan en el principio de que es posible separar las dos cadenas de DNA (desnaturalización) obteniéndose una cadena simple (el RNA ya es monocatenario) que bajo determinadas condiciones puede unirse a una cadena complementaria (hibridación). Esta cadena complementaria, que podemos fabricarla de forma automatizada se marca para su detección, bien sea de forma radioactiva con P32 (detectable mediante la impresión que produce en una película radiográfica) o bien con fluorescencia.



Estas cadenas complementarias utilizadas en el estudio de DNA o RNA se denominan sondas. Cuando queremos conocer la presencia de un gen en el DNA de un tejido utilizamos sondas complementarias de ese DNA problema, de manera que si existe se unirá a él (hibridará) y lo marcará por cualquiera de las formas descritas. La técnica de fragmentación del DNA y su marcaje con P32 se denomina Southern blot (en homenaje a E.M. Southern que la describió).

Siguiendo el mismo principio es posible detectar RNAm mediante sondas marcadas complementarias (Northern blot). Cuando la técnica de hibridación se realiza sobre células o tejidos y no sobre extractos de ácido nucleico se denomina hibridación in situ (frecuentemente usada para el estudio del RNA) y si se marca la sonda con fluorescencia es conocida como FISH.

Para realizar el análisis del DNA mediante Southern blot es necesario fragmentarlo dada su gran longitud (al contrario de lo que ocurre con el mRNA), para lo cual se utilizan las enzimas de restricción que cortan el DNA cada vez que encuentran una determinada secuencia de nucleótidos. La técnica que estudia la longitud de estos fragmentos es lo que se conoce como polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). Los fragmentos de restricción pueden variar con tan sólo el cambio de una única base del DNA, de manera que utilizando sondas específicas para regiones cromosómicas sucesivas nos permite realizar un verdadero mapa de una región cromosómica que interese estudiar. Los estudios de polimorfismos han resultado vitales en la localización de genes supresores al confirmarse la constante ausencia de una determinada región cromosómica.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada a mediados de los años ochenta que vino a solucionar el problema de que un gen específico a estudiar es una mínima diana dentro del complejo genoma de una célula que puede contener otros 100.000 genes. La PCR permite obtener un enorme número de copias de una determinada secuencia de DNA al aprovechar el mecanismo de la replicación. La DNA polimerasa usa una de las cadenas de DNA como molde para la síntesis de otra nueva cadena complementaria en presencia de los nucleótidos necesarios. Por el simple método del calentamiento hasta una temperatura cercana a la ebullición se consigue una cadena única de DNA que será el molde sobre el que actúe la DNA polimerasa, simplemente calentando la doble cadena, volveremos a separar ambas cadenas de manera que servirán de nuevo como molde para la creación de DNA bicatenario que, a su vez, puede ser separado por el



calor; si repetimos este proceso 32 veces obtendremos 1.073.741.824 copias del fragmento de DNA objeto de estudio.

Una variante de la PCR la constituye la PCR utilizando la transcriptasa inversa (RT-PCR). Esta técnica permite la identificación de células que expresan un determinado mRNA. Utilizando la transcriptasa inversa se consigue, a partir del RNA formar DNA monocatenario, y a partir de éste podemos aplicar la técnica de PCR.

Las técnicas moleculares han progresado hasta el extremo de poder determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ácido nucléico. Estos estudios de secuenciación se basan en un ingenioso sistema en el que el DNA se fragmenta en segmentos progresivamente mayores que terminan bruscamente al incorporar un dideoxidonucleótido marcado, específico de cada base nitrogenada, de manera que no es capaz de incorporar más nucleótidos a la cadena. La lectura de la secuencia de dideoxidonucleótidos nos dará la secuencia del gen en estudio.

Aunque la mayor parte de los análisis mediante PCR son cualitativos, indicando sólo ausencia o presencia de la alteración. En la actualidad se puede llevar a cabo la cuantificación de la alteración mediante PCR en tiempo real (real-time PCR), en la que se detecta el producto específico a medida que se produce, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados proporciona una medida cuantitativa del grado de afectación.

Además de la PCR utilizada en la rutina diagnóstica para la detección de translocaciones, existen otras muchas técnicas moleculares de gran interés en la genética del cáncer. Entre ellas, el análisis de mutaciones de genes supresores tumorales y oncogenes y la tecnología de microarrays que, aunque de momento se utiliza como investigación, en un futuro no muy lejano, con la aplicación de nuevos sistemas robotizados como los chips o microarrays de DNA, permitirá el análisis simultáneo de un gran número de genes y de sus niveles de expresión en una muestra.

El hecho de que el papel funcional del DNA y el RNA sea desempeñado finalmente por proteínas, unido a la falta de correlación exhaustiva entre los niveles de transcritos y proteínas han llevado al desarrollo de tecnologías de alto rendimiento para la determinación de proteínas.



En el nivel de proteína, distintos cambios se producen durante la diferenciación celular y durante la transformación de una célula sana en una célula neoplásica. Tales cambios pueden ir desde la expresión alterada, a la modificación diferencial de proteínas, cambios en la actividad específica, o a la localización aberrante. Es por ello que obtener información en el nivel de las proteínas es fundamental para la comprensión de la función de los tipos celulares específicos y su papel en la salud y de este modo desentrañar los cambios críticos que se producen como parte de la patogénesis de la enfermedad. La identificación y la comprensión de estos cambios son los temas subyacentes a la proteómica.

Originalmente definida para representar el análisis de todo el componente proteico de una célula o un tejido¹⁸, la proteómica abarca ahora el estudio de las proteínas expresadas, incluyendo la identificación y elucidación de la relación estructura-función en condiciones de salud y condiciones de enfermedad. En combinación con la genómica, la proteómica ayuda a proporcionar una comprensión holística de los procesos de la enfermedad de la biología subyacente.

Tanto la expresión de las proteínas como su función están sujetas a la modulación a través de la transcripción, así como a través de eventos post-transcripcionales y post-traslacionales. Más de un RNA puede resultar de un mismo gen a través de un proceso de corte y empalme diferencial. Además, hay más de 200 modificaciones post-traslacionales que pueden afectar a la función de la proteína, a la interacción proteína-proteína, a la interacción proteína-nucleído, la estabilidad, la orientación, un medio de vida, y así sucesivamente¹⁹⁰, todo lo cual contribuye a un potencialmente gran número de productos de proteína de un gen.

El aumento de técnicas de proteómica ha sido además favorecido por la relevancia biológica asociada a un mejor conocimiento en los niveles de expresión proteicos y sus modificaciones post-traslacionales, y el hecho de que las proteínas representan también la mayor parte de dianas terapéuticas para ser desarrolladas farmacológicamente. Las técnicas de proteómica están encontrando una amplia aplicación en la determinación de las bases moleculares asociadas a cualquier enfermedad (proteómica funcional), las bases de los mecanismos de acción de fármacos y su toxicidad (farmacoproteómica), así como en el desarrollo de nuevos marcadores específicos de cada enfermedad (proteómica clínica).



En el estudio del cáncer, la proteómica abarca la identificación y el análisis cuantitativo de proteínas expresadas diferencialmente en relación con muestras homólogas de tejidos sanos en diferentes etapas de la enfermedad, desde preneoplasia a la neoplasia¹⁹¹. Aquí, el análisis de expresión directamente en el nivel de la proteína es necesario para desentrañar los cambios críticos que se producen como parte de la patogénesis de la enfermedad. Esto es porque las proteínas se expresan a menudo en concentraciones y formas que no se pueden predecir a partir de análisis de mRNA⁵⁶. En este sentido, la proteómica también se puede utilizar para identificar marcadores diagnósticos en el cáncer, para controlar la evolución de la enfermedad, y para identificar dianas terapéuticas. El proteoma de la célula cancerosa puede ser investigado usando distintas estrategias, que pueden ser guiadas (si la proteína investigada se conoce previamente) o no.

Para el estudio de las proteínas, se puede emplear una técnica similar al Southern y Northern blot, en la que la proteína, una vez extraída del tejido, se hace progresar por un gel de agarosa y se identifica al añadir un anticuerpo específico marcado con P32 o fluorescencia. Es lo que se conoce como Western blot. La segunda opción es utilizar el método inmunohistoquímico sobre el tejido objeto de estudio, para lo cual utilizaremos un anticuerpo específico ante la proteína objeto de estudio. Este anticuerpo está marcado de manera que lo podamos identificar mediante microscopía.

La proteómica cuantitativa trata de investigar los cambios en la expresión de proteína en diferentes estados, como en el tejido sano y enfermo, y en las diferentes etapas de la enfermedad.

Las técnicas de radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (ELISA) e inmunoluminiscencia (LIA) se utilizan para la detección de proteínas en fase líquida. Emplean para ello el anticuerpo o el antígeno específico que va a ser detectado al marcarse específicamente con isótopos radiactivos, con enzimas o con luminol. Se basan en la inmovilización del antígeno o el anticuerpo en un soporte sólido y en la incubación de estos con reactivos secundarios o terciarios unidos covalentemente a una enzima la cual cataliza una reacción de hidrólisis y rinde un producto coloreado o fluorescente que puede ser detectado espectrofotométricamente. Presentan la ventaja frente a las anteriores de su gran sensibilidad, pudiendo detectar cantidades inferiores a los 100 pg/ml de proteína, y permitiendo utilizar muy escasas cantidades de reactivos.



La reciente aparición de los arrays de anticuerpos, ha permitido refinar aún más estas técnicas. Los arrays de anticuerpos consisten en portas de distintos materiales en los que los anticuerpos pueden inmovilizarse para capturar y cuantificar la presencia de proteínas específicas¹⁹². En los arrays de proteínas, pueden inmovilizarse péptidos, proteínas o complejos extractos proteicos. Una de las ventajas fundamentales de la tecnología de arrays de anticuerpos es su capacidad para medir cientos de proteínas simultáneamente usando pequeños volúmenes tanto de las muestras clínicas o biológicas a analizar, como de los anticuerpos generalmente caros. Su aplicación en el mundo de la urología, y dentro de este, al estudio del CCT es relativamente reciente¹⁹³.



Hipótesis



2. HIPÓTESIS

En las últimas décadas se ha estudiado la base molecular del proceso de desarrollo del cáncer, y se han propuesto modelos de progresión genéticos para varios tipos de tumores.

Se ha observado que la acumulación, de varias formas de alteraciones genéticas, es la base para la progresión desde una célula normal a una célula cancerosa, denominándose al proceso, carcinogénesis de múltiples pasos y que puede definirse en condiciones moleculares.

Según esta teoría, los tumores crecen mediante un proceso de evolución clonal dirigida por mutaciones, en donde múltiples procesos son necesarios para desarrollar el carcinoma. Los modelos más recientes de génesis tumoral muestran que es un proceso en el que median múltiples alteraciones moleculares, a través de las cuales, se activan protooncogenes que estimulan el crecimiento celular, y genes supresores de tumor que inhiben la proliferación celular en condiciones normales, volviéndose inactivos y conduciendo a la célula hacia una transformación neoplásica. Dentro de estas protooncogenes y genes supresores, adquieren especial peso las proteínas EGFR, HER2/neu y p53 directamente implicadas en la regulación del ciclo celular.

Las tres proteínas mencionadas han sido implicadas de uno u otro modo en la génesis del desarrollo tumoral, y en la evolución de la enfermedad, si bien, la evidencia actual indica que el análisis de la expresión de estas proteínas determinada mediante métodos cualitativos y semicuantitativos no ha sido capaz de predecir de un modo suficientemente fiable la evolución clínica del cáncer en general¹⁹⁴⁻¹⁹⁶, ni del CCT en particular¹⁹⁷.

La hipótesis conceptual sobre la que se desarrolla este trabajo es la de que la cuantificación de la expresión de las proteínas EGFR, HER2/neu y p53, que controlan la proliferación y diferenciación celular, permite distinguir de un mejor modo entre los diferentes estados de estimulación del ciclo celular en la célula urotelial, desde el urotelio sano al TVI, pasando por el TVS, y dentro de estos últimos, diferenciar según los niveles de expresión, aquellos que tienen más posibilidad de



desarrollar recidiva o progresión tumoral. Esto supone que la concentración de las proteínas EGFR, HER2/neu y p53 en el tejido tumoral es distinta en individuos sanos, en pacientes con TVI y en paciente con TVS, y en el conjunto de estos últimos, su cuantificación es capaz de mejorar el rendimiento de los criterios clínicos, histológicos tradicionales, y de las determinaciones semicuantitativas a la hora de establecer un subgrupo de pacientes con alto riesgo de desarrollar recidiva, progresión tumoral, o fallecer por este tipo de neoplasia.

Para tratar de demostrar esta hipótesis conceptual, se desarrollaron las siguientes hipótesis operativas:

- Las técnicas de cuantificación proteica son capaces de determinar la concentración de proteína existente en el tejido analizado.
- El aumento de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR en el CCT expresan el nivel de alteración del ciclo celular de las células que los producen y por tanto son mayores en los TVI que en los TVS, y mayores en éstos que en el tejido vesical sano.
- La determinación cuantitativa de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR presenta un buen potencial biológico, y sus determinaciones son consistentes con los resultados obtenidos mediante métodos de determinación tradicionales de fiabilidad ya suficientemente contrastada (IHQ).
- El análisis cuantitativo de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR presenta niveles de exactitud diagnóstica suficientes como para ser considerados marcadores moleculares pronósticos del TVS.
- El análisis cuantitativo de las concentraciones de p53, HER2/neu y EGFR permite predecir la posibilidad de recidiva, progresión, metástasis y muerte del TVS, dividiendo a éstos en distintos grupos riesgo, y existe un nivel determinable, a partir del cual, la sobreexpresión de p53, HER2/neu y EGFR en el tejido tumoral, conlleva un mayor riesgo de desarrollar dichos eventos.



Objetivos



3. OBJETIVOS

El objetivo genérico de este trabajo es investigar si las diferentes técnicas de cuantificación proteica son de utilidad en la caracterización molecular de los TVS y si esto sucede, tratar de averiguar si dentro de ellos, nos permiten distinguir de entre los TVS aquellos que tendrán un comportamiento biológico distinto, y que mostrarán una mayor tendencia a la recidiva y/o a la progresión tumoral.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Determinar por métodos cuantitativos las concentraciones de los marcadores moleculares (proteínas p53, HER2/neu, y EGFR) en el tejido neoplásico de los TVS, en el tejido urotelial sano, y en los TVI, y valorar si existe diferencia alguna entre ellas.
2. Contrastar la fiabilidad de la cuantificación proteica mediante la comparación de las técnicas con otra de fiabilidad ya contrastada (resultados de la tinción IHQ para esas proteínas).
3. Evaluar la exactitud diagnóstica de la determinación de los niveles tisulares de p53, HER2/neu y EGFR mediante diferentes técnicas de cuantificación a la hora de predecir recidiva, progresión, diseminación metastásica y muerte en el grupo de los TVS.
4. Conocer la relación existente entre la concentración de los diferentes marcadores moleculares, y los FP clínicos e histopatológicos de los TVS.
5. Analizar el valor pronóstico de los marcadores moleculares en términos de recurrencia, progresión, y supervivencia global de los pacientes afectos de TVS.



Material y métodos



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

Como ya se ha visto en la introducción, p53, HER2/neu y EGFR son tres de las proteínas involucradas en la tumorigénesis del CCT. De ellas, la que parece tener mayor evidencia de implicación en la recidiva y progresión tumoral es la proteína p53^{59,198} (Figura 6), aunque todas ellas han sido relacionadas con ambos eventos.

Aunque no existen estudios acerca del porcentaje del nivel de sobreexpresión de p53, HER2/neu o EGFR en los TVS mediante técnicas cuantitativas como las empleadas en nuestro estudio, el análisis IHQ estima un porcentaje de sobreexpresión de en torno al 40% para p53 y EGFR^{150,199}, y entre el 61 y 68% para HER2/neu²⁰⁰.

Tras revisar la bibliografía existente, con respecto a la recidiva, estudios llevados a cabo en grupos de pacientes con CCT superficiales similares al nuestro²⁰¹, muestran que la tinción IHQ para p53 (la proteína más estudiada de las tres a este respecto) muestra un alto valor predictivo positivo (VPP) en cuanto a la recurrencia tumoral (VVP = 96%).

Sin embargo objetivamos que el VPP de la tinción IHQ de p53 para la progresión del CCT superficial en los diferentes estudios, bien calculadas directamente por el investigador, bien inferidas mediante el teorema de Bayes, se sitúan en torno al 40% para las estimaciones más optimistas^{202 203} y en cualquier caso, no difieren en demasía del VPP que ofrecen las diferentes agrupaciones de riesgo^{67,89,204} y redes neurales de factores histopatológicos ya contrastados²⁰⁵.



Consideramos que si la cuantificación de los niveles de una proteína pudiera aumentar el VPP para la progresión tumoral del TVS hasta al menos un 65%, supondría ya un notable impacto clínico de cara al seguimiento de los mismos, y podría justificar su empleo en la práctica clínica habitual.

Realizamos el cálculo del tamaño muestral tomando como referencia el VPP del 40% de la tinción IHQ de p53 para la progresión tumoral en el TVS, con la intención de alcanzar un VPP del 65% con alguna de nuestras determinaciones. Empleamos la fórmula utilizada para el cálculo de tamaño de la muestra en estudios acerca de las características de una prueba diagnóstica²⁰⁶:

$$N = \frac{Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{\delta^2}$$

En esta fórmula, p_1 es el VPP de p53 IHQ, p_2 es el VPP deseable de cualquiera de los 3 marcadores detectados mediante pruebas de cuantificación, y $\delta = p_1 - p_2$.

Asumiendo un error alfa (probabilidad de detectar diferencias que no existen) del 5%, y un error beta (probabilidad de no detectar diferencias que realmente existen) del 20%, el número mínimo de pacientes a estudiar calculado (N) fue de 34 pacientes.

4.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

En este grupo se incluyeron 45 pacientes (el estudio se cerró cuando se obtuvieron al menos 34 muestras de los tres marcadores a analizar) sometidos a RTUv por TVS debutante sin presencia de CIS concomitante durante el periodo comprendido entre Noviembre de 1992 y Noviembre de 1993, procedentes del Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario San Carlos.



Se excluyeron para este estudio todos los pacientes a los que se les detectó CIS en el estudio histopatológico por tratarse ésta de una enfermedad con comportamiento clínico distinto, y los tumores recidivados, por la posibilidad de presentar una historia natural diferente de la del TVS primario (distinta frecuencia de recidivas, posibilidad de tratamiento adyuvante previo).

4.3. METODOLOGÍA CLÍNICA, ESTUDIOS HISTOLÓGICOS Y CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

El estudio se dividió en:

- a) Consideración de factores clínicos y tumorales.
- b) Valoración de los hallazgos operatorios y de los rasgos histológicos.
- c) Análisis de la evolución de la enfermedad.

A. CONSIDERACIÓN DE FACTORES CLÍNICOS Y TUMORALES

Los factores clínicos considerados en este estudio y recogidos mediante anamnesis fueron:

- Edad.
- Sexo
- Hábito tabáquico (definido como consumo de al menos 10 cigarrillos/día durante un periodo mayor de 5 años, en los últimos 10 años).
- Hábito enólico (definido como ingestión de más de 100 cc de alcohol absoluto más de 3 días a la semana, durante un periodo mayor de 5 años en los últimos 10 años).



- Modo de presentación (sintomático o incidental).

Como parte de la estadificación preoperatoria, en todos los casos, se llevaron a cabo estudios de imagen preoperatorios (ecografía renal y vesical, y/o urografía intravenosa y/o tomografía axial computerizada), y se procedió a endoscopia urológica. El estudio se completó con el análisis de la citología urinaria tras micción espontánea.

Una vez en quirófano, la RTUv se realizó en dos fases: tras la inspección de la uretra y de la cavidad vesical, se procedió a la extirpación con asa de resección de toda la masa neoplásica. A continuación, se profundizó en la base tumoral, y se llevó a cabo una biopsia múltiple normalizada de la superficie de la vejiga (pared lateral derecha, pared lateral izquierda, fondo, cúpula, trigono y retrotrigono), incluyendo la toma de muestras de la uretra prostática en el varón, con el fin de excluir la presencia de CIS concomitante.

En todos los casos, en la ficha quirúrgica quedaron reflejadas las siguientes características endoscópicas:

- Uni o multiplicidad.
- Aspecto endoscópico (superficial o infiltrante).
- Tamaño tumoral (calculado mediante campos endoscópicos a partir del diámetro del asa de resección con la equivalencia 1 campo = 0,5 cm).

Una vez finalizada la RTUv, el tejido tumoral obtenido se dividió en dos porciones: una destinada al estudio histopatológico, y la otra destinada al estudio de expresión proteica.



B. VALORACIÓN DE LOS HALLAZGOS OPERATORIOS, RASGOS HISTOLÓGICOS Y MARCADORES MOLECULARES

B.1. Estudio histopatológico

La muestra para estudio histopatológico fue fijada inmediatamente en formol al 10% durante 12 horas, para posteriormente ser incluida en parafina. Las secciones histológicas (espesor de 5 micras) fueron teñidas con la técnica de la hematoxilina-eosina según el protocolo del Servicio de Anatomía Patológica y cuya descripción escapa a los objetivos de este estudio.

El diagnóstico histopatológico fue realizado por un único patólogo. En cada caso, se estudió el tipo histológico, y se estableció el grado de diferenciación y el estadio tumoral. En relación con el grado de diferenciación, los tumores fueron distribuidos según la Clasificación de la OMS⁴⁷. Su clasificación se llevó a cabo mediante el sistema de estadificación de la UICC de 1997⁸². Siguiendo los criterios de la OMS y la ISUP⁷⁷, las biopsias en cuyo análisis histopatológico se demostró CIS fueron consideradas como positivas, y los pacientes que asociaron este tipo de tumores fueron excluidos para el estudio.

B.2. Estudios de expresión proteica

Una vez obtenida la muestra para el análisis de expresión proteica, se procedió inmediatamente a su congelación en nitrógeno líquido. En ningún caso el tiempo transcurrido entre la extracción de la pieza quirúrgica y la congelación de la muestra sobrepasó los cinco minutos. Una vez transportada la muestra, se procedió a su almacenamiento en un ultracongelador a -80°C hasta el momento de su procesamiento definitivo.



B.2.1. Preparación de las muestras tisulares

Para la preparación de las muestras tisulares se siguió el siguiente proceso (Fig. 18):

1º. Pulverización-Trituración con un microdismembrador

El tejido se mantuvo en nitrógeno líquido constantemente.

Las muestras se colocaron en un pequeño mortero añadiendo unas gotas de N₂, y a continuación se trituraron.

2º. Pesado del tejido triturado

Se pesó el tejido congelado y triturado dentro del homogeneizador (habiendo pesado previamente el homogeneizado) estableciendo por la diferencia de pesada entre ambos el peso real del tejido.

3º. Homogeneización

Se añadió cinco veces el volumen de la muestra del buffer TRIS-HCl a pH 7,4 (TRIS 0,1 M, EDTA 0,015 M, 10% glicerol, 0,01 % monotioglicerol) al homogeneizado (siempre en baño de hielo), y se homogeneizó la suspensión del tejido tres veces durante quince segundos cada vez, a una velocidad de 1400 r.p.m., deteniendo el centrifugador ocasionalmente para conseguir mantener una temperatura constante. Posteriormente se transfirió el homogeneizado con pipeta Pasteur a un tubo de policarbonato para su centrifugación.

4º. Centrifugación

Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C para obtener un precipitado (pellet) que contiene la fracción nuclear y el sobrenadante (citosol y membranas).

5º. Ultracentrifugación

Se transfirió el sobrenadante a tubos de centrifuga, y se ultracentrifugó a 100.000 g con rotor de ángulo fijo durante 60 minutos, a 4°C. De esta forma, se obtuvo un sobrenadante que contiene el



citosol, y un pellet donde se encuentran las membranas. Éstas, se conservaron suspendidas en buffer TRIS y congeladas a -80°C .

- 6°. El citosol se almacenó en alícuotas para la cuantificación de proteínas, determinando siempre en primer lugar la expresión de HER2/neu, en segundo lugar, la expresión de p53, y, finalmente, si existía muestra suficiente, la expresión de EGFR.

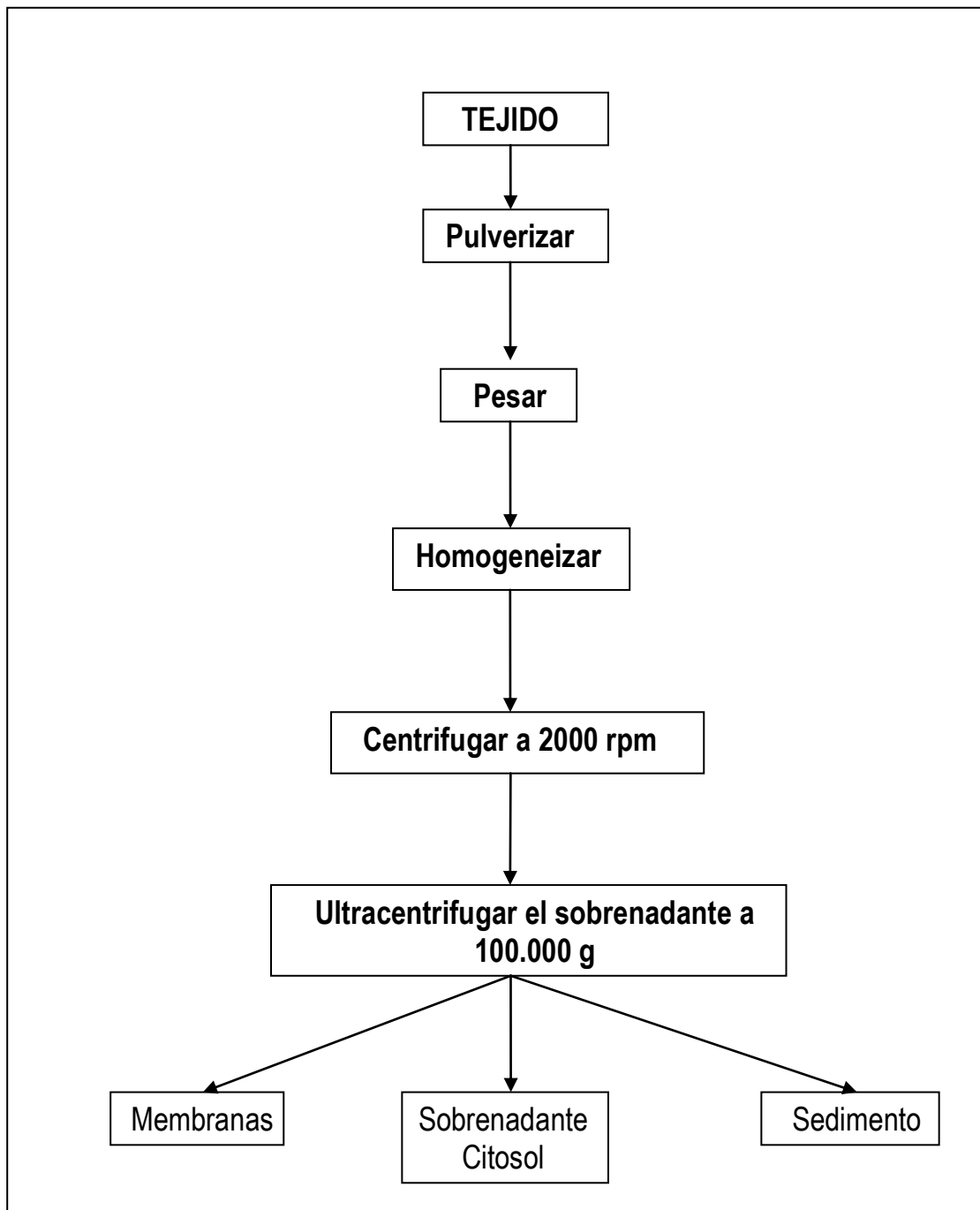


Figura18: Proceso de preparación de las muestras tisulares.



B.2.2. Cuantificación de las proteínas citosólicas y de membrana

La determinación de proteínas en el citosol y en membrana se realizó siguiendo el método cuantitativo de Lowry²⁰⁷. Este análisis se realiza con un rango de proteínas comprendido entre 0.3 y 2.5 mg/ml, diluyéndose en buffer TRIS las muestras que excedan esos valores.

B.2.2.1. Determinación de p53.

La proteína p53 fue cuantificada en el citosol mediante una técnica de inmunoluminiscencia (LIA) (ATOM®) que utiliza dos anticuerpos monoclonales (Pab 1801 y D01) que detectan p53 mutada y nativa, uniéndose a epítomos de la zona N-terminal de la proteína.

Los reactivos utilizados fueron:

- Fase sólida: tubo recubierto con el anticuerpo monoclonal Pab I 801.
- 100 μ l de estándares, controles y muestras citosólicas.
- 100 μ l de trazador conjugado (aminobutiletisoluminol ABEI) unido al anticuerpo monoclonal D01.

Para realizar el ensayo se incubaron 100 μ l de los estándares, controles y muestras citosólicas, con 100 μ l del trazador conjugado (ABEI) unido al anticuerpo monoclonal D01 en los tubos recubiertos de anticuerpo monoclonal Pab 1801, que actúan como fase sólida. Después de incubar durante 16-22 horas a temperatura ambiente, se procedió al lavado de cada tubo 3 veces con 2 ml de solución salina cada vez, para eliminar los compuestos no unidos.

El complejo trazador-p53 unido a las paredes del tubo fue detectado mediante una reacción luminosa producida por la oxidación de la isoluminina, desencadenada con la inyección automática de una solución de peroxidasa alcalina y otra catalítica. La emisión de fotones es medida en el



fotómetro a 450 nm de longitud de onda. La señal luminosa se mide en RLUs, y es directamente proporcional a la concentración de p53 de la muestra. A partir de ella se obtuvo una curva estándar, registrando las señales luminosas de los estándares en función de las concentraciones conocidas de ellos, en ng/ml. A continuación, se interpolaron en la curva estándar las muestras a estudio y el control, utilizando el valor medio de éstas.

El coeficiente de variación inter-ensayo (n=10), que evalúa la reproducibilidad de la prueba fue de 7,66%. El límite de sensibilidad fue de 0.002 ng mg⁻¹ de proteína.

B.2.2.2. Determinación de la proteína HER2/neu.

La determinación de la proteína HER2/neu se realizó en membrana mediante un ensayo de ELISA con un kit comercial (Oncogene Science®). Éste se trata de un inmunoanálisis enzimático tipo "sandwich" que utiliza dos anticuerpos: un anticuerpo monoclonal de ratón para captura del antígeno, y otro anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el dominio externo de HER2/neu. La cantidad de anticuerpo que se ha unido al antígeno se determinó con una IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante. Este enzima cataliza la conversión de O-fenilendiamina en un producto coloreado.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 492 nm, siendo la concentración de HER2/neu presente en la muestra directamente proporcional al color desarrollado.

Los coeficientes de variación inter-ensayo para dos concentraciones de 20 y 142 HNU/ml fueron respectivamente de 5% (n=32) y de 3.6% (n=32). Los coeficientes de variación intra-ensayo obtenidos para esas dos muestras fueron de 5.9% (n=8) y 1.5% (n=8), respectivamente. La sensibilidad del método fue de 10 HNU (1 HNU=0.05 fmol/mg de proteína). La equivalencia de unidades " HNU" (Human Neu Units) y fm (fentomoles) es de 1 HNU =0,5 fm.



B.2.2.3. Determinación del EGFR.

La determinación del EGFR se efectuó en membrana con un kit comercial (VIENNA LAB®), que utiliza un método de radioligando. El análisis consiste en la incubación de 75 UI de preparado de membrana con 75 UI de EGFR₁₂₅ en presencia y ausencia de un exceso de 200 veces de EGF no marcado, de forma que se establezca una competencia. Tras la incubación por espacio de dos horas a temperatura ambiente, el EGF libre es separado del complejo EGF-Receptor mediante la adición de un precipitante (gamma-globulina) y posterior centrifugación. El precipitado que contiene el complejo ligado se introduce en un contador de radiación gamma.

El cálculo del contenido de EGF-R se realizó con arreglo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de uniones} - \text{N}^{\circ} \text{ uniones específicas}}{\text{Cuenta total}} \times \frac{10\text{M}}{\text{Prot total}} = \text{fmol EGFR/mg prot}$$

Las muestras se procesaron por duplicado, considerándose positivas aquéllas que presentaban una diferencia mayor al 90 % entre los enlaces totales e inespecíficos.

La sensibilidad del método se determinó utilizando una muestra de placenta diluida en buffer TRIS, manteniendo la concentración de proteína en 2,5 mg/ml con BSA (seroalbúmina bovina). La sensibilidad obtenida en nuestro análisis fue de 1.1 fmol/mg de proteínas.

Como control se utilizó una preparación de membranas de placenta humana, con una concentración media de proteína de 228±52.1 fmol/mg de proteína oscilando en un rango de 133 y 402 fmol/mg de proteína.



B.3. Análisis del potencial biológico de las técnicas de cuantificación

Para el análisis del potencial biológico de la técnica se utilizaron dos grupos de control: el grupo Control Negativo quedó constituido por 20 pacientes afectados de hiperplasia prostática benigna (HPB) sometidos a resección transuretral de próstata (RTUp) durante el periodo comprendido entre Noviembre de 1992 y Noviembre de 1993. Durante la intervención quirúrgica se tomó una pequeña muestra de pared vesical mediante corte con el asa de resección. Los pacientes fueron seguidos durante un mínimo de 2 años mediante entrevista personal y citología urinaria.

El grupo Control Positivo estuvo constituido por 14 pacientes sometidos a RTUv por TVI durante el periodo comprendido entre Noviembre de 1992 y Noviembre de 1993. El tratamiento definitivo y posterior seguimiento de estos pacientes se realizó observando los protocolos de seguimiento del Hospital Clínico Universitario San Carlos detallados en el apartado C.

Para analizar el rendimiento de la cuantificación molecular frente a la inmunohistoquímica convencional (IHQ), se procedió a comparar los resultados obtenidos mediante cada una de las técnicas (p53, HER2/neu y EGFR), con una determinación IHQ clásica. La IHQ fue llevada a cabo por un único patólogo.

La expresión de p53 fue analizada mediante el anticuerpo monoclonal de ratón NCL-p53-DO7 (Novocasrta® Laboratory, Newcastle, Reino Unido).

Para la valoración semicuantitativa de los resultados de la inmunotinción de p53 se utilizó el porcentaje de núcleos teñidos mediante el siguiente esquema²⁰⁸:

- < 10% de núcleos positivos: nivel 0
- 10-25% de núcleos teñidos: nivel +
- 25-75% de núcleos teñidos: nivel ++
- > 75% de núcleos teñidos: nivel +++



La expresión de HER2/neu se realizó mediante Herceptest (Dako A/S®, Glostrup, Denmark), y se valoró la tinción en membrana.

Para la valoración de la positividad de la inmunotinción para HER2/neu se utilizó el porcentaje de células que expresaban tinción de membrana^{209,210} y se estratificó del siguiente modo^{211,212}:

- 0% de las células: nivel 0
- < 10% de las célula: nivel 1
- 10-50% de las células: nivel ++
- 50% de las células: nivel +++.

La expresión de EGFR fue analizada mediante el anticuerpo monoclonal de ratón EGFR.25 (Leyca Biosystems/Novocasrta® Laboratory, Newcastle, Reino Unido) y se valoró en membrana.

Para la valoración de la positividad de la inmunotinción para EGFR, se utilizó el porcentaje de células que expresaban tinción de membrana^{209,213} y se estratificó del mismo modo que para HER2/neu²¹¹:

- 0% de las células: nivel 0
- < 10% de las célula: nivel 1
- 10-50% de las células: nivel ++
- 50% de las células: nivel +++.

C. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

El seguimiento postoperatorio consistió en la recogida periódica de signos y síntomas, estudios radiológicos y endoscópicos, y pruebas analíticas periódicas.

Las revisiones clínicas tuvieron periodicidad trimestral durante el primer año, semestral a partir de ese momento y hasta los 5 años, y anual a partir de entonces. Se realizaron urografías intravenosas



al año de la intervención, y cada dos años hasta los 5 años; sólo en caso de recidivas se procedió a nuevos controles radiológicos.

El primer control cistoscópico se realizó a los 3 ó 6 meses de seguimiento; las cistoscopias de control se realizaron a los 3 ó 6 meses durante los 2 primeros años, a los 6 ó 12 meses durante los 2 años siguientes, y con periodicidad anual a partir de ese momento.

Se definió recidiva como la detección de cualquier tumor de estirpe urotelial en cualquier parte del tracto urinario mediante citología, cistoscopia o biopsia vesical. No obstante, los casos con citología positiva fueron posteriormente confirmados mediante estudio cistoscópico, biopsia o pruebas de imagen del tracto urinario superior (UIV, TAC). El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la aparición de la primera recidiva se definió como supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Por progresión se entendió el incremento de la categoría T por encima de T1, o de la categoría N, o M por encima de N0 o M0, en cualquiera de las revisiones. El tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y la progresión se definió como supervivencia libre de progresión (SLP).

El tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y la detección de metástasis, en el caso de haberse producido, fue definido como supervivencia libre de metástasis (SLM).

El tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad y el éxitus del paciente, en el caso de haberse producido fue definido como supervivencia global (STC).

Siguiendo el protocolo del Servicio de Urología del Hospital Clínico San Carlos vigente en aquel momento, los pacientes con TVS, si sus condiciones clínicas lo permitían, recibieron mitomicina (MMC) u oncotiotepa intravesical (tumores de bajo riesgo de progresión), o BCG en caso de resultar tumores de alto riesgo, fundamentalmente T1 G3.



En los casos de progresión, se realizó cistectomía radical, siempre y cuando el estado clínico del paciente lo permitió. En caso de enfermedad diseminada se procedió a tratamiento quimioterápico sistémico con M-VAC, individualizado su conveniencia según las características clínicas del caso. El seguimiento de los pacientes que sufrieron progresión incluyó controles trimestrales durante el primer año, semestrales hasta el quinto año, y anual a partir de entonces. Las revisiones consistieron en radiografía de tórax, urografía intravenosa (con placa miccional en casos de sustitución vesical), conductografía (en casos de ureteroileostomía cutánea), TAC abdominopélvico, y citología uretral en casos de remanente uretral.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como estimador de la tendencia central de las variables se utilizaron la media y la mediana. Como estimador de la dispersión se empleó la desviación estándar (DE).

Para comparar las concentraciones de EGFR, HER2/neu y p53 en los TVS, TVI y en controles sanos, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para variables no paramétricas. Este test asume que la variable a estudio tiene una distribución continua y un nivel ordinal de medida.

Para estimar la relación lineal entre los diferentes niveles de proteína cuantificada se utilizó la prueba de correlación de Pearson. Esta prueba es una medida de relación lineal entre dos variables cuantitativas que es independiente de la escala de medida de las variables.

Para estimar la asociación de la cuantificación de proteínas con los resultados obtenidos mediante IHQ se utilizó la prueba no paramétrica de tendencia de Jonckheere-Terpstra. Este test se utiliza para comparar dos o más muestras independientes una de las cuales es cuantitativa de distribución continua (RIA), y la otra categórica (IHQ) y con un orden natural de las categorías.



Para conocer la calidad de las pruebas diagnósticas de cuantificación proteica en el espectro completo de puntos de corte se emplearon curvas de receptor operador (*receiver operating characteristics* o ROC). La curva ROC es un gráfico en el que se observan todos los pares sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. En el eje y de coordenadas se sitúa la sensibilidad (S) o fracción de verdaderos positivos, calculada en el grupo de enfermos. En el eje x se sitúa la fracción de falsos positivos o 1-especificidad (E), y calculada en el subgrupo no afectado. Cada punto de la curva representa un par S/1-E correspondiente a un nivel de decisión determinado. Una prueba con discriminación perfecta, sin solapamiento de resultados en las dos poblaciones, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde S y E toman valores máximos (S y E = 1). Una prueba sin discriminación, con igual distribución de resultados en los dos subgrupos, da lugar a una línea diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. Cuanto más próxima es una curva ROC a la esquina superior izquierda, más alta es la exactitud global de la prueba. De la misma forma, si se dibujan en un mismo gráfico las curvas obtenidas con distintas pruebas diagnósticas, aquella que esté situada más hacia arriba y hacia la izquierda tiene mayor exactitud. De esta forma el área bajo la curva (ABC) ROC es una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica.

Para evaluar la exactitud de las pruebas diagnósticas con respecto a un punto de corte, se calculó S, E, VPP, VPN, y las probabilidades postprueba positiva (Post Odds +) y negativa (Post Odds -), en base a la probabilidad prepueba (Pre Odds) y la razón de verosimilitud positiva o negativa.

Para explorar las relaciones entre las concentraciones de EGFR, HER2/neu y p53 en TVS y los factores pronósticos clínicos, se recurrió a la prueba de la Chi cuadrado previa estratificación de los niveles de esos marcadores.

Para proporcionar una dimensión ajustada de la incidencia de los principales sucesos (recidiva, progresión a enfermedad infiltrante, desarrollo de metástasis a distancia o muerte) se consideró el tiempo de seguimiento. Así, la densidad de incidencia de los principales sucesos se calculó a partir



del sumatorio del seguimiento de todos los pacientes (en años), y se expresó en número de sucesos (recidivas, progresiones a enfermedad infiltrante, metástasis a distancia o fallecimientos) por 100 pacientes/año.

Para analizar el efecto de las variables pronósticas (FP clínicos y concentraciones de EGFR, HER2/neu y p53) sobre el curso de la enfermedad (en términos de SLE, SLP, SLM y STC), se llevó a cabo un análisis de supervivencia. Este tipo de diseño permite estimar cuánto tiempo permanecen una serie de individuos en un determinado estado (sin recidiva y/o sin progresión y/o libres de metástasis y/o vivos, en este estudio). Permite, además, que los individuos se incorporen en diferentes momentos, como sucede en las cohortes abiertas. Finalmente, posibilita la comparación entre dos o más grupos de individuos. Para el análisis de la proyección del tiempo hasta la recidiva se utilizó el método de Kaplan-Meier. El mismo estadístico se utilizó para identificar los rasgos demográficos y tumorales vinculados con la progresión, el desarrollo de metástasis o la muerte. Este procedimiento permite analizar sucesos vinculados al tiempo cuando existen casos censurados (seguimiento interrumpido), y se basa en la estimación de las probabilidades condicionales cuando el suceso tiene lugar, considerando el límite del producto de esas probabilidades para estimar la tasa de supervivencia en cada momento. Acto seguido, y para comparar las distribuciones de supervivencia, se empleó el test log-rank (LR).

Para valorar el efecto de cada variable en presencia del resto de covariables sobre la SLE se utilizaron modelos de regresión de riesgos proporcionales (o de Cox); la recidiva (presente o ausente) actuó como variable dependiente, y las variables demográficas (edad y sexo) y tumorales (estadio, grado, número de tumores, tamaño tumoral, y las concentraciones de EGFR, HER2/neu y p53) como variables pronósticas o independientes. El procedimiento fue idéntico para el análisis de SLP, SLM y STC, en su caso.

Para todas las comparaciones se empleó un nivel de significación estadística del 95%.

El estudio estadístico y la elaboración de los gráficos se llevaron a cabo mediante el programa SPSS versión 15.0.



4.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En el momento del inicio del estudio, anterior al Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero (RCL 2004, 325), no se planteó que el protocolo fuera evaluado por un Comité de Ética. La recogida de datos no conllevó ningún cambio en la práctica clínica sobre los pacientes. En todo momento se siguieron el resto de las recomendaciones de la Declaración de Helsinki con respecto a la investigación en humanos, y se anonimizaron todas las bases de datos en base a las normas para la adecuada protección de los datos personales que establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/1999, de 13 de diciembre de 1999, en nuestro país.



Resultados



5. RESULTADOS

5.1. CONSIDERACIÓN DE LOS FACTORES CLÍNICOS Y TUMORALES.

La edad media de los pacientes incluidos en nuestro estudio fue de 68,27 años (DT 12,16, mínimo 23, máximo 93). Los hombres representaron el 86,7 % del total de la muestra y las mujeres un 13,3 %, siendo por tanto la razón varones:mujeres de 6,5:1 (Figura 19).

En sólo 2 pacientes (2/45, 4,4%) existieron antecedentes familiares de cáncer vesical (Figura 20).

En relación al hábito tabáquico, doce pacientes (12/45, 26,7%) eran no fumadores en el momento del diagnóstico ni lo habían sido de modo continuado durante más de 5 años, mientras que 33 de ellos (33/45, 73,3%) eran fumadores de larga evolución (consumo de al menos 10 cigarrillos/día durante un periodo mayor de 5 años, en los últimos 10 años) (Figura 21).

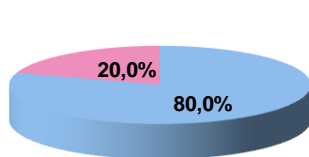
En relación al consumo de alcohol, el 80% (36/45) no eran bebedores ni lo habían sido de modo continuado durante más de 5 años, en tanto que el 20% (9/45) eran bebedores habituales (ingestión de más de 100 cc de alcohol absoluto más de 3 días a la semana, durante un periodo mayor de 5 años en los últimos 10 años) (Figura 22).

El diagnóstico de neoplasia vesical fue producto de los síntomas en el 88,9% de los pacientes (40/45), y constituyó un hallazgo incidental en el resto (5/45, 11,1%). De entre los síntomas, el más frecuente fue la presencia de hematuria (40/45, 88,9%), seguido de los síntomas miccionales irritativos (15/45, 33%) (Figura 23).

El grupo control negativo quedó constituido por 20 varones sometidos a RTUp por HPB, en el curso de la cual se obtuvo un pequeño fragmento de la pared vesical. La edad media fue de 69,7 años (DT 6,90, mínimo 61, máximo 90). Ninguno desarrolló cáncer vesical tras un seguimiento de 2 años.

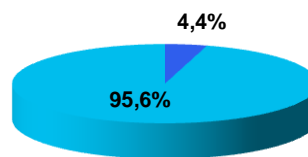


El grupo control positivo fue constituido por 10 varones y cuatro mujeres (edad media 73 años, DT 6,8 años, mínimo 62, máximo 86) con CCT e infiltración de la capa muscular de la vejiga (al menos, estadio local pT2). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los factores demográficos respecto al grupo de TVS (a excepción de la distribución por sexos en el grupo de Control Negativo por cuestiones obvias).



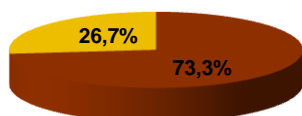
■ Varones ■ Mujeres

Figura 19: Distribución de la serie de TVS en función del sexo (%).



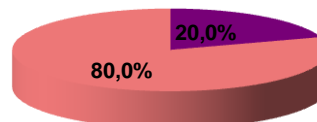
■ Ant Familiar ■ No Ant Familiar

Figura 20: Distribución de la serie de TVS en función de la presencia de antecedentes familiares (%).



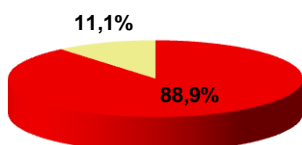
■ Fumadores ■ No fumadores

Figura 21: Distribución de la serie de TVS en función del hábito tabáquico (%).



■ Bebedores ■ No bebedores

Figura 22: Distribución de la serie de TVS en función del hábito enólico (%).



■ Sintomáticos ■ Incidentales

Figura 23: Distribución de la serie de TVS en función de la presencia de sintomatología al diagnóstico (%).

5.2. VALORACIÓN DE LOS HALLAZGOS OPERATORIOS, RASGOS HISTOLÓGICOS Y MARCADORES MOLECULARES.

En relación al número de tumores, en el momento del diagnóstico, el 53,3% de los pacientes (24/45) presentaron un único tumor, mientras que el resto presentaron múltiples neoformaciones (21/45, 46,7%) (Figura 24).

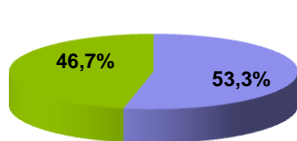
El aspecto tumoral fue superficial en el 91% de los casos (41/45) e infiltrante en el 6,7% (3/45). En un caso (1/45, 2,2%) el tumor fue descrito como de aspecto mixto (Figura 25).

El tamaño tumoral promedio fue de 2,4 cm (mínimo 1 cm, máximo 6 cm, DE 1,05); el tamaño fue inferior a 3 cm en 25 ocasiones (25/45, 55,5%), e igual o mayor de 3 cm en 20 casos (20/45, 44,5%) (Figura 26).

En todos los casos, el diagnóstico histológico fue de CCT y siempre se trató de tumores primarios.

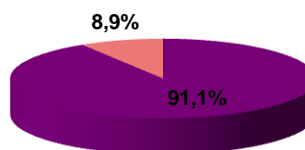
En relación al grado de diferenciación, la distribución fue como sigue: 23 tumores moderadamente diferenciados (grado 2, 23/45, 51,1%), 13 tumores bien diferenciados (grado 1, 13/45, 28,9%) y 9 tumores indiferenciados (grado 3, 9/45, 20%) (Figura 27).

En lo referente al estadio local, veintitrés tumores (23/45, 51,1%) fueron clasificados como Ta, y 22 tumores como T1 (22/45, 48,9%) (Figura 28).



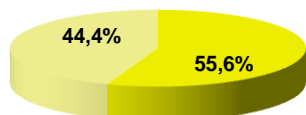
■ Unico ■ Múltiple

Figura 24: Distribución de la serie de TVS en función del número de tumores (%).



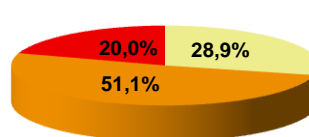
■ Superficial ■ Infiltrante

Figura 25: Distribución de la serie de TVS en función del aspecto endoscópico (%).



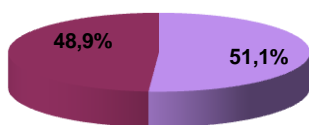
■ < 3 cm ■ > 3 cm

Figura 26: Distribución de la serie de TVS en función del tamaño tumoral (%).



■ Grado I ■ Grado II ■ Grado III

Figura 27: Distribución de la serie de TVS en función del grado de diferenciación celular (%).



■ Ta ■ T1

Figura 28: Distribución de la serie de TVS en función del estadio tumoral (%).



Tabla XII: Características clínicas e histológicas de los pacientes del grupo de TVS.

Características de los pacientes		Número	Porcentaje
Total		45	100
Tumores primarios		45	100
Sexo	Varones	39	86,7
	Mujeres	6	13,3
Grupo etario	< 70 años	21	46,7%
	≥ 70 años	24	53,3%
Antecedentes Familiares	Si	2	4,4%
	No	43	95,6%
Hábito tabáquico	Si	33	73,3%
	No	12	26,7%
Hábito enólico	Si	9	80,0%
	No	36	20,0%
Diagnóstico	Sintomático	40	88,9%
	- Hematuria	40	88,9%
	- Sdr Irritativo	15	33,3%
	- Otros	2	4,4%
	Incidental	5	11,1%
Aspecto tumoral	Superficial	41	91,1%
	Infiltrante	4	8,9%
Número de tumores	Único	24	53,3%
	Múltiple	21	46,7%
Tamaño tumoral	< 3 cm	25	55,5%
	≥ 3 cm	20	44,5%
Grado de diferenciación	G1	13	28,9%
	G2	23	51,1%
	G3	9	20,0%
Estadio local	Ta	23	51,1%
	T1	22	48,9%



A. ESTUDIOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.

La Tabla XIII recoge el detalle del número de determinaciones en cada tejido.

No se detectó cantidad alguna de p53 en ninguno de los controles negativos (0,0 ng/mg, DE 0,0 ng/mg). La concentración media de p53 en los TVS fue de 0,36 ng/mg (DE 0,89 ng/mg), mientras que en los controles positivos fue de 2,55 ng/mg (DE 2,21 ng/mg).

La concentración media de HER2/neu en los controles negativos fue de 122,08 HNU/mg (DE 84,20 HNU/mg), en los TVS fue de 944,48 HNU/mg (DE 555,05) y para los controles positivos fue prácticamente igual que para los TVS (944,64 HNU/mg DE 833,11 HNU/mg)

Para EGFR, la concentración media de los controles negativos fue de 2,54 fmol/mg (DE 1,64 fmol/mg), mientras que para los TVS fue de 10,05 fmol/mg (DE 10,86 fmol/mg) y para los controles positivos fue de 28,96 fmol/mg (DE 17,83 fmol/mg)

Las Tablas XIV-XVI recogen los promedios de los niveles de expresión de los tres oncogenes en los pacientes a estudio y en los controles positivos y negativos.

En los TVS, las concentraciones promedio de todos los marcadores resultaron significativamente superiores a las detectadas en el tejido procedente de los controles negativos. De modo similar, y a excepción del HER2/neu, que presentó concentraciones prácticamente iguales, la concentración de los marcadores en los TVS resultó significativamente inferior a la detectada en el tejido procedente de los controles positivos (Tabla XVII).

La representación gráfica mediante diagramas de cajas (boxplots) se muestra en las Figuras 29-31.



Tabla XIII: Proporción de muestras con determinaciones de cada uno de los marcadores tumorales (p53, EGFR y HER2/neu) en TVS, Controles Positivos y Controles Negativos.

		TIPO DE TEJIDO		
		TVS	Controles Positivos	Controles Negativos
DETERMINACION	P53	45/45	10/10	20/20
	HER2/neu	45/45	10/10	20/20
	EFGR	34/45	10/10	20/20



	Controles Negativos			
	n	Media	D E	Min-Max
P53 (ng/mg)	20	0,00	0,00	0,00-0,00
HER2/neu (HNU/mg)	20	122,08	84,20	38,5-399,2
EGFR (fmol/mg)	20	2,54	1,64	0,1-6,2

Tabla XIV: Media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en el grupo de control negativo.

	TVS			
	n	Media	D E	Min-Max
P53 (ng/mg)	45	0,36	0,89	0,00-4,70
HER2/neu (HNU/mg)	45	944,48	555,05	76,00-2776,70
EGFR (fmol/mg)	34	10,05	10,26	0,00-42,00

Tabla XV: Media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en el grupo de TVS.

	Controles Positivos			
	n	Media	D E	Min-Max
P53 (ng/mg)	14	2,55	2,12	0,00-7,80
HER2/neu (HNU/mg)	14	944,64	883,11	53,00-3804,00
EGFR (fmol/mg)	14	28,96	17,83	3,80-64,80

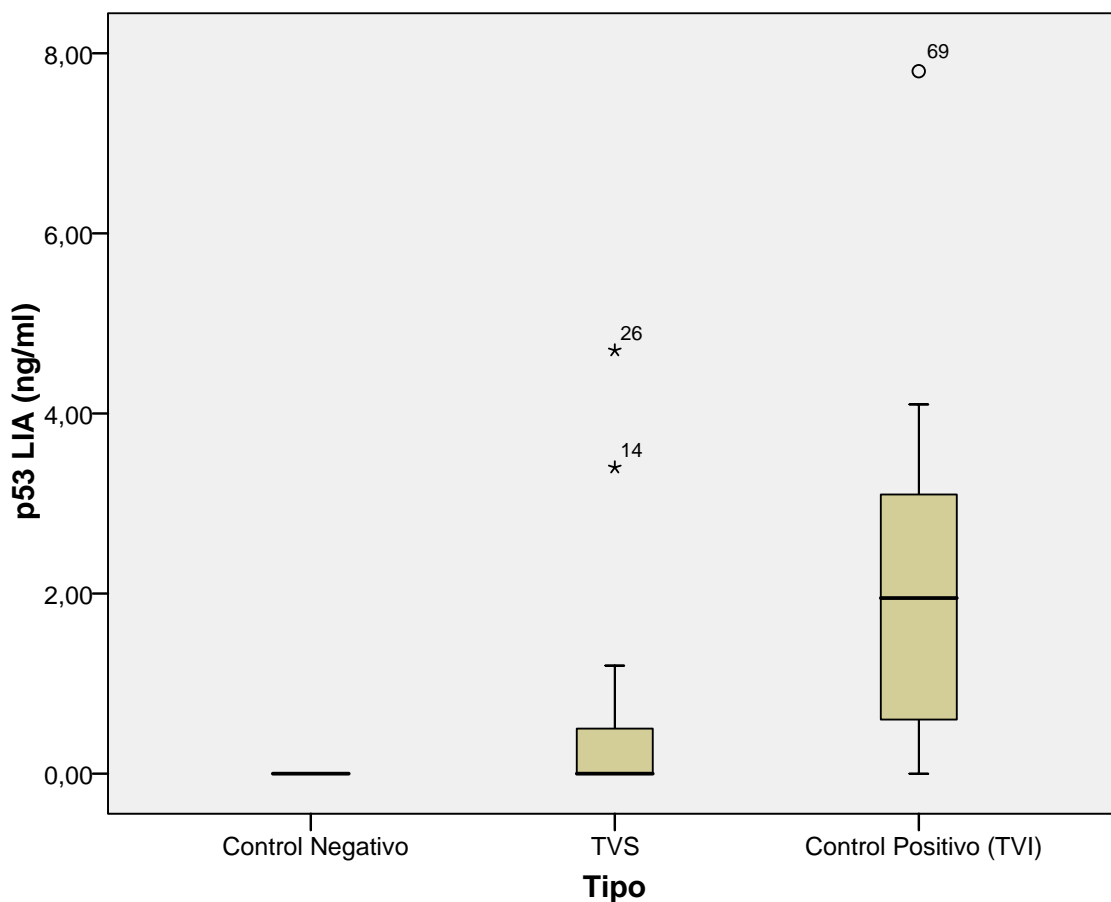
Tabla XVI: Media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en el grupo de control positivo.



Tabla XVII: Comparación de la media, DE y rango de las concentraciones de cada uno de los marcadores tumorales en TVS frente a Controles Negativos y Controles Positivos.

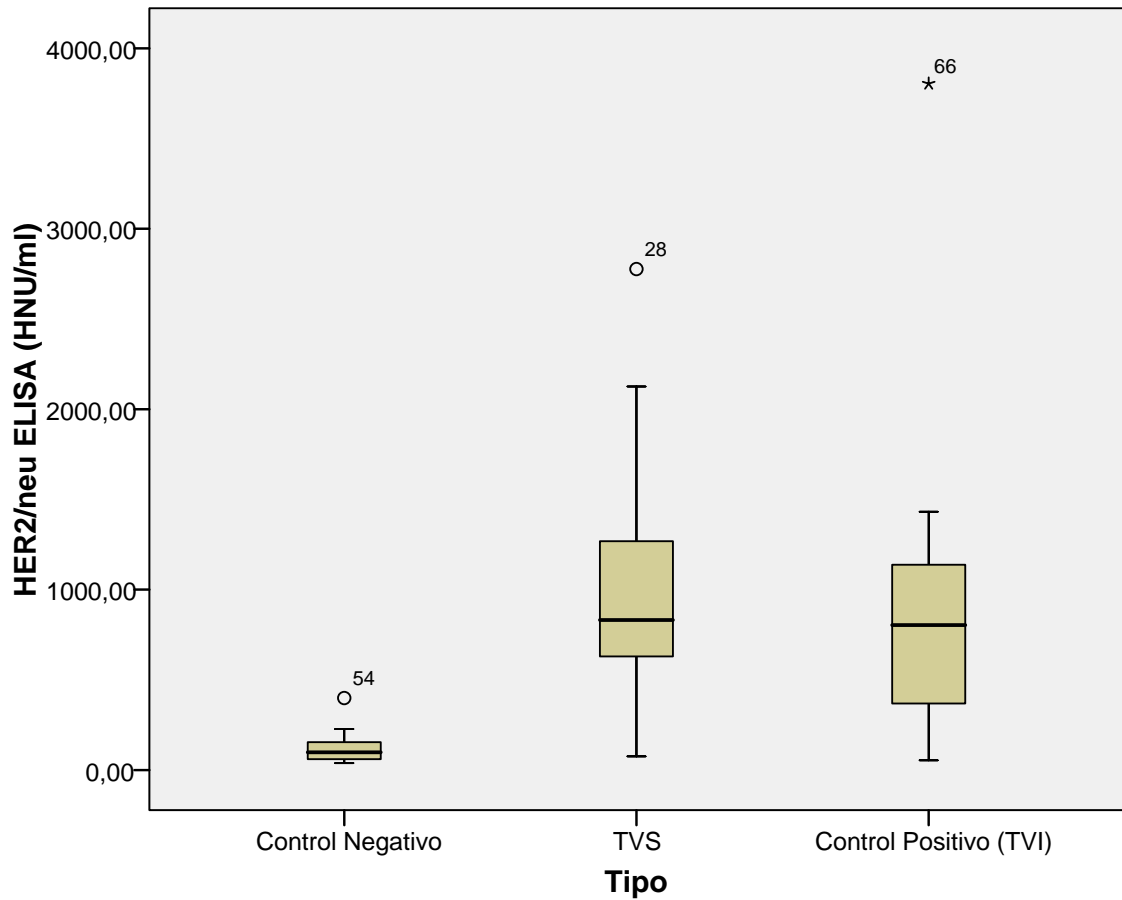
	Controles Negativos				TVS				K-W
	n	Media	D E	Min-Max	n	Media	D E	Min-Max	P
P53 (ng/mg)	20	0,00	0,00	0-0	45	0,36	0,89	0,00-4,70	0,011
HER2/neu (HNU/mg)	20	122,08	84,20	38,5-399,2	45	944,48	555,05	76,00-2776,70	< 0,001
EGFR (fmol/mg)	20	2,54	1,64	0,1-6,2	34	10,05	10,26	0,00-42,00	< 0,001

	Controles Positivos (TVI)				TVS				K-W
	n	Media	D E	Min-Max	n	Media	D E	Min-Max	P
P53 (ng/mg)	14	2,55	2,12	0,00-7,80	45	0,36	0,89	0,00-4,70	< 0,05
HER2/neu (HNU/mg)	14	944,64	883,11	53,00-3804,00	45	944,48	555,05	76,00-2776,70	NS
EGFR (fmol/mg)	14	28,96	17,83	3,80-64,80	34	10,05	10,26	0,00-42,00	< 0,01



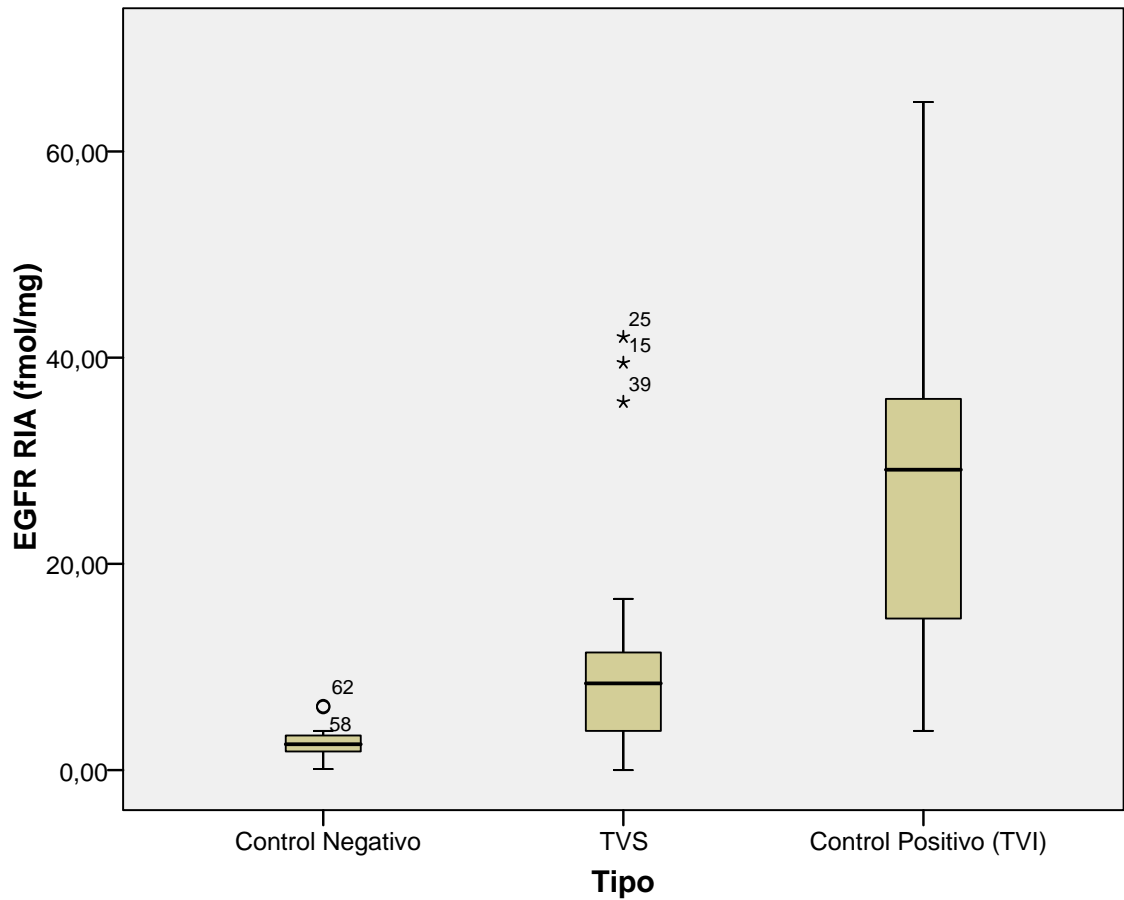
- * y o : Valores extremos (outliers).
- — : valores extremos de la distribución.
- — : valor promedio de la distribución.
- ■ : percentil 75.

Figura 29: Representación gráfica de los valores de p53 RIA en TVS frente a Controles Negativos y Controles Positivos.



- * y o : Valores extremos (outliers).
- — : valores extremos de la distribución.
- — : valor promedio de la distribución.
- ■ : percentil 75.

Figura 30: Representación gráfica de los valores de HER2/neu ELISA en TVS frente a Controles Negativos y Controles Positivos.



- * y o : Valores extremos (outliers).
- — : valores extremos de la distribución.
- — : valor promedio de la distribución.
- ■ : percentil 75.

Figura 31: Representación gráfica de los valores de EGFR RIA en TVS frente a Controles Negativos y Controles Positivos.



B. ANÁLISIS DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LAS TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.

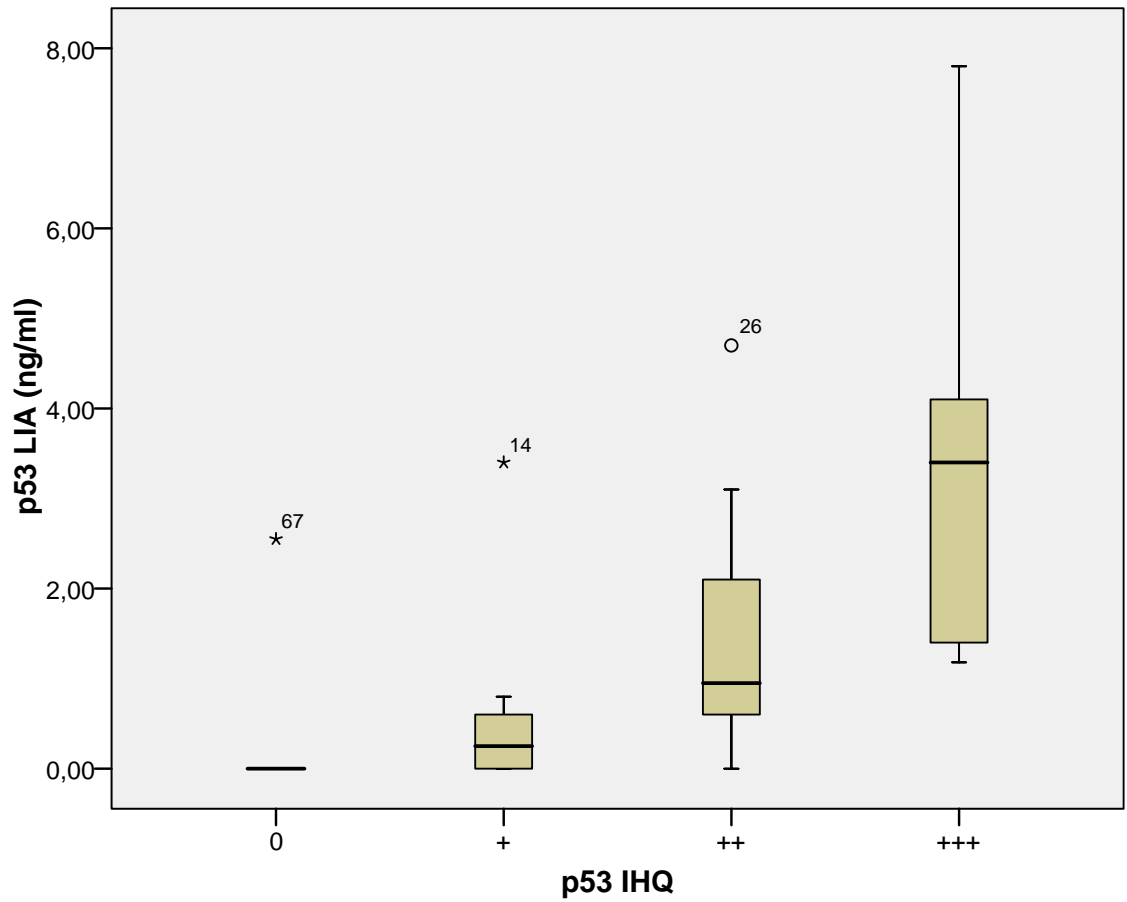
Con el fin de analizar el potencial biológico de las diferentes técnicas de cuantificación proteica, se procedió a valorar la asociación de los resultados obtenidos mediante las mismas con los hallazgos procedentes del análisis IHQ de cada uno de los pacientes y controles.

Para p53 los resultados del análisis IHQ fueron los siguientes:

- Todas las muestras obtenidas de controles sanos obtuvieron un nivel de tinción 0 (< 10% núcleos teñidos).
- De las muestras obtenidas de controles positivos, 4 (28,6%) obtuvieron un nivel de tinción 0 (< 10% núcleos teñidos), 0 (0%) un nivel de tinción + (10-25% núcleos teñidos), 5 (35,7%) un nivel de tinción ++ (25-75% de núcleos teñidos) y 5 (35,7%) un nivel de tinción +++ (>75% de núcleos teñidos).
- De las muestras obtenidas de TVS, 26 (57,8%) obtuvieron un nivel de tinción 0 (< 10% núcleos teñidos), 10 (22,2%) un nivel de tinción +, y 9 (20%) un nivel de tinción ++ (25-75% de núcleos teñidos).

La representación gráfica de los valores de p53 LIA para cada nivel de tinción p53 IHQ mediante diagrama de cajas se muestra en la Figura 32.

El test de Jonckheere-Terpstra reveló una relación estadísticamente significativa a la asociación entre los niveles de p53-IHQ y de p53-LIA. El grado de significación hallado, indica que el nivel de p53 medido mediante RIA presenta una tendencia creciente con el nivel de tinción IHQ ($p < 0,001$).



- * y ○ : Valores extremos (outliers).
- — : valores extremos de la distribución.
- — : valor promedio de la distribución.
- ■ : percentil 75.

Figura 32: Representación gráfica de los valores de p53 LIA para cada nivel de tinción p53 IHQ.

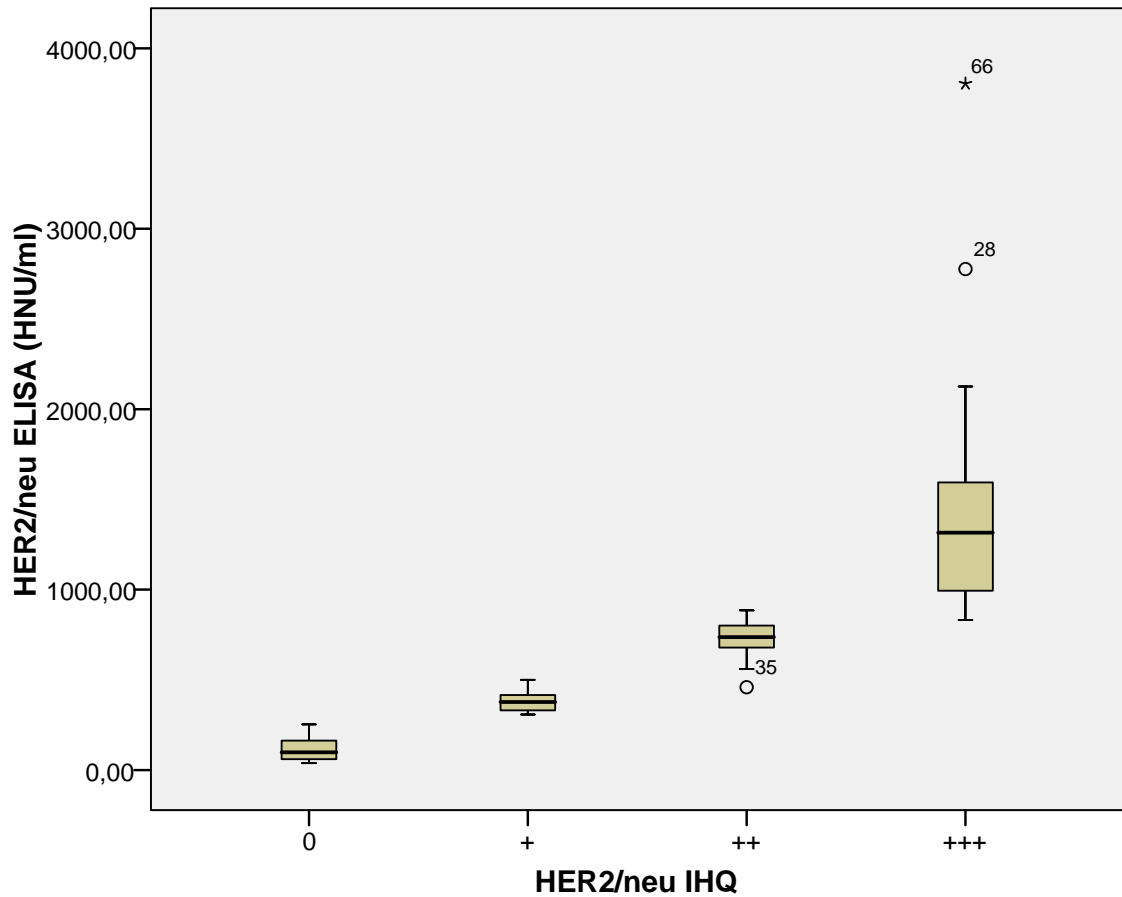


Para HER2/neu los resultados del análisis IHQ fueron los siguientes:

- Todas las muestras obtenidas de controles sanos menos una obtuvieron un nivel de tinción 0 (0% células teñidas). La otra muestra, presentó un nivel de tinción +.
- De las muestras obtenidas de controles positivos, 2 (14,3%) obtuvieron un nivel de tinción 0 (0% células teñidas), 3 (21,4%) un nivel de tinción + (<10% células teñidas), 5 (35,7%) un nivel de tinción ++ (10-30% de células teñidas) y 3 (21,4%) un nivel de tinción +++ (>30% de células teñidas).
- De las muestras obtenidas de TVS 26 (57,8%) obtuvieron un nivel de tinción 0, 10 (22,2%) un nivel de tinción +, y 9 (20%) un nivel de tinción ++ (25-75% de núcleos teñidos).

La representación gráfica de los valores de HER2/neu ELISA para cada nivel de tinción HER2/neu IHQ mediante diagrama de cajas se muestra en la Figura 33.

El test de Jonckheere-Terpstra reveló una relación estadísticamente significativa a la asociación entre los niveles de HER2/neu IHQ y de HER2/neu ELISA. El grado de significación hallado, indica que el nivel de HER2/neu medido mediante ELISA presenta una tendencia creciente con el nivel de tinción IHQ ($p < 0,001$).



- * y ○ : Valores extremos (outliers).
- — : valores extremos de la distribución.
- — : valor promedio de la distribución.
- ■ : percentil 75.

Figura 33: Representación gráfica de los valores de HER2/neu ELISA para cada nivel de tinción HER2/neu IHQ.

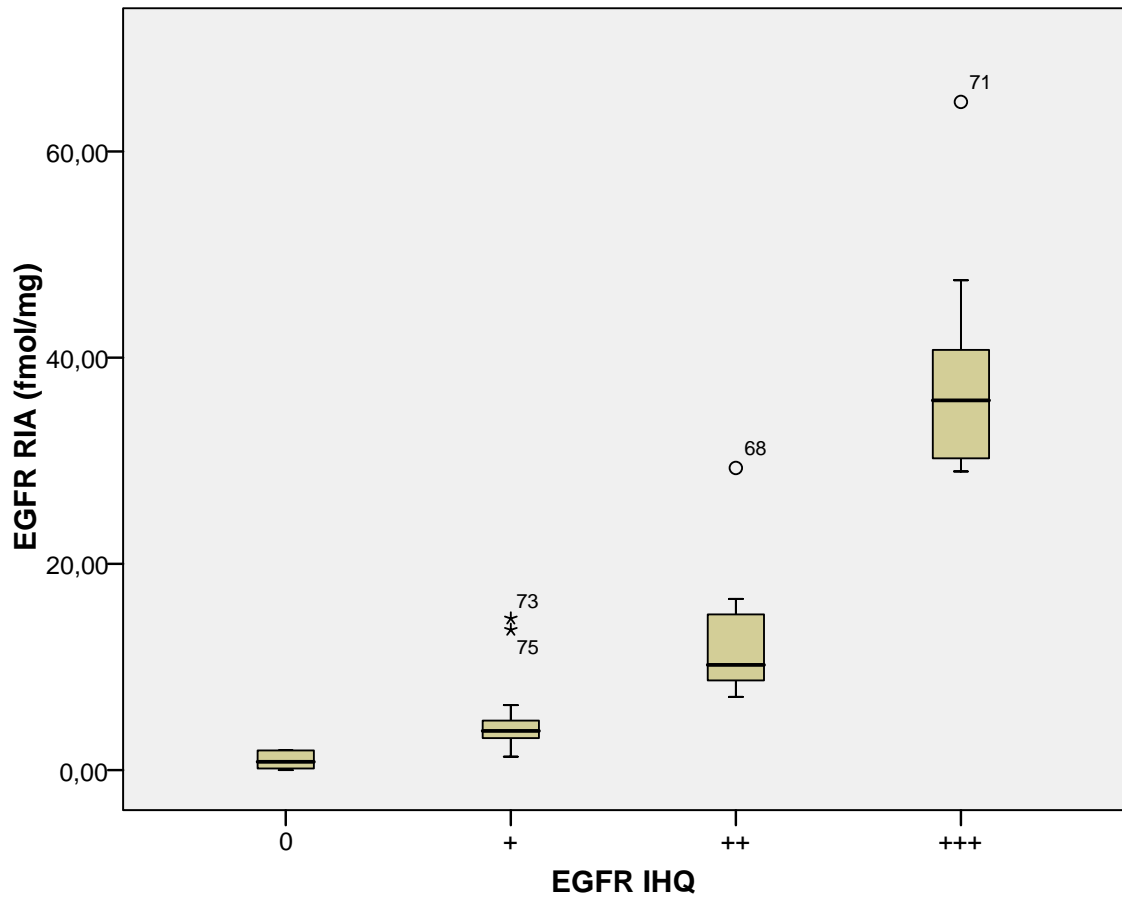


Para EGFR los resultados del análisis IHQ fueron los siguientes:

- Nueve muestras obtenidas de controles sanos (45%) obtuvieron un nivel de tinción 0 (0% células teñidas). Once muestras (55%), presentaron un nivel de tinción +.
- De las muestras obtenidas de controles positivos, 4 (28,6%) un nivel de tinción + (<10% de células teñidas), 1 (7,1%) un nivel de tinción ++ (10-50% de células teñidas) y 9 (64,3%) un nivel de tinción +++ (>50% de células teñidas).
- De las muestras obtenidas de TVS 2 (5,9%) obtuvieron un nivel de tinción 0 (< 10% núcleos teñidos), 12 (35,3%) un nivel de tinción +, 16 (47%) un nivel de tinción ++ (25-75% de núcleos teñidos) y 3 (8,8%) un nivel de tinción +++ (>75% de células teñidas).

La representación gráfica de los valores de EGFR RIA para cada nivel de tinción EGFR IHQ mediante diagrama de cajas se muestra en la Figura 34.

El test de Jonckheere-Terpstra reveló una relación estadísticamente significativa a la asociación entre los niveles de HER2/neu-IHQ y de HER2/neu-ELISA. El grado de significación hallado, indica que el nivel de HER2/neu medido mediante ELISA presenta una tendencia creciente con el nivel de tinción IHQ ($p < 0,001$).



- * y ○ : Valores extremos (outliers).
- — : valores extremos de la distribución.
- — : valor promedio de la distribución.
- ■ : percentil 75.

Figura 34: Representación gráfica de los valores de EGFR RIA para cada nivel de tinción EGFR IHQ.

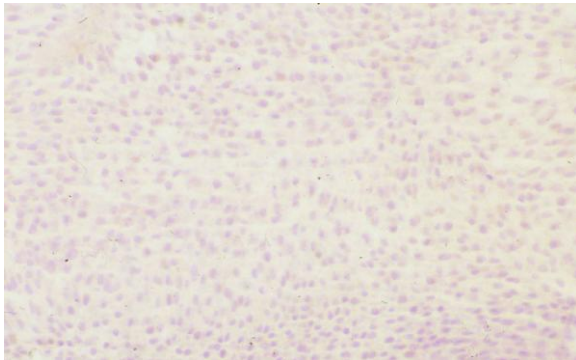


Figura 35: Tinción IHQ para p53 tumor de bajo grado, nivel de tinción 0.

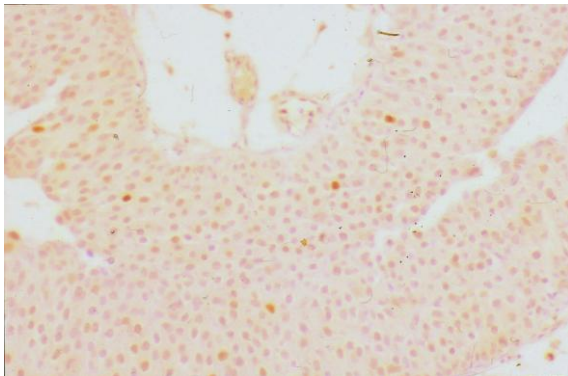


Figura 36: Tinción IHQ para p53 tumor de bajo grado, nivel de tinción +.

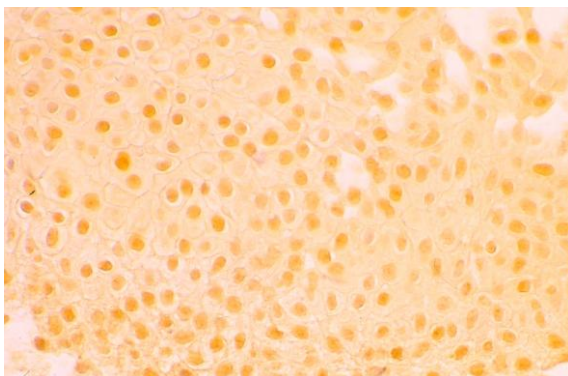


Figura 37: Tinción IHQ para p53 tumor de bajo grado, nivel de tinción ++.

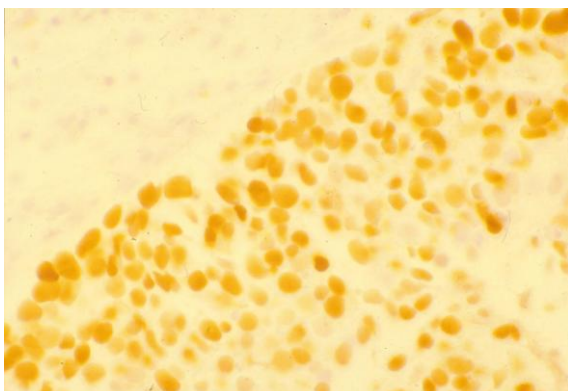


Figura 38: Tinción IHQ para p53 tumor de alto grado, nivel de tinción +.

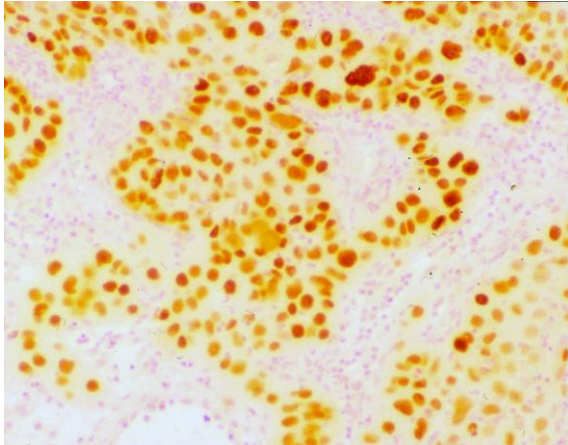


Figura 39: Tinción IHQ para p53 tumor de alto grado, nivel de tinción +++.

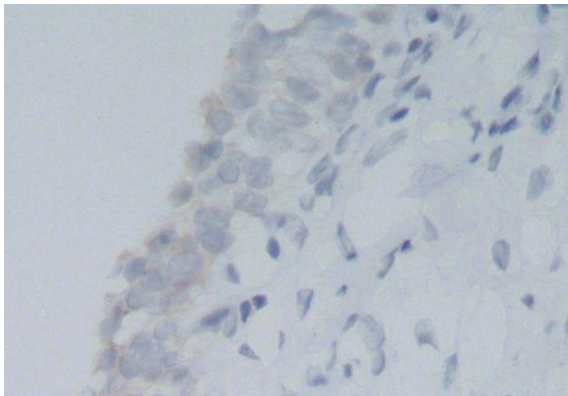


Figura 40: Tinción IHQ para HER 2/neu en tejido urotelial sano, nivel de tinción 0.

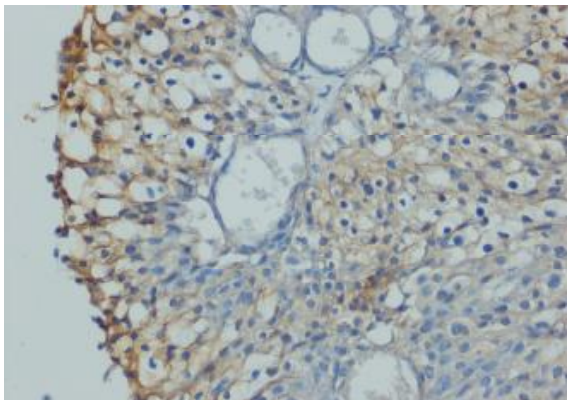


Figura 41: Tinción IHQ para HER2/neu en tumor de alto grado, nivel de tinción +++.

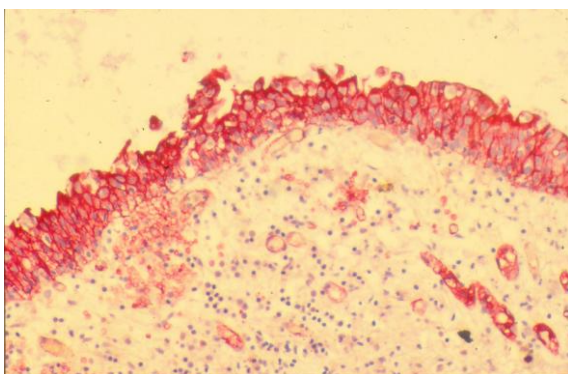


Figura 42: Tinción IHQ para EGFR en tumor vesical, nivel de tinción +++



C. CORRELACION ENTRE LOS DIFERENTES NIVELES DE PROTEINAS OBTENIDOS MEDIANTE TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.

Se analizó la posible existencia de correlación entre los valores de las proteínas p53, EGFR, y HER2/neu en la totalidad de pacientes incluidos para el análisis (Controles Negativos, TVS y TVI).

No se detectó correlación significativa entre los niveles de p53 LIA y HER2/neu ELISA ($R=0,421$; $p=0,092$) (Figura 43).

Se detectó correlación positiva significativa débil ($R=0,327$; $p<0,01$) entre las determinaciones de p53 LIA y EGFR RIA (Figura 45). La figura 46 muestra la recta de regresión correspondiente a esta relación.

Se detectó correlación positiva significativa débil ($R=0,267$; $p<0,05$) entre las determinaciones de HER2/neu ELISA y EGFR RIA (Figura 47). La figura 48 muestra la recta de regresión correspondiente a esta relación.

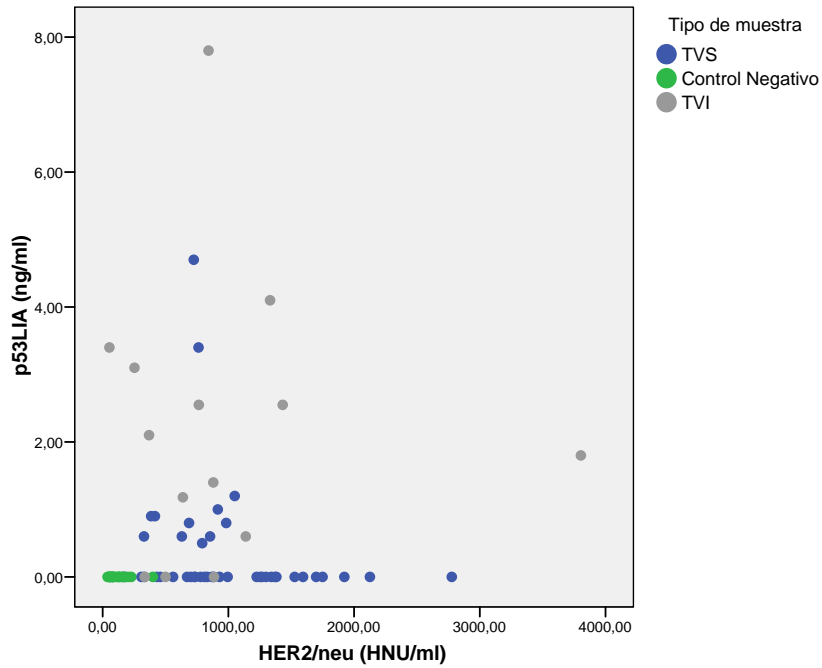


Figura 43: Distribución en diagrama de nube de puntos de los valores de p53 LIA y HER2/neu ELISA. (R=0,421; p=0,092)

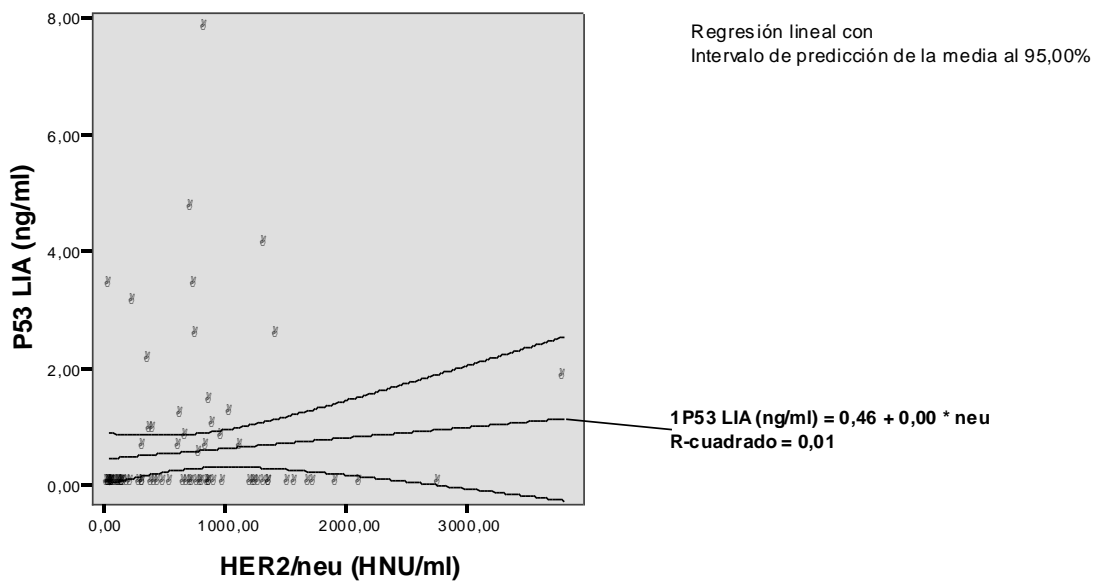


Figura 44: Recta de regresión calculada para los valores de p53 LIA y HER2/neu ELISA. (NS)

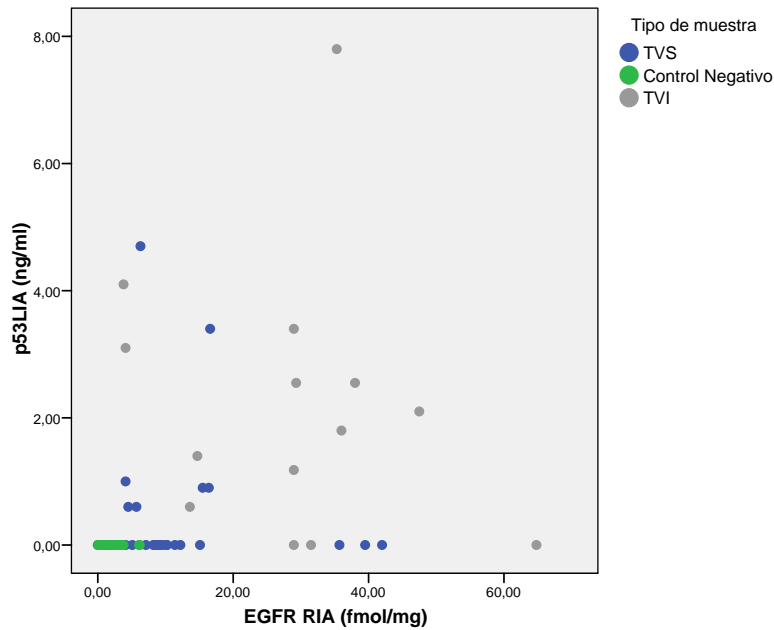


Figura 45: Distribución en diagrama de nube de puntos de los valores de p53 LIA y EGFR RIA. (R=0,267; p<0,01)

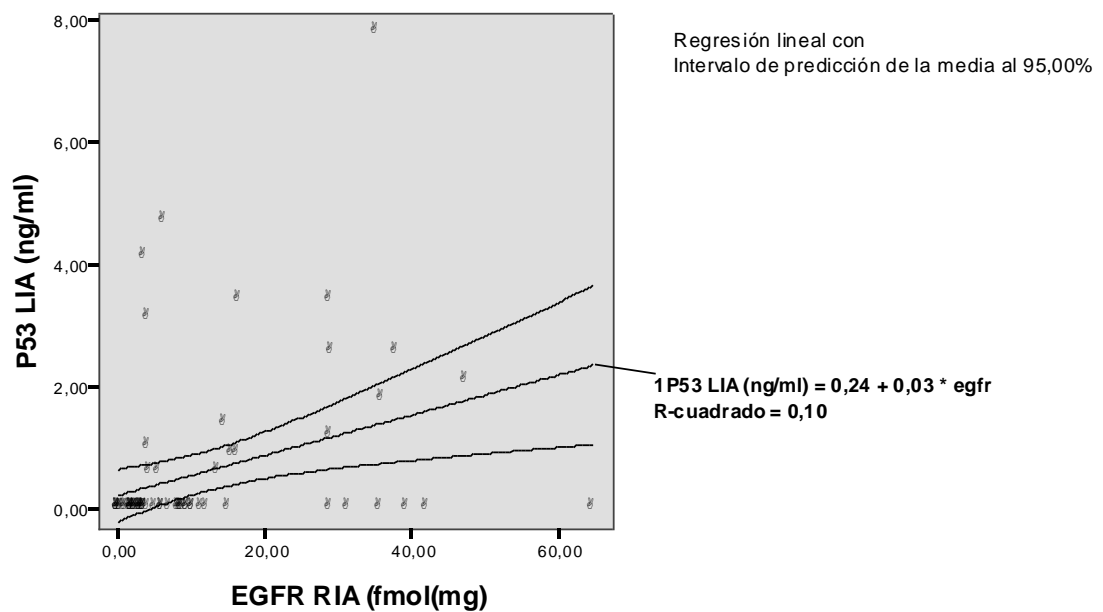


Figura 46: Recta de regresión calculada para los valores de p53 LIA y EGFR RIA.

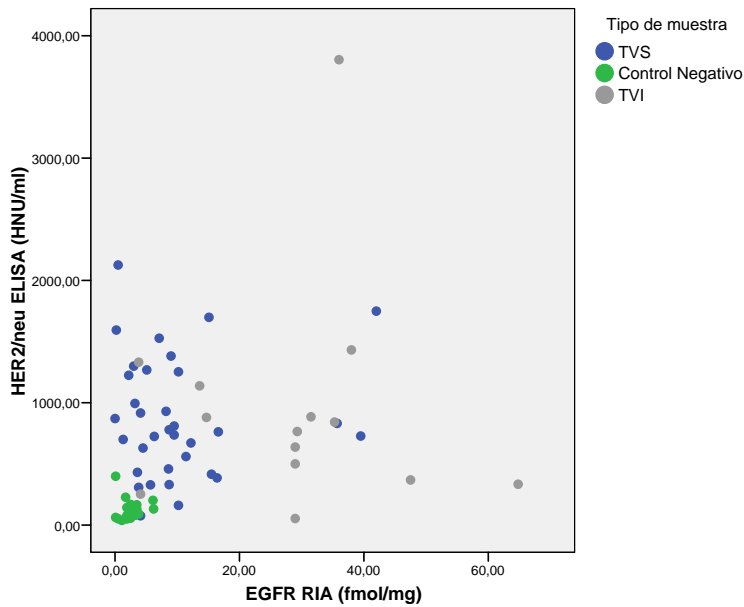


Figura 47: Distribución en diagrama de nube de puntos de los valores de HER2/neu ELISA y EGFR. (R=0,327; p<0,05)

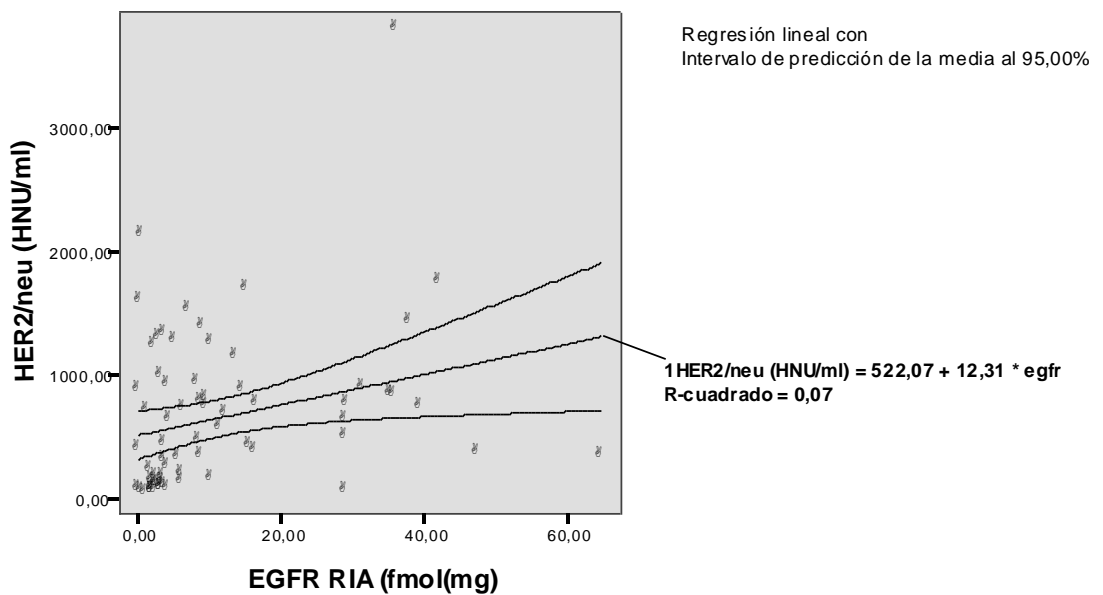


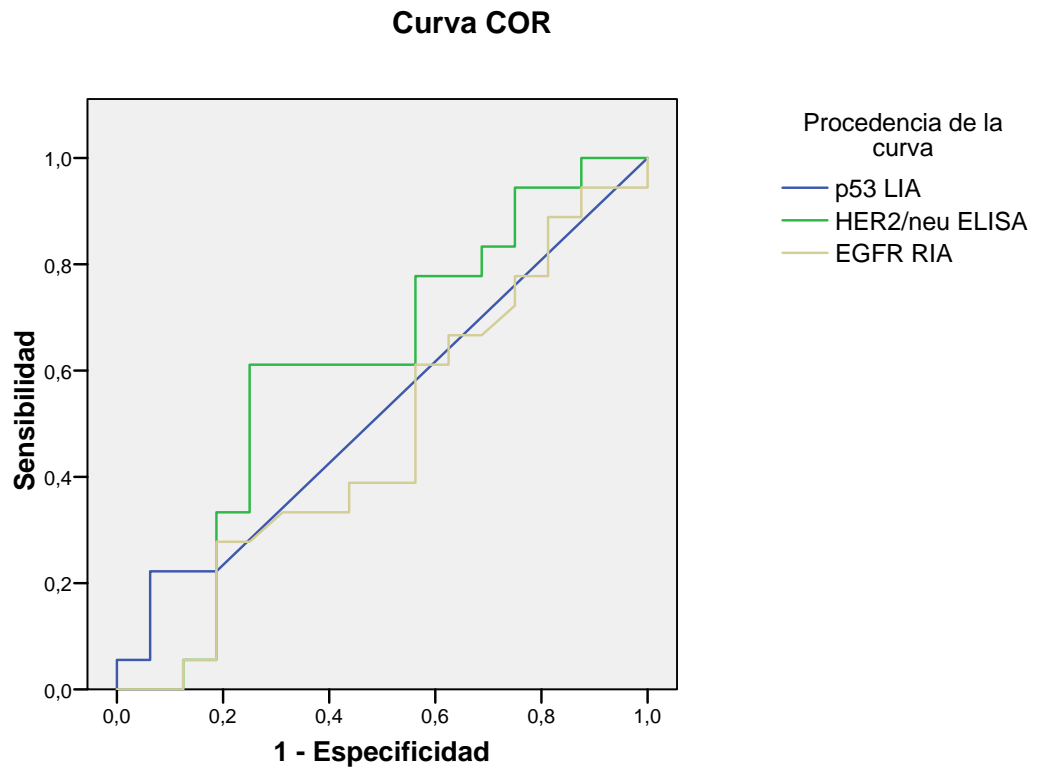
Figura 48: Recta de regresión calculada para los valores de p53 LIA y EGFR RIA.



5.3. ANÁLISIS DE LA EXACTITUD DIAGNÓSTICA PARA LA PREDICCIÓN DE EVENTOS DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN PROTÉICA.

Como primera medida, y dado que se ha confirmado la capacidad que la cuantificación de los niveles proteicos de p53, HER2/neu y EGFR tienen para diferenciar entre pacientes con TVS e individuos sanos, planteamos un análisis de la exactitud diagnóstica de estas proteínas tisulares para predecir recidiva, progresión, diseminación metastásica y muerte en el grupo de los TVS.

Inicialmente para conocer la calidad de las pruebas en el espectro completo de puntos de corte se emplearon curvas de ROC y se analizó el ABC como medida global de la exactitud de las mismas. Ninguna de ellas presentó un ABC suficiente para establecer un punto óptimo de corte mediante este método (Figuras 49-52). Por ello, y teniendo presente el espíritu del análisis – continuar con un estudio de supervivencia- para proseguir el estudio fue preciso establecer niveles de corte para estas variables continuas. Para ello se examinó la distribución de percentiles de las variables p53, HER2/neu y EGFR en tres tertiles (T) (Tabla XIX) y con ellos, se procedió a valorar la exactitud diagnóstica de cada uno de ellos mediante cálculo de S, E, VPP, VPN, PreOdds, PostOdds + y PostOdds – (Tabla XIX). Ninguno de ellos mostró tampoco valores de VPP suficientemente adecuados para su empleo en la práctica clínica.

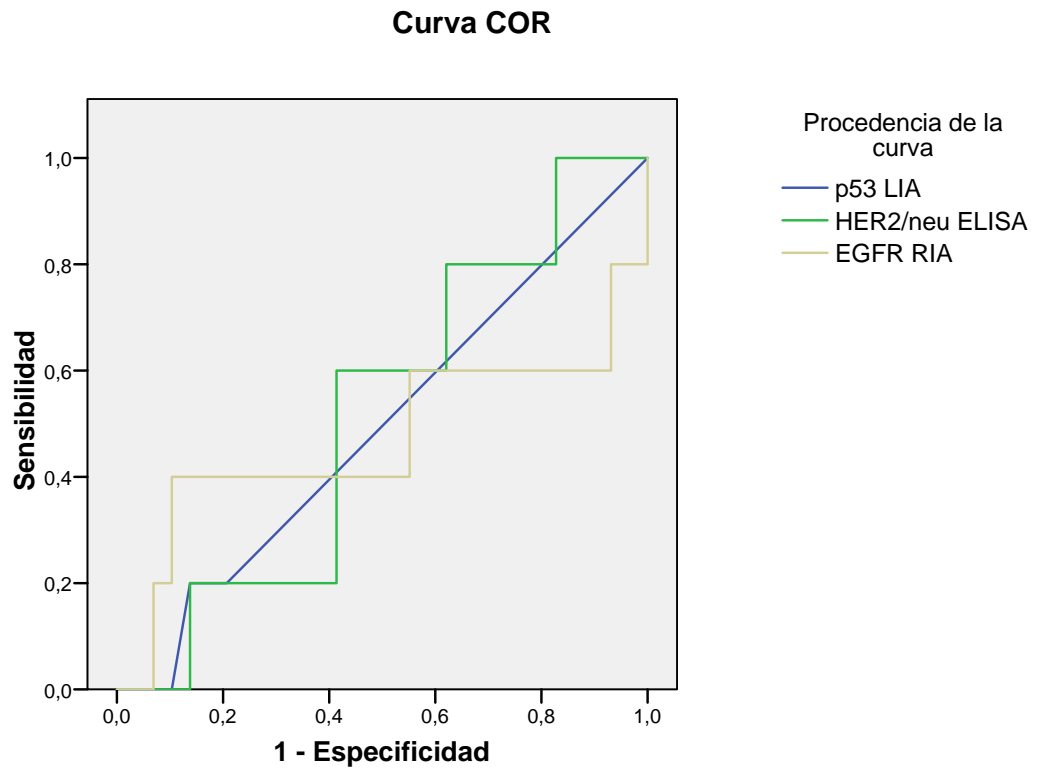


ABC p53 LIA: 0,53

ABC HER2/neu ELISA: 0,61

ABC EGFR RIA: 0,48

Figura 49: Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de recidiva de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA. Se especifica el Área Bajo la Curva (ABC) para cada marcador.

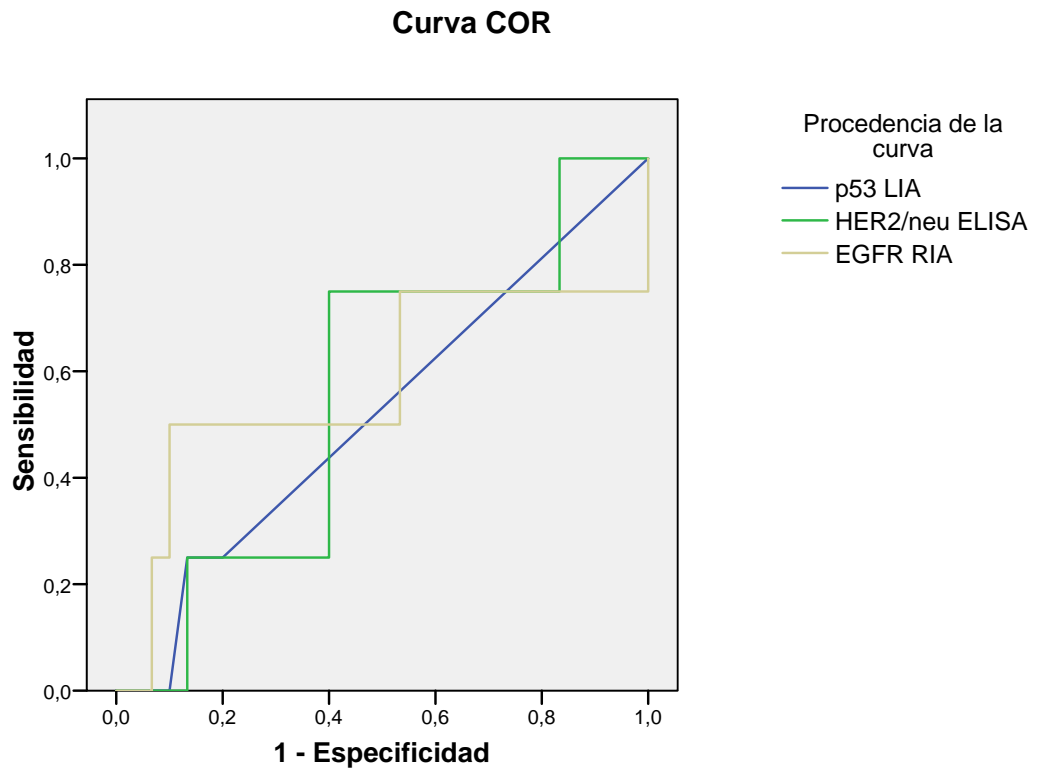


ABC p53 LIA: 0,49

ABC HER2/neu ELISA: 0,52

ABC EGFR RIA: 0,47

Figura 50: Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de progresión de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA. Se especifica el Área Bajo la Curva (ABC) para cada marcador. ABC p53 LIA: 0,53

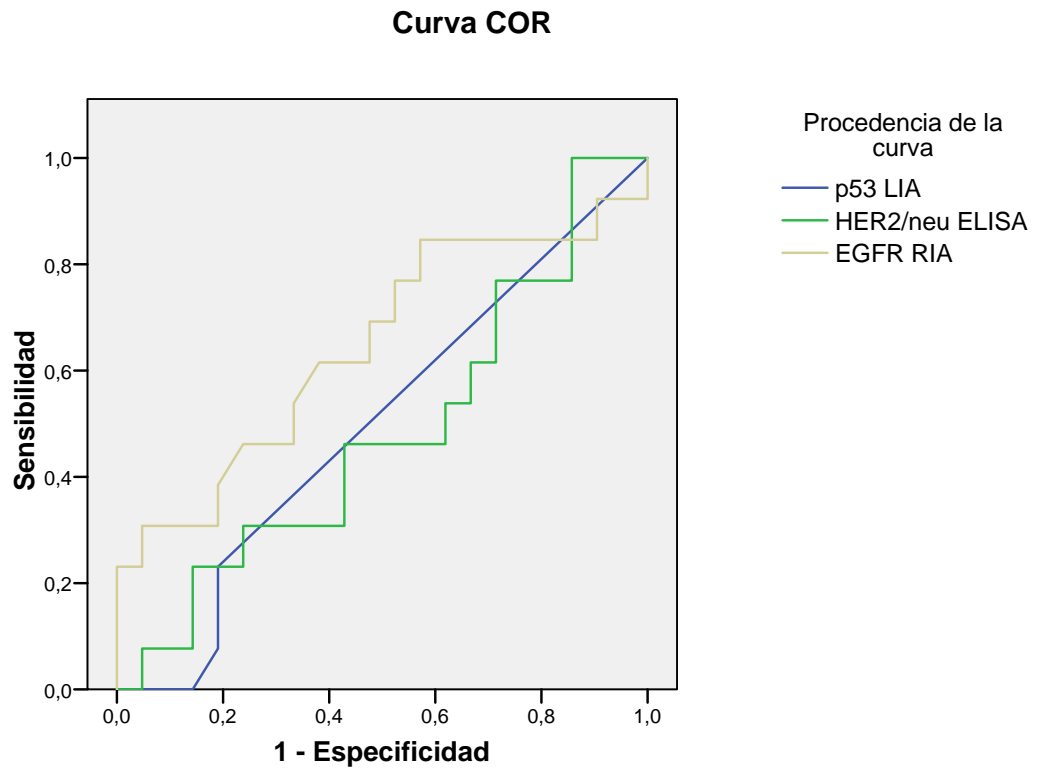


ABC p53 LIA: 0,52

ABC HER2/neu ELISA: 0,56

ABC EGFR RIA: 0,57

Figura 51: Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de metástasis de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA. Se especifica el Área Bajo la Curva (ABC) para cada marcador.



ABC p53 LIA: 0,50

ABC HER2/neu ELISA: 0,48

ABC EGFR RIA: 0,64

Figura 52: Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de muerte de p53 LIA, HER2/neu ELISA y EGFR RIA. Se especifica el Área Bajo la Curva (ABC) para cada marcador.



Tabla XVIII Distribución de tertiles (p33,3) para los diferentes marcadores tumorales (p53, EGFR, HER2/neu).

		TERTILES		
		TERTIL 1	TERTIL 2	TERTIL 3
DETERMINACION	P53 ng/mg	0,00 – 0,00	0,00 – 0,00	0,01 – 4,70
	HER2/neu HNU/mg	76,00 – 708,17	708,18 – 1031,67	1031,68 – 2776,70
	EFGR fmol/mg	0, 00 – 4,37	4,38 – 9,73	9,74 - 42

Tabla XIX: Cálculo de S, E, VPP; VPN, Pre Odds, Post Odss +, Post Odds – y Prev de recidiva, progresión, metástasis y muerte para la agrupación de Tertiles de p53, HER2/neu, y EGFR.



		S	E	VPP	VPN	Pre Odds	Post Odds +	Post Odds -	Prev
RECIDIVA	p53 LIA	0,25	0,72	0,42	0,55	0,8	0,71	0,58	0,44
	HER2neu ELISA (T1 y T2 vs T3)	0,60	0,66	0,55	0,65	0,8	1,2	0,37	0,44
	HER2neu ELISA (T1 vs T2 y T3)	1	0,12	0,48	1	0,8	0,91	0	0,44
	EGFR RIA (T1 y T2 vs T3)	0,50	0,44	0,50	0,44	1,13	1	0,54	0,53
	EGFR RIA (T1 vs T2 y T3)	0,89	0,19	0,55	0,60	1,13	1,24	0,27	0,53
PROGRESIÓN	p53 LIA	0,17	0,72	0,08	0,85	0,15	0,09	1	0,13
	HER2neu ELISA (T1 y T2 vs T3)	0,50	0,51	0,14	0,87	0,15	0,16	0,85	0,13
	HER2neu ELISA (T1 vs T2 y T3)	1	0,08	0,14	1	0,15	0,17	0	0,13
	EGFR RIA (T1 y T2 vs T3)	0,40	0,45	0,11	0,81	0,17	0,13	1,13	0,15
	EGFR RIA (T1 vs T2 y T3)	0,60	0,10	0,10	0,60	0,17	0,12	3,41	0,15
METÁSTASIS	p53 LIA	0,25	0,73	0,08	0,91	0,1	0,09	0,94	0,09
	HER2neu ELISA (T1 y T2 vs T3)	0,50	0,51	0,09	0,91	0,1	0,1	0,89	0,09
	HER2neu ELISA (T1 vs T2 y T3)	1	0,07	0,10	1	0,1	0,11	0	0,09
	EGFR RIA (T1 y T2 vs T3)	0,5	0,47	0,11	0,88	0,13	0,13	0,94	0,12
	EGFR RIA (T1 vs T2 y T3)	0,75	0,13	0,11	0,8	0,13	0,11	1,69	0,12
MUERTE	p53 LIA	0,33	0,78	0,5	0,64	0,67	1	0,52	0,40
	HER2neu ELISA (T1 y T2 vs T3)	0,44	0,48	0,36	0,57	0,67	0,57	0,7	0,4
	HER2neu ELISA (T1 vs T2 y T3)	0,94	0,07	0,4	0,67	0,67	0,67	0,52	0,4
	EGFR RIA (T1 y T2 vs T3)	0,62	0,52	0,44	0,69	0,62	0,80	0,45	0,38
	EGFR RIA (T1 vs T2 y T3)	0,85	0,14	0,38	0,6	0,62	0,61	0,66	0,38



5.4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES CON LOS ANTECEDENTES PERSONALES Y LOS FACTORES DE RIESGO CLÁSICOS.

El análisis de la relación de los diferentes FP moleculares cuando se les cruzó con los distintos antecedentes personales (género, grupo etario, consumo de tabaco, consumo de alcohol, antecedentes familiares y motivo de diagnóstico) mostró una tendencia estadística ($p = 0,095$) a la asociación entre el consumo crónico de tabaco y expresión aumentada de la proteína p53 (tertil 3) medida mediante LIA (Tabla XXIX).

Se evidenció una tendencia estadística ($p = 0,094$) a la asociación entre la ausencia de consumo crónico de tabaco y la expresión aumentada de la proteína EGFR en el estudio de RIA (Tabla XXXI), tendencia que se confirmó ($p < 0,05$) al agrupar los tertiles inferiores (T1 y T2). (Tabla XXXII) También mostró una tendencia estadística ($p = 0,066$) a la asociación entre el consumo crónico de alcohol y la expresión aumentada de la proteína HER2/neu en el estudio de ELISA (Tabla XXXIV), tendencia que se confirmó ($p < 0,05$) al agrupar los tertiles superiores (T2 y T3) (Tabla XXXV).

En el resto de antecedentes personales, no se objetivó ninguna relación estadística con los diferentes marcadores moleculares. Del mismo modo, tampoco se objetivaron relaciones estadísticas entre los FP moleculares y los diferentes factores de riesgo clásico (aspecto tumoral, número de tumores, tamaño tumoral, grado, estadio tumoral, y empleo de tratamiento adyuvante).

El global de las tablas que analizan estas relaciones son las siguientes (Tablas XX a LVI):



		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
GÉNERO	VARÓN	28 84,8%	11 91,7%	39 86,8%	NS
	MUJER	5 15,2%	1 8,3%	6 13,3%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XX: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el género y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
GÉNERO	VARON	3 100%	17 85,0%	19 84,6%	39 86,8%	NS
	MUJER	0 0%	3 15,0%	3 13,6%	6 13,3%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XXI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el género y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
GÉNERO	VARON	5 100%	10 90,9%	13 72,2%	28 86,8%	NS
	MUJER	0 0%	1 9,1%	5 27,8%	6 13,3%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XXII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el género y los diferentes tertiles del EGFR.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
GRUPO ETARIO	≥ 70	16 48,5%	8 66,7%	24 53,3%	NS
	< 70	17 51,5%	4 33,3%	21 46,7%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XXIII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el grupo etario y los diferentes tertiles de la proteína p53.



		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
GRUPO ETARIO	≥ 70	0 0%	13 65%	11 50%	24 53,3%	NS
	< 70	3 100%	7 35,0%	11 50,0%	21 46,7%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XXIV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el grupo etario y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
GRUPO ETARIO	≥ 70	3 60%	6 54,5%	11 61,1%	20 58,8%	NS
	< 70	2 40,0%	5 45,5%	7 38,9%	14 41,2%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XXV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el grupo etario y los diferentes tertiles del EGFR.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
ANT. FAMILIARES	SI	2 6,1%	0 0%	2 4,4%	NS
	NO	31 93,9%	12 100,0%	43 95,6%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XXVI: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre los antecedentes familiares y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
ANT. FAMILIARES	SI	0 0%	1 5,0%	1 4,5%	2 4,4%	NS
	NO	3 100%	19 95,0%	21 95,5%	43 95,6%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XXVII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre los antecedentes familiares y los diferentes tertiles del HER2/neu.



		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
ANT FAMILIARES	SI	0 0%	1 9,1%	1 5,6%	2 5,9%	NS
	NO	5 100%	10 90,9%	17 94,4%	32 94,1%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XXVIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre los antecedentes familiares y los diferentes tertiles del EGFR.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
TABACO	SÍ	22 66,7%	11 33,3%	33 73,3%	p = 0,095
	NO	11 33,3%	1 3,3%	12 26,7%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XXIX: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
TABACO	SÍ	3 100%	14 70,0%	16 72,2%	33 73,3%	NS
	NO	0 0%	6 30,0%	6 27,3%	12 26,7%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XXX: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
TABACO	SÍ	5 100%	9 81,8%	10 55,6%	24 70,6%	NS 0,095
	NO	0 0%	2 18,2%	8 44,4%	10 29,4%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XXXI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles del EGFR.



		TERTILES de EGFR			
		T1-2	T3	Total	
TABACO	SI	14 87,5%	10 55,6%	24 70,6%	P<0,05
	NO	2 12,5%	8 44,4%	10 29,4%	
Total		16 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XXXII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito tabáquico y los diferentes tertiles del EGFR, agrupados T1 y T2.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
ALCOHOL	SI	6 18,2%	3 25,0%	9 20,0%	NS
	NO	27 81,8%	9 75,0%	36 80,0%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XXXIII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
ALCOHOL	SI	1 33,3%	18 90,0%	17 77,3%	36 80,0%	NS 0,066
	NO	2 66,7%	2 10,0%	5 22,7%	9 20,0%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XXXIV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES de HER2/neu AGRUPADOS			
		T1	T2-3	Total	
ALCOHOL	SI	1 33,3%	35 83,3%	36 80,0%	< 0,05
	NO	2 66,7%	7 16,67%	9 20,0%	
Total		3 100%	42 100%	45 100%	

Tabla XXXV: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles del HER2/neu agrupados T2 y T3.



		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
ALCOHOL	SI	4 80,0%	10 90,9%	16 88,9%	30 88,2%	NS
	NO	1 10,0%	1 9,1%	2 11,1%	4 11,8%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XXXVI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el hábito enólico y los diferentes tertiles del EGFR.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
MOTIVO DCO	SINT	3 100%	17 85,0%	20 90,9%	40 88,9%	NS
	INC	0 0%	3 15,0%	2 9,1%	5 11,1%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XXXVII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el motivo de diagnóstico y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
MOTIVO DCO	SINT	5 100%	10 90,9%	11 77,8%	29 85,3%	NS
	INC	0 0%	1 9,1%	4 22,2%	5 14,7%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XXXVIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el motivo de diagnóstico y los diferentes tertiles de EGFR.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
ASPECTO TUMORAL	SUPERF	31 93,9%	10 83,3%	41 91,1%	NS
	INFILTR	2 6,1%	2 16,7%	4 8,9%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XXXIX: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el aspecto tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53.



		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
ASPECTO TUMORAL	SUPERF	2 66,7%	18 90,0%	21 95,5%	41 91,1%	
	INFILTR	1 33,3%	2 10,0%	1 4,52%	4 8,9%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	NS

Tabla XL: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el aspecto tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
ASPECTO TUMORAL	SUPERF	4 80,0%	10 90,9%	17 94,4%	31 91,2%	
	INFILTR	1 20,0%	1 9,1%	1 5,6%	3 8,8%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	NS

Tabla XLI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el aspecto tumoral y los diferentes tertiles de EGFR.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
NÚMERO TUMORES	UNICO	16 48,5%	5 41,7%	21 46,7%	
	MÚLTIP	17 51,5%	7 58,3%	24 53,3%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	NS

XLII: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre la multiplicidad y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
NÚMERO TUMORES	ÚNICO	2 66,7%	7 35,0%	12 54,5%	21 46,7%	
	MULTIP	1 33,3%	13 65,0%	10 45,5%	24 53,3%	
		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	NS

XLIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre la multiplicidad y los diferentes tertiles del HER2/neu.



		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
NÚMERO TUMORES	ÚNICO	2 40,0%	4 36,4%	10 55,6%	16 47,1%	NS
	MULTIP	3 60,0%	7 63,6%	10 55,6%	18 52,9%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XLIV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre la multiplicidad y los diferentes tertiles del EGFR.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	18 54,5%	7 58,3%	25 55,6%	NS
	≥ 3 cm	15 45,5%	5 41,7%	20 44,2%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XLV: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el tamaño tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	1 33,3%	12 60,0%	12 54,5%	25 55,6%	NS
	≥ 3 cm	2 66,7%	8 40,0%	10 45,5%	20 44,4%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XLVI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tamaño tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	2 40,0%	7 63,6%	10 55,6%	19 55,9%	NS
	≥ 3 cm	3 60,0%	4 36,4%	8 44,4%	14 44,1%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla XLVII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tamaño tumoral y los diferentes tertiles de EGFR.



		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
GRADO	G1	11 33,3%	2 16,7%	13 28,9%	NS
	G2	16 48,5%	7 58,3%	23 51,1%	
	G3	6 18,2%	3 25,0%	9 20,0%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla XLVIII: Tabla de 2x3 para valorar asociación entre el grado tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
GRADO	G1	1 33,3%	7 35,0%	5 22,7%	13 28,9%	NS
	G2	1 33,3%	8 40,0%	14 63,6%	23 51,1%	
	G3	1 33,3%	5 25,0%	3 13,6%	9 20,0%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla XLIX: Tabla de 3x3 para valorar asociación entre el grado tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
GRADO	G1	1 20,0%	2 18,2%	6 33,3%	9 26,5%	NS
	G2	3 60,0%	8 72,7%	7 38,9%	18 52,9%	
	G3	1 20,0%	1 9,1%	5 27,8%	7 20,6%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla L: Tabla de 3x3 para valorar asociación entre el grado tumoral y los diferentes tertiles de EGFR.



		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
ESTADIO	Ta	17 51,6%	6 50,0%	23 51,1%	NS
	T1	16 48,5%	6 50,0%	22 48,9%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla LI: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el estadio tumoral y los diferentes tertiles de la proteína p53.

		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
ESTADIO	Ta	1 33,3%	10 50,0%	12 54,5%	23 51,1%	NS
	T1	2 66,7%	10 50,0%	10 45,5%	22 48,9%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla LII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el estadio tumoral y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
ESTADIO	Ta	2 40,0%	5 45,5%	9 50,0%	16 47,1%	NS
	T1	3 60,0%	6 54,5%	9 50,0%	18 52,9%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla LIII: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el estadio tumoral y los diferentes tertiles de EGFR.

		TERTILES de p53			
		T1-2	T3	Total	
TTO ADYUVANTE	SI	31 93,9%	11 91,7%	42 93,3%	NS
	NO	2 6,1%	1 8,3%	3 6,7%	
Total		33 100%	12 100%	45 100%	

Tabla LIV: Tabla de 2x2 para valorar asociación entre el tratamiento adyuvante y los diferentes tertiles de la proteína p53.



		TERTILES DE HER2/neu				
		T1	T2	T3	Total	
TTO ADYUVANTE	SÍ	3 100%	18 90,0%	21 95,5%	42 93,3%	NS
	NO	0 0%	2 10,0%	1 4,5%	3 6,7%	
Total		3 100%	20 100%	22 100%	45 100%	

Tabla LV: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tratamiento adyuvante y los diferentes tertiles del HER2/neu.

		TERTILES DE EGFR				
		T1	T2	T3	Total	
TTO ADYUVANTE	SÍ	5 100%	10 90,9%	16 88,9%	31 91,2%	NS
	NO	0 0%	1 9,1%	2 11,1%	3 8,8%	
Total		5 100%	11 100%	18 100%	34 100%	

Tabla LVI: Tabla de 3x2 para valorar asociación entre el tratamiento adyuvante y los diferentes tertiles del EGFR.



5.5. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Los 45 pacientes que forman parte de esta fase del estudio fueron seguidos por un promedio de 82 meses (mediana 91,13 meses, mínimo 3 meses-máximo 135 meses, DE 46,65 meses).

A lo largo del seguimiento, veinte pacientes (20/45=44,4%) sufrieron alguna recidiva. La densidad de incidencia del evento se calculó a partir del sumatorio del seguimiento en meses, y se expresó en número de pacientes recidivados por cada 100 pacientes y año de seguimiento, alcanzando 6,45 (pacientes recidivados por cada 100 pacientes y año de seguimiento).

El promedio de tiempo a la primera recidiva fue de 20,98 meses (mediana 10,88 meses, min 1 max 82, DE 23,4 meses). Por otra parte, el total de recidivas durante el período de seguimiento fue de 37 (11,9 recidivas por 100 pacientes/año).

De modo similar, seis pacientes (6/45=13,3%) progresaron a enfermedad musculoinfiltrante (densidad de incidencia, 1,93 progresiones por 100 pacientes/año). El tiempo promedio a la progresión fue de 27,36 meses (mediana 17,3 meses, min 1 max 91, DE 33,8 meses). No se produjeron progresiones a partir del 82º mes.

En 4 pacientes (4/45, 8,8%) se detectaron metástasis (densidad de incidencia, 1,3 por 100 pacientes/año). El tiempo promedio a la aparición de las metástasis fue de 69,33 meses (mediana 66,13 meses, min 20, max 125, DE 53,7 meses). No se detectaron metástasis a partir del 125º mes.

Finalmente, dieciocho pacientes (18/45=40%) murieron por todas las causas a lo largo del período de seguimiento (densidad de incidencia, 5,81 muertes por 100 pacientes/año). El tiempo promedio a la muerte fue de 45,27 meses (mediana 48,57 meses, min 3 max 115, DE 34,25 meses). No se produjeron muertes a partir del 106º mes.



5.6. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS DEMOGRÁFICOS Y TUMORALES CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD, LA PROGRESIÓN, EL DESARROLLO DE METÁSTASIS Y LA SUPERVIVENCIA POR TODAS LAS CAUSAS.

En este punto, se procedió a esclarecer la existencia de algún tipo de orden intrínseco en las principales variables mediante tablas de contingencia en las que se examinaron los vínculos de esas variables con el evento. Para facilitar el análisis matemático se crearon dos grupos etarios: menores de 70 años y de edad igual o superior a 70 años. Del mismo modo, se diferenció entre tumores únicos y múltiples, y con respecto al tamaño, los tumores se agruparon en < 3 cm y ≥ 3 cm.

En cuanto a los factores histológicos, se detectó una clara tendencia ($p=0,068$) a la recidiva en los pacientes con los tumores de grados más indiferenciados (Tabla LXII).

Se detectó una clara tendencia ($\chi^2=0,096$) a la progresión entre los pacientes con tumores infiltrantes de la capa submucosa de la vejiga (T1) cuando se compararon con los pacientes con tumores superficiales (Ta) (Tabla LXXIV).

Únicamente el tamaño tumoral tuvo efecto sobre el tiempo libre de metástasis, de manera que la proporción de pacientes con tumores de tamaño igual o superior a tres centímetros que desarrollaron metástasis a lo largo de su seguimiento (20%) fue significativamente superior ($\chi^2<0,05$) a la de pacientes con tumores de pequeño tamaño (< 3 cm) que sufrió esa evolución (no se detectó enfermedad metastásica en este grupo de pacientes) (Tabla LXXXIII).

Como era previsible, los pacientes de mayor edad (≥ 70) se encontraron significativamente más expuestos al riesgo de morir por cualquier causa que los más jóvenes ($\chi^2<0,01$) (Tabla XCI). De igual modo, los pacientes con tumores infiltrantes de la capa submucosa de la vejiga (T1) se



encontraron expuestos a un riesgo de muerte significativamente superior ($\chi^2=0,05$) al de los pacientes con tumores limitados a la capa mucosa de la vejiga (estadio Ta) (Tabla XCVI).

El resto de FP analizados, no parecieron tener un efecto significativo sobre la SLE, SLP, SLM y SG

El global de las tablas que analizan estas relaciones son las siguientes (Tablas LVII a C):



		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
GENERO	VARÓN	16	23	39	NS
	MUJER	4	2	6	
Total		20	25	45	

Tabla LVII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del género.

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
GRUPO ETARIO	≥ 70	12	12	24	NS
	< 70	8	13	21	
Total		20	25	45	

Tabla LVIII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del grupo etario.

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
ASPECTO TUMORAL	INFILTR	1	3	4	NS
	SUPERF	19	22	41	
Total		20	25	45	

Tabla LIX: Análisis univariante. Número de recidivas en función del aspecto tumoral.

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
NUMERO TUMORES	MULTIP	8	16	24	NS
	ÚNICO	12	9	25	
Total		20	25	45	

Tabla LX: Análisis univariante. Número de recidivas en función del número de tumores.



		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
TAMAÑO TUMORAL	≥ 3 cm	7	13	20	NS
	< 3 cm	13	12	25	
Total		20	25	45	

Tabla LXI: Análisis univariante. Número de recidivas en función del tamaño tumoral.

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
GRADO DE DIFERENC	G3	3	6	9	P=0,068
	G2	14	9	23	
	G1	3	10	13	
Total		20	25	45	

Tabla LXII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del grado de diferenciación celular.

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
ESTADIO	T1	10	12	22	NS
	Ta	10	13	23	
Total		20	25	45	

Tabla LXIII: Análisis univariante. Número de recidivas en función del estadio tumoral.

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
TTO ADYUVANTE	NO	1	2	3	NS
	SÍ	19	23	42	
Total		20	25	45	

Tabla LXIV: Análisis univariante. Número de recidivas en función del empleo de tratamiento adyuvante.



		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
p53	T3	5	7	12	NS
	T1-2	15	18	33	
Total		20	25	45	

Tabla LXV: Análisis univariante. Número de recidivas en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles).

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
HER2/neu	T3	12	10	22	NS
	T2	8	12	20	
	T1	0	3	3	
Total		20	25	45	

Tabla LXVI: Análisis univariante. Número de recidivas en función de los niveles de HER2/neu ELISA (Tertiles).

		RECIDIVA			p
		SI	NO	Total	
EGFR	T3	9	9	18	NS
	T2	7	4	11	
	T1	2	3	5	
Total		18	16	34	

Tabla LXVII: Análisis univariante. Número de recidivas en función de los niveles de EGFR RIA (Tertiles).



		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
GENERO	VARÓN	5	34	39	NS
	MUJER	1	5	6	
Total		6	39	45	

Tabla LXVIII: Análisis univariante. Número de progresiones en función del género.

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
GRUPO ETARIO	≥ 70	5	19	6	NS
	< 70	1	20	39	
Total		6	39	45	

Tabla LXIX.: Análisis univariante. Número de progresiones en función del grupo etario.

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
ASPECTO TUMORAL	INFILTR	1	3	4	NS
	SUPERF	5	36	41	
Total		6	39	45	

Tabla LXX: Análisis univariante. Número de progresiones en función del aspecto tumoral.

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
NUMERO TUMORES	MULTIP	2	22	24	NS
	ÚNICO	4	17	21	
Total		6	39	45	

Tabla LXXI: Análisis univariante. Número de progresiones en función del número de tumores.



		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
TAMAÑO TUMORAL	≥ 3 cm	4	16	20	NS
	< 3 cm	2	23	25	
Total		6	39	45	

Tabla LXXII: Análisis univariante. Número de progresiones en función del tamaño tumoral,

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
GRADO DE DIFERENC	G3	1	8	9	NS
	G2	5	18	23	
	G1	0	13	13	
Total		6	39	45	

Tabla LXXIII: Análisis univariante. Número de progresiones en función del grado de diferenciación celular.

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
ESTADIO	T1	5	17	22	P=0.096
	Ta	1	22	23	
Total		6	39	45	

Tabla LXXIV: Análisis univariante. Número de progresiones en función del estadio tumoral.

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
TTO ADYUVANTE	NO	0	3	3	NS
	SÍ	6	36	39	
Total		6	39	45	

Tabla LXXV: Análisis univariante. Número de progresiones en función del empleo de tratamiento adyuvante.



		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
p53	T3	1	11	12	NS
	T1-2	5	28	33	
Total		6	39	45	

Tabla LXXVI: Análisis univariante. Número de progresiones en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles).

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
HER2/neu	T3	3	19	22	NS
	T2	3	17	20	
	T1	0	3	3	
Total		6	39	45	

Tabla LXXVII: Análisis univariante. Número de progresiones en función de los niveles de HER2/neu ELISA (Tertiles).

		PROGRESIÓN			p
		SI	NO	Total	
EGFR	T3	2	16	18	NS
	T2	1	10	11	
	T1	2	3	5	
Total		5	29	34	

Tabla LXXVIII: Análisis univariante. Número de progresiones en función de los niveles de EGFR RIA (Tertiles).



		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
GENERO	VARÓN	3	36	39	NS
	MUJER	1	5	6	
Total		4	41	45	

Tabla LXXIX: Análisis univariante. Número de metástasis en función del género.

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
GRUPO ETARIO	≥ 70	3	21	24	NS
	< 70	1	20	41	
Total		4	41	45	

Tabla LXXX: Análisis univariante. Número de metástasis en función del grupo etario.

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
ASPECTO TUMORAL	INFILTR	1	3	4	NS
	SUPERF	3	38	41	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXI: Análisis univariante. Número de metástasis en función del aspecto tumoral:

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
NUMERO TUMORES	MULTIP	1	23	24	NS
	ÚNICO	3	18	21	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXII: Análisis univariante. Número de metástasis en función del número de tumores



		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
TAMAÑO TUMORAL	≥ 3 cm	4	16	20	P<0,05
	< 3 cm	0	25	25	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXIII: Análisis univariante. Número de metástasis en función del tamaño tumoral.

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
GRADO DE DIFERENC	G3	1	8	9	NS
	G2	3	20	23	
	G1	0	13	13	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXIV: Análisis univariante. Número de metástasis en función del grado de diferenciación celular.

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
ESTADIO	T1	3	19	22	NS
	Ta	1	22	23	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXV: Análisis univariante. Número de metástasis en función del estadio tumoral.

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
TTO ADYUVANTE	NO	0	3	3	NS
	SÍ	4	38	42	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXVI: Análisis univariante. Número de metástasis en función del empleo de tratamiento adyuvante.



		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
p53	T3	1	11	12	NS
	T1-2	3	30	33	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXVII: Análisis univariante. Número de metástasis en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles).

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
HER2/neu	T3	2	20	22	NS
	T2	2	18	20	
	T1	0	3	3	
Total		4	41	45	

Tabla LXXXVIII: Análisis univariante. Número de metástasis en función de los niveles de de HER2/neu ELISA (Tertiles).

		METÁSTASIS			p
		SI	NO	Total	
EGFR	T3	2	16	18	NS
	T2	1	10	11	
	T1	1	4	5	
Total		4	30	34	

Tabla LXXXIX: Análisis univariante. Número de metástasis en función de los niveles de EGFR RIA (Tertiles).



		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
GENERO	VARÓN	15	24	39	NS
	MUJER	3	3	6	
Total		18	27	45	

Tabla XC: Análisis univariante. Número de muertes en función del género.

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
GRUPO ETARIO	≥ 70	14	10	24	P<0,01
	< 70	4	17	21	
Total		18	27	45	

Tabla XCI: Análisis univariante. Número de muertes en función del grupo etario.

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
ASPECTO TUMORAL	INFILTR	1	3	4	NS
	SUPERF	17	24	41	
Total		18	27	45	

Tabla XCII: Análisis univariante. Número de muertes en función del aspecto tumoral.

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
NUMERO TUMORES	MULTIP	8	16	24	NS
	ÚNICO	10	11	21	
Total		18	27	45	

Tabla XCIII: Análisis univariante. Número de muertes en función del número de tumores.



		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
TAMAÑO TUMORAL	≥ 3 cm	10	10	20	NS
	< 3 cm	8	17	25	
Total		18	27	45	

Tabla XCIV: Análisis univariante. Número de muertes en función del tamaño tumoral.

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
GRADO DE DIFERENC	G3	4	5	9	NS
	G2	10	13	23	
	G1	4	9	13	
Total		18	27	45	

Tabla XCV: Análisis univariante. Número de muertes en función del grado de diferenciación celular.

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
ESTADIO	T1	12	10	2	P=0,05
	Ta	6	17	25	
Total		18	27	45	

Tabla XCVI: Análisis univariante. Número de muertes en función del estadio tumoral.

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
TTO ADYUVANTE	NO	3	0	3	NS
	SÍ	15	27	42	
Total		18	27	45	

Tabla XCVII: Análisis univariante. Número de muertes en función del empleo de tratamiento adyuvante.



		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
p53	T3	6	6	12	NS
	T1-2	12	21	33	
Total		18	27	45	

Tabla XCVIII: Análisis univariante. Número de muertes en función de los niveles de p53 LIA (Tertiles).

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
HER2/neu	T3	8	14	22	NS
	T2	9	11	20	
	T1	1	2	3	
Total		18	27	45	

Tabla XCIX: Análisis univariante. Número de muertes en función de los niveles de HER2/neu ELISA. (Tertiles).

		MUERTE			p
		SI	NO	Total	
EGFR	T3	8	10	18	NS
	T2	3	8	11	
	T1	2	3	5	
Total		13	21	34	

Tabla C: Análisis univariante. Número de muertes en función los niveles de EGFR RIA (Tertiles).



5.7. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.

En este punto, se procedió al análisis de supervivencia.

A. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE).

Se observó una clara tendencia hacia recidivas más precoces -y proporcionalmente más habituales- entre las mujeres. Es un hecho a destacar las diferencias en el perfil de riesgo para ambos sexos: todas las recaídas que se produjeron entre las mujeres tuvieron lugar en los primeros 20 meses, en tanto que los varones se encontraron expuestos al riesgo de recidiva por un espacio de tiempo muy superior.

La consideración de la edad tampoco aportó valor pronóstico al análisis: no se detectaron diferencias de significación estadística (LR=2,70 p=0,10; 1 GL) en la SLE entre los pacientes de edad igual o inferior a 70 años, y los de mayor edad (≥ 70 años); no obstante, resultó muy evidente la tendencia hacia la mayor recidiva entre estos últimos.

Sorprendentemente, los tumores de aspecto más agresivo exhibieron un comportamiento más indolente, lo que resalta el escaso valor pronóstico de la consideración de extremos profundamente subjetivos como el aspecto tumoral. Por el contrario, se detectó una clara -aunque no significativa- (LR=0,38 p=0,09; 1 GL) tendencia hacia recidivas más precoces entre los pacientes con tumores únicos. Otro de los factores subjetivos considerados, el tamaño tumoral, tampoco constituyó un factor pronóstico (LR=1,49 p=0,41; 1 GL) a la hora de predecir un comportamiento más desfavorable (esto es, una tendencia superior a recidivas más precoces), lo que subraya la escasa capacidad predictiva de los rasgos dependientes de la consideración subjetiva.



La consideración de los factores moleculares no resultó de utilidad en la valoración del riesgo de recidiva; ni la valoración de los niveles de p53 (LR=0,0 p=0,98; 1 GL), ni la titulación del nivel de HER2/neu (LR=2,59 p=0,28; 2 GL) o de EGFR (LR=1,85 p=0,76; 2 GL) permitieron delimitar algún grupo particularmente expuesto a la recidiva.

Las tablas CI-CXII y las Figuras 53-64 recogen los principales aspectos de esta fase del estudio. La Tabla CXIII representa la función de riesgo acumulada para la recidiva, comparando los períodos bajo análisis. La Tabla CXIV expone la probabilidad acumulada de recidiva en función de cada una de las variables predictivas, estimada mediante el método KM y el test LR.

El análisis multivariante confirmó algunas de las tendencias detectadas en el análisis univariante, y reveló que el género constituyó un factor de riesgo independiente para la recidiva tumoral; así, las mujeres se encontraron expuestas a un riesgo de recidivar 3,99 veces (razón de riesgo ajustada 3,99, IC 95% 1,08-14,66, p=0,037) superior al de los hombres.

Con respecto a los marcadores moleculares analizados, ni ellos ni el resto de variables demográficas, tumorales e histológicas, parecieron ejercer efecto independiente alguno sobre el riesgo de recidivar.

Función de supervivencia

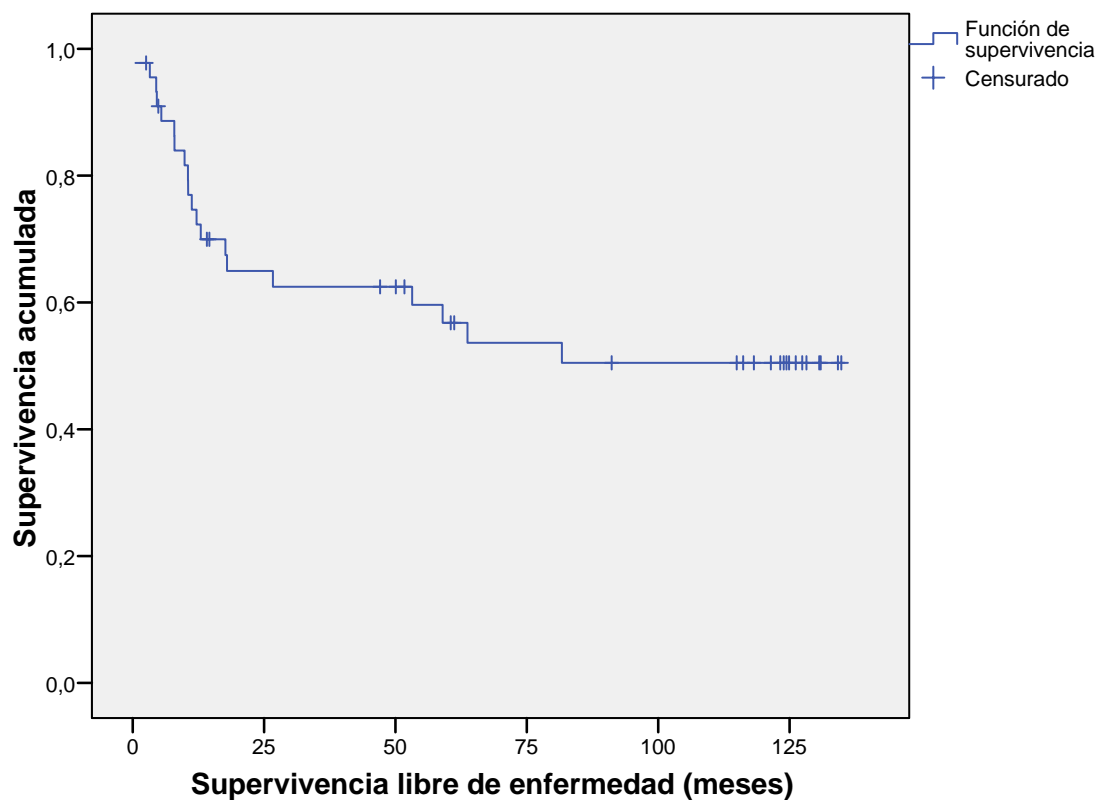


Figura 53: Curva de Kaplan-Meyer para la SLE global.

Tabla C1: Tabla de vida para la SLE global. En la primera fila se detalla el número de individuos que alcanzan el final del periodo sin desarrollar el evento (SLE) y en la segunda fila se expresa en porcentaje sobre el total de enfermos que alcanza ese periodo de seguimiento.

SLE	INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
	0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
INDIVIDUOS	26	25	20	18	15	12	
SUPERV ACUMULADA	64,97%	62,67%	59,63%	53,64%	50,48%	50,48%	

Funciones de supervivencia

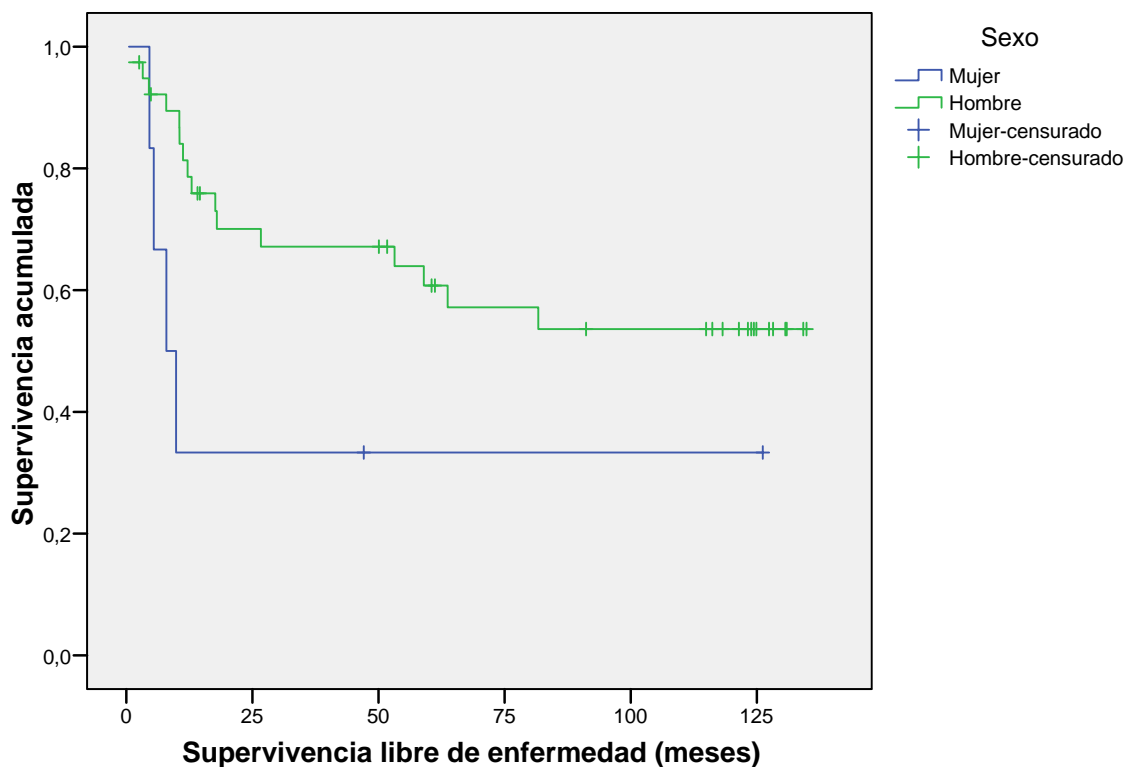


Figura 54: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del género.

Tabla CII: Tabla de vida para la SLE en función del género. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

SEXO		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Varones	EXPUESTOS AL RIESGO	37	23	22	18	16	14	11
	SUCESOS	4	0	2	2	1	3	11
Mujeres	EXPUESTOS AL RIESGO	6	2	2	1	1	1	1
	SUCESOS	0	0	1	0	0	0	1

Funciones de supervivencia

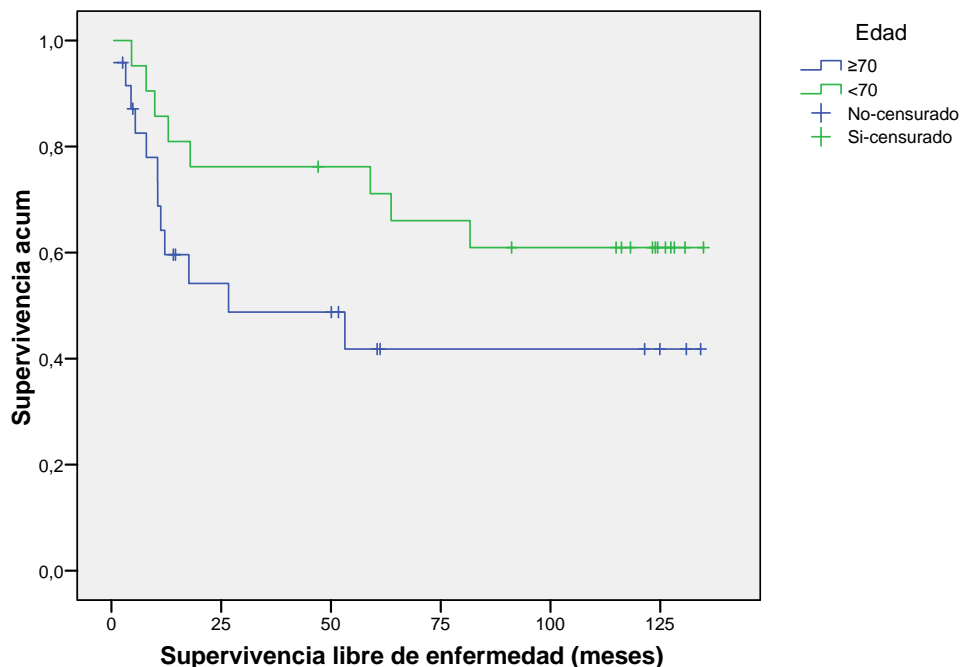


Figura 55: Curva de Kaplan-Meyer para la SLE en función de la edad.

Tabla CIII: Tabla de vida para la SLE en función de la edad. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

EDAD		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
≥ 70	EXPUESTOS AL RIESGO	23	10	9	6	4	4	4
	SUCESOS	4	0	2	2	0	0	4
< 70	EXPUESTOS AL RIESGO	20	15	15	13	13	11	8
	SUCESOS	0	0	1	0	1	3	8

Funciones de supervivencia

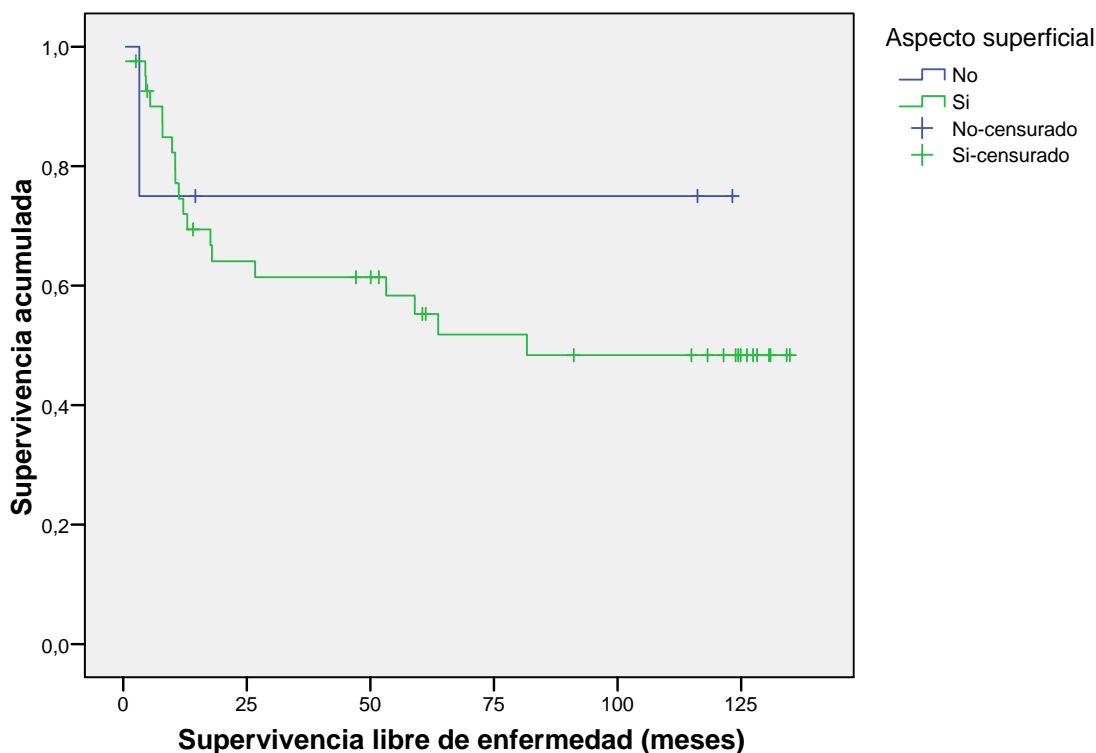


Figura 56: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del aspecto tumoral.

Tabla CIV: Tabla de vida para la SLE en función del aspecto tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ASPECTO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
SUPERFICIAL	EXPUESTOS AL RIESGO	39	23	22	17	15	13	11
	SUCESOS	3	0	3	2	1	2	11
INFILTRANTE	EXPUESTOS AL RIESGO	4	2	2	2	2	2	1
	SUCESOS	1	0	0	0	0	1	1

Funciones de supervivencia

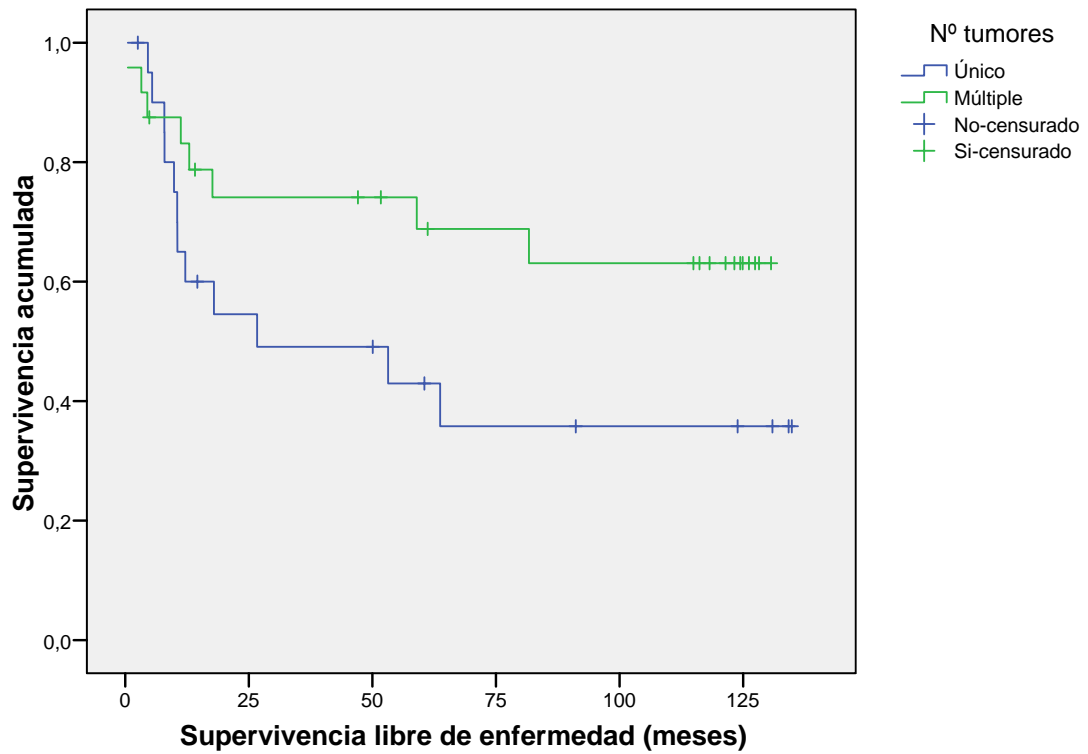


Figura 57: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del número de tumores.

Tabla CV: Tabla de vida para la SLE en función del número de tumores. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

NUMERO DE TUMORES		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
UNICO	EXPUESTOS AL RIESGO	23	16	16	13	12	11	8
	SUCESOS	2	0	2	1	0	3	8
MÚLTIPLE	EXPUESTOS AL RIESGO	20	9	8	6	5	4	4
	SUCESOS	2	0	1	1	1	0	4

Funciones de supervivencia

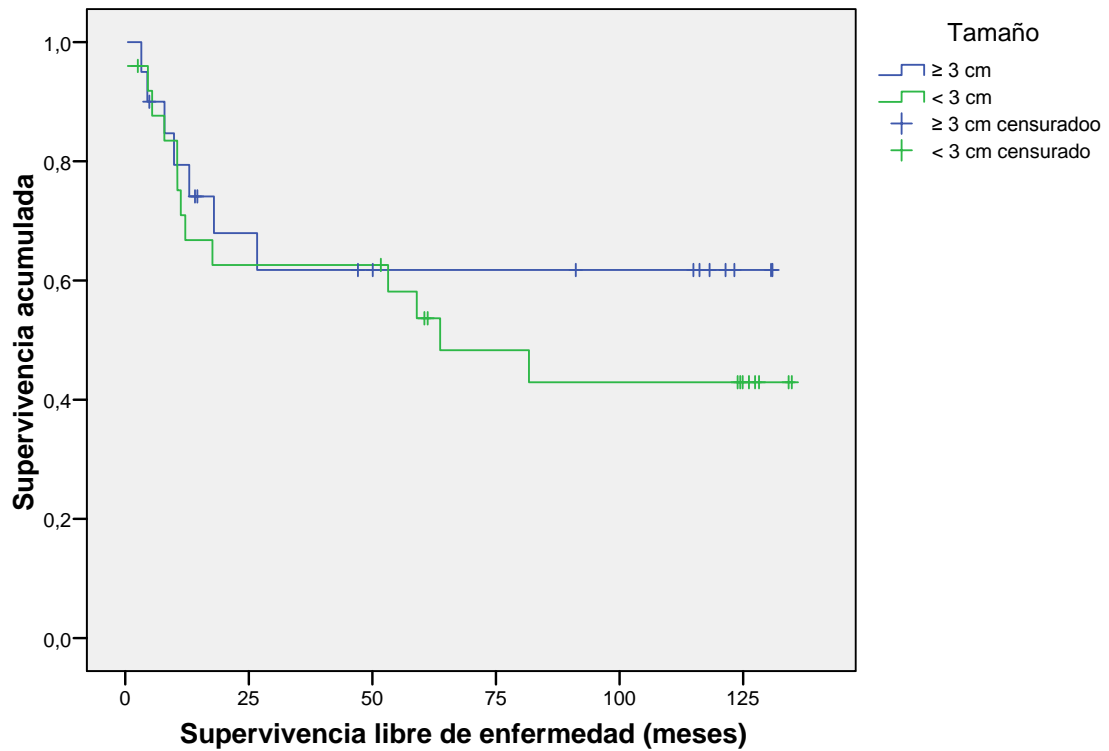


Figura 58: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tamaño tumoral.

Tabla CVI: Tabla de vida para la SLE en función del tamaño tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TAMAÑO		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
< 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	23	14	14	11	9	8	8
	SUCESOS	1	0	1	2	0	0	8
≥ 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	20	11	10	8	8	7	4
	SUCESOS	3	0	2	0	1	3	4

Funciones de supervivencia

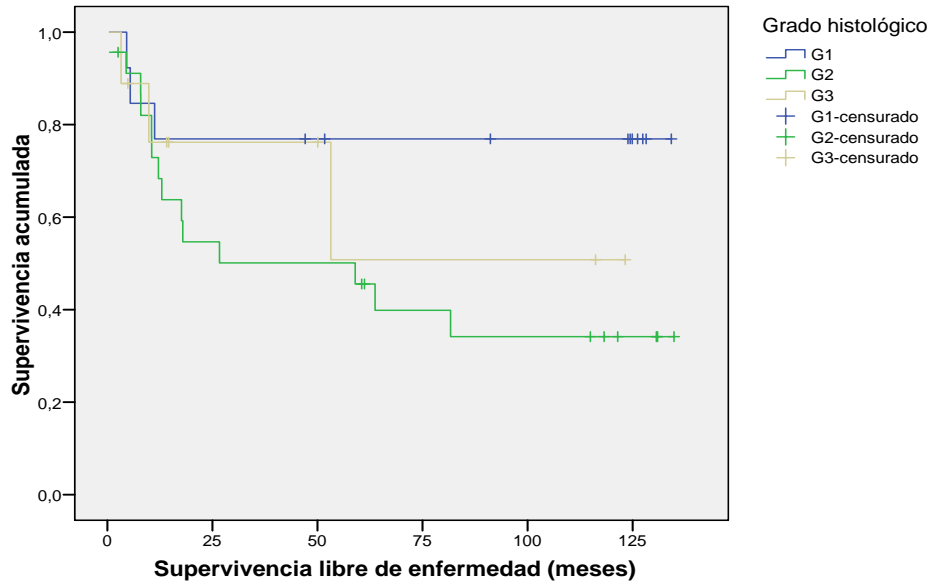


Figura 59: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del grado de diferenciación.

Tabla CVII: Tabla de vida para la SLE en función del grado de diferenciación. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

GRADO DE DIFERENCIACION		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
G1	EXPUESTOS AL RIESGO	13	10	10	8	8	7	7
	SUCESOS	0	0	2	0	1	0	7
G2	EXPUESTOS AL RIESGO	21	11	10	9	7	6	4
	SUCESOS	1	0	0	2	0	2	4
G3	EXPUESTOS AL RIESGO	9	4	4	2	2	2	1
	SUCESOS	3	0	1	0	0	1	1

Funciones de supervivencia

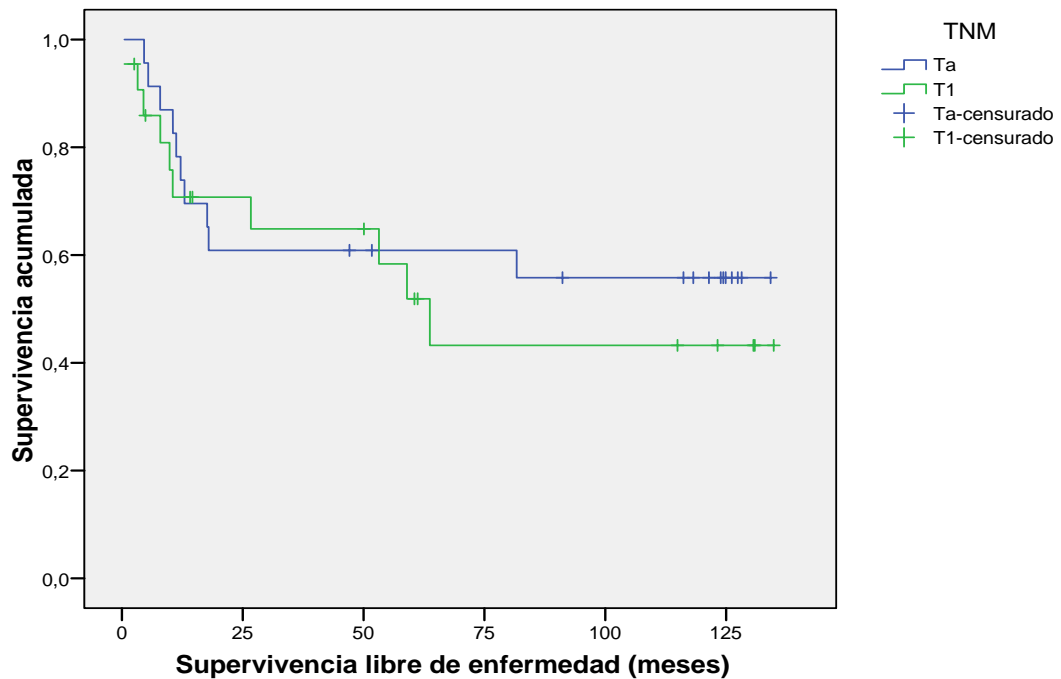


Figura 60: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del estadio tumoral.

Tabla CVIII: Tabla de vida para la SLE en función del estadio tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ESTADIO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Ta	EXPUESTOS AL RIESGO	27	17	17	14	13	11	9
	SUCESOS	0	0	2	1	1	2	9
T1	EXPUESTOS AL RIESGO	16	8	7	5	4	4	3
	SUCESOS	4	0	1	1	0	1	3

Funciones de supervivencia

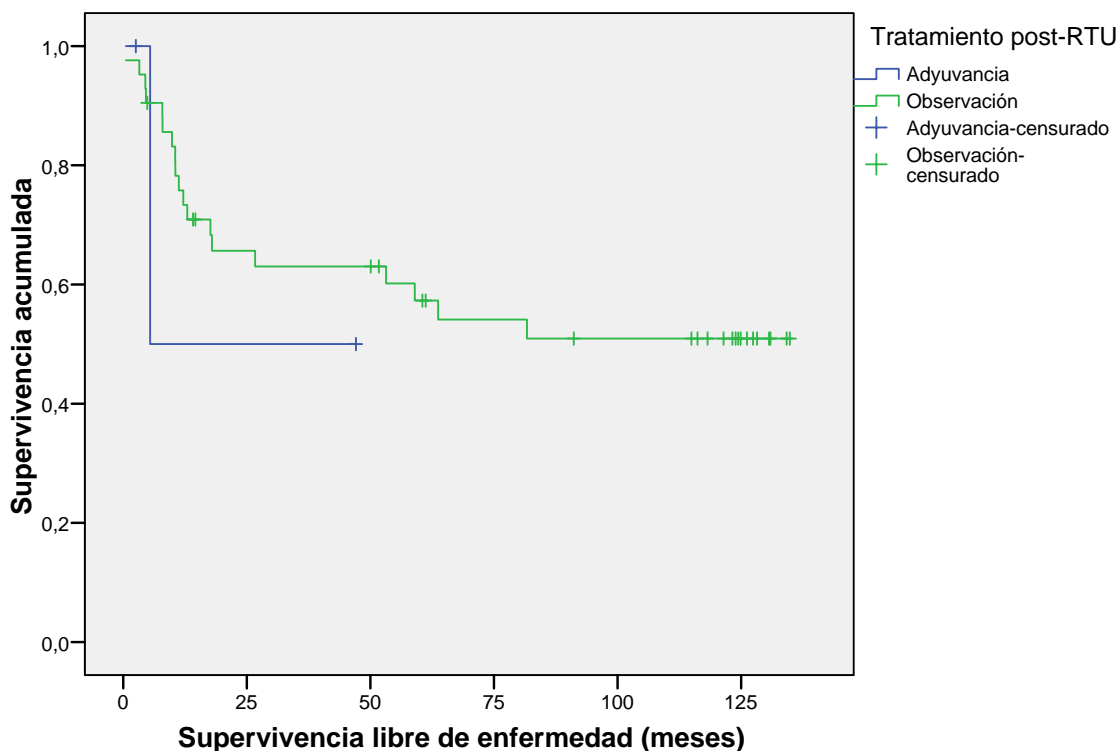


Figura 61: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del empleo de tratamiento adyuvante.

Tabla CIX: Tabla de vida para la SLE en función del empleo de tratamiento adyuvante. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TRATAMIENTO ADYUVANTE		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
ADYUVANCIA	EXPUESTOS AL RIESGO	40	24	23	19	17	15	12
	SUCESOS	3	0	2	2	1	3	12
OBSERVACION	EXPUESTOS AL RIESGO	3	1	1	-	-	-	-
	SUCESOS	1	0	1	-	-	-	-

Funciones de supervivencia

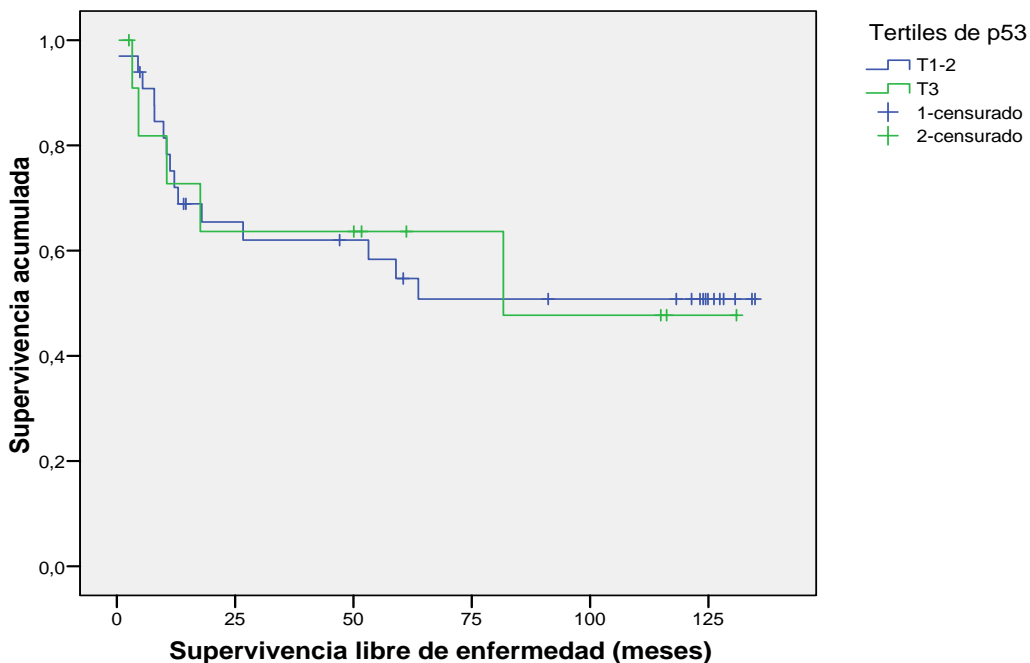


Figura 62: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tertil de p53 LIA.

Tabla CX: Tabla de vida para la SLE en función del tertil de p53 LIA. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE p53 LIA		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1-2	EXPUESTOS AL RIESGO	32	18	17	14	13	12	11
	SUCESOS	3	0	1	1	1	1	11
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	11	7	7	5	4	3	1
	SUCESOS	1	0	2	1	0	2	1

Funciones de supervivencia

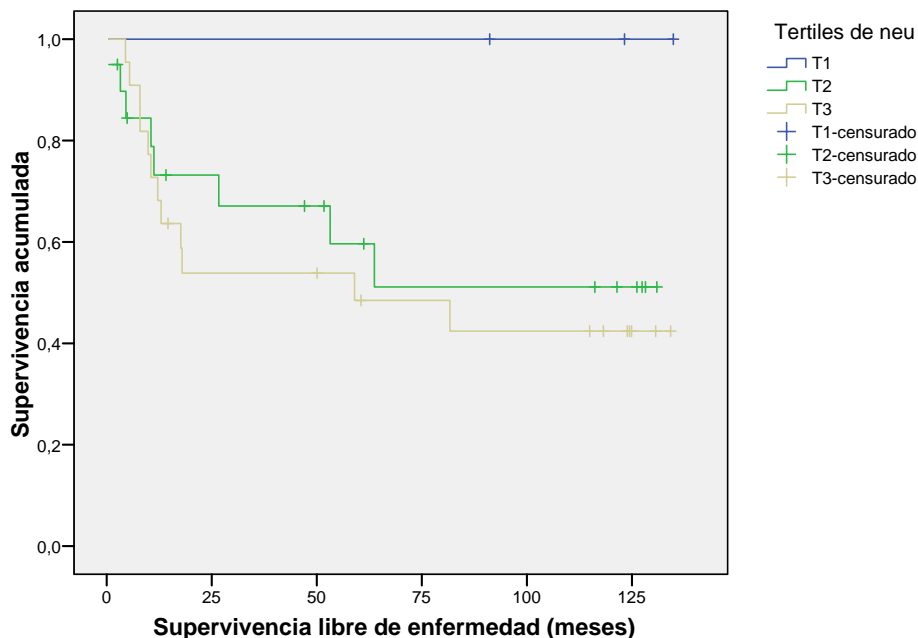


Figura 63: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tercil de HER2/neu.

Tabla CXI: Tabla de vida para la SLE en función del tercil de HER2/neu. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE HER2/neu		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	3	3	3	3	3	2	2
	SUCESOS	0	0	0	0	1	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	19	11	10	7	6	6	5
	SUCESOS	3	0	2	1	0	1	5
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	21	11	11	9	8	7	5
	SUCESOS	1	0	1	1	0	2	5

Funciones de supervivencia

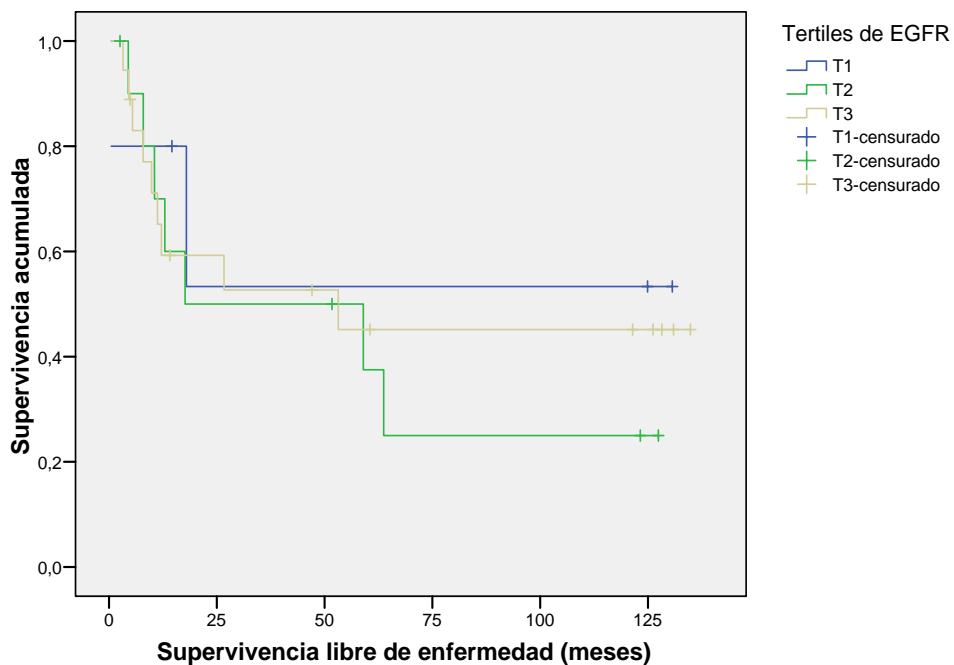


Figura 64: Curva de Kaplan-Meier para la SLE en función del tertil de EGFR.

Tabla CXII: Tabla de vida para la SLE en función del tertil de EGFR. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (recidiva) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE EGFR		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	5	2	2	2	2	2	2
	SUCESOS	1	0	0	0	0	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	9	4	4	2	2	2	2
	SUCESOS	1	0	1	0	0	0	2
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	18	9	8	6	5	5	5
	SUCESOS	2	0	1	1	0	0	5



Tabla CXIII: Tabla de vida para la SLE: La mediana de tiempo al suceso señala el tiempo en el que la mitad de los individuos han sufrido el suceso y las columnas de los meses, el % de individuos que habiendo alcanzado este tiempo de seguimiento, han desarrollado el suceso. NA; no alcanzada.

VARIABLE EXPLICATIVA		SUPERVIVENCIA LIBRE de ENFERMEDAD (% DE)						
		MEDIANA (meses)	20 meses	40 meses	60 meses	80 meses	100 meses	120 meses
GENERO	Varones	NA	70,07%	67,15%	60,57%	57,18%	53,60%	53,60%
	Mujeres	8	33,33%	33,33%	33,33%	33,33%	33,33%	33,33%
EDAD	≥ 70	27	54,19%	48,77%	41,80%	41,80%	41,80%	41,80%
	< 70	NA	76,19%	76,19%	71,11%	66,03%	60,95%	60,95%
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	82	64,08%	61,41%	55,27%	51,81%	48,36%	48,36%
	INFILTRANTE	NA	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%
NUMERO DE TUMORES	UNICO	NA	74,12%	74,12%	68,82%	68,82%	63,09%	63,09%
	MULTIPLE	27	54,55%	49,09%	42,95%	35,80%	35,80%	35,80%
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	64	62,61%	62,61%	53,66%	48,30%	42,93%	42,93%
	≥ 3 cm	NA	67,94%	61,76%	61,76%	61,76%	61,76%	61,76%
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	NA	76,92%	76,92%	76,92%	76,92%	76,92%	76,92%
	G2	59	54,66%	50,10%	45,55%	39,86%	34,16%	34,16%
	G3	NA	76,19%	76,19%	50,79%	50,79%	50,79%	50,79%
ESTADIO TUMORAL	Ta	NA	60,87%	60,87%	60,87%	55,80%	55,80%	55,80%
	T1	64	70,75%	64,85%	51,88%	43,24%	43,24%	43,24%
TRATAMIENTO ADYUVANTE	OBSERVACION	5	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%
	ADYUVANCIA	NA	65,66%	63,03%	57,30%	54,12%	50,94%	50,94%
TERTILES p53 LIA	T 1-2	NA	65,44%	62,00%	54,71%	50,80%	50,80%	50,80%
	T 3	82	63,44%	63,44%	63,44%	63,44%	63,44%	63,44%
TERTILES HER2/neu	T1	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	T2	NA	73,19%	67,07%	59,63%	51,11%	51,11%	51,11%
	T3	59	53,85%	53,85%	48,46%	48,46%	44,20%	44,20%
TERTILES EGFR	T1	NA	53,33%	53,33%	53,33%	53,33%	53,33%	53,33%
	T2	18	50,00%	50,00%	37,50%	25,00%	25,00%	25,00%
	T3	53	59,26%	52,67%	45,15%	45,15%	45,15%	45,15%



Tabla CXIV: SLE en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de LR. En la primera columna aparecen las variables predictoras del evento RECIDIVA. En cada variable, la primera de las categorías actúa como referencia. Los valores proceden de comparar cada categoría con su categoría de referencia. RRC: razón de riesgo cruda. IC 95%: intervalo de confianza para el 95% de las observaciones. LR: Log Rank.

FACTORES PRONOSTICOS PARA LA RECIDIVA		RRC	IC 95%	p	LR	p
GENERO	Varones	1	-	-	1	-
	Mujeres	2,71	0,83-8,26	0,078	3,35	0,067
EDAD	<70	1	-	-	1	-
	≥ 70	2,12	0,56-5,36	0,10	2,70	0,10
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	1	-	-	1	-
	INFILTRANTE	1,81	0,24-13,51	0,56	1,78	0,56
NUMERO DE TUMORES	UNICO	1	-	-	1	-
	MULTIPLE	0,47	0,19-1,15	0,098	0,35	0,09
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	1	-	-	1	-
	≥ 3 cm	1,47	0,58-3,68	0,41	1,49	0,41
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	1	-	-	1	-
	G2	3,2	0,92-11,3	0,06	3,94	0,14
	G3	2,04	0,41-10,19	0,38		
ESTADIO TUMORAL	Ta	1	-	-	1	-
	T1	1,32	0,54-3,18	0,53	1,69	0,54
TRATAMIENTO ADYUVANTE	ADYUVANCIA	1	-	-	1	-
	OBSERVACION	1,7	0,22-12,94	0,6	3,7	0,64
TERTILES p53 LIA	T 1-2	1	-	-	1	-
	T 3	1,007	0,38-2,77	0,99	0,0	0,98
TERTILES HER2/neu	T1	1	-	-	1	-
	T2	23313,40	0-8,9e096	0,93	2,59	0,28
	T3	29791,71	0- 1,1e097	0,92		
TERTILES EGFR	T1	1	-	-	1	-
	T2	1,73	0,35-8,34	0,49	1,85	0,76
	T3	1,36	0,29-6,31	0,69		



B. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP).

En relación a la SLP, la edad presentó efecto pronóstico (LR=4,30 p=0,038, 1 GL) progresando en mayor medida los pacientes con edad ≥ 70 años. El estudio de las curvas de KM también reveló una clara tendencia hacia progresiones más precoces entre los pacientes de mayor edad cercana a la significación (p=0,072).

Con respecto a los factores endoscópicos, las curvas de KM sugirieron un efecto penalizador del aspecto infiltrante, de los tumores múltiples y de los tumores de tamaño igual o superior a 3 centímetros respectivamente que no se llegó a demostrar.

Cuando se consideraron los factores histológicos, el estadístico LR sólo identificó diferencias significativas en lo referente al estadio tumoral (LR=4,45 p=0,034): los pacientes con tumores con extensión a la capa submucosa de la vejiga (estadio T1) se encontraron expuestos a sufrir progresión de la enfermedad con mayor frecuencia que los afectados por enfermedad no invasiva.

La valoración de los niveles de p53 no aportó valor al análisis del riesgo (entendido como probabilidad) de progresión (LR=0,20 p=0,65, 1 GL), como tampoco lo hizo el estudio de los niveles de HER2/neu (LR=1,49 p =0,72; 2 GL) o de EGFR (LR=2,64 p=0,27; 2 GL).

Las Tablas CXV-CXXIV y las Figuras 65-76 recogen los detalles de esta fase del estudio. La Tabla CXXV representa la función de riesgo acumulada para la progresión, comparando los períodos bajo análisis. La Tabla CXXVI expone la probabilidad acumulada de progresión en función de cada una de las variable predictivas, estimada mediante el método de KM y el test LR.

De modo similar, el análisis multivariante no pudo confirmar las tendencias detectadas durante el análisis univariante, de manera que la consideración del efecto de unas variables en presencia del resto de covariables no permitió identificar variable predictiva independiente alguna.

Función de supervivencia

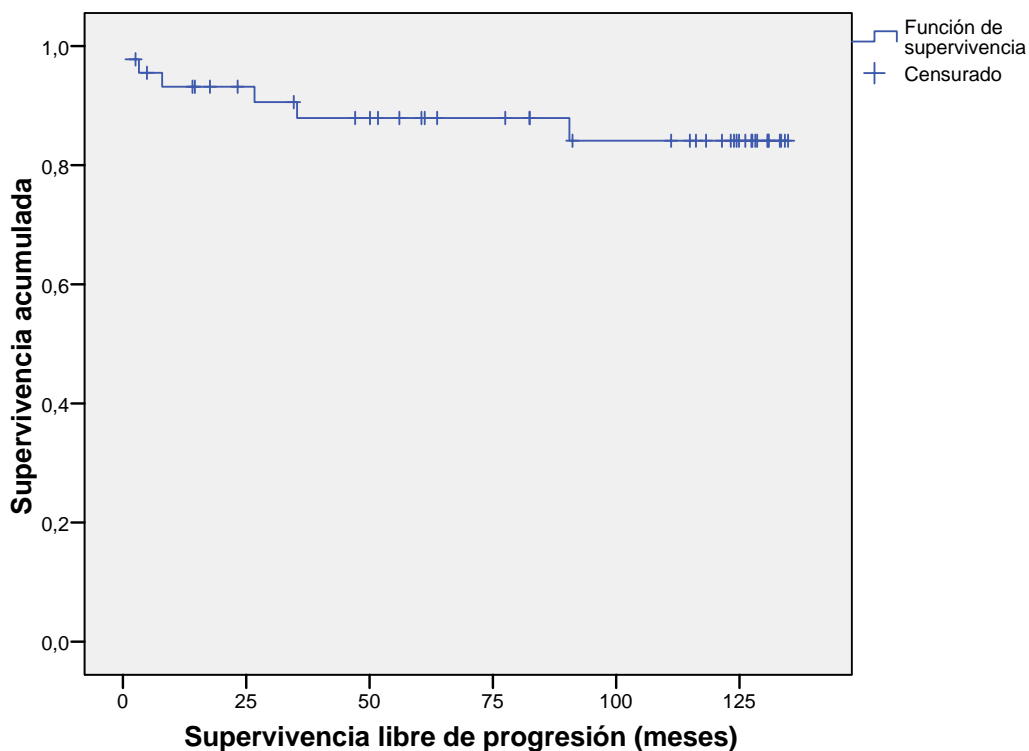


Figura 65: Curva de Kaplan-Meier para la SLP global

Tabla CXV: Tabla de vida para la SLP global. En la primera fila se detalla el número de individuos que alcanzan el final del periodo sin desarrollar el evento (SLP) y en la segunda fila se expresa en porcentaje sobre el total de enfermos que alcanza ese periodo de seguimiento.

SLP	INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
	0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
INDIVIDUOS	39	35	31	26	22	18	18
SUPERV ACUMULADA	95,2%	85,5%	82,2%	74,8%	68,5%	62,6%	62,6%

Funciones de supervivencia

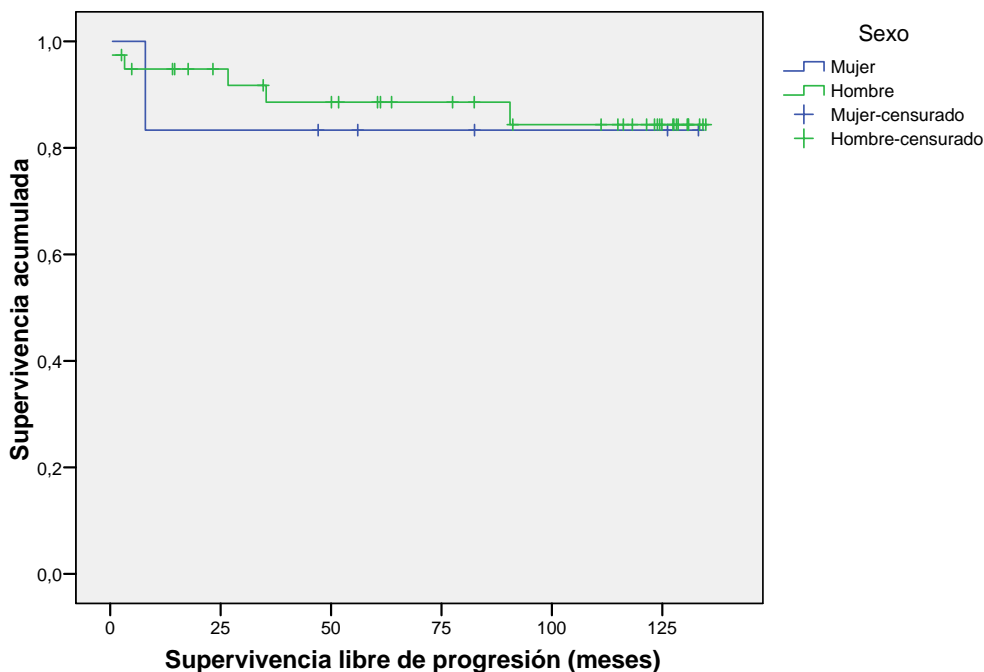


Figura 66: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del sexo.

Tabla CXVI: Tabla de vida para la SLP en función del sexo. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

GENERO		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Varones	EXPUESTOS AL RIESGO	39	32	28	26	22	19	15
	SUCESOS	5	2	2	4	2	2	15
Mujeres	EXPUESTOS AL RIESGO	6	5	5	3	3	2	2
	SUCESOS	0	0	2	0	1	0	0

Funciones de supervivencia

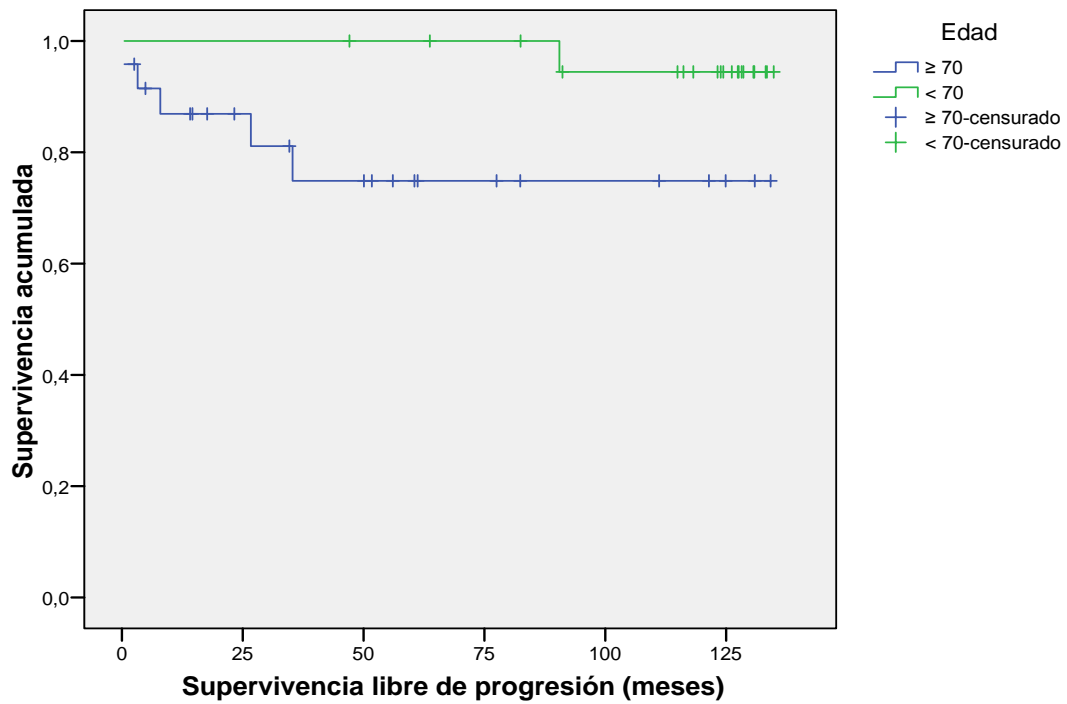


Figura 67: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función de la edad.

Tabla CXVII: Tabla de vida para la SLP en función de la edad. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

EDAD		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
≥ 70	EXPUESTOS AL RIESGO	24	16	12	9	6	5	4
	SUCESOS	5	2	3	3	1	1	4
< 70	EXPUESTOS AL RIESGO	21	21	21	20	19	16	13
	SUCESOS	0	0	1	1	2	3	13

Funciones de supervivencia

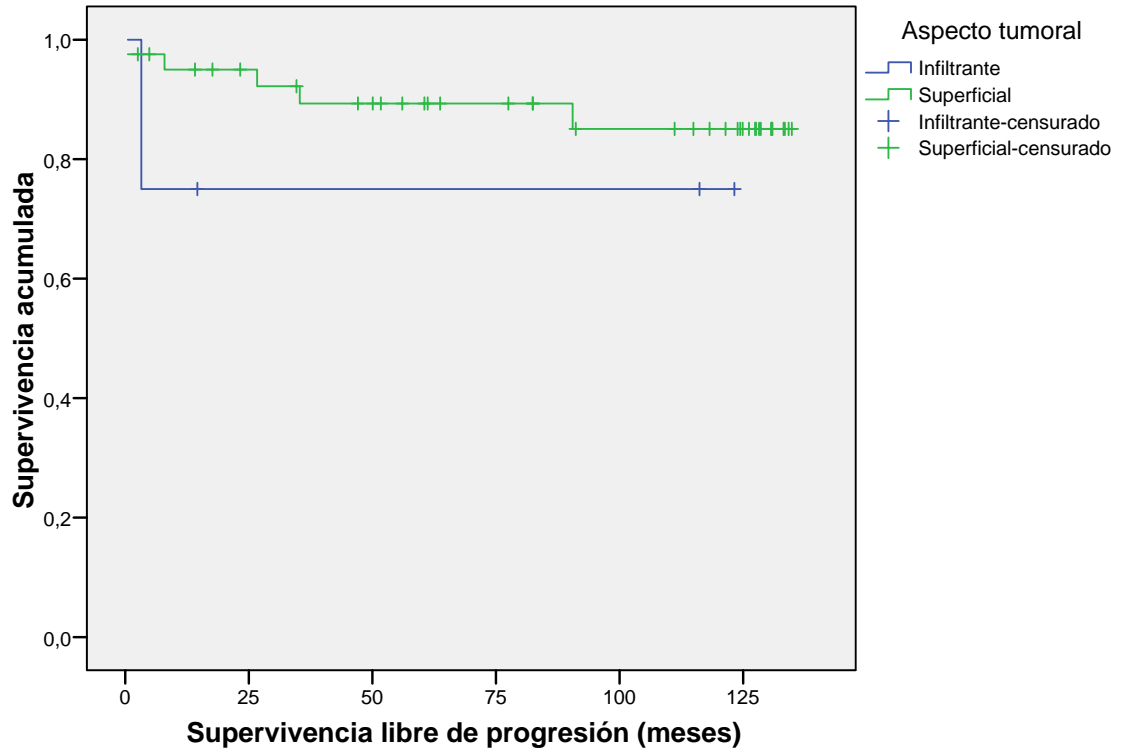


Figura 68: Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del aspecto tumoral.

Tabla CXVIII: Tabla de vida para la SLP en función del aspecto tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ASPECTO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
SUPERFICIAL	EXPUESTOS AL RIESGO	41	35	31	27	23	19	16
	SUCESOS	4	2	4	4	3	3	16
INFILTRANTE	EXPUESTOS AL RIESGO	4	2	2	2	2	2	1
	SUCESOS	1	0	0	0	0	1	1

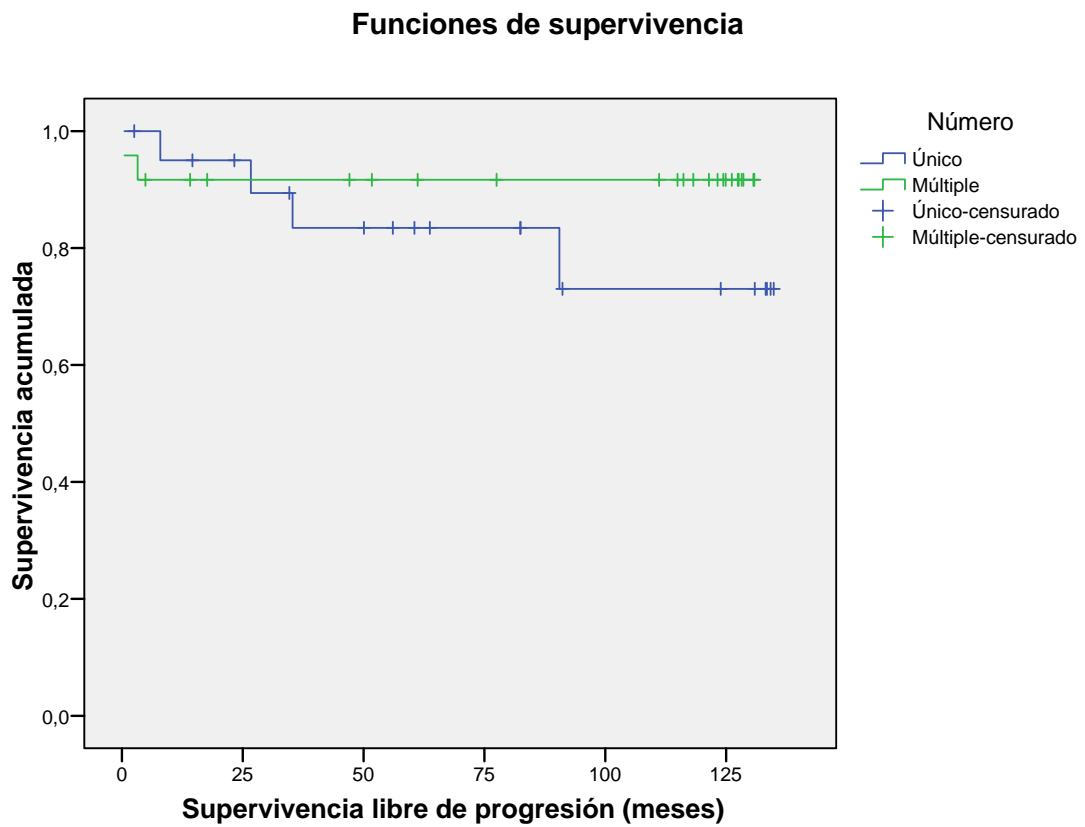


Figura 69: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del número de tumores.

Tabla CXIX: Tabla de vida para la SLP en función del número de tumores. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

NUMERO DE TUMORES		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
UNICO	EXPUESTOS AL RIESGO	24	19	19	17	15	15	11
	SUCESOS	3	0	2	2	0	4	11
MULTIPLE	EXPUESTOS AL RIESGO	21	18	14	12	10	6	6
	SUCESOS	2	2	2	2	3	0	6

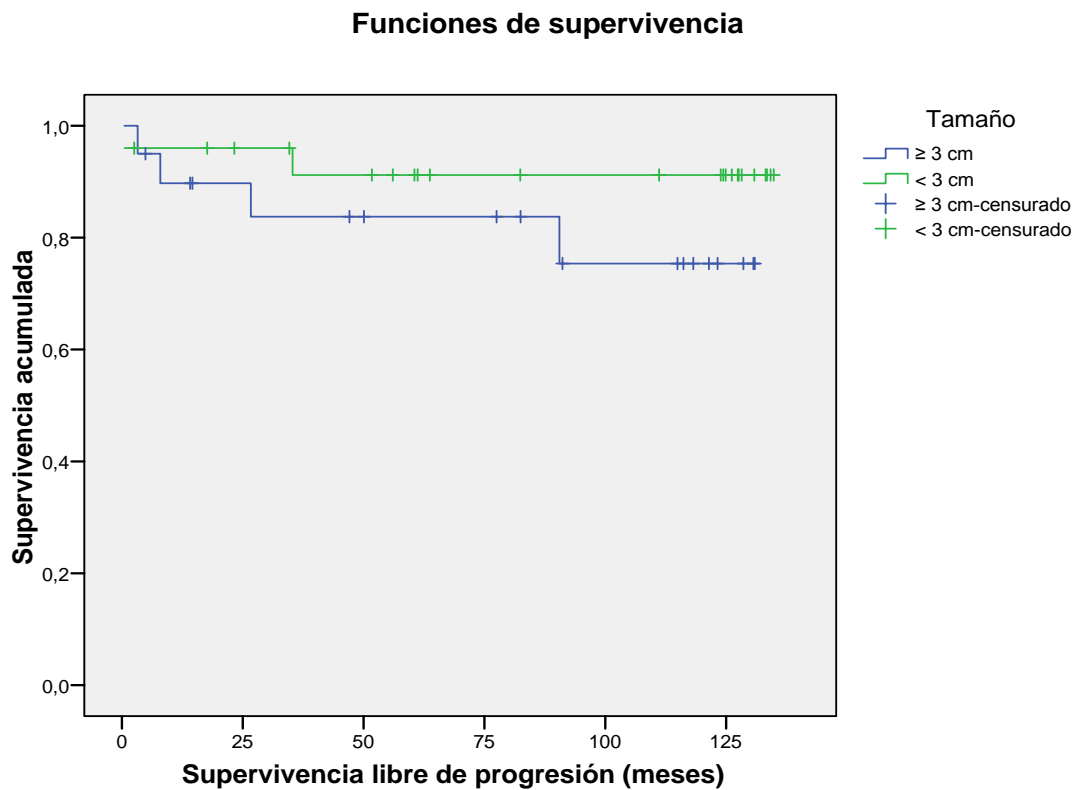


Figura 70: Curva de Kaplan-Meyer para la SLP en función del tamaño tumoral.

Tabla CXX: Tabla de vida para la SLP en función del tamaño tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TAMAÑO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
< 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	25	22	19	17	14	13	12
	SUCESOS	2	2	2	3	1	1	12
≥ 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	20	15	14	12	11	8	5
	SUCESOS	3	0	2	1	2	3	5

Funciones de supervivencia

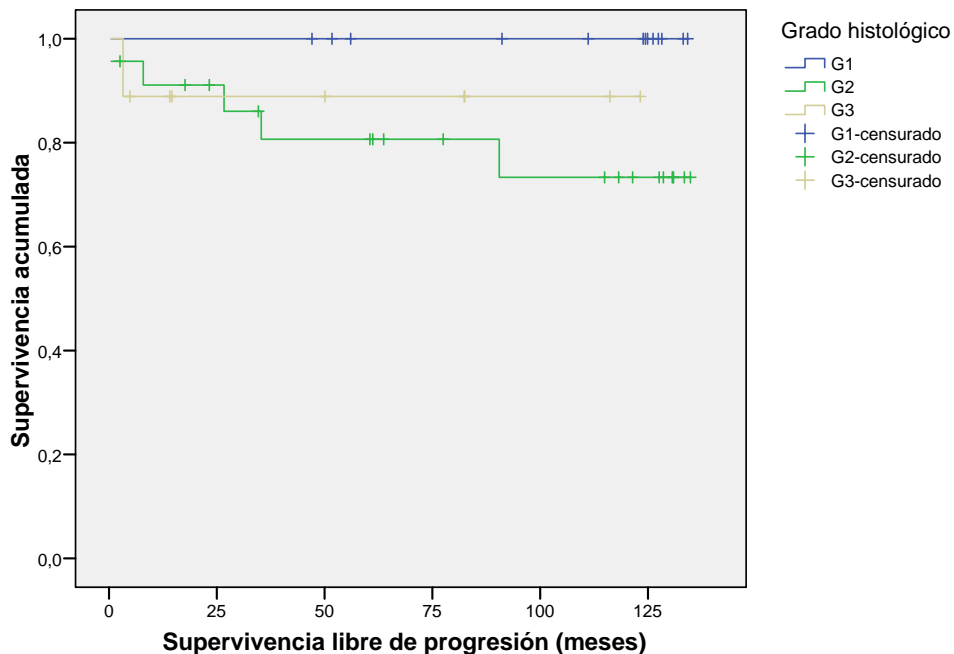


Figura 71: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del grado de diferenciación.

Tabla CXXI: Tabla de vida para la SLP en función del grado de diferenciación. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

GRADO DE DIFERENCIACION		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
G1	EXPUESTOS AL RIESGO	13	13	13	10	10	9	8
	SUCESOS	0	0	3	0	1	1	8
G2	EXPUESTOS AL RIESGO	23	19	15	15	11	10	8
	SUCESOS	2	2	0	4	0	2	8
G3	EXPUESTOS AL RIESGO	9	5	5	4	4	2	1
	SUCESOS	3	0	1	0	2	1	1



Funciones de supervivencia

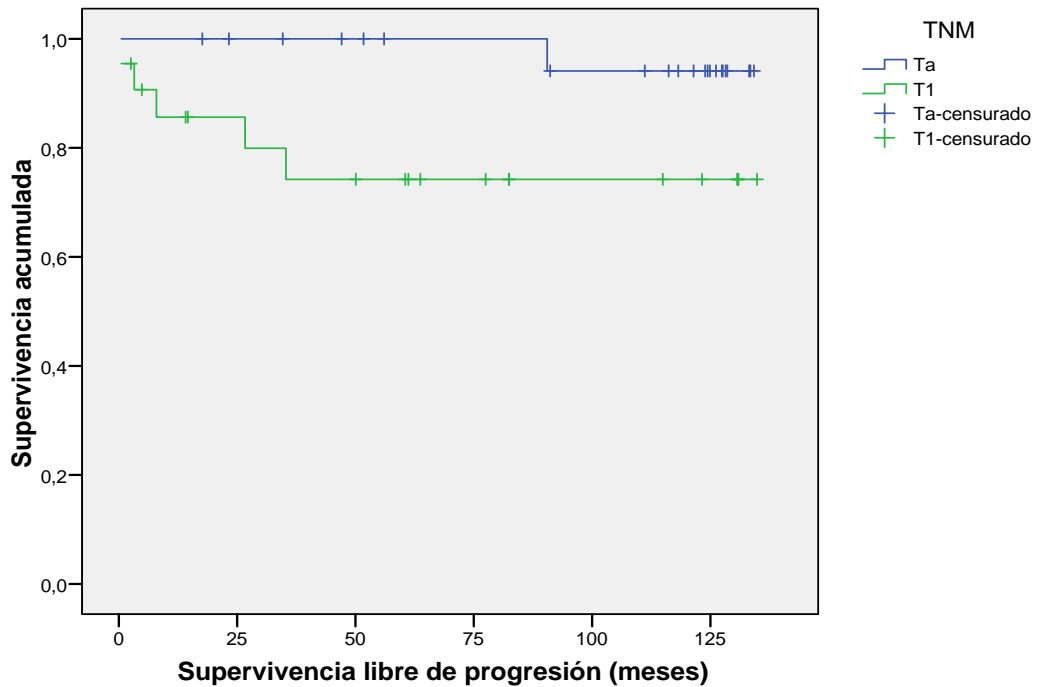


Figura 72: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del estadio tumoral.

Tabla CXXII Tabla de vida para la SLP en función del estadio tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ESTADIO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Ta	EXPUESTOS AL RIESGO	23	22	20	17	17	15	12
	SUCESOS	1	2	3	0	1	3	12
T1	EXPUESTOS AL RIESGO	22	15	13	12	8	6	5
	SUCESOS	4	0	1	4	2	1	5

Funciones de supervivencia

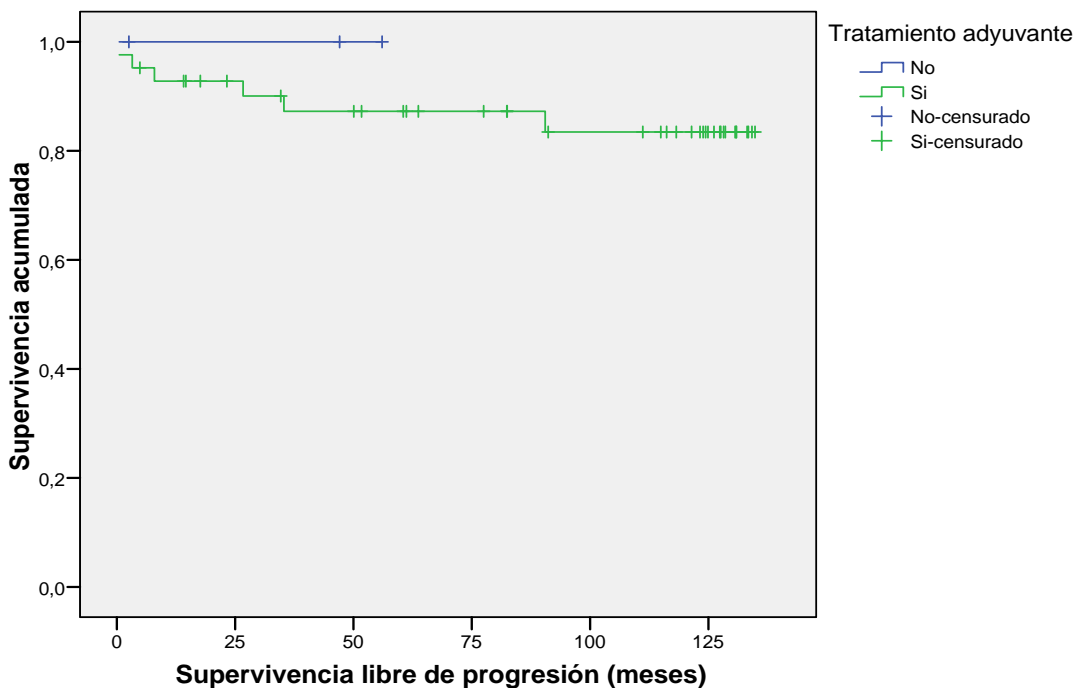


Figura 73: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del empleo de tratamiento adyuvante.

Tabla CXXIII: Tabla de vida para la SLP en función del empleo de tratamiento adyuvante. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TRATAMIENTO ADYUVANTE		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
ADYUVANCIA	EXPUESTOS AL RIESGO	42	35	31	29	25	21	17
	SUCESOS	4	2	2	4	3	4	17
OBSERVACION	EXPUESTOS AL RIESGO	3	2	2	0	0	0	0
	SUCESOS	1	0	2	0	0	0	0

Funciones de supervivencia

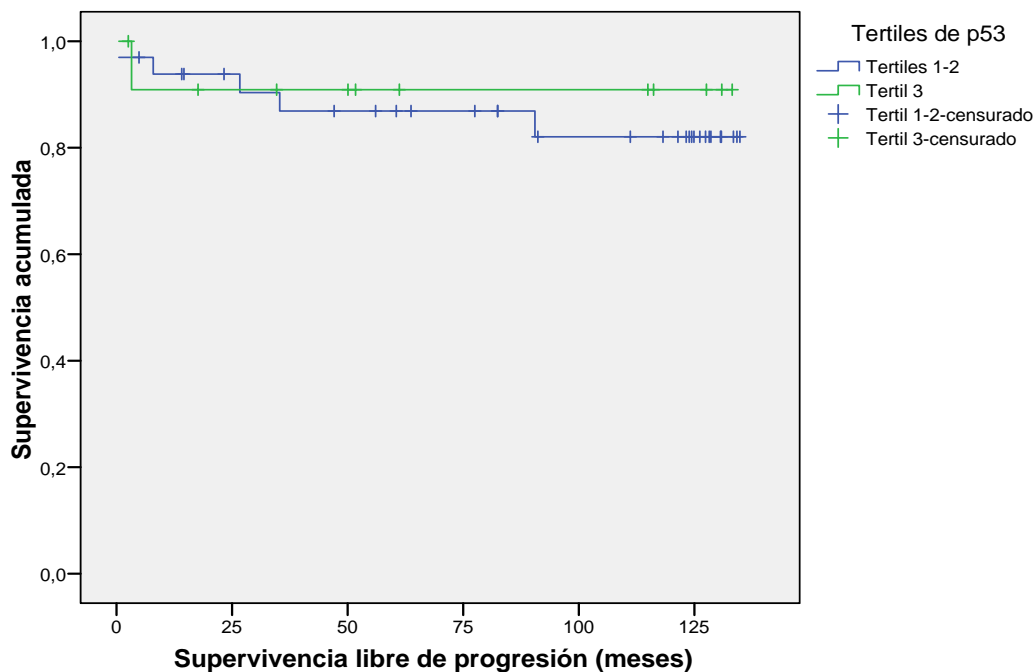


Figura 74: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del tertil de p53 LIA.

Tabla CXXIV: Tabla de vida para la SLP en función del tertil de p53 LIA. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE p53 LIA		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1-2	EXPUESTOS AL RIESGO	33	28	25	23	20	16	14
	SUCESOS	3	1	2	3	3	2	14
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	12	9	8	6	5	5	3
	SUCESOS	2	1	2	1	0	2	3

Funciones de supervivencia

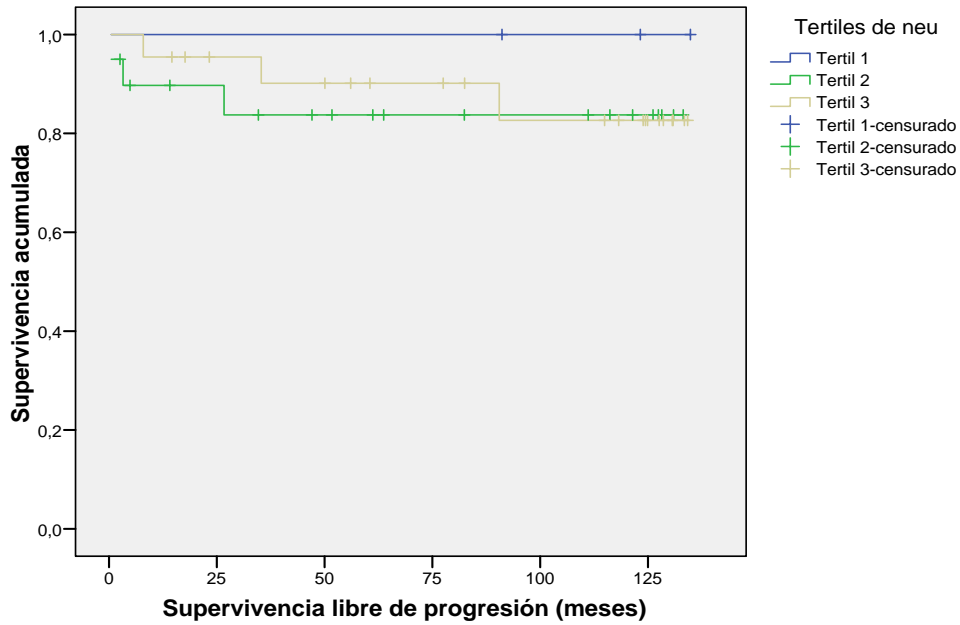


Figura 75: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del tertil de HER2/neu.

Tabla CXXV: Tabla de vida para la SLP en función del tertil de HER2/neu. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE HER2/neu		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	3	3	3	3	3	2	2
	SUCESOS	0	0	0	0	1	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	20	15	13	11	9	8	6
	SUCESOS	3	1	2	2	1	2	6
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	22	19	17	15	13	11	9
	SUCESOS	2	1	2	2	1	2	9

Funciones de supervivencia

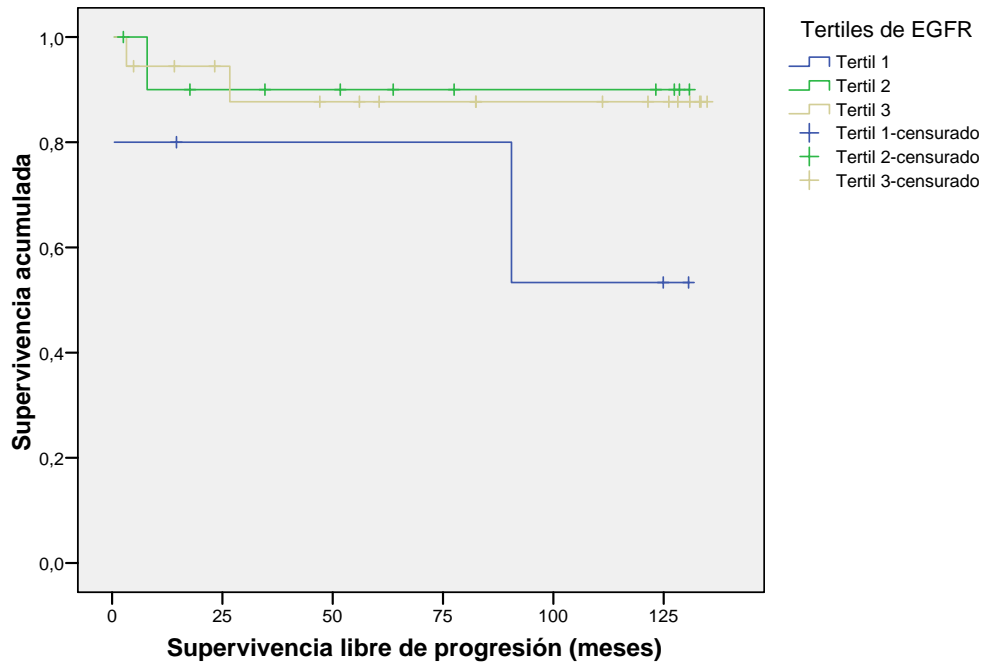


Figura 76: Curva de Kaplan-Meier para la SLP en función del tertil de EGFR.

Tabla CXXVI: Tabla de vida para la SLP en función del EGFR. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ERTILES DE EGFR		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	5	3	3	3	3	2	2
	SUCESOS	1	0	0	0	0	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	11	8	7	6	4	4	4
	SUCESOS	2	1	1	2	0	0	4
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	18	15	13	11	10	8	7
	SUCESOS	2	1	2	1	2	1	7



Tabla CXXVII: Tabla de vida para la SLP: La mediana de tiempo al suceso señala el tiempo en el que la mitad de los individuos han sufrido el suceso y las columnas de los meses, el % de individuos que habiendo alcanzado este tiempo de seguimiento, han desarrollado el suceso. NA; no alcanzada

FACTORES PRONOSTICOS		SUPERVIVENCIA LIBRE de PROGRESION (% DE)						
		MEDIANA (meses)	20 meses	40 meses	60 meses	80 meses	100 meses	120 meses
GENERO	Varones	NA	94,80%	88,58%	88,58%	88,58%	84,36%	84,36%
	Mujeres	NA	83,33%	83,33%	83,33%	83,33%	83,33%	83,33%
EDAD	≥ 70	NA	86,90%	81,11%	74,87%	74,87%	74,87%	74,87%
	< 70	NA	94,44%	94,44%	94,44%	94,44%	94,44%	94,44%
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	NA	94,99%	89,32%	89,32%	89,32%	85,07%	85,07%
	INFILTRANTE	NA	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%
NUMERO DE TUMORES	UNICO	NA	91,67%	91,67%	91,67%	91,67%	91,67%	91,67%
	MULTIPLE	NA	95,00%	89,41%	83,45%	83,45%	73,02%	73,02%
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	NA	96,00%	96,00%	91,20%	91,20%	91,20%	91,20%
	≥ 3 cm	NA	89,72%	83,74%	83,74%	83,74%	75,37%	75,37%
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	G2	NA	91,10%	80,66%	80,66%	80,66%	73,33%	73,33%
	G3	NA	88,99%	88,99%	88,99%	88,99%	88,99%	88,99%
ESTADIO TUMORAL	Ta	NA	100%	100%	100%	100%	94,12%	94,12%
	T1	NA	85,64%	74,22%	74,22%	74,22%	74,22%	74,22%
TRATAMIENTO ADYUVANTE	OBSERVACION	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	ADYUVANCIA	NA	92,80%	87,25%	87,25%	87,25%	83,46%	83,46%
TERTILES p53 LIA	T 1-2	NA	93,84%	86,89%	86,89%	86,89%	82,06%	82,06%
	T 3	NA	90,91%	90,91%	90,91%	90,91%	90,91%	90,91%
TERTILES HER2/neu	T1	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	T2	NA	89,72%	83,74%	83,74%	83,74%	83,74%	83,74%
	T3	NA	95,45%	90,15%	90,15%	90,15%	82,64%	82,64%
TERTILES EGFR	T1	NA	80,00%	80,00%	80,00%	80,00%	53,33%	53,33%
	T2	NA	90,00%	90,00%	90,00%	90,00%	90,00%	90,00%
	T3	NA	94,44%	87,70%	87,70%	87,70%	87,70%	87,70%



Tabla CXXVIII: SLP en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de LR. En la primera columna aparecen las variables predictoras del evento PROGRESIÓN. En cada variable, la primera de las categorías actúa como referencia. Los valores proceden de comparar cada categoría con su categoría de referencia. RRC: razón de riesgo cruda. IC 95%: intervalo de confianza para el 95% de las observaciones. LR: Log Rank.

FACTORES PRONOSTICOS PARA LA PROGRESION		RRC	IC 95%	p	RRA	p
GENERO	Varones	1	-	-	1	-
	Mujeres	1,30	0,15-11,36	0,80	15,87	0,80
EDAD	<70	1	-	-	1	-
	≥70	7,51	0,83-66,67	0,072	4,30	0,038
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	1	-	-	1	-
	INFILTRANTE	2,43	0,28-20,83	0,42	1,42	0,40
NUMERO DE TUMORES	ÚNICO	1	-	-	1	-
	MÚLTIPLE	0,40	0,07-2,23	0,29	0,84	0,28
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	1	-	-	1	-
	≥ 3 cm	2,63	0,49-14,28	0,27	1,31	0,25
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	1	-	-	1	-
	G2	104x10 ³	0-E	0,95	3,52	0,17
	G3	88x10 ³	0-E	0,095		
ESTADIO TUMORAL	Ta	1	-	-	1	-
	T1	7,43	0,85-64,89	0,07	4,45	0,0034
TRATAMIENTO ADYUVANTE	OBSERVACION	1	-	-	1	-
	ADYUVANCIA	21,93	0-E	0,72	3,45	0,59
TERTILES p53 LIA	T 1-2	1	-	-	1	-
	T 3	0,61	0,07-5,28	0,65	0,20	0,65
TERTILES HER2/neu	T1	1	-	-	1	-
	T2	29x10 ³	0-E	0,92	1,49	0,72
	T3	28x10 ³	0-E	0,92		
TERTILES EGFR	T1	1	-	-	1	-
	T2	0,23	0,02-2,56	0,23	2,64	0,27
	T3	0,18	0,04-1,89	0,18		



C. SUPERVIVENCIA LIBRE DE METÁSTASIS (SLM).

Las proyecciones de la aparición de enfermedad metastásica por medio de los métodos de KM y LR sugirieron que la edad, a pesar de no constituir un factor con efecto estadísticamente significativo sobre el tiempo a la aparición de metástasis (LR= 3,01 p=0,08, 1 GL), pareció marcar una clara tendencia: así, los pacientes de edad superior a 70 años parecieron encontrarse expuestos a sufrir enfermedad metastásica antes que los pacientes más jóvenes (edad igual o inferior a 70 años).

El tamaño tumoral representó un factor de riesgo sustancial para la enfermedad diseminada: los pacientes con los tumores de mayor tamaño (igual o superior a 3 cm) se encontraron sometidos a un riesgo significativamente superior (LR=6,00 p=0,01, 1 GL) que los afectados por tumores de menor tamaño. De hecho, ninguno de los pacientes con tumores de pequeño tamaño sufrió diseminación durante el período del estudio.

Ni los títulos de p53 (LR=0,01 p=0,92 1 GL), HER2/neu (LR=2,65 p=0,82, 2 GL) y EGFR (LR=1,69 p=0,54, 2 GL) permitieron diferenciar poblaciones con mayor riesgo de desarrollar enfermedad diseminada.

Las Tablas CXXIX-CXL y las Figuras 77-88. Exponen los detalles de esta parte del análisis. La Tabla CXLI representa la función de riesgo acumulada para el desarrollo de enfermedad metastásica, comparando los períodos bajo análisis. La Tabla CXLII expone la probabilidad acumulada del desarrollo de metástasis en base a cada una de las variable predictivas, estimada mediante el método de KM y el test LR.

El análisis multivariante no pudo confirmar las tendencias detectadas durante el análisis univariante, de modo que la consideración del efecto de unas variables en presencia del resto no permitió identificar variable pronóstica independiente alguna.



Función de supervivencia

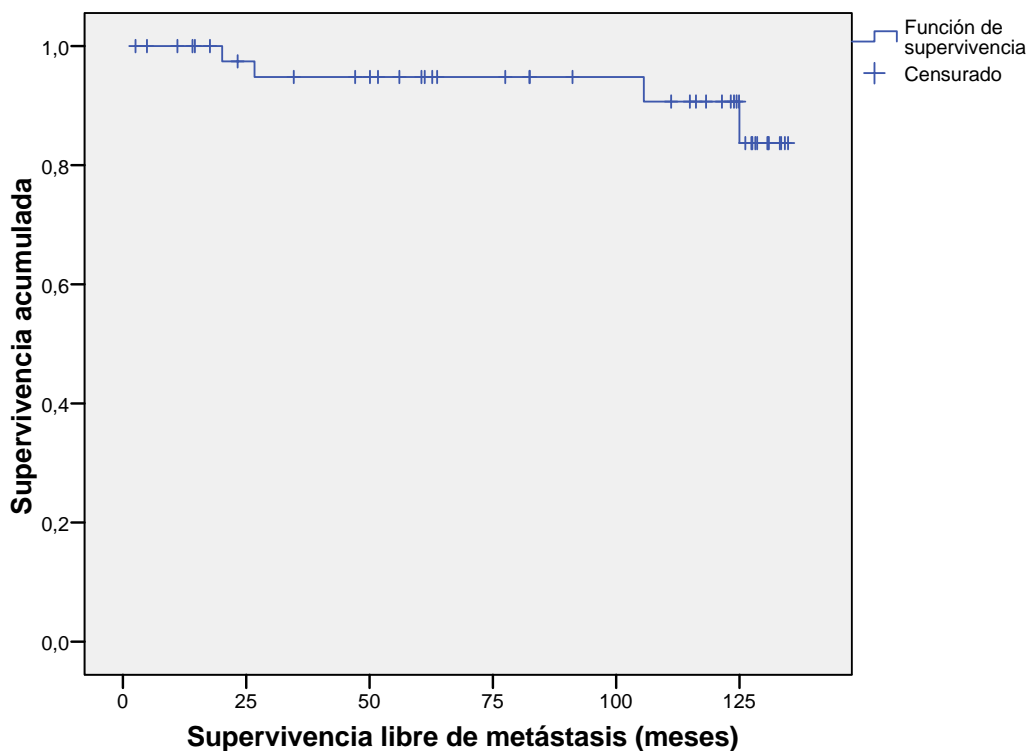


Figura 77: Curva de Kaplan-Meyer para la SLM global

Tabla CXXIX: Tabla de vida para la SLM global. En la primera fila se detalla el número de individuos que alcanzan el final del periodo sin desarrollar el evento (SLM) y en la segunda fila se expresa en porcentaje sobre el total de enfermos que alcanza ese periodo de seguimiento.

SLM	INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
	0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
INDIVIDUOS	38	35	31	26	23	18	12
SUPERV ACUMULADA	97,4	94,8	94,8	94,8	94,8	90,7	83,7



Funciones de supervivencia

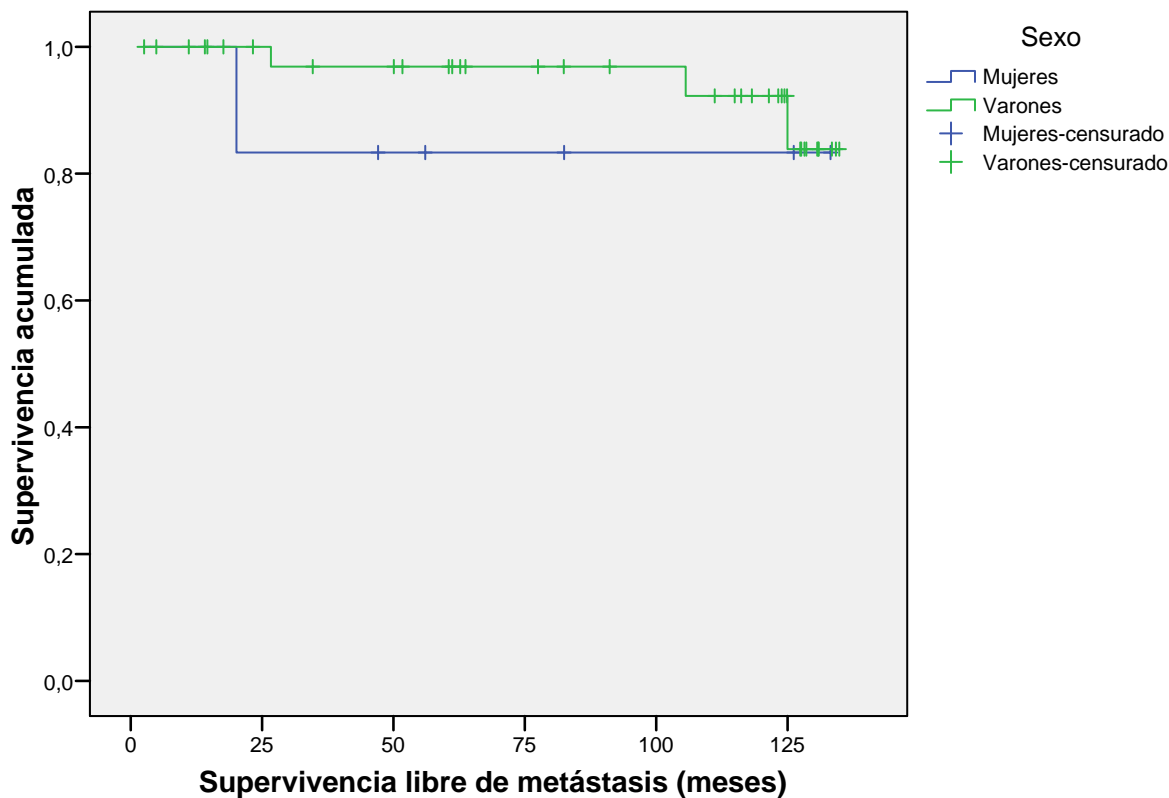


Figura 78: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del sexo.

Tabla CXXX: Tabla de vida para la SLM en función del sexo. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

GENERO		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Varones	EXPUESTOS AL RIESGO	39	33	30	28	23	21	16
	SUCESOS	6	2	2	5	2	4	15
Mujeres	EXPUESTOS AL RIESGO	6	6	5	3	3	2	2
	SUCESOS	0	0	2	0	1	0	2



Funciones de supervivencia

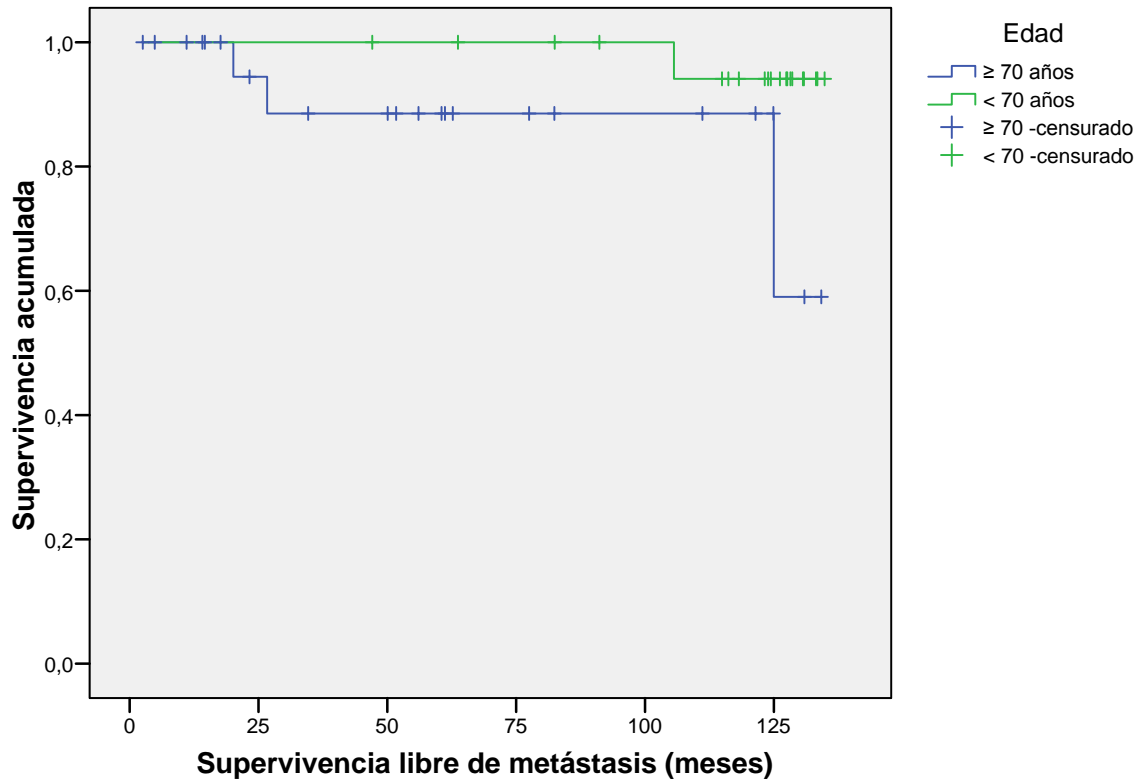


Figura 79: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función de la edad.

Tabla CXXXI: Tabla de vida para la SLM en función de la edad. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

EDAD		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
≥ 70	EXPUESTOS AL RIESGO	24	18	14	11	7	6	5
	SUCESOS	6	2	3	4	1	1	4
< 70	EXPUESTOS AL RIESGO	21	21	21	20	19	17	13
	SUCESOS	0	0	1	1	2	3	13



Funciones de supervivencia

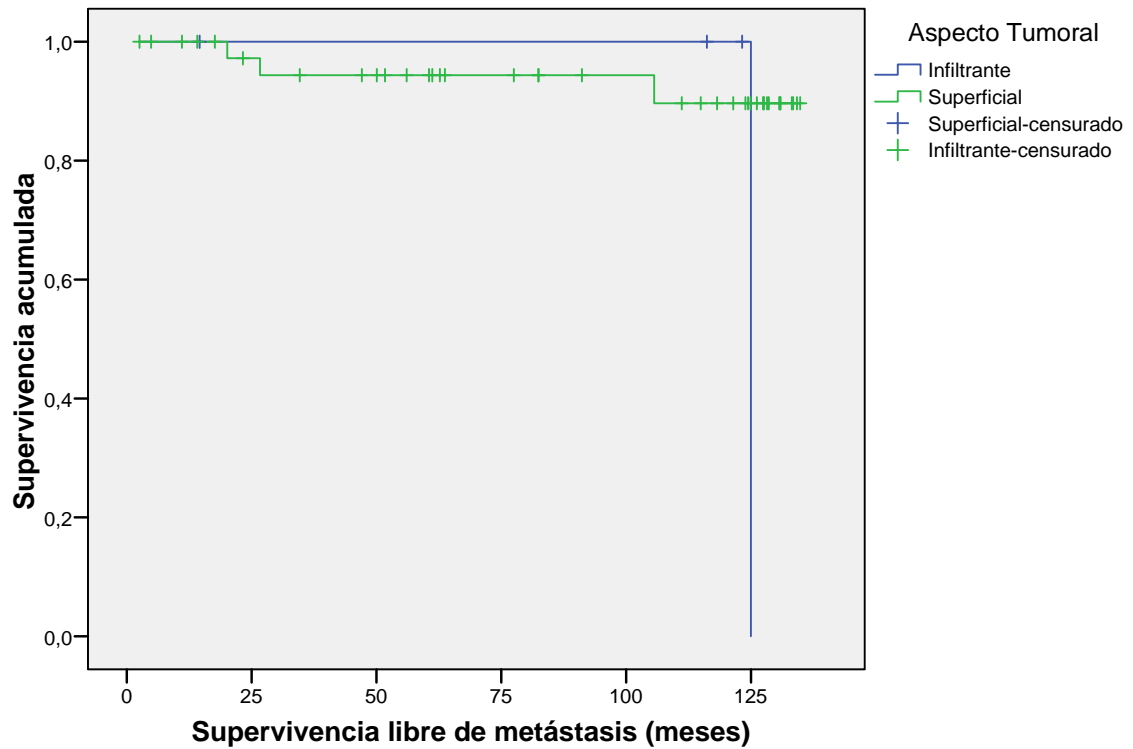


Figura 80: Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del aspecto tumoral.

Tabla CXXXII: Tabla de vida para la SLM en función del aspecto tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ASPECTO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
SUPERFICIAL	EXPUESTOS AL RIESGO	41	36	32	28	23	20	16
	SUCESOS	5	2	4	5	3	3	16
INFILTRANTE	EXPUESTOS AL RIESGO	4	3	3	3	3	3	2
	SUCESOS	1	0	0	0	0	0	1



Funciones de supervivencia

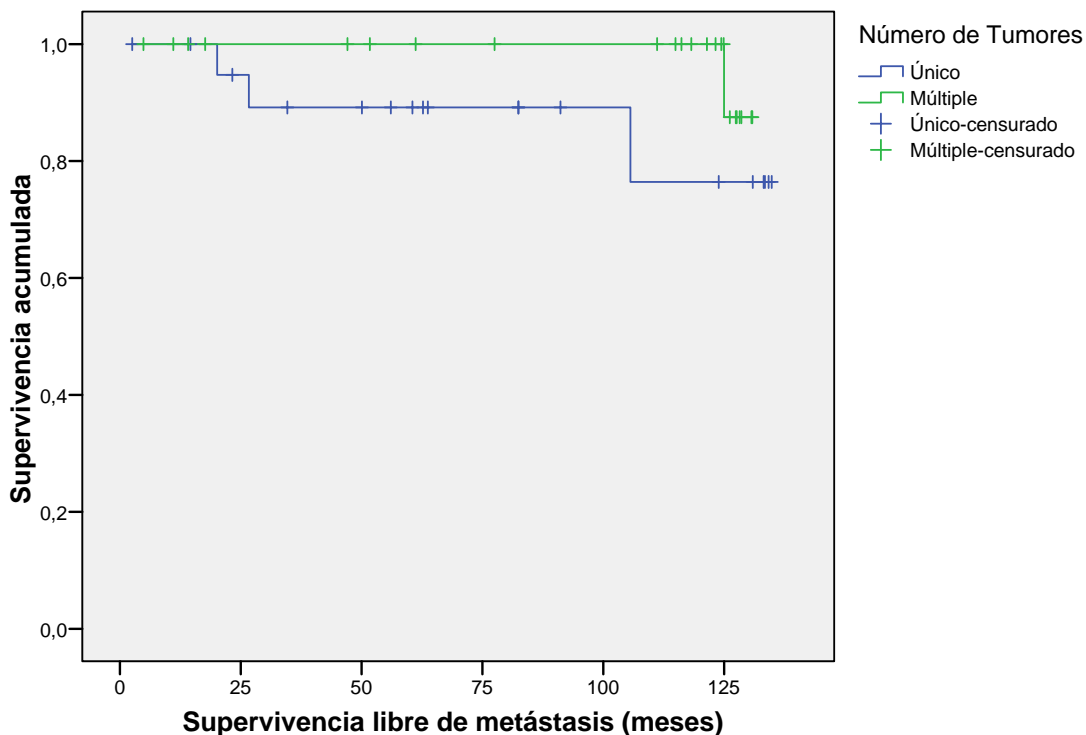


Figura 81: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del número de tumores.

Tabla CXXXIII: Tabla de vida para la SLM en función del número de tumores. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

NUMERO DE TUMORES		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
UNICO	EXPUESTOS AL RIESGO	24	20	20	18	16	16	12
	SUCESOS	4	0	2	2	0	1	11
MULTIPLE	EXPUESTOS AL RIESGO	21	19	15	13	10	7	6
	SUCESOS	2	2	2	3	3	0	6



Funciones de supervivencia

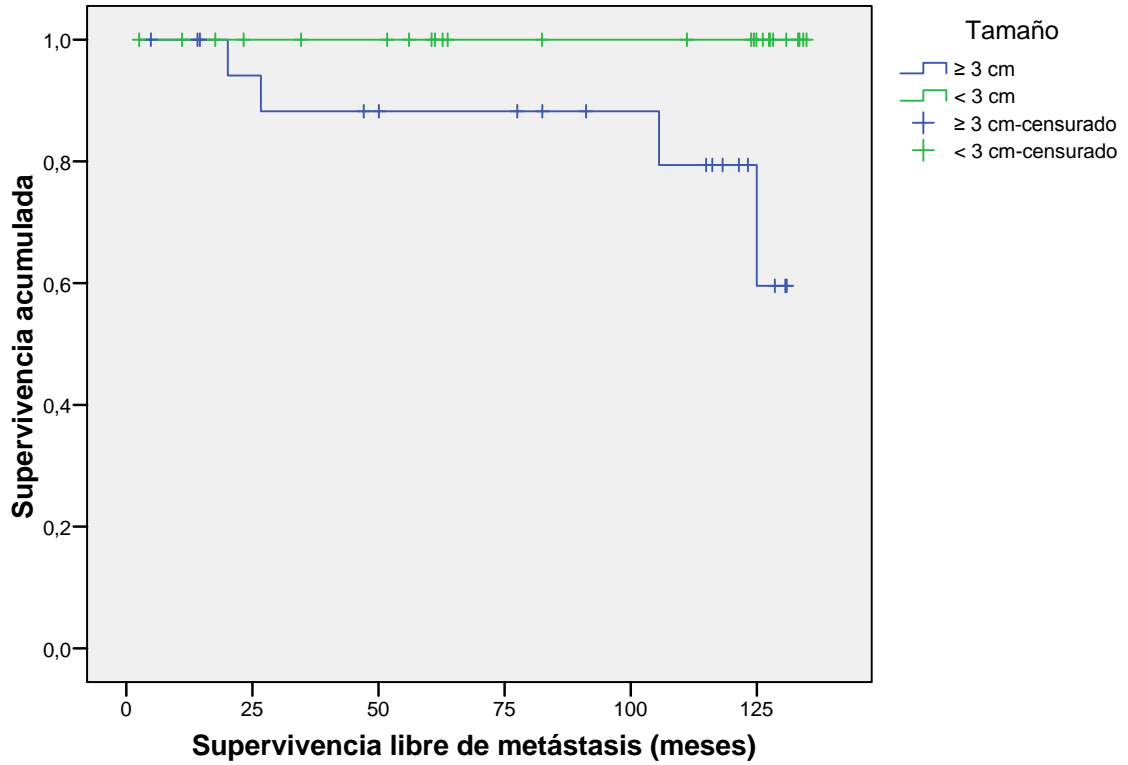


Figura 82: Curva de Kaplan-Meyer para la SLM en función del tamaño tumoral.

Tabla CXXXIV: Tabla de vida para la SLM en función del tamaño tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TAMAÑO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
< 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	25	22	20	18	14	13	12
	SUCESOS	3	2	2	4	1	1	12
≥ 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	20	17	15	13	12	10	6
	SUCESOS	3	0	2	1	2	3	5

Funciones de supervivencia

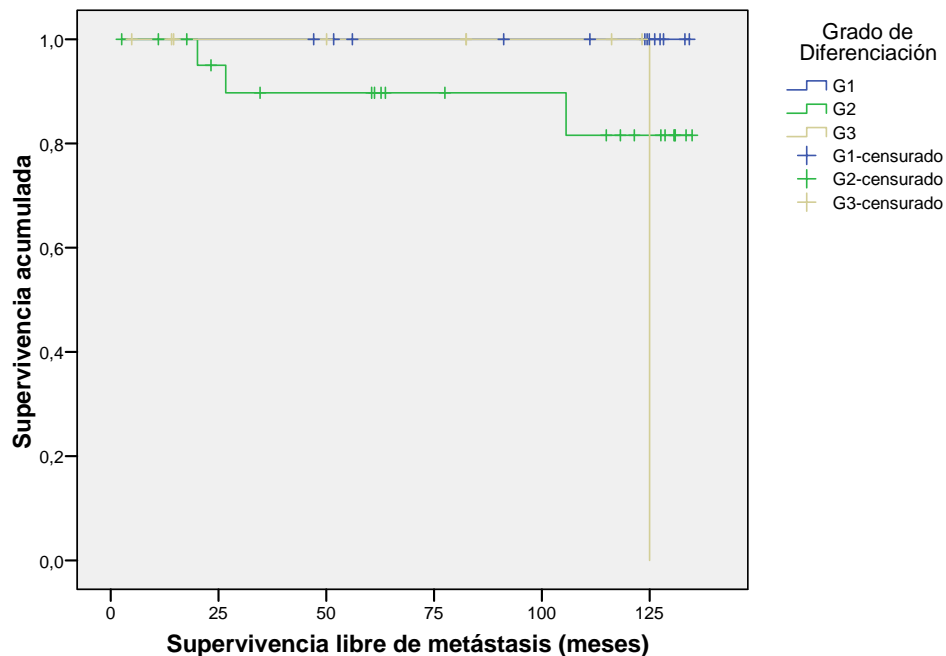


Figura 83: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del grado de diferenciación.

Tabla CXXXV: Tabla de vida para la SLM en función del grado de diferenciación. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

GRADO DE DIFERENCIACION		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
G1	EXPUESTOS AL RIESGO	13	13	13	10	10	9	8
	SUCESOS	0	0	3	0	1	1	8
G2	EXPUESTOS AL RIESGO	23	20	16	16	11	11	8
	SUCESOS	3	2	0	5	0	2	8
G3	EXPUESTOS AL RIESGO	9	6	6	5	5	3	2
	SUCESOS	3	0	1	0	2	1	1



Funciones de supervivencia

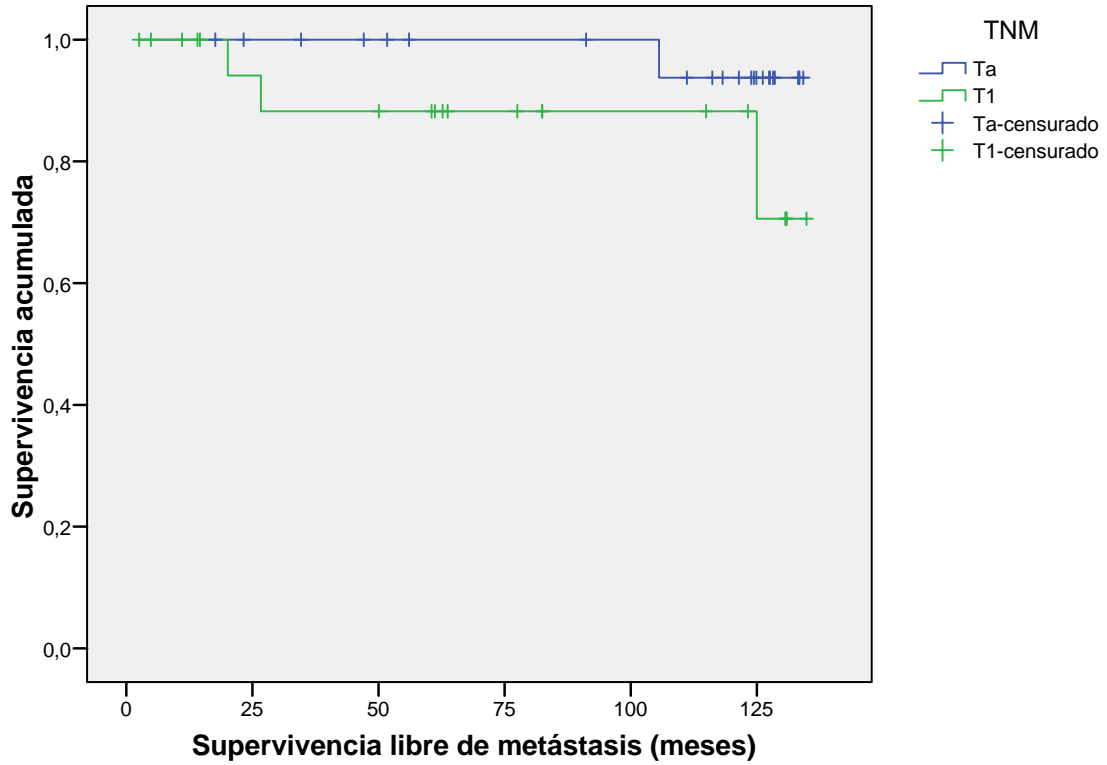


Figura 84: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del estadio tumoral.

Tabla CXXXVI: Tabla de vida para la SLM en función del estadio tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ESTADIO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Ta	EXPUESTOS AL RIESGO	23	22	20	17	17	16	12
	SUCESOS	1	2	3	0	1	3	12
T1	EXPUESTOS AL RIESGO	22	17	15	14	9	7	6
	SUCESOS	5	0	1	5	2	1	5

Funciones de supervivencia

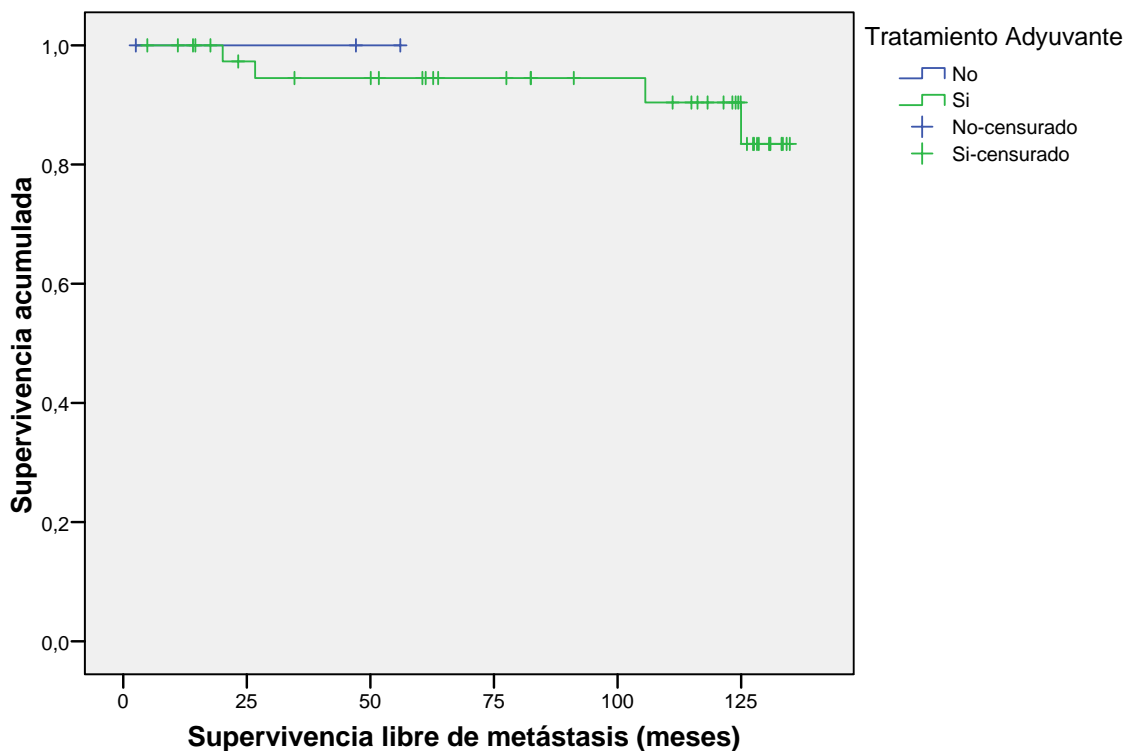


Figura 85: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del empleo de tratamiento adyuvante.

Tabla CXXXVII: Tabla de vida para la SLM en función del empleo de tratamiento adyuvante. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TRATAMIENTO ADYUVANTE		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
ADYUVANCIA	EXPUESTOS AL RIESGO	42	37	33	31	26	23	18
	SUCESOS	5	2	2	5	3	4	17
OBSERVACION	EXPUESTOS AL RIESGO	3	2	2	0	0	0	0
	SUCESOS	1	0	2	0	0	0	0

Funciones de supervivencia

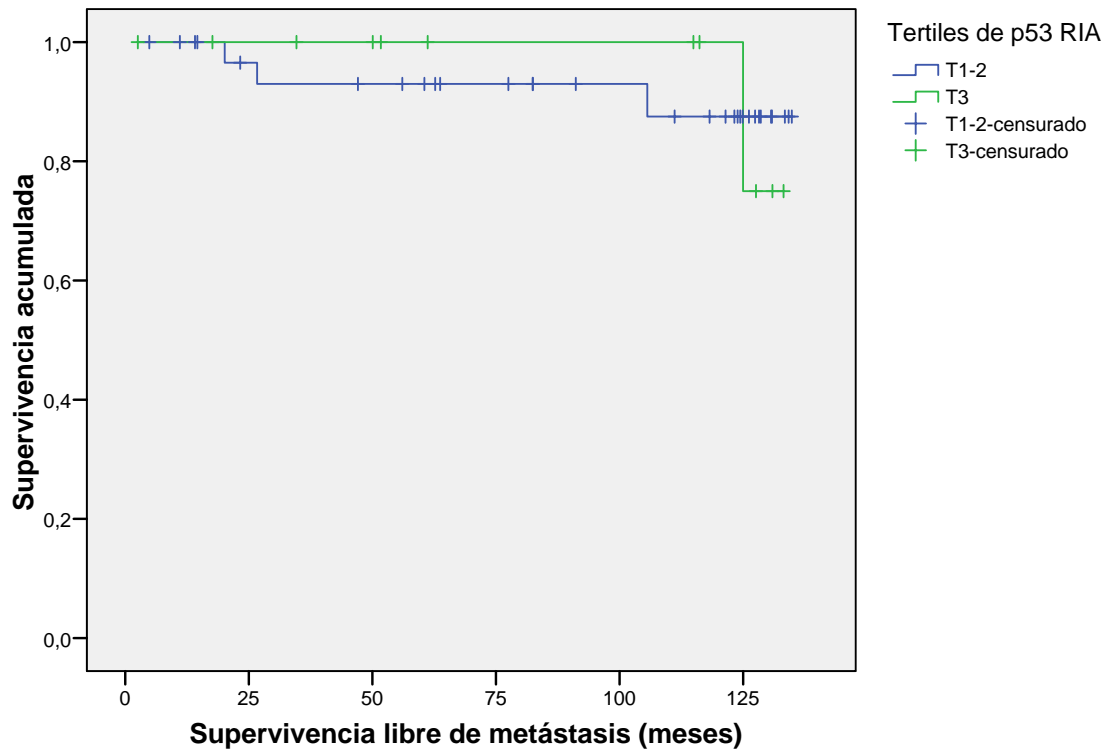


Figura 86: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del tertil de p53 LIA.

Tabla CXXXVIII: Tabla de vida para la SLM en función del tertil de p53 LIA. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE p53 LIA		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1-2	EXPUESTOS AL RIESGO	33	29	26	24	20	17	14
	SUCESOS	4	1	2	4	3	2	14
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	12	10	9	7	6	6	4
	SUCESOS	2	1	2	1	0	2	3

Funciones de supervivencia

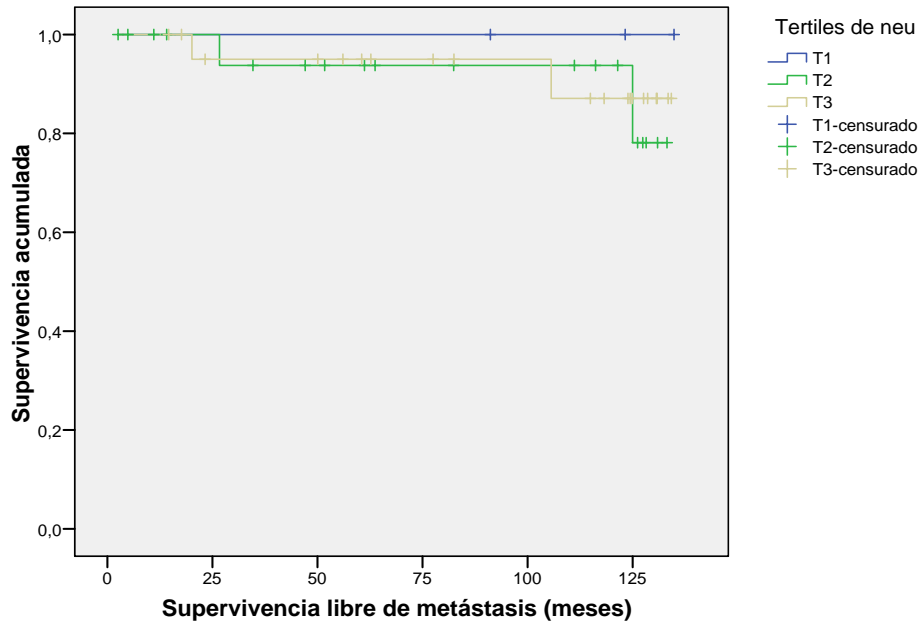


Figura: 87 Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del tertil de HER2/neu.

Tabla CXXXIX: Tabla de vida para la SLM en función del empleo de tratamiento adyuvante. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE HER2/neu		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	3	3	3	3	3	2	2
	SUCESOS	0	0	0	0	1	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	20	16	14	12	10	9	7
	SUCESOS	4	1	2	2	1	2	6
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	22	20	18	16	13	12	9
	SUCESOS	2	1	2	3	1	2	9

Funciones de supervivencia

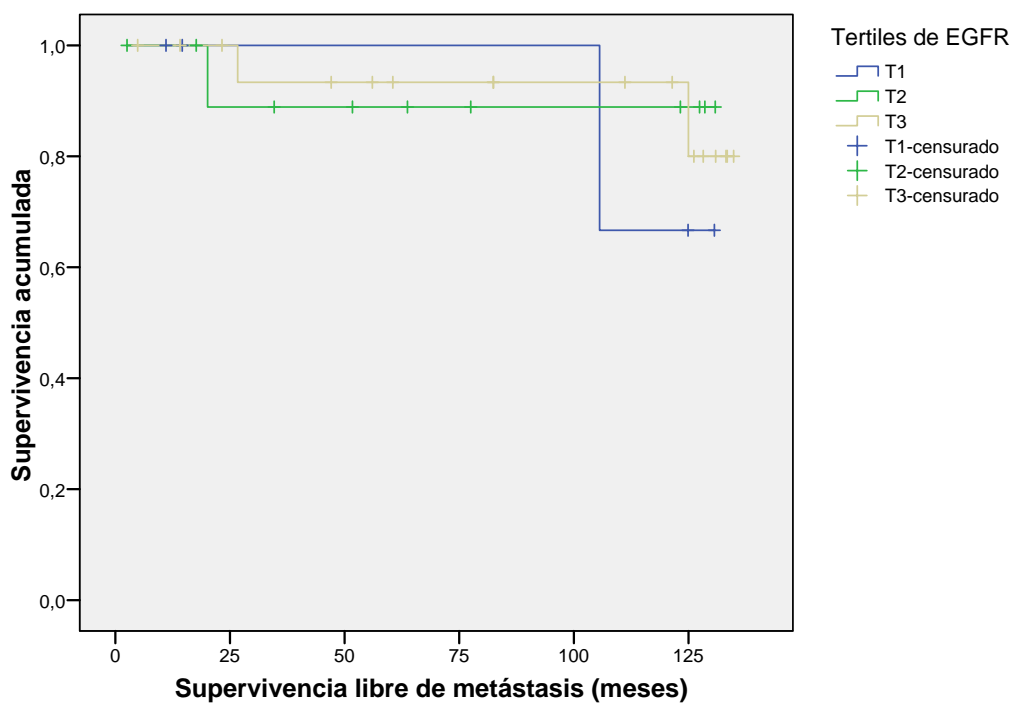


Figura 88: Curva de Kaplan-Meier para la SLM en función del tercil de EGFR.

Tabla CXL: Tabla de vida para la SLM en función del empleo de tratamiento adyuvante. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE EGFR		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	5	3	3	3	3	3	2
	SUCESOS	2	0	0	0	0	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	11	9	7	6	4	4	4
	SUCESOS	2	1	1	2	0	0	4
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	18	16	14	12	11	9	8
	SUCESOS	2	1	2	1	2	1	7



Tabla CXLI: Tabla de vida para la SLM. La mediana de tiempo al suceso señala el tiempo en el que la mitad de los individuos han sufrido el suceso y las columnas de los meses, el % de individuos que habiendo alcanzado este tiempo de seguimiento, han desarrollado el suceso. NA; no alcanzada

FACTORES PRONOSTICOS		SUPERVIVENCIA LIBRE de METASTASIS (% DE)						
		MEDIANA (meses)	20 meses	40 meses	60 meses	80 meses	100 meses	120 meses
GENERO	Varones	NA	100%	96,88%	96,88%	96,88%	96,88%	92,66%
	Mujeres	NA	83,33%	83,33%	83,33%	83,33%	83,33%	83,33%
EDAD	≥ 70	NA	94,44%	88,54%	88,54%	88,54%	88,54%	88,54%
	< 70	NA	100%	100%	100%	100%	100%	94,12%
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	NA	97,22%	94,36%	94,36%	94,36%	94,36%	89,64%
	INFILTRANTE	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
NUMERO DE TUMORES	UNICO	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	MULTIPLE	NA	94,74%	89,16%	89,16%	89,16%	89,16%	76,43%
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	≥ 3 cm	NA	94,12%	88,24%	88,24%	88,24%	88,24%	79,41%
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	G2	NA	95,00%	89,72%	89,72%	89,72%	89,72%	81,57%
	G3	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ESTADIO TUMORAL	Ta	NA	100%	93,75%	93,75%	93,75%	93,75%	93,75%
	T1	NA	94,12%	88,24%	88,24%	88,24%	88,24%	88,24%
TRATAMIENTO ADYUVANTE	OBSERVACION	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	ADYUVANCIA	NA	97,30%	94,52%	94,52%	94,52%	94,52%	90,41%
TERTILES p53 LIA	T 1-2	NA	96,55%	92,98%	92,98%	92,98%	92,98%	87,51%
	T 3	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
TERTILES HER2/neu	T1	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	T2	NA	100%	93,75%	93,75%	93,75%	93,75%	93,75%
	T3	NA	95,00%	87,08%	87,08%	87,08%	87,08%	87,08%
TERTILES EGFR	T1	NA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	T2	NA	88,89%	88,89%	88,89%	88,89%	88,89%	88,89%
	T3	NA	100%	93,33%	93,33%	93,33%	93,33%	93,33%



Tabla CXLII Supervivencia en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de LR. En la primera columna aparecen las variables predictoras del evento METÁSTASIS. En cada variable, la primera de las categorías actúa como referencia. Los valores proceden de comparar cada categoría con su categoría de referencia. RRC: razón de riesgo cruda. IC 95%: intervalo de confianza para el 95% de las observaciones. LR: Log Rank.

FACTORES PRONOSTICOS PARA LA ENFERMEDAD METASTASICA		RRC	IC 95%	p	RRA	p
GENERO	Varones	1	-	-	1	-
	Mujeres	2,19	0,22-21,27	0,49	2,08	0,49
EDAD	<70	1	-	-	1	-
	≥70	6,16	0,61-61,95	0,12	3,01	0,08
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	1	-	-	1	-
	INFILTRANTE	3,35	0,34-32,72	0,29	1,21	0,27
NUMERO DE TUMORES	UNICO	1	-	-	1	-
	MULTIPLE	0,22	0,02-2,19	0,19	0,51	0,16
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	1	-	-	1	-
	≥ 3 cm	108,68	0,025-464285,2	0,27	6,00	0,01
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	1	-	-	1	-
	G2	5,32	0,53-366,41	0,96	2,39	0,30
	G3	4,61	0,032-159289,74	0,96		
ESTADIO TUMORAL	Ta	1	-	-	1	-
	T1	4,79	0,49-46,68	0,17	2,21	0,13
TRATAMIENTO ADYUVANTE	ADYUVANCIA	1	-	-	1	-
	OBSERVACION	0,04	0,008-E	0,82	0,90	0,73
TERTILES p53 LIA	T1-2	1	-	-	1	-
	T3	0,88	0,092-8,51	0,91	0,01	0,92
TERTILES HER2/neu	T1	1	-	-	1	-
	T2	0,71	0,52-1,22	0,97	2,65	0,82
	T3	1,17	0,16-8,33	0,87		
TERTILES EGFR	T1	1	-	-	1	-
	T2	2,37	0,21-26,75	0,48	1,69	0,54
	T3	1,01	0,092-11,25	0,98		

D. SUPERVIVENCIA GLOBAL POR TODAS LAS CAUSAS (STC).

Como era previsible, durante el análisis univariante los pacientes de mayor edad se encontraron expuestos a un mayor riesgo de morir por cualquier causa a lo largo del período del estudio (LR=12,28 $p<0,001$, 1 GL). Entre las variables tumorales e histológicas analizadas, únicamente el estadio (LR=5,17 $p=0,02$, 1 GL) pareció tener efecto sobre la mortalidad, de manera que los pacientes con tumores estadio T1 murieron más precozmente que aquéllos con tumores estadio Ta. De modo similar, la utilización de adyuvancia pareció modificar significativamente el riesgo de morir durante el estudio univariante (LR=10,97 $p=0,001$, 1 GL). Este fenómeno se explica por el hecho de que los pacientes no susceptibles de tratamiento adyuvante son los pacientes cuya situación basal no permitía realizarlo por su mayor patología de base, y por tanto, mayor riesgo de fallecer.

El análisis de los factores moleculares tampoco resultó de utilidad a la hora de establecer proyecciones de mortalidad (LR=1,07 $p=0,3$, LR=1,06 $p=0,59$, LR=0,39 $p=0,82$ para p53, HER2/neu y EGFR respectivamente).

Las Tablas CXLIII-CLIV y las Figuras 89-100 muestran los detalles de esta parte del estudio. La Tabla CLV representa la función de riesgo acumulada para el desarrollo de muerte comparando los períodos bajo análisis. La Tabla CLVI expone la probabilidad acumulada de fallecer en base a cada una de las variable predictivas, estimada mediante el método de KM y el test LR.

La Tabla CLV representa la función de riesgo acumulada para la muerte por cualquier causa, comparando los períodos bajo análisis. La Tabla CLVI expone la probabilidad acumulada de progresión en función de cada una de las variable predictivas, estimada mediante el método de KM y el test LR.

Del mismo modo, el análisis multivariante confirmó el efecto penalizador independiente de la edad, de modo que el riesgo de morir durante el período del estudio para los pacientes de edad inferior a 70 años fue un 85% inferior al de los pacientes de edad igual o superior a 70 años (RRA 0,15, IC 95% 0,033-0,71, $p=0,017$). También, la utilización de tratamiento adyuvante tuvo un efecto protector independiente, de manera que los pacientes no tratados (sometidos a observación) se encontraron



expuestos a un riesgo de morir 24 veces superior al de los individuos sometidos a adyuvancia (RRA 23,83, IC 95% 2,01-281,98, $p=0,012$). Este hecho sin duda tiene que ver con que únicamente fueron excluidos para el tratamiento adyuvante aquellos pacientes cuya situación basal no permitía realizarlo.

Función de supervivencia

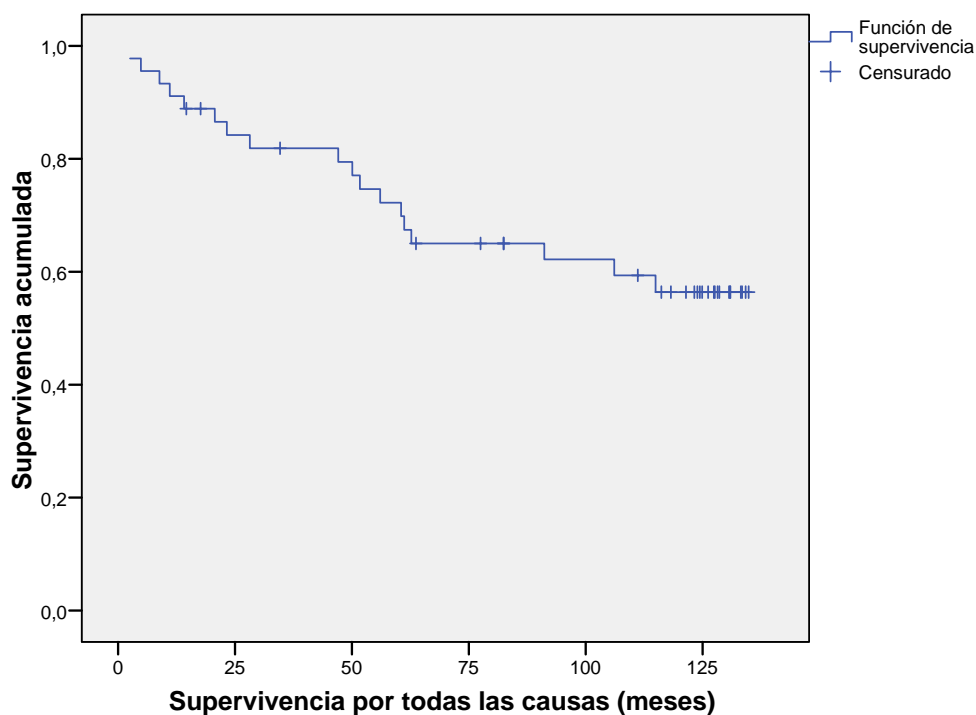


Figura 89: Curva de Kaplan-Meier para la STC global

Tabla CXLIII: Tabla de vida para la STC global. En la primera fila se detalla el número de individuos que alcanzan el final del periodo sin desarrollar el evento (STC) y en la segunda fila se expresa en porcentaje sobre el total de enfermos que alcanza ese periodo de seguimiento.

STC	INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
	0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
INDIVIDUOS	40	35	30	27	22	17	16
SUPERV ACUMULADA	88,9	81,9	72,2	65,0	62,2	56,4	56,4

Funciones de supervivencia

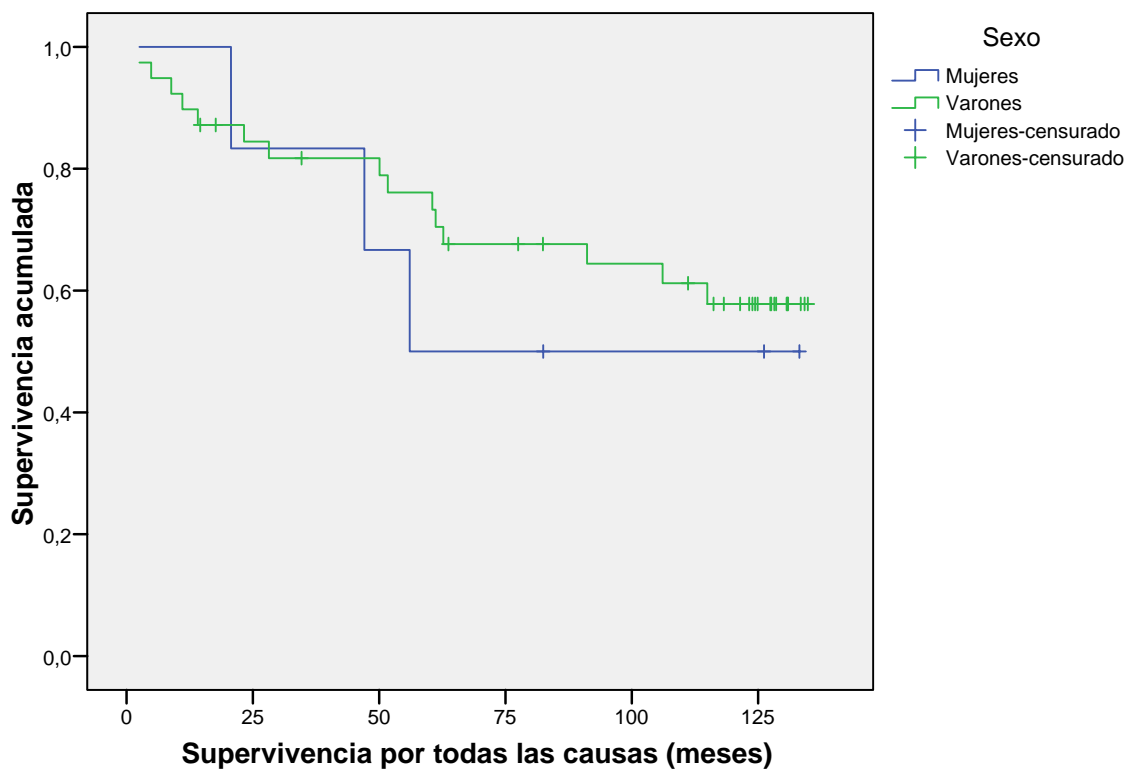


Figura 90: Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del género.

Tabla CXLIV: Tabla de vida para la STC en función del género. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

GENERO		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Varones	EXPUESTOS AL RIESGO	39	32	29	27	24	22	17
	SUCESOS	2	1	0	0	1	3	7
Mujeres	EXPUESTOS AL RIESGO	6	6	5	3	3	3	3
	SUCESOS	0	0	0	0	0	0	3

Funciones de supervivencia

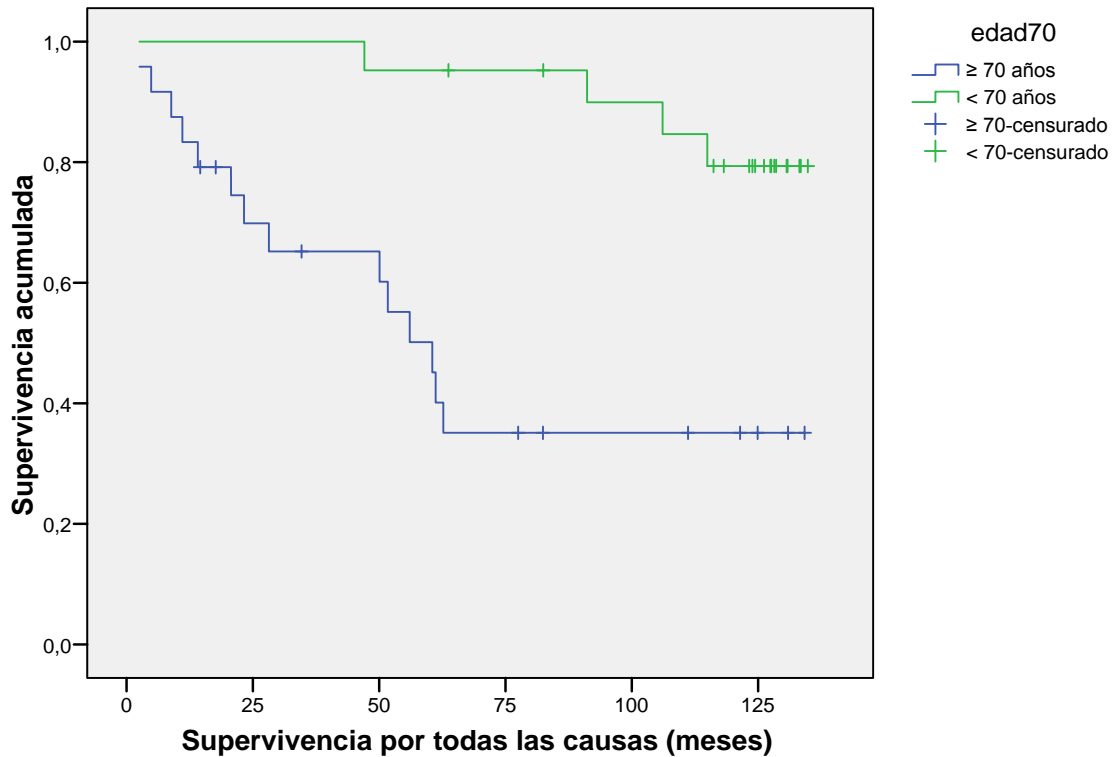


Figura 91: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función de la edad.

Tabla CXLV: Tabla de vida para la STC en función de la edad. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

EDAD		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
≥ 70	EXPUESTOS AL RIESGO	24	17	13	10	7	6	5
	SUCESOS	2	1	0	0	1	1	5
< 70	EXPUESTOS AL RIESGO	21	21	21	20	20	19	15
	SUCESOS	0	0	0	0	0	0	5

Funciones de supervivencia

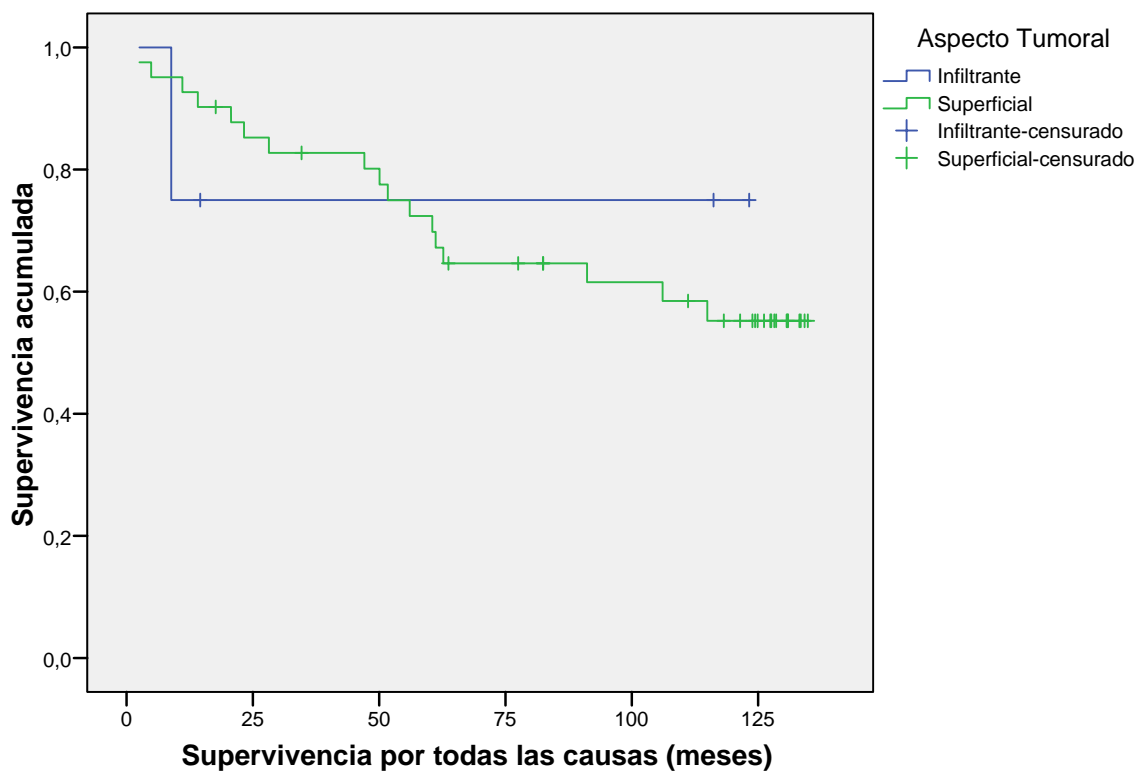


Figura 92: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del aspecto tumoral.

Tabla CXLVI: Tabla de vida para la STC en función del aspecto tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ASPECTO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
SUPERFICIAL	EXPUESTOS AL RIESGO	41	36	32	28	25	23	19
	SUCESOS	1	1	0	0	1	2	19
INFILTRANTE	EXPUESTOS AL RIESGO	4	2	2	2	2	2	1
	SUCESOS	1	0	0	0	0	1	1

Funciones de supervivencia

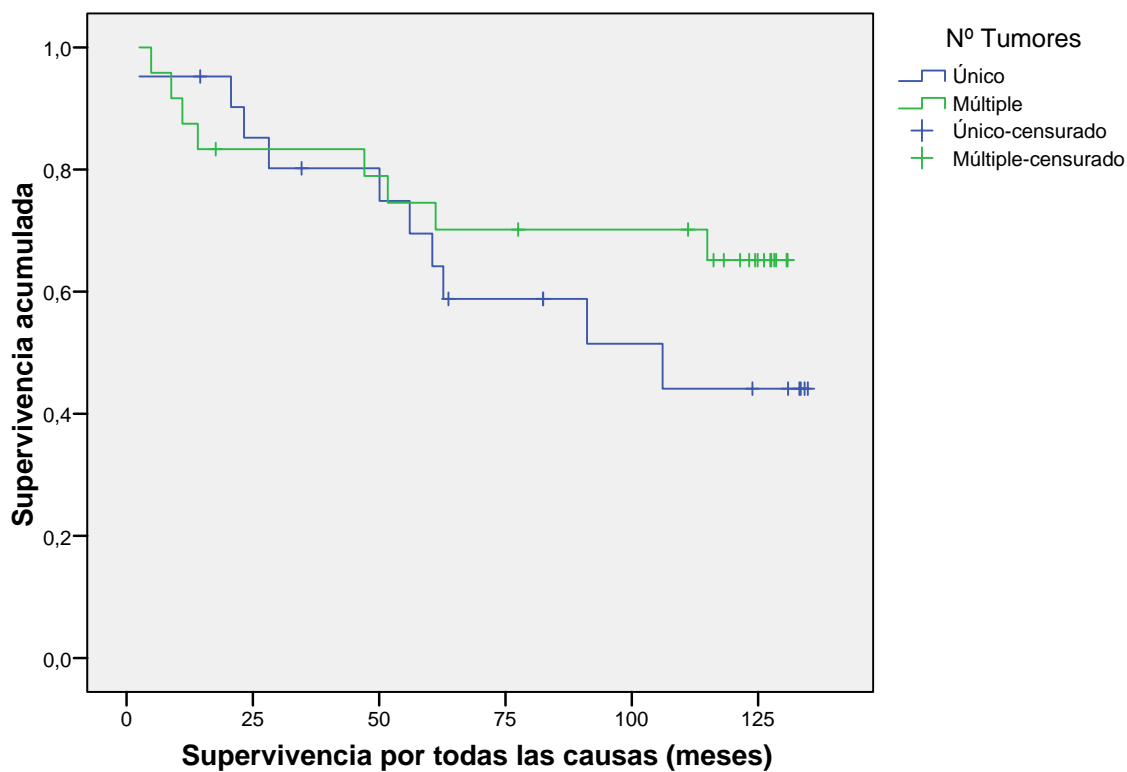


Figura 93: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del número de tumores.

Tabla CXLVII: Tabla de vida para la STC en función del número de tumores. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

NUMERO DE TUMORES		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
UNICO	EXPUESTOS AL RIESGO	41	36	32	28	25	23	19
	SUCESOS	1	1	0	0	1	2	19
MULTIPLE	EXPUESTOS AL RIESGO	4	2	2	2	2	2	1
	SUCESOS	1	0	0	0	0	1	1

Funciones de supervivencia

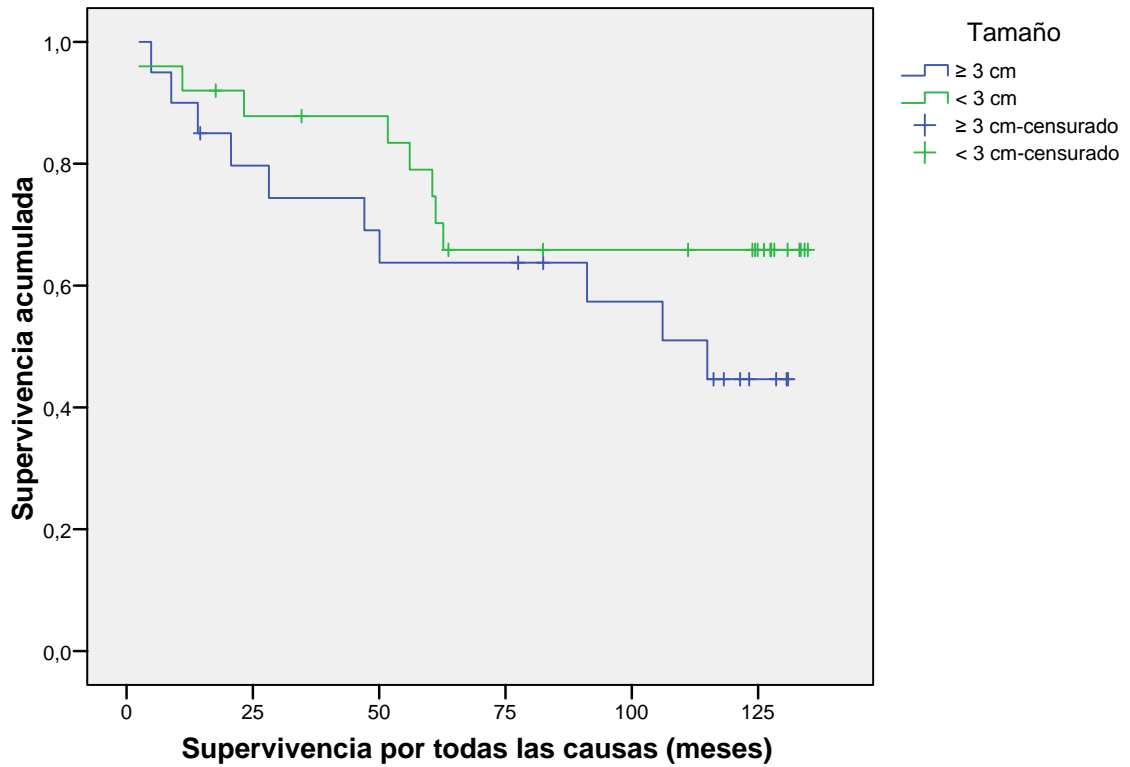


Figura 94: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del tamaño tumoral.

Tabla CXLVIII: Tabla de vida para la STC en función del tamaño tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TAMAÑO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
< 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	20	16	14	12	12	11	7
	SUCESOS	1	0	0	0	0	2	7
≥ 3 cm	EXPUESTOS AL RIESGO	24	19	19	17	16	16	12
	SUCESOS	1	0	0	0	0	3	12

Funciones de supervivencia

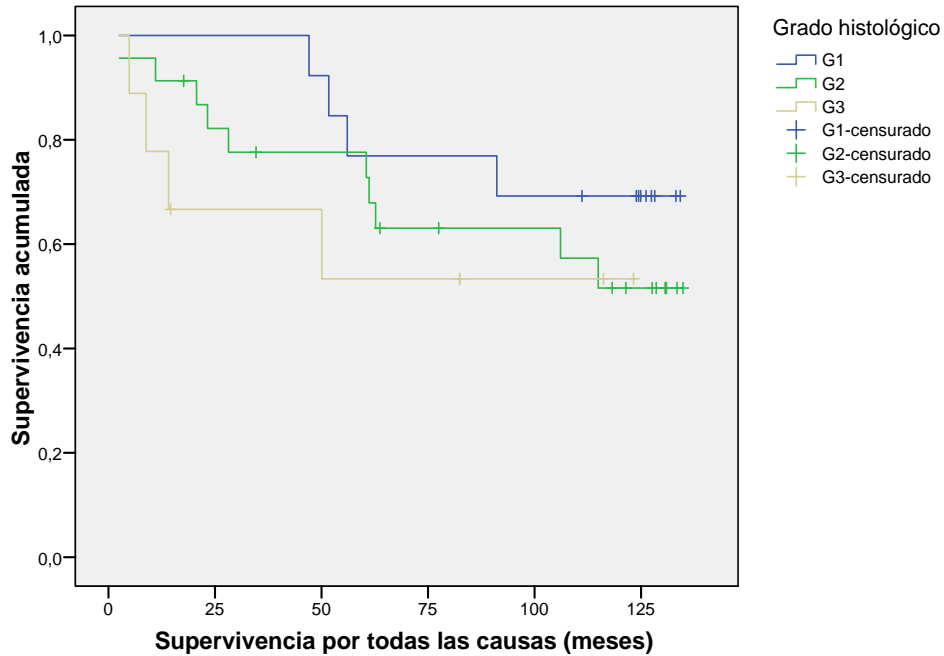


Figura 95: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del grado de diferenciación.

Tabla CXLIX: Tabla de vida para la STC en función del grado de diferenciación. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

GRADO DE DIFERENCIACION		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
G1	EXPUESTOS AL RIESGO	13	13	13	10	10	9	8
	SUCESOS	0	0	0	0	0	1	8
G2	EXPUESTOS AL RIESGO	23	20	16	16	13	13	10
	SUCESOS	1	1	0	0	0	1	10
G3	EXPUESTOS AL RIESGO	9	5	5	4	4	3	2
	SUCESOS	1	0	0	0	1	1	2



Funciones de supervivencia

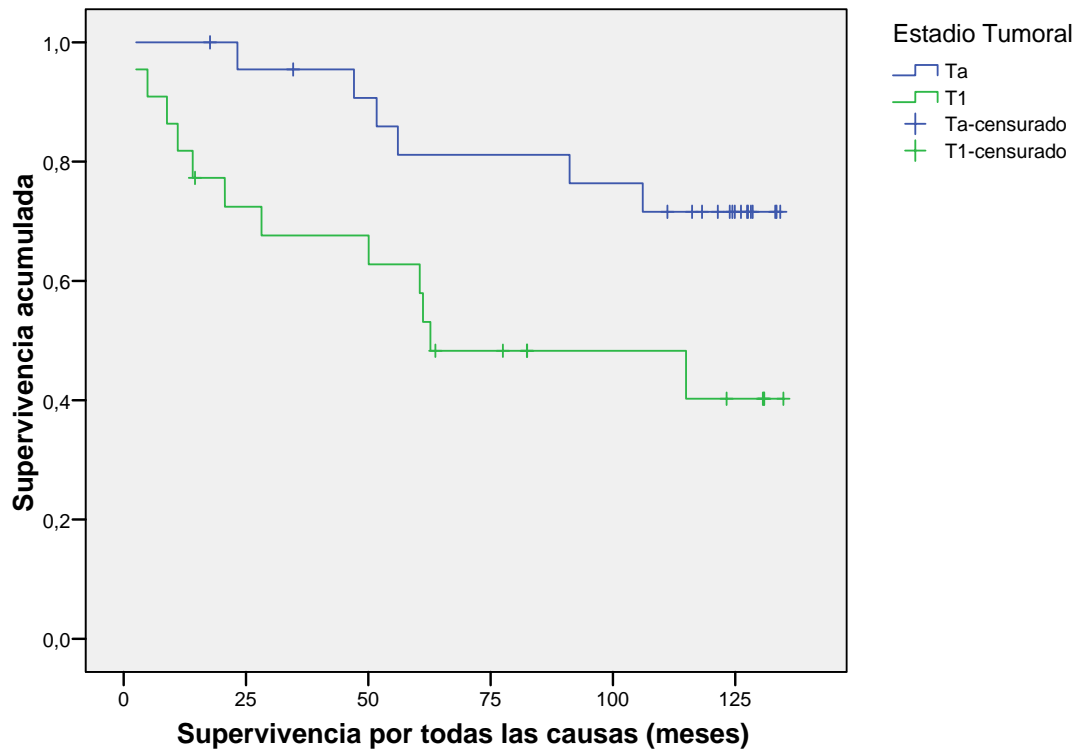


Figura 96: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del estadio tumoral.

Tabla CL: Tabla de vida para la STC en función del estadio tumoral. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

ESTADIO TUMORAL		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
Ta	EXPUESTOS AL RIESGO	23	22	20	17	17	16	12
	SUCESOS	1	1	0	0	0	2	12
T1	EXPUESTOS AL RIESGO	22	16	14	13	10	9	8
	SUCESOS	1	0	0	0	1	0	8



Funciones de supervivencia

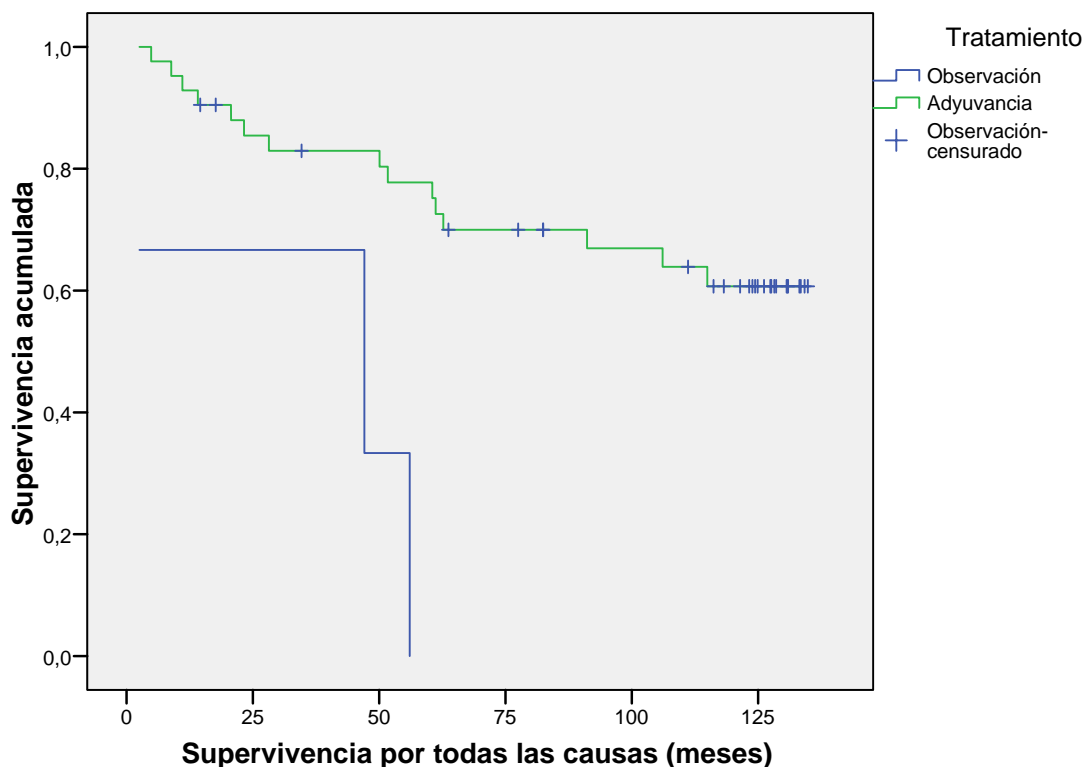


Figura 97: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del empleo de tratamiento adyuvante.

Tabla CLI: Tabla de vida para la STC en función del empleo de tratamiento adyuvante. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TRATAMIENTO ADYUVANTE		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
ADYUVANCIA	EXPUESTOS AL RIESGO	42	36	32	30	27	25	20
	SUCESOS	2	1	0	0	1	3	20
OBSERVACION	EXPUESTOS AL RIESGO	3	2	2	0	0	0	0
	SUCESOS	0	0	0	0	0	0	0

Funciones de supervivencia

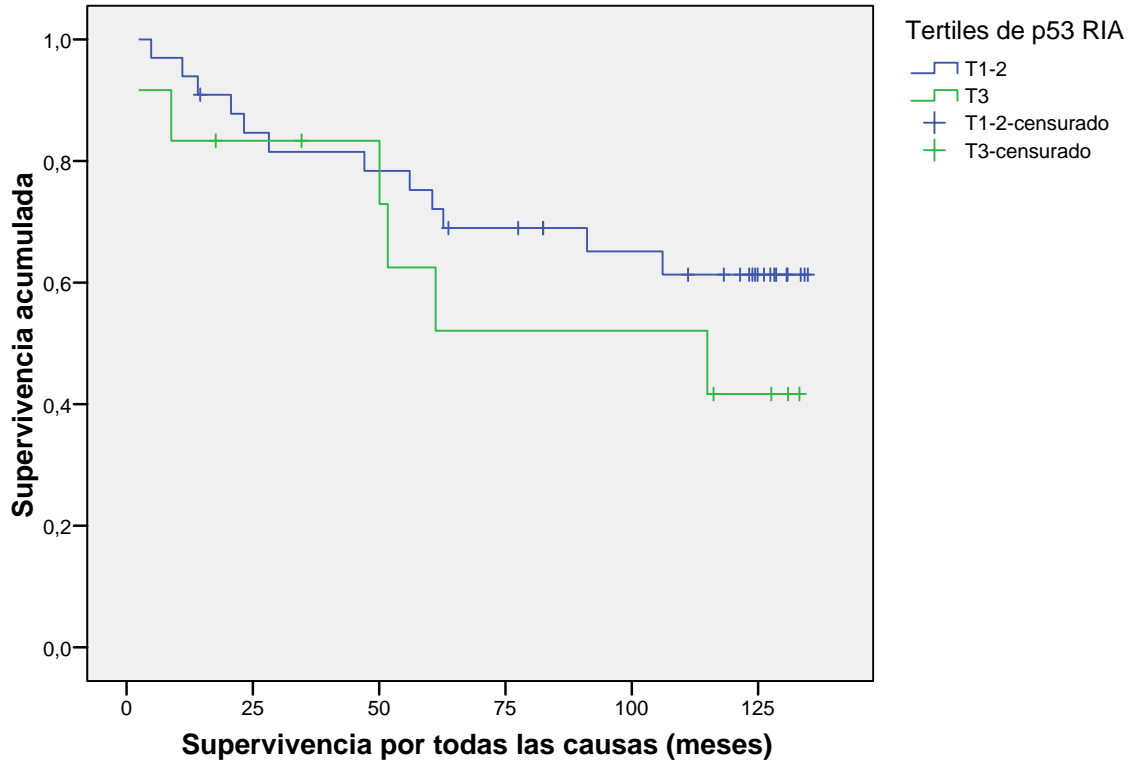


Figura 98: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del tercil de p53 LIA.

Tabla CLII: Tabla de vida para la STC en función del tercil de p53 LIA. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE p53 LIA		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1-2	EXPUESTOS AL RIESGO	33	29	26	24	22	20	17
	SUCESOS	1	0	0	0	1	2	17
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	12	9	8	6	5	5	3
	SUCESOS	1	1	0	0	0	1	3

Funciones de supervivencia

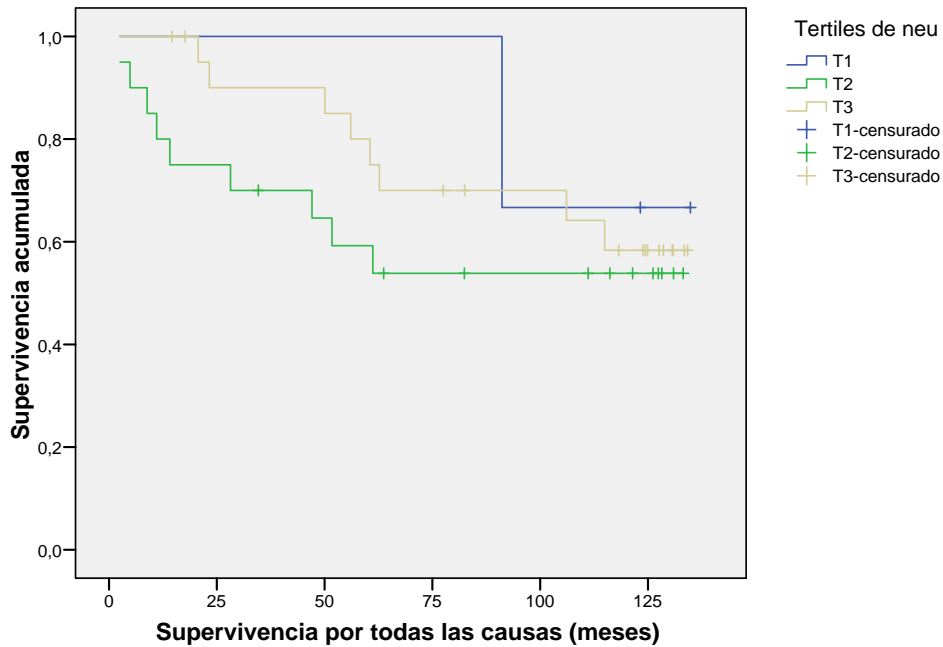


Figura 99: Curva de Kaplan-Meier para la STC en función del tercil de HER2/neu.

Tabla CLIII: Tabla de vida para la STC en función del tercil de HER2/neu. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE HER2/neu		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	3	3	3	3	3	2	2
	SUCESOS	0	0	0	0	0	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	20	15	13	11	10	9	7
	SUCESOS	0	1	0	0	1	2	7
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	22	20	18	16	14	14	11
	SUCESOS	2	0	0	0	0	1	11

Funciones de supervivencia

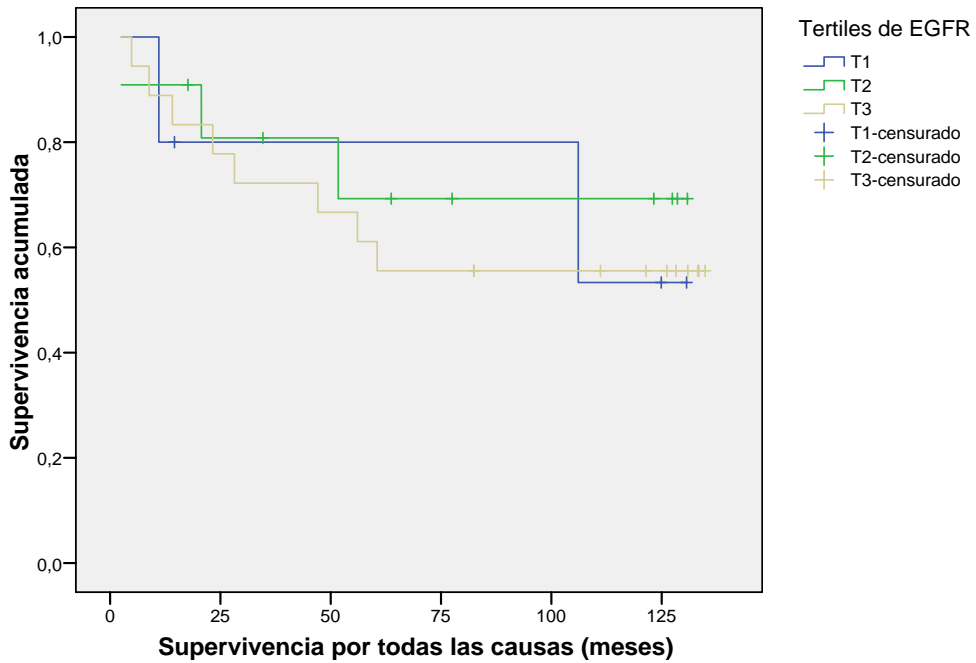


Figura 100: Curva de Kaplan-Meyer para la STC en función del tertil de EGFR.

Tabla CLIV: Tabla de vida para la STC en función del tertil de EGFR. En la primera fila de cada categoría, se detalla el número de pacientes expuestos al riesgo (progresión) y en la segunda el número de pacientes que desarrollan este suceso.

TERTILES DE EGFR		INTERVALO DE TIEMPO (meses)						
		0-20	21-40	41-60	61-80	81-100	101-120	> 120
T 1	EXPUESTOS AL RIESGO	5	3	3	3	3	3	2
	SUCESOS	1	0	0	0	0	0	2
T 2	EXPUESTOS AL RIESGO	11	9	7	6	6	6	6
	SUCESOS	1	1	0	0	0	0	6
T 3	EXPUESTOS AL RIESGO	18	15	13	11	10	9	8
	SUCESOS	0	0	0	0	1	1	8



Tabla CLV: Tabla de vida para la SG: La mediana de tiempo al suceso señala el tiempo en el que la mitad de los individuos han sufrido el suceso y las columnas de los meses, el % de individuos que habiendo alcanzado este tiempo de seguimiento, han desarrollado el suceso. NA; no alcanzada

FACTORES PRONOSTICOS		SUPERVIVENCIA POR TODAS LAS CAUSAS (% DE)						
		MEDIANA (meses)	20 meses	40 meses	60 meses	80 meses	100 meses	120 meses
GENERO	Varones	NA	87,18%	81,73%	76,09%	67,74%	61,20%	57,80%
	Mujeres	56	100%	83,33%	66,67%	50,00%	50,00%	50,00%
EDAD	≥ 70	61	79,17%	65,20%	50,15%	35,11%	35,11%	35,11%
	< 70	NA	100%	100%	95,24%	95,24%	89,45%	73,37%
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	NA	90,24%	82,72%	72,38%	64,63%	61,55%	55,22%
	INFILTRANTE	NA	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%	75,00%
NUMERO DE TUMORES	UNICO	NA	83,33%	83,33%	74,56%	70,18%	70,18%	65,16%
	MULTIPLE	106	95,24%	80,20%	69,51%	58,81%	51,46%	44,11%
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	NA	92%	87,82%	83,43%	65,86%	65,86%	65,86%
	≥ 3 cm	115	85,00%	74,38%	63,75%	63,75%	63,75%	44,63%
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	NA	100%	92,31%	76,92%	69,23%	69,23%	69,23%
	G2	NA	91,30%	77,61%	77,61%	63,06%	63,06%	63,06%
	G3	NA	66,67%	66,67%	53,33%	53,33%	53,33%	53,33%
ESTADIO TUMORAL	Ta	NA	100%	95,45%	81,14%	81,14%	76,36%	71,59%
	T1	63	77,24%	67,61%	67,61%	48,30%	48,30%	40,25%
TRATAMIENTO ADYUVANTE	OBSERVACION	47	66,67%	66,67%	33,33%	0%	0%	0%
	ADYUVANCIA	NA	90,48%	82,94%	77,15%	69,98%	69,98%	63,89%
TERTILES p53 LIA	T1-2	NA	90,91%	81,50%	78,37%	68,97%	68,97%	61,30%
	T3	115	83,33%	83,33%	62,50%	52,08%	52,08%	41,67%
TERTILES HER2/neu	T1	NA	100%	100%	100%	100%	66,67%	66,67%
	T2	NA	75,00%	70,00%	59,23%	53,85%	53,85%	53,85%
	T3	NA	100%	90,00%	80,00%	70,00%	70,00%	58,33%
TERTILES EGFR	T1	NA	80,00%	80,00%	80,00%	80,00%	80,00%	55,33%
	T2	NA	90,91%	80,81%	69,26%	69,26%	69,26%	69,26%
	T3	NA	83,33%	72,22%	61,11%	55,56%	55,56%	55,56%



Tabla CLVI: Supervivencia en relación a las variables predictoras tras análisis mediante la regresión de Cox y test de Log Rank. En la primera columna aparecen las variables predictoras del evento MUERTE. En cada variable, la primera de las categorías actúa como referencia. Los valores proceden de comparar cada categoría con su categoría de referencia. RR: razón de riesgo cruda. IC 95%: intervalo de confianza para el 95% de las observaciones. LR: Log Rank.

FACTORES PRONOSTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA POR TODAS LAS CAUSAS		RRC	IC 95%	p	RRA	p
GENERO	Varones	1	-	-	1	-
	Mujeres	1,4	0,4-4,88	0,58	3,45	0,59
EDAD	≥70	1	-	-	1	-
	<70	0,16	0,053-0,51	0,002	0,08	<0,001
ASPECTO TUMORAL	SUPERFICIAL	1	-	-	1	-
	INFILTRANTE	1,33	0,17-10,06	0,77	12,50	0,23
NUMERO DE TUMORES	UNICO	1	-	-	1	-
	MULTIPLE	1,63	0,64-4,16	0,3	0,93	0,0,30
TAMAÑO TUMORAL	< 3 cm	1	-	-	1	-
	≥ 3 cm	1,75	0,69-4,43	0,24	1,42	0,23
GRADO DE DIFERENCIACION	G1	1	-	-	1	-
	G2	1,74	0,54-5,57	0,34	1,75	0,41
	G3	2,48	0,61-9,99	0,2		
ESTADIO TUMORAL	Ta	1	-	-	1	-
	T1	2,98	1,11-8,03	0,03	5,17	0,002
TRATAMIENTO ADYUVANTE	ADYUVANCIA	1	-	-	1	-
	OBSERVACION	6,76	1,82-25	0,004	10,91	0,012
TERTILES p53 LIA	T1-2	1	-	-	1	-
	T3	1,67	0,62-4,46	0,3	1,07	0,30
TERTILES HER2/neu	T1	1	-	-	1	-
	T2	2,07	0,26-16,41	0,49	1,05	0,59
	T3	1,35	0,17-10,82	0,78		
TERTILES EGFR	T1	1	-	-	1	-
	T2	0,69	0,11-4,14	0,68	0,39	0,82
	T3	1,04	0,22-4,92	0,96		



Discusión



6. DISCUSIÓN

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

A. JUSTIFICACIÓN

Debido a su larga supervivencia, al precio del tratamiento, y a la necesidad de revisiones durante largo plazo, el coste por paciente del cáncer de vejiga desde el diagnóstico hasta la muerte es el más alto de todos los cánceres²¹⁴, habiendo siendo estimado entre 96.000 y 187.000 dólares por paciente y año²¹⁵. Estas cifras le suponen ocupar el quinto lugar entre los distintos tumores en términos de gastos totales de asistencia médica en EEUU, con un coste total de casi 3.7 mil millones dólares al año²¹⁶. La prevención primaria, la detección temprana del CCT y de su recurrencia y progresión, son por tanto, objetivos fundamentales para los urólogos².

Como ya se ha mencionado en varias ocasiones, el 75-80 % de los tumores vesicales son superficiales en el momento del diagnóstico, y un porcentaje entre el 40 y el 80 % de estos pacientes desarrollan recidivas locales, con una frecuencia de progresión hacia estadios avanzados de entre el 10 y el 20 % de estos casos, existiendo una relación proporcional entre frecuencia de recidivas, progresión y mortalidad⁸⁴. Todo ello, origina que el paciente diagnosticado de TVS necesite frecuentes controles en su seguimiento, que en la actualidad se realiza mediante pruebas diagnósticas. A día de hoy, la cistoscopia y la citología siguen siendo las pruebas capitales para el seguimiento del TVS. Desde sus inicios, la cistoscopia se ha desarrollado como el pilar para el diagnóstico y vigilancia del CCT vesical, con una alta sensibilidad y especificidad para detectar lesiones^{214,217,218}. Éste es, sin embargo, un procedimiento invasivo, que causa molestias a los pacientes y provoca un gran número de visitas en seguimiento mientras que, como discutiremos más adelante, la utilidad de la citología sigue siendo limitada.



Con el fin de mejorar los criterios de seguimiento de los TVS, tradicionalmente los FP utilizados para ayudar a predecir el comportamiento futuro han sido fundamentalmente histopatológicos, entre ellos la multiplicidad, la clasificación por grados de diferenciación, y la estadificación en niveles de infiltración tumoral. Sin embargo, tampoco ninguno de ellos es considerado en la actualidad lo suficientemente sensible o específico como para modificar las pautas de seguimiento en el TVS.

Por una parte, porque estos parámetros dependen del espécimen y de la habilidad del patólogo, habiendo actualmente controversia en la interpretación tanto del grado como del estadio. Por otra, porque el cáncer vesical puede tener distinto comportamiento en diferentes pacientes aún presentándose en el mismo grado y estadio. Por lo tanto, el disponer de algún marcador de otro tipo que pudiera predecir con precisión la posibilidad de recurrencia, el riesgo de progresión y la probable supervivencia en el paciente con cáncer vesical sería de gran utilidad, y permitiría individualizar el tratamiento en base a características específicas de cada tumor. Parece por tanto de máximo interés tratar de, mediante nuevas líneas de investigación, identificar factores que mejoren la comprensión del comportamiento biológico del tumor.

Actualmente, los mecanismos que median el comportamiento heterogéneo de los tumores permanecen aún en parte desconocidos, si bien, se sabe que es en la propia célula neoplásica donde se encuentran muchas de las características que van a determinar el comportamiento biológico tumoral¹³². El desarrollo de las técnicas de biología molecular en los últimos años ha supuesto un poderoso impulso para la investigación oncológica, permitiendo estudiar los genes específicos que controlan la proliferación y diferenciación celular (protooncogenes, genes supresores y genes reparadores), y aportando información sobre las modificaciones genotípicas y fenotípicas acaecidas en las células cancerosas²¹⁹.

El reciente mapeo del genoma humano, junto con los avances en la tecnología genética y proteómica han dado lugar a una explosión de la información biológica y a la identificación de un gran número de sustancias candidatas a ser catalogadas como biomarcadores moleculares o dianas terapéuticas. Esta explosión de conocimientos sobre los procesos biológicos básicos y la genética del cáncer han llevado a un creciente optimismo acerca de que este conocimiento pueda ser objeto de un uso clínico práctico en un futuro próximo para llevar a cabo una medicina más



individualizada. De hecho, ya se pueden encontrar ejemplos importantes en las áreas del descubrimiento de fármacos y su desarrollo, en el diagnóstico de enfermedades y su clasificación, en la selección de los regímenes terapéuticos para pacientes individuales, y en el diseño de ensayos clínicos. En este contexto, la proteómica presenta un vasto potencial para descubrir nuevos biomarcadores oncológicos que podrían ayudar a diagnosticar el cáncer en una etapa temprana o establecer perfiles específicos de tumores que podrían presentar una agresividad distinta.

El conocimiento de las alteraciones en estos genes, y de las proteínas sintetizadas por los mismos, está abriendo nuevos caminos en la lucha contra el cáncer. En este sentido, la determinación tisular de las proteínas codificadas por oncogenes y de genes supresores, ha demostrado ser de utilidad en el establecimiento del pronóstico tumoral. Diversas moléculas y características de las células tumorales, como el Ki-67, Rb, pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9, p-27, ciclina D1, E-cadherina y otras, están siendo estudiadas como posibles herramientas pronósticas de utilidad en el CV^{220,221}.

En la actualidad, los datos disponibles acerca del valor pronóstico de muchos marcadores moleculares en el CCT 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. Entre las diferentes moléculas cuyo valor pronóstico ha sido estudiado en CV, poseen un interés especial las proteínas implicadas en el control del ciclo celular, debido a su posible papel predominante en la carcinogénesis de este tumor. Un artículo reciente de Netto¹⁹⁷ señala cuáles se pueden considerar en la actualidad como factores pronóstico moleculares de futuro en el TVS (Tabla CLVII).

De entre todos ellos, Mitra et al²²² resaltan el papel preponderante de los receptores de crecimiento celular, y de la proteína p53 en el CCT.

Es por ello que propusimos realizar un estudio acerca de la utilidad de tres diferentes proteínas tumorales (EGFR, HER2/neu, y p53) que habían demostrado ser utilidad en la caracterización y pronóstico tanto en otros tumores¹⁸⁴, como en el CCT⁵², y dentro de ellos, ser de cierta utilidad en la predicción de recidiva y progresión del TVS^{278,279,221}.

Tabla CLVII: FP moleculares emergentes en el TVS¹⁹⁷.

- FISH multitarget
- Mutación/sobreexpresión de FGFR3
- Alteraciones del HRAS
- Grado molecular (mG)
- Índices de proliferación (Ki67, MIB1)
- **Acumulación/inactivación de p53**
- Regulación a la baja de la expresión de pRb1, p21, p27
- Sobreexpresión de ciclina D3 y ciclina D1
- **Sobreexpresión de familia ERBB**
- Pérdida de E-cadherina
- Análisis de expresión de multimarcadores 8P53, P27, Ki67, pRb1, p21
- Paneles de expresión génica arrays
- Estatus de DNA ploidía y cinéticas de fase S
- Sobreexpresión de marcadores de angiogénesis (VEGF, HIF 1A, THBS1)
- Promotores de hipermetilación (RASSF1, DAPK, APC, CDH1, EDNRB)

Con respecto a la elección de las técnicas de estudio utilizadas, dada la orientación eminentemente dirigida a la aplicación práctica que posee la investigación en factores pronósticos, clásicamente la IHQ ha sido el método más ampliamente utilizado en la evaluación de marcadores proteicos a nivel tisular. La IHQ puede resultar fácilmente utilizable en la práctica clínica, sin requerir un incremento excesivo en la sofisticación técnica y el coste del proceso. La IHQ, 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 controvertidos²²³⁻²²⁸. Otras técnicas moleculares de mayor complejidad, 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) y las micromatrices de tejido, son de gran interés en la investigación básica, pero su aplicación en la práctica asistencial es por el momento escasa. Tanto el RIA como el ELISA o la LIA son técnicas baratas, de gran sensibilidad (pudiendo detectar cantidades inferiores a los 100 pg/ml de proteína), y utilizan cantidades de reactivos muy escasas.

Teniendo en cuenta los modestos resultados obtenidos mediante las técnicas IHQ empleadas tradicionalmente para realizar este tipo de análisis, la ventaja teórica que aportan las técnicas de cuantificación proteica al ser independientes del observador, y a los buenos resultados obtenidos con diferentes métodos de cuantificación proteica en otros tumores²²⁹⁻²³², decidimos decantarnos por valorar la utilidad de distintas técnicas cuantitativas en el CV dado que la determinación proteica de todas ellas parece ser de mayor utilidad que el análisis genético. Para afirmarlo, nos basamos en los hallazgos realizados en los siguientes estudios revisados:

A.1. Utilidad del estudio de TP53 y su producto p53 en el cáncer vesical

Como en cualquier otra proteína, el análisis de las alteraciones del p53, se puede realizar mediante análisis molecular a nivel del gen, o mediante el estudio de su producto proteico. Para el análisis a nivel génico, la amplificación mediante la técnica de la PCR seguida de secuenciación, permite estudiar directamente la mutación específica que afecta al gen TP53. En el 90% de los casos, esta alteración se trata de una mutación puntual que puede ocurrir en 90 de los 393 aminoácidos que conforman la proteína, pero se han descrito hasta la actualidad más de 28.000 mutaciones somáticas de este gen consignadas en la base internacional de datos TP53²³³. Esta gran heterogeneidad de mutaciones, dificulta el uso rutinario de esta técnica en la clínica diaria, y hace que solo se emplee para estudios epidemiológicos.



Existen otros métodos indirectos para detectar las alteraciones del gen *TP53* como el análisis de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP (single strand conformation polymorphism)), el análisis de gradiente de desnaturalización del gel de electroforesis DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), y el análisis del gel de electroforesis desnaturalizado (CDGE (constant denaturant gel electrophoresis) que realizan el análisis genético del *TP53* entre los exones 5-9 y como se sabe desde hace tiempo, en un porcentaje de casos no despreciable (5-8%) las mutaciones se realizan fuera de esas regiones²³⁴.

Si bien estas técnicas presentan buena correlación con el análisis molecular²³⁵, se sabe que existen mutaciones con pérdida de la expresión de p53 (mutaciones silentes, inserciones y deleciones) y proteínas de origen viral (oncoproteína E6) que inducen el rápido catabolismo de la proteína p53, que proporcionan resultados negativos con el análisis mediante estas técnicas²³⁴.

El análisis IHQ y el LIA determinan la expresión de la proteína mutada en vez del gen tumoral. Con la IHQ se visualiza la acumulación nuclear de la proteína, mientras que el LIA permite la cuantificación de la proteína en las células tumorales.

Numerosos datos experimentales soportan el concepto de que la tinción nuclear está estrechamente relacionada con la presencia de mutaciones intragénicas de *TP53*, pero es bien sabido que el análisis IHQ también presenta numerosas limitaciones inherentes al mismo. No hay que olvidar que la IHQ no es capaz de detectar mutaciones "nonsense", y que un 30-40% de posibles mutaciones detectadas por IHQ no son confirmadas por secuenciación. Por otra parte, las variaciones en la técnica, el uso de diversos anticuerpos, la heterogeneidad tumoral, y la falta de estandarización de los valores usados para definir como positiva una tinción (desde un determinado porcentaje de células teñidas como punto de corte, que puede o no haberse establecido a priori, y haber sido determinado arbitrariamente en el 10%²³⁶⁻²³⁸, 5%²³⁹ ó 40%²⁴⁰ según autores, pasando por el valor mediano^{241,242}, hasta el empleo de numerosos puntos de corte para determinar cuál es el óptimo^{243,244}) contribuyen a la escasa fidelidad de los resultados puramente basados en la IHQ. Es por este motivo por el que algunos investigadores se han mostrado escépticos en cuanto al papel del análisis de expresión proteica de la p53 mediante IHQ como factor pronóstico de tumores. Otros motivos de escepticismo acerca del valor del análisis del producto génico en cuanto a la interpretación de resultados, es la posibilidad de variación entre el empleo de cortes congelados o



parafinados y el hecho de que determinados tumores pueden sobreexpresar la proteína en ausencia de su alteración genética, como consecuencia de su estabilización mediante la formación de complejos con otras proteínas celulares o virales²⁴⁵. Recientes estudios²⁴⁶ indican también que la proteína p53 “wild type” puede acumularse en el marco de una activación normal de p53, incluyendo situaciones como la hipoxia y el daño al DNA²⁴⁷.

A pesar de todo ello, en el cáncer vesical, se sabe que existe una fuerte correlación positiva entre la inmunorreactividad y las mutaciones del gen *TP53*^{235,248}. Varios investigadores han relacionado las alteraciones genotípicas y fenotípicas de la p53 en el CCT. Esrig et al²⁴⁹, describieron una relación altamente significativa entre la mutación del *TP53* y la tinción positiva para IHQ y Cordon-Cardo et al²⁵⁰, que también encontraron una fuerte asociación entre p53 IHQ y SCCP y secuenciación de DNA.

Por todo ello pensamos que la cuantificación de los niveles de proteína pudiera aportar alguna objetividad al estudio de p53 en el CCT, siendo de utilidad para la predicción del pronóstico de este tumor del mismo modo que lo ha demostrado en otros tumores^{199,229,230,251-253}.

A.2. Utilidad del estudio de c-erb-2 y su producto HER2/neu en cáncer vesical

La mutación del gen HER2 es un fenómeno poco específico²⁵⁴ y su amplificación génica es un fenómeno poco común en el CCT^{255,256}. En un reciente estudio de Cogan et al³¹⁹ sobre 54 CTT, se observó un 26% de sobreexpresión proteica de las muestras en el estudio IHQ (con diferencias estadísticamente significativas dependientes de grado y estadio), mientras que ninguna de las mismas (0%) presentaba amplificación génica en el estudio FISH, concluyendo que la amplificación génica no parece ser el mecanismo de sobreexpresión de c-erbB-2 en el CCT. Aún más recientemente Amsellem-Ouzana et al²⁵⁷ llegan a las mismas conclusiones mediante un estudio de RT-PCR que demostró un 34,2% de positividad IHQ y un 5,5% para DNA RT-PCR. Otro reciente estudio de Caner et al²⁵⁸, orienta hacia el mismo sentido al respecto de la mayor fiabilidad del análisis de la sobreexpresión de HER2/neu frente a la amplificación del gen *c-erbB.2*.



Históricamente el método más comúnmente utilizado hasta la actualidad para determinar la sobreexpresión de la oncoproteína HER2/neu también ha sido la IHQ^{259,260}, aunque también en esta proteína su empleo presenta varias complicaciones. La variabilidad en la sensibilidad (6 a 80%) de los anticuerpos disponibles en el mercado^{261,262}, la pérdida de sensibilidad secundaria a la alteración de epítomos sufrida durante la fijación estándar de los tejidos^{263,264}, y el carácter subjetivo de su interpretación²⁶⁵ limitan su utilidad. Las técnicas de cuantificación han demostrado solventar gran parte de estos problemas, demostrando un buen perfil de correlación con la IHQ clásica²⁶⁶.

De entre ellas, desde hace tiempo se ha demostrado in vivo que, la cuantificación del dominio extracelular de HER2/neu puede realizarse inmunológicamente mediante la técnica de ELISA²³² con buenos resultados tanto en el diagnóstico como en la monitorización de la respuesta tratamiento²⁶⁷. El ELISA ha mostrando para otros tumores una muy buena correlación en otros tumores, tanto con la positividad del estudio histoquímico²⁶⁸, como con la amplificación génica en niveles altos y bajos de HER2/neu²⁶⁹, y una mejor discriminación en los niveles intermedios de esta proteína²⁶⁴, hecho este que nos llevó a pensar que pudiera ser de utilidad para identificar de un modo más apropiado que las técnicas cualitativas subgrupos de pacientes de mayor y menor riesgo, del mismo modo que lo ha hecho en otros tumores^{264,270}.

A.3. Utilidad del estudio de c-erb-1 y su producto EGFR en el cáncer vesical

En cuanto al empleo del EGFR, pese a que está claramente descrita la sobreexpresión de EGFR en el CCT¹⁵⁰ las anomalías de este gen son excepcionales. Tal es así que en el estudio de Berger et al²⁷¹ para el CCT, no hallaron deleciones, truncamientos o reordenamientos importantes en las regiones estudiadas del gen *c-erbB-1*, pero sí identificaron un tumor con una multiplicación 8-10 veces superior de dicho gen. Wood et al²⁷² en un estudio sobre 12 tumores tampoco hallaron datos de multiplicación de DNA del EGFR, encontrando sin embargo, sobreexpresión del producto en 5 de los 14 tumores. Gorgoulis et al²⁷³ publicaron un caso de multiplicación del gen de EGFR sobre 35 tumores. Este paciente presentaba un tumor T3a G3 y falleció a los 12 meses del diagnóstico. Parece por tanto que las anomalías del gen *c-erbB-1* en el CCT no producen información diagnóstica, y cobra importancia el análisis del producto génico en sí.



Sin embargo, la sobreexpresión de EGFR en el CCT ha sido ampliamente descrita en la literatura^{167,274-276} y varios estudios han demostrado que la positividad de EGFR se ha asociado con el alto grado, la progresión tumoral y la disminución de la supervivencia^{274,275,277}. El mecanismo por el que la sobreexpresión de EGFR se asocia a la progresión del CCT no está enteramente dilucidado, aunque existe alguna evidencia asociando la activación del EGFR con el factor activador de la transcripción de la proteína-1 que produce una inducción de la actividad de una metaloproteínasa de matriz²⁷⁸.

Diferentes técnicas de cuantificación, han mostrado su utilidad en diversos tumores, tanto en tejido fresco como fijado²⁷⁹⁻²⁸². Desde la descripción de su utilidad para este propósito²³¹, el RIA ha sido una técnica empleada en muchos estudios para establecer los niveles de EGFR en tejido neoplásico de diferentes tipos de tumores^{283,284} por medio cada vez de métodos más sensibles y específicos^{285,286}, y se ha demostrado una técnica eficaz, y que puede llevarse a cabo con pequeñas muestras de tejido²⁸⁷. Existen otras muchas técnicas que permiten la cuantificación de este factor de crecimiento, entre las cuales, también ha demostrado ser de gran utilidad el ELISA²⁸⁸⁻²⁹⁰, y la citometría de flujo^{291,292}, empleada por otros grupos para realizar este mismo análisis. Concretamente en el CCT, el RIA ha demostrado que, además de presentar una buena correlación con el estudio IHQ a altas concentraciones de EGFR (> 35 fmol/mg) es un método más sensible que esta última a concentraciones bajas o moderadas (como las que presentan la mayoría de los TVS)²⁹³.

B. DISEÑO

Conceptualmente, el desarrollo de nuevos marcadores tumorales debe ser un proceso que es similar a la evaluación de fármacos terapéuticos. El desarrollo de fármacos es un proceso altamente regulado con fases cuidadosamente regulados desde el descubrimiento de aplicaciones humanas. En 2002, la Red de Investigación de Detección Temprana del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU desarrolló un enfoque de cinco fases para el descubrimiento y evaluación sistemática de marcadores tumorales^{294,295}. Las fases de la investigación se deben ordenar generalmente de acuerdo con la fuerza de la evidencia que cada uno proporciona a favor del marcador tumoral. Obtener resultados positivos de las fases anteriores es generalmente necesario para abordar el



diseño las fases posteriores. En nuestro estudio, diseñamos un estudio Fase 0 y Fase 1, que incluyen procesos de descubrimiento y optimización del marcador (definición del marcador, y determinación de los puntos de corte de ensayo en una población definida), la prevalencia de la alteración que se utilizará como determinante, el desarrollo de ensayos preliminares en muestras de pacientes para evaluar la reproducibilidad de prueba, su relevancia, y la prueba en un pequeño grupo de pacientes para determinar su capacidad para discriminar entre individuos sanos y enfermos.

A la hora de decidir qué tumores incluir y excluir de este estudio, observamos que la mayoría de los estudios publicados acerca de la utilidad de FP moleculares, incluían en el mismo conjunto todo tipo de tumores^{296,297}. Este hecho, unido a la escasez de estudios con análisis multivariante^{196,298} hacen que se obtengan conclusiones falseadas acerca de la utilidad de los marcadores, en tanto en cuanto, tumores superficiales e infiltrantes, o de alto o bajo grado presentan diferente pronóstico, y diferentes concentraciones de estos marcadores. Es por ello que a la hora de diseñar nuestro estudio tuvimos claro que debía de tratarse de escoger un solo grupo de tumores entre TVS y TVI, y tratar de evitar los sesgos objetivados en estudios previos mediante el análisis de supervivencia y el estudio multivariante.

En nuestro caso, decidimos utilizar el conjunto de los TVS Ta y T1 pese que este conjunto en global presenta diferencias de pronóstico en cuanto a progresión^{66,60,69,72,84} y mortalidad⁷⁵, en base a que a día de hoy, los TVS se tratan como una única entidad de manejo clínico⁹⁸, a que presentan unas vías de desarrollo moleculares similares^{58,197}, y a que, incluso dentro del propio estadio T1 se han propuesto diversas subestadificaciones en función de su diferente pronóstico²⁹⁹⁻³⁰². Por estos motivos, y dada la incapacidad para distinguir antes del análisis histopatológico entre los distintos TVS (Ta vs T1), hemos tratado de evitar el sobregasto de recursos que supondría una atomización excesiva de los grupos a analizar.

En cuanto a los criterios de exclusión, decidimos excluir para este estudio los pacientes a los que se les detecto CIS en el análisis histopatológico, bien como tumor primario o en las muestras de BMN, por tratarse ésta, como se ha visto, de una enfermedad con comportamiento clínico radicalmente distinto^{71,86,43} y con unas vías de desarrollo molecular absolutamente independientes del resto de TVS⁵⁸,



Con respecto a la gradación tumoral, planteamos la posibilidad de reestadificar los tumores utilizando la clasificación de consenso OMS/ISUP de 1998^{77,303}, pero finalmente nos decantamos por mantener la de la OMS de 1973⁴², puesto que debido a su popularidad, es, la clasificación que sigue siendo más aceptada en la actualidad, la que sigue utilizando la mayor parte de los ensayos clínicos que se siguen publicando en la actualidad^{304,305}, y debido al hecho de que la misma EAU reconoce que hasta que dicha clasificación no se haya validado en estudios clínicos a largo plazo, se puede seguir empleando¹¹.

Se excluyeron también los tumores recidivados, por la posibilidad de presentar éstos una historia natural diferente de la del TVS primario dada su mayor frecuencia de recidivas a partir del segundo episodio^{62,64}, y por la posibilidad de que el tratamiento adyuvante administrado, pudiera alterar la biología molecular de los subsiguientes tumores.

Vickers et al³⁰⁶ revisaron una muestra de 129 estudios para determinar si los análisis estadísticos utilizados permitiría extraer conclusiones sobre la utilidad clínica de los marcadores estudiados. Los autores encontraron que la mayoría de los artículos sobre los marcadores tumorales se centraron en probar la hipótesis nula de asociación o no entre el marcador y el resultado del cáncer. Sólo una pequeña minoría de ellos (11%), informaron de su exactitud predictiva, y ni uno sólo utilizó un diseño estadístico dirigido a valorar si el uso del mismo en la práctica mejoraría los resultados clínicos. Es por ello que la hora de escoger el tamaño muestral, decidimos que deberíamos hacer una serie limitada de casos con el fin de comparar si predecía una sustancial mejora de las pruebas empleadas en la actualidad. Dado que se trataba de realizar un estudio experimental, tuvimos claro que en la actualidad, es necesario encontrar herramientas de trabajo de utilidad práctica, aplicabilidad clínica y capaces de mejorar la toma de decisiones³⁰⁷. De nada sirve obtener diferencias estadísticamente significativas si el número de pacientes a realizar la prueba hace que no tenga sentido alguno su empleo en la práctica clínica habitual.

Para definir el tiempo de seguimiento, tuvimos en cuenta el hecho de que cada vez existe más evidencia de que la recurrencia y progresión de los TVS, especialmente en los riesgos intermedio y alto riesgo, se puede producir después de más de 10 años de SLE^{78,308}, por lo que muchos autores



aconsejan no finalizar seguimiento nunca en los TVS de alto riesgo³⁰⁸ y por ello decidimos hacer un análisis de resultados a largo plazo.

Debido al hecho ya mencionado de que no existen artículos publicados acerca de la utilidad pronóstica del análisis cuantitativo de p53, HER2/neu o EGFR en el CCT fuera de las publicaciones de nuestro grupo³⁰⁹⁻³¹², nos propusimos en primer lugar determinar el valor biológico de estas determinaciones para conocer si éstas eran capaces de discriminar entre muestras pertenecientes a distintos estados de salud y enfermedad. Para ello, decidimos comparar las concentraciones promedio de nuestros marcadores en los TVS, frente a las detectadas en el tejido procedente de diferentes controles. De este modo, estos mismos marcadores, fueron analizados en un grupo Control Negativo de individuos, y en otro grupo Control Positivo compuesto por pacientes con TVI con el fin de comparar si la concentración de estos productos en las muestras de TVS era significativamente distinta a la de la mucosa vesical sana, y a la de TVI.

De cara a planificar como obtener muestras control, en cuanto al Control Positivo, optamos por obtener muestras de RTUv en TVI mediante el mismo método que el empleado para obtenerlas en TVS. Preferimos este método frente la obtención de muestras de tumor en el acto de la cistectomía para contrarrestar el posible sesgo que pudiera producir la presencia de diatermia en el tejido procedente de las muestras de TVS y su ausencia en las muestras obtenidas la de intervención abierta.

En cuanto a las muestras Control Negativo, a la hora de planear su obtención, encontramos varias posibilidades:

1. Obtener tejido histopatológicamente sano en el mismo acto de la RTU o en la posterior cistectomía de pacientes con tumores vesicales.
2. Analizar piezas procedentes de necropsia y/o extracciones multiorgánicas.
3. Obtener especímenes de tejido vesical sano procedente de pacientes sometidos a intervención quirúrgica por hiperplasia benigna de próstata.



Cualquiera de las formas de obtención mencionadas presenta inconvenientes evidentes. En este sentido creemos que la obtención de muestras de tejido de aspecto sano en pacientes sometidos a RTUv o cistectomía por tumor no son las formas más indicadas, debido a que se sabe que las neoplasias uroteliales vesicales en realidad no son enfermedades localizadas exclusivamente en la zona de lesión excrecente, y se ha demostrado la presencia de alteraciones a nivel de estos marcadores en áreas histológicamente sanas de pacientes con CCT³¹³. La posibilidad de obtener la muestra en necropsias tiene asimismo dos posibles sesgos: desestructuración de las proteínas al poco tiempo del fallecimiento y la dificultad de la obtención de las mismas. Por todo ello creímos conveniente optar por un sistema sencillo de obtención de muestras de Control Negativo basado en la posibilidad de extraer muestras de tejido urotelial en pacientes sometidos a intervención quirúrgica por hiperplasia benigna de próstata. Y dentro de ellos, decidimos optar por muestras de pacientes sometidos a RTUp frente a las de pacientes sometidos a adenomectomía para, del mismo modo que en las muestras de TVI, eliminar el posible sesgo que pudiera producir la presencia de diatermia en el tejido procedente de las muestras de TVS y su ausencia en las muestras obtenidas de adenomectomía.

Obviamente el diseño de este estudio presenta muchas limitaciones:

Las limitaciones del tamaño muestral son evidentes, y aunque ya explicamos el motivo de las mismas, hacen que no se hayan demostrado algunas relaciones clinicopatológicas irrefutables en los estudios realizados.

El hecho de haber realizado el estudio en el amplio y heterogéneo grupo de los TVS debido a lo acotado de la disponibilidad de tumores en el tiempo, a la dificultad del diagnóstico histopatológico a priori, y a las restricciones económicas de un estudio no relacionado con la práctica asistencial, es una de las debilidades de este trabajo, y también puede haber contribuido a no haber conseguido una mejor caracterización biológica.

La falta de bibliografía al respecto del empleo de las técnicas de cuantificación proteica en el CCT hace que hayamos tenido que utilizar métodos bien descritos en otro tipo de tumores, si bien, no sabemos si son completamente fiables en el CCT debido al particular modo en el que se obtienen muestras en este tipo de neoplasia (fundamentalmente RTUv) y a la artefactación que puedan



producir los diferentes tóxicos tisulares empleados en obtención de las mismas (bisturí eléctrico, solución de glicina, etc.).

La disponibilidad de muestras para análisis, directamente relacionada con el tamaño del tumor puede haber producido un sesgo hacia el análisis exclusivo de pacientes con muestras tumorales disponibles. Para tratar de minimizarlo en la medida de lo posible, el análisis de las muestras fue prospectivo y se realizó en orden de disponibilidad de muestra tumoral.

Otro problema inherente a nuestro estudio (y a todos los estudios de cuantificación proteica en tejido) es la presencia de componente estromal en las muestras, el cual es variable y contribuye en parte a la obtención de proteínas de membrana y tisulares. Inicialmente pensamos que al presentar la proteína p53 nativa una vida media muy corta, y al haber utilizado proteínas con alta presencia epitelial (EGFR y HER2/neu) y menor presencia estromal, este posible sesgo haya sido limitado, pero la alta sensibilidad de las pruebas empleadas hacen que no sea descartable el hecho de que pueda estar presente, y explicar así en parte la variabilidad de algunas muestras (outliers) en las pruebas de comparación con la IHQ (que sólo examina las células epiteliales).

Otra limitación inseparable siempre a este tipo de estudios es el que supone la heterogeneidad tumoral, es decir, la posibilidad de que las proteínas analizadas pueden ser expresadas de modo diferente dentro del mismo tumor. Para solventar este posible sesgo, el tumor entero debería de haber sido analizado en cada uno de los casos, lo cual, no es posible por razones evidentes.

Con todo ello, pese a las evidentes limitaciones descritas, a la hora de diseñar el estudio, hemos tratado de contemplar todos y cada uno de los 20 puntos establecidos como recomendaciones del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos y la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (NCI-EORTC) para la elaboración de directrices y presentación de informes de estudios con marcadores (Reporting recommendations for tumour marker prognostic studies (REMARK)³¹⁴ y que son aquí enumerados. El objetivo de estas directrices es fomentar la información transparente y completa para ayudar a los lectores a juzgar los datos y entender el contexto en el que se aplican las conclusiones de los estudios realizados.

Introducción:



1. Estado del arte acerca de los marcadores examinados, los objetivos del estudio, y cualquier hipótesis preestablecidas.

Material y Métodos:

Pacientes

2. Describir las características de los pacientes del estudio, incluyendo su origen y los criterios de inclusión y exclusión.
3. Describir los tratamientos recibidos y cómo se han asignado.

Características de muestras:

4. Describir el tipo de material biológico utilizado (incluyendo muestras de control), y los métodos de conservación y almacenamiento.

Métodos de ensayo:

5. Especificar el método de ensayo utilizado y proporcionar un protocolo detallado, incluyendo reactivos específicos, los procedimientos de control de calidad, evaluaciones de reproducibilidad, métodos de cuantificación y de puntuación y los protocolos de informes. Especificar si los ensayos fueron cegados y cómo lo fueron.

Diseño del estudio:

6. Especificar el método de selección de casos, incluyendo si se fue prospectivo o retrospectivo y si se realizó estratificación. Especificar el período de tiempo a partir del cual se incluyeron los casos, el final del período de seguimiento, y el tiempo de seguimiento medio.
7. Definir con precisión todos los puntos finales clínicos examinados.
8. Lista de todas las variables candidatas inicialmente examinadas o consideradas para su inclusión.
9. Dar justificación de tamaño de la muestra.

Métodos de análisis estadísticos:

10. Indicar todos los métodos estadísticos, incluidos los detalles de los procedimientos de selección de variables, cómo se verifican las hipótesis del modelo, y el manejo de los datos perdidos.
11. Aclarar cómo se manejaron valores de los marcadores en los análisis; en su caso, describir los métodos utilizados para la determinación de punto de corte.



Resultados:

Datos:

12. Describir el flujo de pacientes a través del estudio, incluyendo el número de pacientes incluidos en cada etapa del análisis. Específicamente, tanto en general como para cada subgrupo informar el número de pacientes y el número de eventos.

13. Informar sobre las distribuciones de características básicas demográficas (al menos edad y sexo), las variables pronósticas estándar, y marcadores tumorales, incluyendo los números de los valores perdidos.

Análisis y presentación:

14. Análisis de la relación del marcador con las variables pronósticas estándar.

15. Univariante: presentar en el análisis la relación entre el marcador y el resultado, con el efecto estimado (por ejemplo, razón de riesgo y la probabilidad de supervivencia). Preferiblemente proporcionar análisis similares para ser analizadas todas las demás variables. Para el efecto de un marcador tumoral en un resultado a tiempo hasta el evento, se recomienda realizar curvas de Kaplan-Meier.

16. Para los análisis multivariantes presentar los efectos estimados (por ejemplo, cociente de riesgos) con intervalos de confianza para el marcador y, al menos para el modelo final, todas las demás variables del modelo.

17. Proporcionar efectos estimados con intervalos de confianza de un análisis en el que se incluyen el marcador y variables pronósticas estándar, independientemente de su significado.

18. Si se hace, informar de los resultados de nuevas investigaciones, los análisis de sensibilidad y validación interna.

Discusión

19. Interpretar los resultados en el contexto de las hipótesis preestablecidas y otros estudios pertinentes; incluir una discusión de las limitaciones del estudio.

20. Discutir las implicaciones para la investigación futura y el valor clínico.



6.2. CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS Y ACERCA DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Pese a no reunir las condiciones adecuadas (fundamentalmente por el escaso número de casos analizado) para realizar consideraciones epidemiológicas de nuestra serie, a la vista de los resultados de los diferentes rasgos clínicos e histológicos de la misma, podemos concluir que en nuestro grupo de TVS, la distribución de la incidencia de CCT por edad, género, tipo histológico, nivel de infiltración tumoral y grado de diferenciación celular es bastante similar en resultados a la de las grandes series españolas y europeas³¹⁵⁻³¹⁹.

La edad media de diagnóstico de nuestro grupo, 68,27 años, es superponible a la edad media de diagnóstico descrita habitualmente en la literatura³²⁰. La distribución por sexos (86,7% de varones y 13,3% de mujeres), también es similar a la descrita por la bibliografía clásica³²¹, y prácticamente idéntica a las series de hospitales de nuestro entorno³³⁰³²² (88,3% de varones y 11,7% de mujeres en el Hospital de Getafe y 83,5% varones y 16,5% mujeres en el Hospital Central de Asturias). A este respecto, la razón observada varón/mujer (6,5:1) es similar, pero aún menor, que la de otras series españolas³²³ donde casi alcanza el 9:1, y contrasta con la de países de Europa central y del norte donde dicha razón es más baja (3:1)¹⁰. Esta diferencia en la razón entre géneros respecto a las áreas del centro y el norte de Europa podría ser debida a una mayor exposición de los varones a los factores de riesgo clásicos y un retraso o más reciente incorporación de las mujeres a estos factores (fundamentalmente el tabaco) en la población española, efecto en parte mitigado en nuestro caso al tratarse de una población urbana.

En cuanto a la multiplicidad, nuestra serie, presentó un mayor número de TVS múltiples en comparación con otras series españolas^{71,322}, un 46,7% frente al 34,3% de Santos et al³²² y el 35% del grupo de Millán-Rodríguez⁷¹. En cuanto al tamaño tumoral, la única de las 2 series que hace referencia a este respecto⁷¹, presentaba un 78,5% de tumores menores de 3 cm por un 55,5% la nuestra.



Respecto a la distribución por grado, casi todas las series³³⁰ describen una preponderancia marcada del G2 frente al G1 y G3 62% vs 12% y 26% en la serie de Millán-Rodríguez et al⁷¹ y 48,2% vs 31,9% y 19,8% para Santos et al³²². Respectivamente; del mismo modo, estas diferencias también se objetivaron en nuestra serie 51,1% vs 28,9% y 20% respectivamente.

En la mayoría de publicaciones, se describen como más frecuentes los TVS de estadio Ta frente a los T1 en el primodiagnóstico³²⁴, si bien varían en la proporción de T1 sobre el total de TVS del 12 al 57% según autores^{325,326}. Estas dos series españolas, a diferencia de lo descrito, presentan una mayor proporción de T1 frente a Ta 64% y 47,1% respectivamente. El 48,9% % de tumores T1 de nuestra serie es similar al porcentaje de Santos et al³²², si bien ellos describen un 9,9% de tumores Tx que hacen al grupo T1 el más preponderante.

Nuestra tasa de recidiva, alcanzó el 44,4%, cifras similares a las descritas por otros autores españoles en series epidemiológicas con seguimientos prolongados, y concordante con la estimación realizada para el cálculo de tamaño muestral. Así, Arrizabalaga Moreno et al³²⁷ describen un 46% de recidivas para TVS a los 5 años, 56% a los 10 y 62% a los 15 para su serie de 551 pacientes. La densidad de incidencia de la recidiva de 6,45 (pacientes recidivados por cada 100 pacientes y año de seguimiento), el promedio de tiempo a la primera recidiva de 20,98 meses y el total de recidivas durante el período de seguimiento (11,9 recidivas por 100 pacientes/año) siguen encontrándose en cifras similares a las de otras series epidemiológicas españolas³²².

En nuestro estudio, no se identificaron variables clínico-patológicas claramente pronósticas para la recidiva tumoral. Mientras que para otros autores, la multiplicidad^{61,62,330}, el tamaño tumoral^{71,74}, o la presencia de una cistoscopia de control positiva a los tres meses de la resección⁸³ suponen factores que claramente incrementan el RR de recidiva tumoral, en nuestro estudio, con carácter general, el riesgo de recidivar (entendido como probabilidad) resultó equivalente en todos los períodos bajo observación y para todas las variables consideradas. Únicamente el análisis multivariante confirmó el efecto del género como único factor de riesgo independiente para la recidiva tumoral. A este respecto, las mujeres se encontraron expuestas a un riesgo de recidivar casi 4 veces superior al de los hombres (RR 3,99, IC 95% 1,08-14,66, p=0,037). Solamente hemos encontrado en la bibliografía dos series, ambas españolas, en la que el sexo femenino sea un factor pronóstico significativo desfavorable tal como ha ocurrido en la nuestra³²⁷, sin tener ninguna de ellas una clara



explicación para este fenómeno, si bien es cierto que ambas series son epidemiológicamente similares a la nuestra, y de Áreas Sanitarias geográficamente cercanas.

El índice de progresión a enfermedad musculoinfiltrante del 13,3% (densidad de incidencia, 1,93 progresiones por 100 pacientes/año), si bien alto en comparación por el reseñado por algunos autores³⁸⁹ es también similar al documentado por otras series españolas³²⁷, con unos tiempos promedio a la progresión similarmente precoces (27,36 meses de media y 17,3 meses de mediana para nuestra serie y 39,6 meses de media y 14,4 meses de mediana para Arrizabalaga et al³²⁷ a los de este autor).

Como FP, en el estudio univariante, encontramos que los pacientes con tumores con extensión a la capa submucosa de la vejiga (estadio T1) se encontraron expuestos a sufrir progresión de la enfermedad con mayor frecuencia que los afectados por enfermedad no invasiva (LR=0,034). El riesgo de progresar (entendido como probabilidad) resultó equivalente en todos los períodos bajo observación y para todas las variables consideradas. En nuestro caso, los resultados del análisis univariante no se confirmaron durante el estudio multivariante, si bien, parece claro para la mayoría de los autores, que el riesgo de progresión es menor para los tumores de estadio bajos del TVS (Ta), que en los de estadios elevados (T1). Globalmente, el riesgo de invasión muscular es dos veces más bajo para los tumores Ta (9%) que para los tumores T1 (18%)⁶⁶, habiéndose documentado cifras de progresión de hasta el 46% para estos últimos autores^{69,84}. Aún así, parece, que el grado tumoral es un factor pronóstico tan importante, dado que los tumores de Grado 1 progresan 5 veces menos que los tumores de Grado 3 (6% vs 30%, respectivamente)⁶⁶, aspecto este que no pudimos confirmar en nuestro trabajo.

Con respecto al resto de factores histopatológicos, en otro estudio reciente de Millán et al⁷¹, el tamaño tumoral mayor de 3 cm, supuso un incremento del RR de 1,7 veces para la progresión, y la presencia de tumor múltiple, multiplica por 1,9 el riesgo de progresión. En cuanto a este último, son escasos los estudios que valoran el papel que desempeña la multiplicidad tumoral, pero parecen ser concordantes en que la multiplicidad incrementa el riesgo de progresión, teniendo un papel más incierto en cuanto a la mortalidad^{71,72}.



En nuestra serie encontramos un 8,8% de diseminación metastásica (densidad de incidencia, 1,3 por 100 pacientes/año). El tiempo promedio a la aparición de las metástasis fue de 69,33 meses (mediana 66,13 meses, min 20, max 125, DE 53,7 meses).

Para nuestros pacientes, en el estudio univariante, el tamaño tumoral representó un claro factor de riesgo de diseminación metastásico en el análisis univariante, si bien, el análisis multivariante no pudo confirmar ese efecto. En la bibliografía, apenas existen comunicaciones acerca de la importancia del tamaño tumoral específicamente en la aparición de metástasis, y no existe un claro consenso en la importancia del tamaño tumoral para la progresión y diseminación de los tumores. Varios estudios han demostrado influencia del mismo en la recurrencia, en la progresión, y en la supervivencia⁷¹ de los pacientes. Es posible que la falta de unanimidad en el criterio de la definición de tamaño de riesgo entre las distintas series (algunos autores ponen el límite en 3 cm, otros en 5 gr, otras más del 80% de la superficie vesical, en otras ocasiones se suman los múltiples tumores resecaados) tenga su cierto grado de importancia en este aspecto.

La escasa mortalidad cáncer específica de nuestro estudio (5 pacientes, y cuatro de ellos fallecidos por el desarrollo de metástasis) nos llevó a utilizar la mortalidad global como índice a investigar. Respecto a la mortalidad por todas las causas, es importante destacar el elevado índice de mortalidad de nuestra serie, consecuencia sin duda del largo seguimiento de una serie dominada por varones cercanos a los 70 años (con una esperanza de vida ajustada por edad de 15,4 años para los varones mayores de 65 años en el año 1991 en nuestro país¹⁷⁰).

Lógicamente, durante el análisis univariante los pacientes de mayor edad se encontraron expuestos a un mayor riesgo de fallecer, y entre las variables analizadas, únicamente el estadio pareció tener efecto sobre la mortalidad (estadio T1). El tratamiento adyuvante tuvo un potente efecto protector, de manera que los pacientes no tratados (sometidos a observación) se encontraron expuestos a un riesgo de morir 24 veces superior al de los individuos sometidos a adyuvancia. Este hecho tiene su explicación en que el único criterio de exclusión para el empleo de adyuvancia fueron las condiciones clínicas basales del paciente, siendo los de peor estado basal aquellos que no recibieron ningún tipo de adyuvancia.



El análisis multivariante confirmó el efecto penalizador de la edad, de modo que el riesgo de morir durante el período del estudio para los pacientes de edad inferior a 70 años fue un 85% inferior al de los pacientes de edad igual o superior a 70 años (RRA 0,15, IC 95% 0,033-0,71, $p=0,017$).

En resumen, ningún dato relevante se obtuvo del análisis de la mortalidad global. Únicamente la edad más avanzada y el peor estado basal (indirectamente valorado por la exclusión para el tratamiento adyuvante), como era de esperar, resultaron ser factores predictores de la misma.



6.3. CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES.

A. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA, ANÁLISIS DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LA TÉCNICA Y ASOCIACIÓN CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE IHQ

En nuestro estudio, las concentraciones de los tres marcadores resultaron ser significativamente superiores a las detectadas en el tejido procedente de los Controles Negativos, y a excepción del HER2/neu, significativamente inferiores a la detectada en el tejido procedente de los Controles Positivos. El hecho, ya descrito por otros autores²⁵⁶, de no encontrarse diferencias en la expresión de HER2/neu entre los TVS y TVI, pudiera corresponder a que dicha sobreexpresión es un fenómeno precoz en el CCT.

La estrecha correlación de la comparación de las distintas técnicas de detección y cuantificación de marcadores empleadas, con sus homónimas IHQ, corrobora el valor biológico de las determinaciones, y subraya el hecho de que a mayor número de células teñidas en el estudio IHQ, la detección de proteína cuantificada en el tumor es mayor. La presencia de una relación inversa o no existente, debería de poner en cuestión su valor biológico.

El urotelio benigno, raramente muestra tinción positiva para p53³²⁸, mientras que la expresión en el CCT varía entre el 18 y el 78% de los casos según estudios^{202,329,330}. Wright et al³³¹ describieron un 54 % de positividad para p53 en el CCT, presentando una tinción intensa el 18 % de los mismos y una tinción débilmente positiva el 36 %. Más recientemente Sinik et al³³⁰ por su parte documentaron cifras de un 18'2 %, de positividad, Popov et al²⁴¹ de un 22%, Cordon et al³³² de un 37 % y Goto et al³³³ cercanas a un 50 % de sobreexpresión de p53 en muestras de CCT. Tal variación en el porcentaje de positividades probablemente es debida a los factores inherentes a la IHQ comentados anteriormente.



El hecho de que en nuestro estudio, ninguna de las muestras Control Negativo marcara para p53, concuerda de modo palpable con ello, y con los datos obtenidos por otros autores³²⁸, quienes describen la inexistencia de inmunorreactividad para p53 mutante en urotelio normal, sin afectación neoplásica.

En cuanto a la proteína HER2/neu, se sabe que existe una expresión habitual de receptores HER2/neu en las capas superficiales del urotelio normal (células más diferenciadas)^{213,334}, y que existe una traslocación de receptores del citoplasma a la membrana durante el proceso de la carcinogénesis³³⁵. Numerosos autores han documentado la posibilidad de tinción IHQ para HER2/neu tanto del tejido urotelial sano^{213,336} como del urotelio displásico³³⁶, mientras que en pacientes con CCT, el porcentaje de detección comunicado varía entre el 8% de algunos autores³³⁷ y el 76 % de otros²⁵⁶. Tal variación de datos parece residir en la subjetividad del método IHQ, la falta de concordancia de criterio entre los examinadores, y en los diferentes criterios escogidos sobre los que establece la positividad o negatividad de la tinción³³⁸.

En nuestro estudio, es clara la diferencia de concentración media de HER2/neu obtenida de los TVS (944,48 HNU/ml) en comparación con la obtenida en los Controles Sanos (122,08 HNU/ml), y prácticamente superponible a la de los Controles Positivos obtenidos de los TVI (944,64 HNU/ml). Esta diferencia con el tejido sano y la presencia de alta positividad de HER2 independiente de que se trate de estadio precoces o tardíos ha sido descrito de modo similar por otros autores utilizando técnicas de IHQ^{334,339} y de medición de niveles de mRNA mediante RT-PCR³⁴⁰⁻³⁴², y para algunos autores puede interpretarse como un fenómeno temprano en la alteración del urotelio.

En este sentido es de destacar que nuestros resultados son prácticamente superponibles a los obtenidos por Eissa et al³⁴³ que utilizando también la técnica de ELISA en la que analizaron 35 pacientes con lesiones uroteliales benignas, 28 con CV escamoso y 25 con CCT observaron una diferencia estadísticamente significativa entre el tejido sano (12,24 pg/mg de proteína) y el CCT (48,3 pg/mg de proteína). Del mismo modo que en nuestro estudio, no evidenciaron diferencias en la concentración de HER2/neu en los tumores superficiales (23,7 pg/mg de proteína) e infiltrantes (27,2 pg/mg de proteína).



Ecke et al³⁴⁴ mediante una técnica de ELISA similar (utilizando distinto anticuerpo) obtuvieron resultados muy similares a los nuestros, en tanto en cuanto, obtuvieron diferencias de concentración entre los pacientes con patología urológica benigna (1563 HNU7nl) y los TVS (1988,5 HNU/ml) ($p < 0,001$) sin diferencias entre tumores superficiales.

Las diferencias en los resultados numéricos acerca de las concentraciones halladas en estos tres estudios, son explicables entre muchos otros motivos por las distintas afinidades de los anticuerpos utilizados por cada uno de los grupos, pero hasta donde hemos podido investigar, utilizando técnicas de cuantificación en los TVS, estas dos publicaciones son junto con la nuestra, las únicas realizadas a tal efecto, y presentan resultados superponibles con los encontrados en este estudio.

El EGFR se ha identificado de modo fisiológico en las capas basales del urotelio sano^{213,334,345}. También numerosos grupos han documentado la positividad de la tinción para EGFR en tejido urotelial sano de pacientes con CCT³⁴⁶, y en tejido vesical cicatricial³⁴⁷, en las lesiones inflamatorias (lo que para algunos explicaría el papel de la cistitis crónica como lesión premaligna), y en el CCT, habiéndose descrito diferencias de concentración entre TVS y TVI por numerosos autores^{273,348-351} y que varían entre el 27 y el 86% usando técnicas cuantitativas y semicualitativas^{216,334,352,353}. A este respecto, se sabe que el EGFR del urotelio sano presenta una afinidad por sus ligandos que no difiere de la de las células tumorales, y donde se producen las diferencias es en la localización del EGFR en el tejido epitelial, en la respuesta celular tras la unión del factor, y en la cantidad de moléculas expresadas. Por una parte, parece que el epitelio normal y el neoplásico difieren en cuanto a la distribución tisular del EGFR, ya que mientras en el epitelio normal se limita a la membrana basal, en el CCT el EGFR se expresa en todas las capas, desde la membrana basal hasta la superficie³⁵⁴, existiendo, del mismo modo que en el otro miembro de su familia (HER2/neu), un proceso de traslocación de receptores del citoplasma a la membrana³³⁵ provocando que la unión del EGF a su receptor en el epitelio hiperplásico y en el epitelio malignizado desemboque en un aumento importante del crecimiento y la proliferación con respecto al epitelio sano^{345,355}. La razón a esta respuesta diferencial puede estar en que el receptor es internalizado de un modo más rápido en las células malignas que en las células sanas³⁵⁶.



Es por todo ello por lo que cobra sentido el análisis cuantitativo de la expresión de proteína EGFR en el CCT. Algunos autores, que han utilizado la misma técnica que nosotros como Neal et al²⁹³, establecen la concentración de 10 fmol/mg de proteína como límite superior de la normalidad, y consideran como negativas aquellos tumores con concentraciones inferiores a ese nivel. En nuestra serie el valor medio hallado en las muestras de Controles Negativos fue de 2'54 fmol/mg, muy por debajo del límite superior de 10 fmol/mg establecido por Neal et al para el tejido urotelial sano²⁷⁴, y muy concordante con el hecho de la práctica ausencia de expresión en membrana del tejido sano documentada por otros autores ya mencionados³³⁵. Las muestras obtenidas de tejido tumoral presentaron una concentración media de EGFR de 10,26 para TVS y 28,96 para los Controles Positivos fmol/mg, cifras muy similares a las obtenidas por el grupo de Smith³⁵⁷ mediante el uso de I¹²⁵ unido a EGFR (si bien las técnicas utilizadas no son superponibles), que encontraron niveles más elevados en tumores vesicales invasivos (20'5 fmol/mg de proteína) frente a TVS (11'4 fmol/mg), y por debajo de los valores obtenidos por Mellon et al³⁵⁸ utilizando nuestra misma técnica de RIA.

B. CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES TIPOS DE PROTEÍNAS OBTENIDOS MEDIANTE CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXACTITUD DIAGNÓSTICA PARA LA PREDICCIÓN DE EVENTOS

No existe bibliografía que ahonde en la correlación entre los valores de las proteínas p53, EGFR, y HER2/neu en el CCT. En este sentido, sólo hemos encontrado una reciente publicación que ha analizado las correlaciones entre las proteínas HER2, p53 y EGFR en el tumor de mama, encontrando una correlación positiva entre estas dos últimas.

En nuestro estudio se detectó correlación significativa entre las determinaciones de p53 LIA y EGFR RIA y entre las determinaciones de HER2/neu ELISA y EGFR RIA, siendo algo que podría ser estudio de una mayor investigación.

Una vez analizadas las correlaciones entre las distintas proteínas, nos propusimos averiguar la posible utilidad de las mismas como posibles marcadores tumorales. La primera dificultad con la que nos encontramos para ello fue la delimitación del concepto de marcador tumoral y determinar si



entraría dentro del mismo la detección tisular de proteínas. Un breve repaso a la literatura sobre el tema permite comprobar la existencia de múltiples definiciones a este respecto. Unas, más estrictas, entienden por marcador tumoral a toda sustancia producida exclusivamente por las células neoplásicas y liberada a la circulación en cantidad suficiente para su detección por las técnicas convencionales³⁵⁹ mientras que otras prefieren aceptar como marcador tumoral a toda sustancia presente en cualquier lugar del organismo, cuya detección refleje de forma cualitativa o cuantitativa la presencia de un tumor maligno³⁶⁰. En la actualidad, y de acuerdo con el NIH, un marcador biológico es una característica que se mide y evalúa como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacéuticas a una intervención terapéutica^{361,362}.

Clásicamente, los biomarcadores para determinar eventos sistémicos han sido históricamente medidos en sangre, suero y en orina, aunque cada vez existe mayor evidencia de que la identificación de biomoléculas en tejido puede tener tanto o más valor que los biomarcadores circulantes, ya que se acompaña de la información espacial cerca del lugar de la producción del evento³⁶³. En los tejidos, la coexistencia de múltiples tipos de células en diferentes estados funcionales es una rica fuente de posibles datos: Este hecho es aún más evidente en los estudios de biomarcadores de tejidos tumorales, hasta el punto de que la capacidad de estimar el nivel de expresión de un determinado marcador dentro de un determinado compartimento tisular (HER2/neu en la membrana de las células epiteliales de mama) ha conducido a estudios que han conseguido la aprobación de la FDA y a la prescripción de fármacos, hechos que no pudieron conseguirse mediante estudios con medición en sangre. Parece pues que la determinación tisular de p53, HER2/neu y EGFR puede ser incluida en el concepto de marcadores tumorales tisulares.

En cuanto al tipo de marcador, según Shariat et al³⁶⁴, se pueden diferenciar seis tipos diferentes de marcadores tumorales en el CV:

1) Marcadores tumorales de detección precoz: que se utilizan para evaluar a los pacientes con cualquiera de los factores de riesgo para o síntomas de cáncer. La orina es una fuente ideal de marcadores para la detección del CV, ya que se puede obtener de modo no invasivo, fácil y relativamente barato. Varios de estos marcadores tumorales se utilizan actualmente, como NMP-22 y UroVysion, pese a lo cual, ninguno de ellos es costo-efectivo.



2) Marcadores tumorales de diagnóstico: este tipo de marcadores pueden ayudar a la caracterización histopatológica clásica en la evaluación de la presencia o ausencia de cáncer. La Uroplakina es un ejemplo de ellos.

3) Marcadores tumorales de pronóstico: proporcionan información sobre el curso clínico probable de una enfermedad en base a las diferencias de riesgo de recurrencia, progresión, o muerte. Marcadores de pronóstico clásicos son receptores de la hormona en el cáncer de mama y de PSA en cáncer de próstata.

4) Marcadores tumorales predictivos: se utiliza para predecir si un tratamiento (fármaco u otra terapia) será efectiva, y/o para monitorizar la eficacia del mismo. En el CV, hasta donde sabemos, no hay biomarcador predictivo en uso o en el ensayo clínico.

5) Marcadores tumorales de diana terapéutica: este biomarcador puede ayudar a identificar a los pacientes que se beneficiarán de un régimen de tratamiento particular e identifica las dianas moleculares de nuevas terapias. Por ejemplo, en los tumores de mama que expresan receptores de estrógeno se tratan mejor con un antiestrógeno tal como tamoxifeno o con un inhibidor de la aromatasa. En el CV, hasta donde sabemos, no hay biomarcadores diana terapéutica en uso o en ensayo clínico.

6) Marcadores tumorales sustitutos de punto final: estos marcadores se utilizan para sustituir a un criterio de valoración clínica y/o para medir el beneficio clínico, el daño o la falta de beneficio o daño. Los sustitutos podrían reemplazar los puntos finales tradicionales, como la mortalidad debido a la enfermedad o la recurrencia o recaída de la enfermedad. Los biomarcadores pueden reducir factores de tiempo y costos para la Fase I y II de los ensayos clínicos mediante la sustitución de los puntos finales clínicos. Un ejemplo para un posible marcador sustituto es el nivel de marcadores después de la terapia para evaluar la respuesta a un fármaco en un entorno ensayo clínico o en la práctica clínica. En el CV, hasta donde sabemos, tampoco hay marcador tumoral sustituto en uso o en el ensayo clínico.

Respecto a la utilidad de estas proteínas como tales, un marcador tumoral ideal sería aquella sustancia producida única y exclusivamente por las células neoplásicas y no por las células sanas,



cuya detección fuera posible en las fases iniciales de la enfermedad, aplicando para ello procedimientos poco complejos, no traumáticos y de bajo coste.

Por lo tanto, de acuerdo a la anterior definición, la detección de alguna de estas sustancias, indicaría indefectiblemente la existencia de un tumor maligno, sin posibilidad de duda respecto a otras situaciones patológicas o a la normalidad. En segundo lugar, su detección en épocas tempranas del desarrollo neoplásico, permitiría un diagnóstico precoz, mejorando sensiblemente las posibilidades terapéuticas. Por último, la sencillez de su determinación, el bajo coste económico y el tratarse de procedimientos no invasivos, lo haría aplicable a programas de "screening" de la población general.

Desgraciadamente, pocas de las sustancias que en la actualidad se utilizan como marcadores tumorales, presentan características que permitan etiquetarlas como marcador tumoral ideal. Las proteínas p53, HER2/neu y EGFR, si bien no están exclusivamente producidas por las células neoplásicas, la diferencia de concentración con las células sanas es evidente, son marcadores de las fases tempranas de la enfermedad, su obtención no es traumática (se produce en el mismo acto quirúrgico), y el coste de las técnicas de cuantificación empleadas es bastante menor que el de otras tecnologías utilizadas (arrays, etc.).

La mayoría de los marcadores tumorales representan cambios medibles en las proteínas o genes asociados con la enfermedad que se puede medir, pero es necesario identificar qué cambios son significativos y cuáles pueden ser clínicamente útiles. A la hora de definir cuales debieran de ser los parámetros a analizar para decidir la utilidad de nuestras proteínas, una reciente revisión de Grossman et al³¹³ sobre la utilidad del empleo de marcadores tumorales en el CCT vesical, expone los principales problemas del uso de marcadores para este tumor, destacando como principales los siguientes aquí referidos:

- Aunque el empleo rutinario de marcadores se basa en la S y E de los mismos, la prevalencia del TVS en la población, afecta de un modo dramático el VPP de dichos marcadores.



- Se deben buscar marcadores con alto VPP como indicadores de intervención (como por ejemplo, indicar una cistectomía en un TVS), mientras que los marcadores con altos valores predictivos negativos, se deben emplear para evitar intervenciones (por ejemplo, disminuir la frecuencia de las cistoscopias en los seguimientos del TVS).
- Un marcador, debe ser validado prospectivamente para determinar la seguridad, y el coste-efectividad de su empleo.

La citología urinaria es el marcador no invasivo estándar. Presenta una especificidad muy alta, pero es operador dependiente, y con baja sensibilidad negativa para los tumores de vejiga especialmente en los grados bajos³⁶⁵. En este contexto, una prueba ideal para el seguimiento del CCT, debería tener la posibilidad de sustituir o retrasar la cistoscopia en el seguimiento de los pacientes con cáncer de vejiga, mejorando los resultados de la citología urinaria.

Impulsado por la baja sensibilidad de la citología de orina, se han desarrollado numerosas pruebas urinarias para la detección de la recidiva y progresión del TVS^{93,366,367}. Budman et al³⁶⁸ realizaron un reciente estudio de revisión acerca de la S y E de los marcadores en orina más frecuentemente utilizados con los siguientes resultados:

- Citología, 12,1% -84,6% y 78,0% -100%;
- BTA stat (Polymedco), 52,5% -78,0% y 69,0% -87,1%;
- BTA Trak (Polymedco), el 51% -100% y el 73% -92,5%
- Prueba NMP22 cáncer de vejiga (Matritech), 34,6% -100% y 60,0% -95,0%;
- Test NMP22 (Matritech), 49,5% -65,0% y 40,0% -89,8%;
- ImmunoCyt / uCyt + (DiagnoCure), 63,3% -84,9% y 62,0% -78,1%;
- ImmunoCyt / uCyt + Citología, 81,0% -89,3% y 61,0% -77,7%;
- UroVysion (Abbott Molecular) / FISH, 68,6% -100% y 65,0% -96,0%.

Las pruebas tienen por lo general una mayor S pero menor E que la citología urinaria, encontrando que ningún marcador en orina de CCT actualmente disponible es capaz de sustituir a la citología de



orina en el seguimiento o ayudar a bajar la frecuencia del número de controles cistoscópicos rutinarios⁷⁸, en el diagnóstico o en el seguimiento del TVS.

Las técnicas IHQ han experimentado un gran desarrollo, en primer lugar, a partir de la descripción del método de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) y la posterior incorporación de la Avidina-Biotina, con lo que se consigue una mayor sensibilidad, y en segundo lugar tras la aplicación de anticuerpos monoclonales, que confieren un aumento de especificidad.

Dado que revisamos que la tinción IHQ para p53 (la proteína más estudiada de las tres a este respecto) muestra un alto VPP en cuanto a la recurrencia tumoral del CCT superficial (96%)²⁰¹, y bastante más limitado para la progresión (40%)²⁰², decidimos, siguiendo las recomendaciones de Grossman utilizar la mejora del VPP de la progresión a la hora de calcular el tamaño muestral.

Aunque algunos autores³⁶⁹ han incluido a estas tres proteínas en el conjunto de marcadores moleculares pronóstico, una vez realizadas las tablas de exactitud diagnóstica en nuestro estudio, ninguna de las tres proteínas analizadas obtuvo VP suficientes como para recomendar su empleo como marcadores tumorales en la práctica clínica habitual.

C. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES, ANTECEDENTES PERSONALES Y FACTORES DE RIESGO CLÁSICOS.

Al llevar a cabo el estudio de relación de los marcadores moleculares con respecto a los antecedentes personales y los FP clásicos, no encontramos relación entre ninguno de los antecedentes personales del paciente y la concentración de marcadores tumorales. Como únicos hallazgos se encontraron una tendencia a la significación entre el nivel de tertil de p53 y el abuso de tabaco, y la asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los altos niveles de HER2/neu (tertiles 2º y 3º) y el abuso crónico de alcohol.



La asociación entre el abuso del tabaco y las alteraciones de p53 ya fue descrita en 1993 por Habuchi et al⁶², que objetivaron un distinto patrón de expresión en la mutación génica. Spruck et al³ encontraron asociación entre el uso del tabaco y la presencia de mutaciones dobles. Husgafvel-Pursianen et al²¹ también observaron una proporción elevada de mutaciones de *TP53* en los CCT de fumadores respecto a los de no fumadores y exfumadores. LaRue et al⁷³ en un reciente estudio llevado a cabo sobre pacientes con TVS detectan una asociación significativa entre la presencia de mutaciones de *TP53* y el número de años fumando, de tal modo que los pacientes que habían fumado durante 30 años o más o que habían dejado de fumar en un plazo menor de 5 años, eran portadores de mutaciones sin sentido de *TP53*. Ya en estudios de sobreexpresión proteica Zhang et al³⁷⁰ también detectaron asociación entre el número de cigarrillos consumidos a diario y la sobreexpresión de p53. No obstante, otros estudios no han encontrado esta relación entre el hábito de fumar cigarrillos y anomalías específicas de p53. Kusser et al⁸⁰ no apreciaron correlación entre el número de paquetes/año y las mutaciones de p53, y Xu et al¹⁹³ tampoco objetivaron diferencias mutacionales significativas entre fumadores y no fumadores. Esta conflictividad de datos puede ser debida, y también en nuestro caso, a la escasez del tamaño de alguno de los grupos, pero por otra parte, también pudieran reflejar la compleja interacción de otros factores ambientales a este aspecto.

Llamativamente, existe una muy bien documentada asociación inversa entre las mutaciones del gen EGFR y el consumo crónico de tabaco en el cáncer de pulmón, descrita por muchos autores³⁷¹⁻³⁷⁴. Esta asociación inversa está reconocida y es interpretada como que la mutación del gen del EGFR producida en este tipo de tumores no está causada por los carcinógenos del tabaco³⁷², pudiendo expresar un patrón causal y fenotípico distinto para estos casos³⁷¹. No hemos encontrado ninguna referencia a esta asociación en el CCT ni en el nivel de mutación génica ni en el nivel de expresión proteica, lo cual creemos que hace a este hallazgo aun más interesante, y pudiera ser una fuente de estudio para el futuro.

La relación entre la sobreexpresión de HER2/neu y el consumo de alcohol crónico, se encuentra bastante menos establecida. No existe ninguna documentación bibliográfica en la literatura que haya investigado esta relación en el CCT, si bien en otra serie de tumores y en experimentos in vitro y en animales, se ha descrito de un modo fehaciente, que el consumo crónico de alcohol provoca genotoxicidad en el cromosoma 17 (que contiene el gen *c-erbB-2*)¹⁹², y también la alteración de la



estructura y la sobreexpresión de HER2/neu en varios tipos de tumores, que parece estar mediada por la inhibición de la autofosforilación de la proteína provocada por el etanol³⁷⁵⁻³⁷⁸. Esta sobreexpresión a su vez parece estar implicado en el desarrollo en determinados tumores de enfermedad diseminada (p. ej. el cáncer de mama) y ser mediada por la sobreproducción de metaloproteinasas de matriz (MMP), fundamentalmente MMP-2 y MMP9, que favorecerían la migración de las células al torrente circulatorio³⁷⁹. Esta relación por tanto, también pudiera ser objeto de otra investigación en el futuro diseñada a este respecto.

Con respecto a la ausencia en nuestro estudio de relación entre los factores moleculares con los FP clásicos, muchos trabajos publicados hasta la actualidad han asociado la expresión de p53 con el grado de diferenciación tumoral. Kamel et al²¹⁰ afirmaron que la positividad fue significativamente superior en los G2-3 que en los tumores bien diferenciados ($p=0.004$). La mayor positividad se encontró en los tumores G3 (78 %), 48 % en G2 y 33 % en los G1. Análogamente, Kuczyk et al³⁸⁰ describen un 46'7 % y 75 % de positividad a p53 en G1 y G3, respectivamente, y Al-Abadi et al³⁸¹ un 10-25% para los tumores G1, un 25-75% para los tumores G2, y un 58% para los G3. . Estudios previos de nuestro grupo^{11,310} con esta misma técnica, también objetivaron esta relación si bien, en todos ellos, se analizaron juntos TVS y TVI sin llegar a realizar análisis multivariante, y algunos trabajos más recientes y con mayor número de casos³⁸² describen esta afirmación observando únicamente TVS tampoco llegan a realizar estudio multivariado.

Esta correlación descrita de p53 con el grado también se ha descrito con el estadio tumoral^{237,332}. Así, los primeros estudios citogenéticos revelaron que la pérdida del brazo corto del cromosoma 17 junto con las mutaciones en el gen p53 se aprecian fundamentalmente en tumores con estadios avanzados y alto grado y son raras en los tumores superficiales. Al-Abadi et al³⁸³ objetivaron positividad IHQ para p53 en un 28% de tumores Ta, un 73% en T1-2 y un 68% en pT3-4. Fujimoto et al¹⁷⁷ describió en el primer estudio realizado por PCR en CCT, una mutación en p53 en 6 de 11 pacientes con carcinoma vesical invasivo, no detectando su expresión en carcinomas superficiales. En un estudio posterior realizado por Ye et al³⁸⁴ se demostró positividad a la proteína p53 en un 36 % de los tumores superficiales y en un 71 % de los carcinomas infiltrantes. Kuczyk et al³⁸⁰ publicaron la existencia de correlación entre positividad a p53 y estadio tumoral, detectando una positividad de 38'5 % y 83'3 % en tumores superficiales (Ta) y músculo-invasivos, respectivamente, y el estudio de Nakopoulou et al³⁸⁵ describió un 37'8% de positividad en tumores superficiales y



un 59'5% en infiltrantes, lo que estableció la diferencia de positividad entre tumores superficiales e invasores. Trabajos posteriores^{386,387}, han confirmado esta primera aportación. En este sentido los estudios biomoleculares acerca de la mutación génica también describen un 40'8 % de mutaciones en *TP53* en el carcinoma vesical, llegando a alcanzar más de un 50 % en estadios avanzados (>T₂)^{388,389}. De cualquier forma, lo que se encuentra bien establecido es que la sobreexpresión de p53 es en general más rara en TVS que en los TVI, pudiendo alcanzar un 60 % en estos últimos. En este sentido, los trabajos del International Study Initiative on Bladder Cancer han sido clarificadores. Los datos de 25 centros con un total de 1706 pacientes y un umbral de positividad del 23% demuestran que solo el 25% de los tumores superficiales son p53 positivos, frente al 48% de los músculo-invasores³⁹⁰, lo que para algunos sugiere que las mutaciones en p53 pueden estar asociadas de por sí con una evolución más agresiva de los tumores^{241,391-394} y con un mayor índice de recidiva y progresión a TVI de la enfermedad³⁹⁵, aunque también hay quien afirma que este hecho simplemente supone un signo asociado a la indiferenciación celular, sin valor pronóstico independiente³⁹⁶.

Respecto a las técnicas de cuantificación proteica, la detección cuantitativa digital de p53 nuclear mediante tinción de inmunofluorescencia de muestras histológicas parece proporcionar valores más objetivos y reproducibles que corresponden a la concentración de la proteína p53 en el núcleo de la célula que el sistema de recuento de las células teñidas positivamente tradicional³⁹⁷.

Con respecto al HER2/neu, en el CCT se ha descrito tanto la amplificación de este gen como la sobreexpresión de su proteína³⁹⁸. La incidencia de sobreexpresión de HER2/neu en el CV es uno de los más altos entre todos los tumores malignos humanos, que van del 9% al 34% de los cánceres analizados^{343,399-401}. En la literatura, las afirmaciones acerca de la relación entre positividad a HER2/neu y grado y estadio son contradictorias. Algunos autores afirman encontrar esta asociación entre la amplificación génica⁴⁰² o la positividad IHQ a HER2/neu y el grado²⁵⁵, el estadio tumoral⁴⁰³ o ambos^{404,405} mientras que para otros, no existe tal paralelismo, llegando incluso a describir mayores niveles de positividad en tumores superficiales que infiltrantes^{256,406}, y un menor riesgo de invasión tumoral especialmente cuando se asocia con positividad a EGFR³⁹³, hallazgos ambos que se han descrito como secundarios a una indiferenciación celular como causa de este fenómeno.



El primer grupo en demostrar la sobreexpresión del HER2/neu en el cáncer vesical fue el grupo de Zhau et al⁴⁰⁷. Desde entonces, se han realizado varios estudios sobre la incidencia de la sobreexpresión del HER2/neu en el CCT con resultados discutibles y sin conclusiones definitivas. Mientras algunos de ellos han mostrado una clara relación entre sobreexpresión de HER2/neu y disminución de la supervivencia e intervalo libre de enfermedad, otros han concluido que no aporta información pronóstica adicional al grado histológico o estadio^{398,408}.

Korkolopoulou et al³⁵⁰ estudiaron a 106 pacientes con CCT de vejiga y hallaron una correlación positiva entre la expresión de la proteína HER2/neu y el grado, el estadio y la apariencia no papilar. En este estudio, la expresión de HER2/neu y el estadio tumoral fueron los únicos factores independientes de predicción de supervivencia libre de enfermedad.

En cuanto al TVS, un reciente estudio de Chen et al⁴⁰⁹ se ha observado que un subconjunto de TVS de alto grado contienen la amplificación de HER2 y se asocian con un comportamiento marcadamente agresivo. Otros autores, en estudios sobre tumores superficiales papilares, no confirman estos prometedores hallazgos^{201,410}, y estudios con un importante número de casos, como el de Tetu et al³³⁷ sobre 256 TVS, describen una tinción positiva asociada al estadio T1, la multifocalidad, el alto grado, la tinción a p53 y la aneuploidía. Esta afirmación de la asociación de la positividad al estadio T1, es confirmada por otros autores mediante IHQ⁴¹¹ en un grupo de 45 tumores superficiales.

En el cáncer vesical infiltrante, Kruger et al²⁵⁵ encontraron sobreexpresión de HER2/neu con una mayor frecuencia en los grados más altos (40%) y estadios avanzados (38%) que los grados más bajos (0%) y estadios precoces (8%). A raíz de ello, estudios más recientes, han sugerido un papel pronóstico negativo para la amplificación o sobreexpresión HER2/neu en estos tumores^{412,413}. Entre ellos, cabe destacar el análisis multivariante de Bolenz et al⁴⁰¹ en el que encontraron como factor pronóstico independiente que los pacientes portadores de tumores con sobreexpresión de HER2/neu fueron dos veces más propensos a experimentar recurrencia, y a morir de su cáncer, que los pacientes con tumores HER2/neu negativo.

Los resultados obtenidos por los métodos cuantitativos en otros estudios, mostraron que la oncoproteína HER2/neu se expresa más significativamente en el grupo de tumores malignos en



comparación con los grupos de tumores benignos (NUBPM) y epitelio normal³⁴³, concluyendo así que la evaluación cuantitativa de la expresión de HER2/neu en tumores malignos ayudados por otros marcadores de proliferación podría ser útil en la selección de pacientes para un tratamiento más agresivo o para predecir el resultado del mismo.

A propósito del EGFR, se ha descrito sobreexpresión del EGFR en tumores vesicales de diferente grado y estadio^{150,167,274,275} con una alta variabilidad de positividad (27-86%)^{334 352,411,414-417}. En este sentido, algunos estudios indican que existe una expresión aumentada de EGFR en los tumores poco diferenciados y de alto grado frente a los tumores de bajo grado y más diferenciados^{408,418}, mientras varios estudios han demostrado que la positividad EGFR se asocia con una mayor progresión del tumor, y al pobre resultado clínico de los tratamientos^{274,275,278}.

Mediante técnicas IHQ, Neal et al¹⁶⁷, sobre 48 TVS observaron asociación significativa con el grado de diferenciación tumoral (18 de 21 positividad en tumores indiferenciados frente a 10 de 27 moderadamente diferenciados, $p < 0,01$) y el estadio tumoral (21 de 24 EGFR positivos en TVI frente a 7 de 24 en TVS, $p < 0,001$). En otro estudio posterior, el mismo autor confirmó la correlación de la tinción EGFR positiva con el grado tumoral (0 de 2 G1, 18 de 52 G2, y 30 de 47 G3). Otros grupos, en estudios más recientes^{350,351,393,419}, también han obtenido diferencias significativas con respecto a éste. Mediante estudio IHQ también, recientemente Enache et al⁴¹¹, han comunicado una alta asociación estadística entre EGFR, grado y estadio en un grupo de 45 tumores superficiales.

En nuestro estudio, pese a resultados previos de nuestro grupo³⁰⁹ en los que sí encontramos diferencias significativas respecto a los niveles de EGFR y el grado tumoral en el estudio univariante el CCT de vejiga, no conseguimos evidenciar estas diferencias previas cuando analizamos este grupo de TVS. Es posible que el reducido número de TVS analizados y el efecto asociado de otros factores como el estadio tumoral, fuera parte implicada en la llamativa diferencia hallada entonces (17,07 fmol/mg de proteína en los tumores G3, frente a 6,73 fmol/mg y 14,48 fmol/mg para los tumores G1 y G2 respectivamente).

Utilizando nuestra misma técnica, un estudio de Mellon et al³⁵⁸ pese a no conseguir demostrar diferencias estadísticas, encuentra una tendencia a presentar mayores niveles de EGFR en los tumores más indiferenciados (18'1, 15'7, y 38'9 fmol/mg de proteína para los G1, G2 y G3



respectivamente), si bien, como ya hemos comentado antes, los valores encontrados por este autor, tanto en las muestras tumorales como en las sanas se encuentran muy por encima de las que nosotros hemos objetivado.

E. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LOS FACTORES PRONÓSTICO MOLECULARES, Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Aunque parece absolutamente establecida la importancia de la proteína p53 en la vía molecular de la tumorigénesis del CCT⁵⁹, y muchos de estos estudios han demostrado la importancia de la acumulación nuclear de p53 como factor pronóstico indicador de progresión en el cáncer vesical^{21,392,420}, existe una mayor controversia acerca de su valor como factor pronóstico independiente³⁶⁹, dado que muchos estudios no han demostrado información adicional de la tinción positiva para p53 en el análisis multivariante cuando se separó de la influencia del estadio o el grado^{239,421,422}. Este hecho sugiere en sí que la positividad a p53 puede no ser un FP independiente, y que el efecto de disminución de supervivencia en los pacientes p53 positivos puede estar artefactado por la asociación de tal positividad a tumores de características histológicas más agresivas.

Con respecto a la recurrencia tumoral, en la literatura publicada, no existe consenso acerca de la influencia del p53 en este suceso. Frente a los prometedores primeros resultados de Serth et al⁴²⁰ donde en un estudio sobre 69 pacientes con TVS con un seguimiento medio de 45,8 meses, p53 IHQ se demostró como el único factor predictor de recidiva del CCT ($p = 0,0029$), y a que trabajos posteriores que se mostraron en consonancia con estos hallazgos^{201 382 386}, otros autores afirman no encontrar tal asociación entre la positividad IHQ y la supervivencia libre de enfermedad^{423,424}. El tamaño insuficiente de algunos de estos estudios, el hecho de que en algunos trabajos relaciones positivas p53 IHQ-recidiva en el análisis univariante, no se confirmen en el examen multivariado, y la falta de este tipo de análisis en algunos otros trabajos, puede estar detrás de la razón de estas discrepancias.



Estudios de otros grupos españoles³⁸² y extranjeros^{425,426} utilizando análisis de supervivencia similares al nuestro, mediante técnicas de tinción IHQ vuelven a insistir sobre este fenómeno de asociación de p53 con la recurrencia tumoral del TVS.

Con respecto a la progresión tumoral, estudios anteriores han establecido que tanto las mutaciones de *TP53* (indicando que la estabilización de p53 no codificada por un gen mutante también podría producir vías de señalización aberrantes^{241,427}) como la sobreexpresión proteica de p53 detectada por IHQ son biomarcadores de pronóstico independientes en CCT. Los primeros estudios realizados por Sarkis et al^{428,429} encontraron alteraciones *TP53* como fuertes predictores independientes de progresión de la enfermedad en pacientes con TVS, TVI y CIS. Los estudios iniciales del grupo de Cordón et al⁴²⁸ también describieron de modo prometedor que la acumulación nuclear de p53 se asociaba con progresión tumoral. En uno de sus primeros trabajos⁴²⁹, analizaron 43 pacientes con carcinoma de células transicionales T1, tratados con RTUv exclusivamente, utilizando métodos IHQ. En 18 casos la tinción nuclear fue negativa y 25 muestras mostraron un patrón homogéneo o heterogéneo de inmunorreactividad. La tasa de progresión comparando los dos grupos, fue superior en aquellos pacientes que tenían un patrón homogéneo o heterogéneo de expresión de la proteína p53 mutada (20 % tasa de progresión por año versus 2,5 %). Este mismo grupo de autores⁴²⁸ estudiaron la expresión de p53 en 54 pacientes con tumores Ta y 31 con carcinomas "in situ". Tras realizar un análisis multivariante, encontraron que la expresión nuclear de la proteína p53 mutada es el predictor más importante de progresión en ambas poblaciones.

Desde entonces, son tantas las publicaciones que sugieren que las alteraciones del gen p53 contribuyen a la progresión del carcinoma vesical superficial^{196,241,393} como las que afirman exactamente lo contrario^{424,430-432}. En un reciente trabajo Shariat et al⁴³³ han mostrado un papel independiente de la alteración en la expresión de p53 en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia enfermedad-específica en pacientes con tumores pT1 y pT2 sometidos a cistectomía

De modo global, Schmitz-Drager realizó una revisión de la literatura publicada acerca de la asociación de p53 y el pronóstico del CTT³⁹⁰. Cuarenta y tres ensayos revisados con 3764 pacientes y 1338 publicaciones con grandes diferencias acerca de aspectos técnicos, selección de anticuerpos, puntos de corte, diseños de estudios y selección de pacientes, no permiten concluir nada a este respecto. Otro meta-análisis más reciente, sobre 117 estudios y un total de más de



10.000 pacientes publicado en Lancet por Malats et al⁴³⁴, se expresa en los mismos términos acerca de la falta de homogeneidad, si bien encuentra un 26% de análisis (9/34), un 50% (12/24) y un 29% (10/35) que señalan a p53 como factor pronóstico independiente para la recidiva, progresión y mortalidad respectivamente. También señala que en los estudios que utilizaron el modelo de regresión de Cox el riesgo global de recurrencia fue de 1,6 (IC 95% 1,2-2,1), el de progresión 3,1 (IC 95% 1,9-4,9) y de mortalidad 1,4 (IC 95% 1,2-1,7).

Con respecto a los estudios que analizan exclusivamente el TVS, la mayoría de autores⁶³⁻⁶⁵ son unánimes a la hora de señalar la escasa importancia del análisis IHQ de p53 en la supervivencia enfermedad específica, incluso cuando se analizan específicamente tumores de alto^{238,431}, o bajo riesgo⁴²³; y en casi todos ellos sí que se encuentra asociada a otros factores de mal pronóstico, como el grado y el estadio³⁹⁴, o la presencia de otros oncogenes desfavorables³⁵⁰. Únicamente un estudio realizado sobre pacientes con TVS estadio T1 confiere valor predictivo a la tinción IHQ de la proteína p53 con resultados del 80% de supervivencia a 5 años de pacientes p53 negativos frente al 39% en p53 positivos ($p < 0,0001$), si bien, carece de análisis multivariante⁴³⁵. Un reciente análisis cuantitativo mediante una técnica de inmunofluorescencia digital tampoco observó valor predictivo de la acumulación nuclear de p53 con respecto a la recidiva, progresión, o supervivencia enfermedad específica³⁹⁷.

El significado pronóstico de los valores aislados de HER2/neu en vejiga hasta ahora es limitado en comparación con otros marcadores moleculares. Algunos trabajos aseguran que la sobreexpresión de HER2/neu en los TVS se correlaciona con el tiempo libre de enfermedad, mientras que para otros, la sobreexpresión de esta proteína tiene escasa implicación pronóstica^{58,337,401,433,436,437}. Entre los defensores de esa primera aseveración destaca el trabajo de Korkolopoulou³⁵⁰, en el que se afirma que HER2/neu, junto con el estadio tumoral fueron los dos únicos predictores independientes de SLE. A este respecto, estudios recientes³³⁴ parecen sugerir que su asociación con otros marcadores, como el EGFR si puede tener valor como índice de probabilidad de recurrencia tumoral, lo que podría deberse al papel que desempeña esta proteína como acelerador de respuesta al resto de miembros de la familia ErbB.

Al respecto de la relación de HER2/neu con la progresión tumoral, Underwood et al⁴⁰⁸ realizaron una revisión sobre 236 CCT pertenecientes a 89 pacientes con tumores recidivantes, 20 enfermos sin



recidiva y 10 controles de vejiga sin alteraciones, determinando la presencia de expresión aumentada de proteína del gen *c-erbB-2* y la amplificación de dicho gen. Se objetivó sobreexpresión proteica en el 50% de los pacientes con enfermedad recidivante, en el 45% de aquellos que no tuvieron recidivas y en ninguno de los controles. De los 89 CCT recidivantes, el 48% sufrieron progresión tumoral, y de ellos, el 32% correspondían a pacientes que presentaron amplificación de *c-erbB-2*, lo que puso de manifiesto una estrecha relación entre la amplificación genética y la progresión tumoral. Sin embargo, dicha amplificación sólo se puso de manifiesto cuando la progresión ya había ocurrido, y no en las muestras iniciales. Por otra parte, la multiplicación del gen *c-erbB-2* (RR= 2,45, $p < 0,02$) y la sobreexpresión de la proteína HER2/neu se mostraron como FP independientes de predicción de muerte secundaria a CCT. Otros estudios también han atribuido un papel importante a la amplificación del *c-erbB-2* en la supervivencia en TVS y en TVI⁴³⁸⁻⁴⁴⁰. Con respecto a esta última, Sato et al⁴⁴¹ realizaron un estudio sobre 88 pacientes afectados de CCT tratados mediante RTUv, cistectomía parcial o radical, según el tipo de tumoración, estableciendo además una relación inversa entre la positividad de este oncogén y la supervivencia, independiente del grado y del estadio, de modo que los pacientes con CCT *c-erbB-2* negativos, presentaron una supervivencia global y libre de enfermedad del 48,5% y 65,5% a los 5 años, mientras que para los *c-erbB-2* positivos la supervivencia al mismo tiempo fue del 9,7% y 41,8% respectivamente. Más recientemente, un estudio sobre 138 pacientes esta vez CCT infiltrantes⁴⁴² objetivó la asociación de la sobreexpresión de HER-2 con una peor supervivencia enfermedad-específica tanto en el estudio univariante, como en el multivariante. De modo contrario, otros trabajos²⁷⁷ que incluyen también análisis multivariante demostraron una mayor supervivencia enfermedad-específica en pacientes con positividad para HER2/neu, pero no como factor independiente en este análisis.

El más actual meta-análisis, que revisa la evidencia obtenida de los estudios publicados desde 1985 hasta 2011 comunica un aumento del riesgo de progresión para la sobreexpresión de HER2/neu de 1.1 (IC95% de 0,6-1,9) y de mortalidad de 1.1 (IC 95% 1.0-1.2), haciendo hincapié en la inconsistencia de los datos y los posibles sesgos de comunicación⁴⁴³.

El mecanismo por el cual la expresión de EGFR se asocia con un mal pronóstico no es del todo clara, aunque hay cierta evidencia que vincula el EGFR con la estimulación de activador de la proteína-1 factor de transcripción que induce la actividad de metaloproteinasas de matriz⁴⁴⁴. Aún así, a día de hoy, el valor pronóstico de estos hallazgos sigue siendo controvertido⁴⁴⁵.



En este sentido, algunas publicaciones^{276,446,447} han señalado también la existencia de relación entre la sobreexpresión de EGFR y el mayor índice de recurrencia tumoral. Entre ellas destaca la de Neal et al²⁷⁴, inicialmente sobre 101 pacientes con cáncer de vejiga (34 Ta, 18 pT1, 16 T2, 21 T3 y 12 T4), en la que para el grupo de 52 pacientes con tumores vesicales superficiales, únicamente el EGFR (RR = 2.28, $p < 0.03$) era un factor de predicción independiente del tiempo hasta la recurrencia. Tales hallazgos nosotros no los hemos objetivado en este estudio.

También los informes sobre la importancia pronóstica para la progresión respecto al EFGR han sido contradictorios. Para Neal et al²⁷⁴, el EGF-R (RR =22 1, $p < 0.0001$) y la multiplicidad tumoral (RR = 1.37, $p < 0.05$) eran factores de predicción independientes del tiempo hasta la progresión, mientras que para otros autores, la correlación de la sobreexpresión de EGFR con la supervivencia no está clara³³⁴.

Del mismo modo, el análisis de los resultados de los diferentes estudios en cuanto a la relación entre los valores de EGFR y la supervivencia son confusos. Los autores que han afirmado la existencia de relación entre un mayor índice de EGFR en las muestras tumorales de individuos con una disminución de índice de supervivencia, bien no han obtenido estos resultados a través de estudios multivariantes^{349,446}, por lo que no es descartable la influencia de otros factores sobre los resultados, o bien describen la asociación EGFR – otros factores, como la responsable del empeoramiento del pronóstico (estadio tumoral²⁷⁷, antígeno de proliferación nuclear Ki-67³⁵⁰, el oncogén c-erb B2^{273,419}, o los marcadores tumorales T138 y T43⁴⁴⁸). Algunos estudios, como el de Neal et al²⁷⁴, señalan al EFG-R (RR = 3.42, $p < 0,001$) como factor predictor independiente de mortalidad para el CCT o el de Mellon et al²⁷⁵, que en una actualización posterior de este estudio, llevada a cabo sobre 212 pacientes con CCT, comunicaron que el estadio, el grado y la situación del EFGR eran factores de predicción independientes de la muerte por cáncer de vejiga en toda la cohorte. Un reciente meta-análisis que analiza los resultados de los estudios publicados sobre el valor pronóstico del EGFR desde 1985 hasta 2011 halla un claro aumento del riesgo de progresión para la sobreexpresión de EGFR de 4.5 (IC95% de 2.5-8.4) y de mortalidad, 3.0 (IC 95% 1.6-5.9); si bien invita a interpretar los datos con cautela por posibles sesgos de comunicación y falta de homogeneidad de los datos⁴⁴³.



En resumen, muchos datos contrapuestos de un gran número de publicaciones que no consiguen determinar el verdadero valor de ninguno de estos marcadores. A este respecto la ausencia de resultados estadísticamente significativos acerca de la utilidad de los factores moleculares p53, HER2/neu y EGFR para predecir recidiva, progresión o muerte en nuestro estudio, que inicialmente puede parecer frustrante, en realidad no nos lo parece tanto en sí.

Si a día de hoy se hace un PubMed con la búsqueda "bladder cancer" Y ("biomarker" O "molecular marker") el número de artículos a los que se accede es 5370 (accedido el 07/10/2015). El número de artículos publicados en los marcadores tumorales de cáncer de vejiga se han incrementado de modo sostenido desde 1980, alcanzando cerca de 300 artículos por año en 2009 y 438 en lo que va de año. En Enero de 2014 se publicó en The Lancet un artículo que comunicaba que, de 1575 estudios publicados acerca de marcadores pronóstico de cáncer en el año 2005, 1509 (96%) comunicaron al menos una variable pronóstica significativa, pese a lo cual, muy pocos de esos biomarcadores identificados han sido posteriormente confirmados, y menos aún, han entrado a formar parte de la práctica clínica rutinaria⁴⁴⁹.

El hecho práctico es que a pesar de años de investigación y miles de artículos sobre los marcadores tumorales en Uro-oncología, el número de marcadores que se han convertido en utilidad clínica es llamativamente escaso. De hecho en la actualidad, sólo un marcador tumoral es usado rutinariamente en la práctica diaria del CV, la citología de orina. A menudo las primeras publicaciones acerca de la utilidad de un nuevo marcador tumoral son siempre muy ilusionantes, pero los estudios posteriores sobre el mismo marcador o marcadores relacionados, producen conclusiones inconsistentes o están en contradicción directa con los resultados previos.

A la hora de diseñar este estudio, siempre tuvimos claro que, a la hora de elegir el tamaño muestral, debería de primar la significación clínica frente a la posibilidad de obtener diferencias estadísticamente significativas a costa de incrementar el tamaño muestral, buscando con ese fin la aplicabilidad práctica del estudio. En esta tesis hemos demostrado que la cuantificación proteica de p53 mediante LIA, la cuantificación de HER2/neu mediante ELISA, y la cuantificación de EGFR mediante RIA son técnicas factibles, sencillas, y congruentes con las técnicas tradicionales. Su utilidad en la práctica para predecir el futuro del TVS no es adecuada, pero quizá puedan utilizarse



en el estudio de otros tumores urológicos o incluso en los TVI, si bien, eso deberá ser objeto de futuros estudios con un diseño similar y en caso de demostrarse realizarlo en series mayores.



Conclusiones



7. CONCLUSIONES

1. Las técnicas LIA, ELISA, y RIA permiten cuantificar de un modo fiable la cantidad de proteínas p53, HER2/neu y EGFR presentes en las muestras obtenidas.
2. Los resultados obtenidos mediante técnicas de cuantificación, son concordantes con los obtenidos mediante las técnicas semicuantitativas utilizadas tradicionalmente para este propósito (IHQ).
3. La concentración de los marcadores p53, EGFR y HER2/neu en el TVS es significativamente mayor a la detectada en el tejido vesical sano y significativamente inferior a la detectada en el TVI (a excepción de la concentración de HER2/neu que es prácticamente igual que en este último).
4. Existe una correlación positiva significativa entre los niveles de p53 y los de EGFR en los pacientes con TVS.
5. Existe una correlación positiva significativa entre los niveles de HER2/neu y los niveles de EGFR en los TVS.
6. Existe asociación significativa entre el consumo crónico de alcohol y la expresión aumentada de la proteína HER2/neu en los pacientes con TVS.
7. Existe asociación inversa significativa entre el consumo crónico de tabaco y la expresión aumentada de la proteína EGFR en los pacientes con TVS.
8. Existe una tendencia estadística ($p = 0,095$) a la asociación entre el consumo crónico de tabaco y expresión aumentada de la proteína p53 en los pacientes con TVS.
9. La cuantificación de p53, EGFR y HER2/neu no parece tener valor clínicamente relevante para la predicción de recidiva, progresión tumoral, metastatización o supervivencia de los pacientes con TVS.



Bibliografía



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J; Soerjomataram I; Ervik M, *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No11 [Internet] Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013:2015.
2. Brausi MA. Primary Prevention and Early Detection of Bladder Cancer: Two Main Goals for Urologists. *Eur Urol* 2013;63:242-243.
3. Horner MJ; Ries LAG; Krapcho M, *et al.* *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*, National Cancer Institute. Bethesda, MD,. SEER : Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program 2008.
4. Jemal A; Bray F; Center MM, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
5. Cabanes A; Pérez-Gómez B; Aragonés N, *et al.* La situación del cáncer en España, 1975-2006.: Instituto de Salud Carlos III; 2009.
6. Gil A; Alfonso JL; Cortes C, *et al.* Cáncer de vejiga: estudio de la mortalidad en España (1968-1982). *Act Urol Esp* 1989;13:85-89.
7. Tardón A; Martínez B; Kogevinas M, *et al.* Cáncer de vejiga en Asturias: incidencia y evolución (1982-1993). *Gac Sanit* 1999;13:346-352.
8. Moreno V; González S; Soler M, *et al.* Estimación de la incidencia de cáncer en España: período 1993-1996. *Gac Sanit*, 2001;15:380-388.
9. Urrutia G; Serra C; Bonfill X, *et al.* Incidencia del cáncer de vejiga urinaria en un área industrializada de España. *Gac Sanit* 2002;16:291-297.
10. Parkin DM; Whelan SM; Ferlay J, *et al.* Cancer incidence in Five Continents. *IARC Sci Publ* 1997;II.
11. Jaske G; Algaba F; Fossa S, *et al.* EAU. Guidelines on Bladder Cancer. European Association Of Urology 2007.
12. del Canto M; García-Martínez L; Fernández-Villa T, *et al.* Tendencia y distribución municipal de la incidencia de cáncer de vejiga en el área de salud de León (1996-2010). *Actas Urol Esp* 2015;39:349-353.
13. Cózar JM; Miñana B; Palou-Redorta J, *et al.* Análisis comparativo de la incidencia de cáncer de vejiga en las comunidades de Andalucía, Cataluña y Comunidad de Madrid en el año 2011. *Actas Urol Esp* 2015; available online 29 July 2015.
14. Lopez-Abente G; Pollán M; Aragonés N, *et al.* Atlas municipal de mortalidad por cáncer en España 1989-1998: Instituto de Salud Carlos II; 2007.
15. Lopez-Abente G; Aragonés N; Ramis R, *et al.* Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: Possible role of mining and industry. *BMC Public Health* 2006;6:17.
16. Greenlee RT; Hill-Harmon MB; Murray T, *et al.* Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15-36.
17. Jemal A; Murray T; Ward E, *et al.* Cancer Statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30.
18. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) SEER*Stat Database: Incidence - SEER 9 Regs Research Data, Nov 2014 Sub (1973-2012)



- <Katrina/Rita Population Adjustment> - Linked To County Attributes - Total U.S., 1969-2013 Counties, National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Surveillance Systems Branch, released April 2015, based on the November 2014 submission. www.seercancer.gov2015.
19. Riboli E; Gonzales CA; Gonzales CA, *et al.* Diet and bladder cancer in Spain. A multicentre case-control study. *Int J Cancer* 1991;49:214-219.
 20. SEER*Stat Database: Incidence - SEER 9 Regs Public-Use, Nov 2003 Sub (1973-2001), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2004, based on the November 2003 submission. SEER : Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program2004.
 21. Fay MP; Tiwari RC; Feuer EJ, *et al.* Estimating average annual percent change for disease rates without assuming constant change. *Biometrics* 2006;62:847-854.
 22. Bosetti C; Bertuccio P; Chatenoud L, *et al.* Trends in mortality from urologic cancers in Europe, 1970-2008. *Eur Urol* 2011;60:1-15.
 23. Ferlay J; Randi G; Bosetti C, *et al.* Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU Int* 2008;101:11-19.
 24. Ibrahim AS; Khaled HM; Mikhail NN, *et al.* Cancer incidence in egypt: results of the national population-based cancer registry program. *J Cancer Epidemiol* 2014;2014:1-17.
 25. La Vecchia C; Airoldi L. Human bladder cancer: epidemiological, pathological and mechanistic aspects. *IARC Sci Publ* 1999;147:139-157.
 26. Slattery ML; Schumacher MC; West DW, *et al.* Smoking and bladder cancer: The modifying effect of cigarettes on other factors. *Cancer* 1988;61:402-408.
 27. Dolin PJ. An epidemiological review of tobacco use and bladder cancer. *J Smoking-Related Dis* 1991;2:129-143.
 28. Rehn L. Ueber blasentumoren bei fuchsarbeitern. *Arch Kind Chir* 1895;50:588.
 29. Burger M; Catto JW; Dalbagni G, *et al.* Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013;63:234-241.
 30. Freedman ND; Silverman DT; Hollenbeck AR, *et al.* Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. *JAMA* 2011;306:737-745.
 31. Kirkali Z; Chan T; Manoharan M, *et al.* Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66:4-34.
 32. Silverman DT; Devesa SS; Moore LE, *et al.* Bladder cancer Bladder Cancer. In: . New York, New York: pp. In: Schottenfeld D FJJ, editors, ed. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Third ed. ed: Oxford University Press; 2006:697-706.
 33. Cumberbatch MG; Rota M; Catto JW, *et al.* The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol* 2015.
 34. Ross RK; Jones PA; Yu MC. Bladder cancer epidemiology and pathogenesis. *Semin Oncol* 1996;23:545.
 35. Rushton L; Bagga S; Bevan R, *et al.* Occupation and cancer in Britain. *Br J Cancer* 2010;102:1428-1437.
 36. Tavani A; La Vecchia C. Coffee and cancer: a review of epidemiological studies. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:241-256.
 37. Samanic CM; Kogevinas M; Silverman DT, *et al.* Occupation and bladder cancer in a hospital-based case-control study in Spain. *Occup Environ Med* 2008;65:347-353.
 38. Koutros S; Silverman DT; Baris D, *et al.* Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study. *Int J Cancer* 2011;129:2894-2904.



39. Ros MM; Gago-Dominguez M; Aben KK, *et al.* Personal hair dye use and the risk of bladder cancer: a case-control study from The Netherlands. *Cancer Causes Control* 2012;23:1139-1148.
40. Rafnar T; Vermeulen SH; Sulem P, *et al.* European genome-wide association study identifies SLC14A1 as a new urinary bladder cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2011 Nov 1;20(21):4268-81. *Hum Mol Genet* 2011;20:4268-4281.
41. Martínez Piñeiro JA; Martínez Piñeiro L. Tumores vesicales. In: Edited by Jiménez Cruz JF and Rioja Sanz L, ed. *Tratado de Urología*: Ed. Prous S.A; 1993:1151-1152.
42. Mostofi FK; Davis CJ; Sesterhenn IA. Histological typing of urinary bladder tumours. In: Springer-Verlag, ed. *World Health Organization Histological Classification of Tumours*. 2^o Ed ed. Heidelberg, Germany:: Spinger Berlin; 1999.
43. Algaba F. Neoplasias malignas de vejiga urinaria. In: Edited by Mostofi FK AF, Gaeta JF *et al.*, ed. *Patología del cáncer urogenital Actualizaciones urológicas*. Barcelona, España: Ed. Pulso; 1990:49.
44. Shinka T; Hirano A; Uekado Y, *et al.* Clinical study of prognostic factors of superficial bladder cancer treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin. *Br J Urol* 1990;66:35-39.
45. Kurth KH; Denis L; Bouffoux C, *et al.* Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumors. *Eur J Cancer* 1995;31a:1840-1846.
46. Soloway MS; Sofer M; Vaidya A. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2002;167:1573-1583.
47. Miyamoto H; Miller JS; Fajardo DA, *et al.* Non-invasive papillary urothelial neoplasms: the 2004 WHO/ISUP classification system. *Pathol Int* 2010;60:1-8.
48. Miyamoto H; Brimo F; Schultz L, *et al.* Low-grade papillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic analysis of a post-World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification cohort from a single academic center. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:1160-1163.
49. Golka K; Prior V; Blaszkewicz M, *et al.* The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicol Lett* 2002;128:229-241.
50. Johanson S; Cohen SM. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 1997;13:291-298.
51. Parker SL; Tong T; Bolden S, *et al.* Cancer statistics. *Cancer J Clin* 1997;47:5-27.
52. Stein JP; Grossfeld GD; Ginberg DA, *et al.* Prognostic markers in bladder cancer. A contemporary review of the literature. *J Urol* 1998;160:645-649.
53. Herr HW. Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors. 15 years outcome. *J Urol* 2000;163:60-62.
54. Messing EM; Young TB; Hent UB, *et al.* Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology* 1995;45:387-396.
55. Farrow GM; Utz DC; Rife CC, *et al.* Clinical observation of sixty-nine cases of in situ carcinoma of the urinary bladder. *Cancer Res* 1997;37:2794-2798.
56. Abel PD; Hall RR; William G. Should P1 transitional cell cancer on the bladder still be classified as superficial?. *Br J Urol* 1988;62:235-239.
57. Steinberg GD; Trump DL; Cummings KB. Metastatic bladder cancer. Natural history, clinical course and considerations for treatment. *Urol Clin Nort Am* 1992;19:735-746.



58. van Rhijn BW; Zuiverloon TC; Vis AN, *et al.* Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2010;58:433-441.
59. Droller MJ. Bladder Cancer: State of the art care. *CA Cancer J Clin* 1998;48:274.
60. Chopin DK; Gattegno B. Superficial bladder tumors. *Eur Urol* 2002;42:533-541.
61. Jewett HJ; Strong GH. Infiltrating carcinoma of the bladder: relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of local extension and metastases. *J Urol* 1946;55:366.
62. Bostwick DG. Natural history of early bladder cancer. *J Cell Biochem* 1992;161:131-138.
63. Kwak C; Ku JH; Park JY, *et al.* Initial tumor stage and grade as a predictive factor for recurrence in patients with stage T1 grade 3 bladder cancer. *J Urol* 2004;171:149-152.
64. Oosterlinck W. Guidelines on diagnosis and treatment of superficial bladder cancer. *Minerva Urol Nefrol* 2004;56:65-72.
65. Ali-El-Dein B; Sarhan O; Hinev A, *et al.* Superficial bladder tumours: analysis of prognostic factors and construction of a predictive index. *BJU Int* 2003;92:93-99.
66. Kurth K; Denis L; Sylvester E, *et al.* The natural history and prognosis of treated superficial bladder cancer. EORTC GU Group. *Prog Clin Biol Res* 1992;378:1-7.
67. Sylvester RJ; van der Meijden AP; Oosterlinck W, *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;49:466-477.
68. Loening S; Narayana A; Yoder L, *et al.* Analysis of bladder tumor recurrence in 178 patients. *Urology* 1980;17:137-141.
69. Witjes JA; Kiemeny LAMN; Verbeek ALM, *et al.* Random bladder biopsies and the risk of recurrence in superficial bladder cancer: a prospective study in 1026 patients. *World J Urol* 1992;10:231-234.
70. Mulders PFA; Meyden APM; Doesburg WH, *et al.* Prognostic factors in pTa-pT1 superficial bladder tumors treated with intravesical instillations. *Br J Urol* 1994;73:403-408.
71. Millan-Rodriguez F; Chechile-Toniolo G; Salvador-Bayarri J, *et al.* Multivariate analysis of the prognosis factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 2000;163:73-78.
72. Kiemeny LAMN; Witjes JA; Heijbroek RP, *et al.* Should random urothelial biopsies be taken from patients with primary superficial bladder cancer? A decision analysis. *Br J Urol* 1994;73:164-171.
73. Bostwick DG; Lopez-Beltran A. *Bladder Biopsy Interpretation* 1999.
74. Narayana AS; Loening SA; Slymen DJ, *et al.* Bladder cancer: factors affecting survival. *J Urol* 1983;130:56-60.
75. Takahashi S; Murase T; Mizuno S, *et al.* Multivariate evaluation of prognostic determinants in bladder cancer patients. *Urol Int* 1987;42:368-374.
76. Shinka T; Matsumoto M; Ogura H, *et al.* Recurrence of primary superficial bladder cancer treated with prophylactic intravesical Tokyo 172 Bacillus Calmette-Guerin: a long term follow-up. *Int J Urol* 1997;4:139-143.
77. Epstein JL; Amin MB; Reuter VR, *et al.* The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am Surg Pathol* 1998;22:1435-1448.
78. Babjuk M; Burger M; Zigeuner R, *et al.* EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 2013;64:639-653.
79. Rischmann P; Bittard H; Chopin D, *et al.* AFU recommendations 1998. "Committee on Cancer of the French Association of Urology". *Prog Urol* 2002;12:1159-1160.



80. Bergkvist A; Ljungqvist A; Moberger G. Classification of bladder tumours based on the cellular pattern. *Acta Chir Scand* 1965;130:371-378.
81. Fernandez-Gomez J; Madero R; Solsona E, *et al.* The EORTC tables overestimate the risk of recurrence and progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: external validation of the EORTC risk tables. *Eur Urol* 2011;60:423-430.
82. Sobin LH; Wittekind Ch; editors, *et al.* TNM Classification of malignant tumours. In: LH S, Ch W, eds. New York, USA: *Editorial Wiley-Liss*; 1997:187-190.
83. Parmar M; Freedman LS; Hardgreave TB, *et al.* Prognostic factors for recurrence and followup policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council Subgroup on superficial bladder cancer (Urological Cancer Working Group Party). 1989; 142: 284-288. *J Urol* 1989;142:284-288.
84. Allard P; Bernard P; Fradet Y, *et al.* The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol* 1998;81:692-698.
85. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am* 1992;19:499-508.
86. Kiemeny LA; Witjes JA; Heijbroek RP, *et al.* Dysplasia in normal looking urothelium increases the risk of tumour progression in primary superficial bladder cancer. *Eur J Cancer* 1994;30:1621-1625.
87. Algaba F. Valor pronóstico del carcinoma in situ y de la displasia celular del urotelio.: Universidad Autónoma de Barcelona.; 1985.
88. Fradet Y. Prognostic Factors. Back to the future. In: F P, WR F, eds. *Superficial Bladder Cancer*. Oxford, England: ISIS Medical Media; 1997.
89. Fernández Gómez J; Madero R; Solsona E *et al.* Predicting non muscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with Bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol* 2008;182:2195-2203.
90. Hernández V; De la Peña E; Martín MD *et al.* External validation and applicability of the EORTC risk tables for non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol* 2011;29:409-414.
91. Sakano S; Matsutama H; Takai K *et al.* Risk group stratification to predict recurrence after transurethral resection in Japanese patients with stage Ta and T1 bladder tumours: validation study on the European Association of Urology guidelines *BJU Int* 2011;107:1598-1604
92. Seo KW; Kim BH; Park CH *et al.* The efficacy of the EORTC scoring system and risk tables for the prediction of recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer after intravesical bacillus calmette-guerin instillations. *Korean J Urol* 2010;51:165-170
93. van Rhijn BWC; Zuiverloon TCM; Vis AN *et al.* Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2010;58: 433-441
94. Pillar Wang D; Mayer EK *et al.* Do standardised prognostic algorithms reflect local practice? Application of EORTC risk tables for non-muscle invasive (pTa/pT1) bladder cancer recurrence and progression in a local cohort. *Scientific World Journal* 2011;11:751-759.
95. Madero R Fernández Gómez J, Solsona E, *et al.* . The EORTC tables overestimate the risk of recurrence and progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin plus interferon-alpha. *J Urol* 2011;185:67-71
96. Xylinas E; Kent M; Kluth L *et al.* Accuracy of the EORTC risk tables and of the CUETO scoring model to predict outcomes in non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2013 109:1460-1466.



97. Burger M; Oosterlink W; Konety B et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. . *Eur Urol* 2013 64:36-44.
98. Babjuk M; Burger M; Zigeuner R et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. . *Eur Urol* 2013;64:639-653.
99. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. . *Science* 1996;274:1664-1672.
100. Dictor M; Ehinger M; Mertens F, et al. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol* 1999;111:S40-S52.
101. Buscail L; Vernejoul F; Faure P, et al. Regulation of cell proliferation by somatostatin. *Ann Endocrinol (Paris)* 2002;63:2S13-12S18.
102. Singh RP; Agarwal R. Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. *Antioxid Redox Signal* 2000;4:665-663.
103. Jenkins GM. The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:701-710.
104. Alberts B; Bray D; Lewis J, et al. Cell signaling. In: Garland, ed. *Molecular Biology of the Cell*. 3 ed. New York 1994:682-726.
105. Ullrich A; Schlessinger J.. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 2006;61:203-212.
106. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-1677.
107. Resnitzky D; Gossen M; Bujard H, et al. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994;14:1669-1679.
108. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998;12:2245-2262.
109. Jiricny J. Mediating mismatch repair. *Nat Genet* 2000;24:6-8.
110. Slee EA; O'Connor DJ; Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 2004;23:2809-2818.
111. Bartek J; Lukas J; Bartkova J. Perspective: Defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol* 1999;187:95-99.
112. Nurse P. Checkpoint pathways come of age. *Cell* 1997;91:865-867.
113. Ashkenazi A; Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
114. Thornberry NA; Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
115. Kroemer G; Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-519.
116. Sharma K; Wang RX; Zhang LY, et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 2000;88:333-347.
117. 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;288:1053-1058.
118. Nilsson JA; Cleveland JL. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 2003;22:9007-9021.
119. Varmus HE. Viruses, genes and cancer I. The discovery of cellular oncogenes and their role in neoplasia. *Cancer* 1985;55:2328.
120. Wanhg LH; Halpern CC; Nadel M, et al. Recombination between viral and cellular sequences generates transforming sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:5816.
121. Bigne R; Breitman ML; Moscovici C, et al. Restitution of fibroblast-transforming ability in src deletion mutants of avian sarcoma during animal passage. . *Virology* 1979;93:413-426.
122. Bishop JM. Enemies within the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 1981;30:5-6.



123. Rapp UR; Todaro GJ. Generation of new mouse sarcoma viruses in cell culture. *Science* 1978;201:821-825.
124. Chang EH; Furth ME; Scolnick EM, *et al.* Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of the Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 1892;297:479-493.
125. Karess RE; Hayward WS; Hanafusa H. Cellular information in the genome of recovered avian sarcoma virus directs the synthesis of transforming protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3156-3157.
126. Wangh LH; Snyder P; Hanafusa H, *et al.* Evidence for the common origin of viral and cellular sequences involved in sarcomagenic transformation. *J Virol* 1980;35:52-56.
127. Swanstrom R; Parker RC; Varmus HE, *et al.* Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2519-2523.
128. Huebner RJ. The endogenous origin and transmission of RNA viral genomes that code for cancer. *Recent Results Cancer Res* 1976;54:63-91.
129. Goldfarb MP; Shimizu K; Perucho M, *et al.* Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 1982;296:404-409.
130. Reddy EP; Reynolds RK; Santos E, *et al.* A point mutation is the responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300:149-152.
131. Carney W; Petit D; Hamer P, *et al.* Monoclonal antibody specific for an activated RAS protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7845-7849.
132. Cooper GM; Hausman RE. Cancer. In: GM C, RE H, eds. *The Cell: A Molecular Approach*. 3 ed2003.
133. Ren YX; Xu GM; Li ZS, *et al.* Detection of point mutation in K-ras oncogene at codon 12 in pancreatic diseases. *World J Gastroenterol* 2004;10:881-884.
134. Kawatani M; Imoto M. Deletion of the BH1 domain of Bcl-2 accelerates apoptosis by acting in a dominant negative fashion. *J Biol Chem* 2003;278:19732-19742.
135. Riesch M; Niggli FK; Leibundgut K, *et al.* Loss of X chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;125:27-29.
136. Savelyeva L; Schwab M. Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer Lett* 2001;167:115-123.
137. Boxer LM; Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001;20:5596-5610.
138. Doerfler W. The insertion of foreign DNA into mammalian genomes and its consequences: a concept in oncogenesis. *Adv Cancer Res* 1995;66:313-344.
139. El-Osta A. The rise and fall of genomic methylation in cancer. *Leukemia* 2004;18:233-237.
140. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Acad Sci USA* 1971;68:820-823.
141. Goustin AS; Leof EB; Shiple G, *et al.* Growth factors and cancer. *Cancer Res* 1986;46:1015-1029.
142. Holbro T; Civenni G; Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Expl Cell Res* 2003;284:99-110.
143. Riese DJ 2nd; Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998;20:41-48.
144. Ogiso H; Ishitani R; Nureki O, *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002;110:775-787.



145. Cho HS; Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 2002;297:1330-1333.
146. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2006;19:32S-40S.
147. Yarden Y; Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-137.
148. Olayioye MA; Neve RM; Lane HA, *et al.* The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-3167.
149. Hackel PO; Zwick E; Prenzel N, *et al.* Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:184-189.
150. Colquhoun AJ; Mellon JK. Epidermal growth factor receptor and bladder cancer. *Postgrad Med J* 2002;78:584-589.
151. Guy PM; Platko JV; Cantley LC, *et al.* Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8132-8136.
152. Kim HH; Vijapurkar U; Hellyer NJ, *et al.* Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J* 1998;334:185-195.
153. Frykberg L; Palmieri S; Beug H, *et al.* Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the erbA or erbB oncogenes. *Cell* 1983;32:227-238.
154. Downward J; Yarden Y; Mayes E, *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984;307:521-527.
155. Voldborg BR; Damstrup L; Spang-Thomsen M, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-1206.
156. Miller WE; Earp HS; Raab-Traub N. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* 1995;69:4390-4398.
157. Cohen S. The epidermal growth factor receptor. *Cancer* 1983;51:1787-1791.
158. Threadgill DW; Dlugosz AA; Hansen LA, *et al.* Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995;269:230-238.
159. Miettinen PJ; Berger JE; Meneses J, *et al.* Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995;376:337-341.
160. Sibilio M; Steinbach JP; Stingl L, *et al.* A strain-independent postnatal degeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* 1998;17:719-731.
161. Wells A. The epidermal growth factor receptor, a new target in cancer therapy. *Signal* 2000;1:4-11.
162. Chow NH; Liu HS; Chang CJ, *et al.* Urinary excretion of transforming growth factor- α in patients with transitional cell carcinoma. 1998 May-Jun;18(3B):2053-7. *Anticancer Res* 1998;18:2053-2057.
163. Sainsbury Jr C; Farndon JR; Shebert CU, *et al.* Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985;1:366.
164. Liberman TA; Nusbaum HR; Razon N, *et al.* Amplification enhanced expression and possible rearrangement of EGFR gene in primary human brain tumours of glial origin. 1985; 313: 144-147. *Nature* 1985;313:144-147.
165. Bauknecht T. The evidence and evaluation of epidermal growth factor receptors and EGF-like factors as prognostic agents in ovarian carcinoma. *J Cell Biochem* 1986;Suppl 10C:161.
166. Nicholson RI; Gee JMW; Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37:S9-S15.



167. Neal DE; Marsh C; Bennett MK, *et al.* Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer. Comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* 1985;1:366-368.
168. Tzahar E; Waterman H; Chen X, *et al.* A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:5276-5287.
169. Graus-Porta D; Beerli RR; Daly JM, *et al.* ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647-1655.
170. Indicadores de salud. Información disponible sobre los indicadores de salud utilizados. Esperanza de vida. <http://www.msces/2006>.
171. Beerli RR; Graus-Porta D; Woods-Cook K, *et al.* Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 1995;15:6496-6505.
172. Graus-Porta D; Beerli RR; Hynes NE. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 1995;15:1182-1181.
173. Klapper LN; Glathe S; Vaisman N, *et al.* The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4995-5000.
174. Schechter AL; Stern DF; Vaidyanathan L, *et al.* The neu oncogene: an erbB-related gene encoding a 185,000-Mr tumor antigen. *Nature* 1984;312:513-516.
175. Yonemura Y; Ninomiya I; Ohoyama S. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1991;67:2914-2918.
176. Smith M; Kantoff P. Molecular biology of prostate cancer. In: J M, P H, P H, *et al.*, eds. *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia, USA: Editorial WB Saunders Company; 2001:343-360.
177. Fujimoto K; Yamada Y; Okajima E, *et al.* Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1992;52:1393-1398.
178. Lane D; Crawford L. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979;278:261-264.
179. Baker SJ; Fearon ER; Nigro JM, *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221.
180. Eliyahu D; Raz A; Gruss P, *et al.* Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984;312:646-649.
181. Finlay CA; Hinds PW; Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 2006;57:1083-1089.
182. Hollestein M; Sidransky D; Vogelstein B, *et al.* P53 mutation in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
183. Nigro J; Baker S; Presingeeer A, *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse tumor types. *Nature* 1989;324:705-708.
184. Cattoretti G; Rilke F; Andreole S, *et al.* P53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988;2006;41:178-183.
185. Dei Tos A. P53 protein expression in non neoplastic soft tissue. *Histopathology* 1993;1:50.
186. Finlay CA; Hinds PW; Tan TH, *et al.* Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms a hsc700-p53 complex with an altered half life. *Mol Cell Biol* 1998;8:531-539.
187. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.



188. Liu MG; Gelmann EP. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002;29:249-257.
189. Hollstein M; Rice K; Greenblatt MS, *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3551-3555.
190. 2005 International Agency for Research on Cancer. The Globocan 2002 Database. The Globocan 2002 Database2005.
191. Srinivas PR; Srivastava S; Hanash S *et al.* Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 2001;47:1901-1911.
192. Haab BB; Dunham MJ; Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2001;2:research0004.0001-research0004.0013.
193. Sanchez Carbayo M. Aplicación de arrats de anticuerpos en el estudio del cáncer vesical. *Actas Urol Esp* 2007;31:1082-1088.
194. Vivanco L; Mellinoff IK. Epidermal growth factor receptor inhibitors in oncology. *Curr Opin Oncol* 2010;22:573-578.
195. Fruenhaus J. EGFR function and detection in cancer therapy. *J Exp Ther Oncol* 2006;5:231-236.
196. Goebell PJ; Groshen SG; Schmitz-Dräger BJ. p53 immunohistochemistry in bladder cancer-- a new approach to an old question International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC). *Urol Oncol* 2010;28:377-388.
197. Netto GJ. Molecular biomarkers in urothelial acrcinoma of the bladder: are we there yet? *Nat Rev Urol* 2011;13:41-51.
198. Mitra AP; Birkhann M; Cote RJ. p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. *World J Urol* 2007;25:563-571.
199. Adrover E; Maestro ML; Sanz-Casla MT, *et al.* Expression of high p53 levels in colorectal cancer: a favourable prognostic factor. *Br J Cancer* 1999;81:122-126.
200. Adshead JM; Kessler AM; Ogden CW. Genetic initiation, progression and prognostic markers in transitional cell carcinoma of the bladder: A summary of the structural and transcriptional changes, and the role of development genes. *Br J Urol* 1998;82:503-512.
201. Ramos Soler D; Navarro Fos S; Villamon Fort R, *et al.* Estudio comparativo de la expresión de p53, Bcl-2 y C-erbB-2 en neoplasias papilares debajo grado. *Arch Esp Urol* 2003;56:277-285.
202. Burkhard F; Markwalder R; Thalmann GN, *et al.* Inmunohistochemical determination of p53 expression. *Urol Res* 1997;25:S31-S35.
203. Tobias A. Summary statistics report for diagnostic tests. *Stata Technical Bulletin* 2000; 56:16-18.
204. Millan-Rodríguez F; Chechile-Toniolo G; Salvador-Bayarri J, *et al.* Primary superficial bladder cancer risk groups according to progresión, mortality, and recurrence. *J Urol* 2000;164:680-684.
205. Fujikawa K; Matsui Y; Kobayashi T *et al.* Predicting disease outcome of non-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder using an artificial neural network model: results of patient follow-up for 15 years or longer. *Int J Urol* 2003 10:149-152.
206. Machin D; Campbell MJ; Tan SB *et al.* Sample size tables for clinical studies. Oxford2009.
207. Lowry OH; Rosebrough NJ; Farr AL, *et al.* Protein measurements with Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.



208. Mohamed WS; Omar MM; Kayri TM et al. Assessment of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein expression in HBV and HCV related hepatocellular carcinoma cases in Egypt. *Int J Health Sci* 2008;2:27-34.
209. Van Diest PJ; van DAM P; Hensen-Logmans SC et al. A scoring system for immunohistochemical staining consensus report of the task force for basic research of the EORTC-CGCG European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1997;50:801-804.
210. Kamel D; Soimi Y; Nuorva K, et al. P53 and c-erbB2 expression in schistosomal urinary bladder carcinoma and schistosomal cystitis with premalignant lesions. *Virchows Arch* 1994;424:349.
211. R; Nesland JM; Berner A et al Rotterud. Expression of epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. *BJU Int* 2005;95:1344-1350.
212. Tschui J; Vasella E; Bandi N et al. Morphological and molecular characteristics of HER2 amplified urothelial bladder cancer. *Virchows Arch* 2015;466:703-710.
213. Chow NH; Liu HS; Yang HB, et al. Expression patterns of erbB receptor family in normal urothelium and transitional cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1997;430:461-466.
214. Botteman MF; Pashos CL; Redaelli A, et al. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2003;21:1315-1330.
215. Lee R; Droller MJ. The natural history of bladder cancer: implications for therapy. *Urol Clin North Am* 2000;27 1-13.
216. Ioachim E; Michael M; Salmas M et al. Hypoxia inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in bladder cancer and their associations with other angiogenesis related proteins. *Urol Int* 2006;77:255-263.
217. Mariappan P; Smith G. A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on a 25-year prospective database. *J Urol* 2005;173 1108-1111.
218. van der Aa MN; Steyerberg EW; Bangma C; van Rhijn BW; Zwarthoff EC; van der Kwast TH. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. *J Urol* 2010;183:76-80.
219. Muñoz A. Cáncer, Genes y nuevas terapias. 1 ed: Editorial Hélice.; 1997.
220. Lorenzo MF; Schroeder G. Utilidad de los marcadores tumorales en el pronóstico del cáncer transicional de vejiga. *Actas Urol Esp* 2003;27:501-512.
221. Rink M; Cha EK; Green D et al. Biomolecular predictors of urothelial bladder cancer behaviour and treatment outcomes. *Curr Urol Rep* 2012;13:122-135.
222. Mitra AP; Hansel DE; Cote RJ. Prognostic Value of Cell-Cycle Regulation Biomarkers in Bladder Cancer. *Seminars in oncology* 2012;39:524-533.
223. Cregger M; Berger AJ; Rimm DL. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1026-1030.
224. Taylor CR. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology. *Biotech Histochem* 2006;81:3-12.
225. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment. *Histopathology* 2006;46:406-410.
226. Leong TY; Leong AS. How does antigen retrieval work? *Adv Anat Pathol* 2007;14:129-131.
227. Anagnostou VK; Welsh AW; Giltnane JM et al. Analytic variability in immunohistochemistry biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:982-981.



228. Daneshtalab N; Dore JJ; Smeda JS. Troubleshooting tissue specificity and antibody selection: Procedures in immunohistochemical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61:127-135.
229. Borg A; Lennerstrand J; Stenmark-Askmal M, *et al.* Prognostic significance of p53 overexpression in primary breast cancer; a novel luminometric immunoassay applicable on steroid receptor cytosols. *Br J Cancer* 1995;71:1013-1017.
230. Berns EM; De Witte HH; Klijn JG, *et al.* Prognostic value of TP53 protein accumulation in human primary breast cancer: an analysis by luminometric immunoassay on 1491 tumor cytosols. *Anticancer Res* 1997;17:3003-3006.
231. Gullick WJ; Downward DJ; Marsden JJ, *et al.* A radioimmunoassay for human epidermal growth factor receptor. *Anal Biochem* 1984;141:253-261.
232. Carney WP; Hamer PJ; Petit D, *et al.* Detection and quantification of the human neu oncoprotein. *Tumor Marker Oncol* 1991;6:53-72.
233. Petitjean A; Mathe E; Kato S; Ishioka C; Tavtigian SV; Hainaut P; Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2013;622-629.
234. Greenblatt MS; Bennett WP; Hollstein M, *et al.* Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer ethiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-4878.
235. Gao JP; Uchida T; Wang C, *et al.* Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Oncol* 2000;16:175.
236. Chatterjee SJ; Datar R; Youssefzadeh D, *et al.* Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:1007-1013.
237. Shariat SF; Tokunaga H; Zhou JH, *et al.* p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1014-1024.
238. Shariat SF; Weizer AZ; Green A, *et al.* Prognostic value of P53 nuclear accumulation and histopathologic features in T1 transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology* 2000;56:735-740.
239. 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.
240. Queipo Zaragoza JA; Ruíz Cerdá JL; Palmero Martí L, *et al.* Prognostic value for progression of the regulating proteins of the cellular cycle in PT1G3 bladder tumours. *Actas Urol Esp* 2005;29:261-268.
241. 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.
242. 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;56:239-247.
243. Casetta G; Gontero P; Russo R, *et al.* p53 expression compared with other prognostic factors in OMS grade-I stage-Ta transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 1997;32:229-236.
244. Zlotta AR; Noel JC; Fayt I, *et al.* Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol* 1999;161:792-798.



245. Momand J; Zambetti GP; Olson DC, *et al.* The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237-1245.
246. De Laurenzi V; Malino G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann NY Acad Sci* 2000;926:90-100.
247. DeWolf WC. p53 an important key to understanding urologic cancer. *AUA Update Series* 1995;XIV:258.
248. Bernardini S; Adessi GL; Billerey C, *et al.* Immunohistochemical detection of p53 protein overexpression versus gene sequencing in urinary bladder cancer carcinomas. *J Urol* 1999;162:1496-1501.
249. Esrig D; Spruck CH 3rd; 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;143:1389-1397.
250. Cordon-Cardo C; Dalbagni G; Saez GT, *et al.* p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994;56:347-353.
251. Hallak R; Mueller J; Lotter O, *et al.* p53 genetic alterations, protein expression and autoantibodies in human colorectal carcinoma: A comparative study. *Int J Oncol* 1998;12:785-791.
252. Broet P; Spyrtatos F; Romain S, *et al.* Prognostic value of uPA and p53 accumulation measured by quantitative biochemical assays in 1245 primary breast cancer patients: a multicentre study. *Br J Cancer* 1999;80:536-545.
253. Koul A; Bendahl PO; Borg A, *et al.* TP53 protein expression analysis by luminometric immunoassay in comparison with gene mutation status and prognostic factors in early stage endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:362-371.
254. Wang L; Habuchi T; Takahashi T, *et al.* No association between HER-2 gene polymorphism at codon 655 and a risk of bladder cancer. *Int J Cancer* 2002;97:787-790.
255. Kruger S; Weitsch G; Buttner H, *et al.* Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Int J Oncol* 2002;21:981-987.
256. Latif Z; Watters AD; Dunn I, *et al.* HER2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2003;89:1305-1309.
257. Amsellem-Ouazana D; Bieche I; Molinie V. Is quantitative real-time RT-PCR an adjunct to immunohistochemistry for the evaluation of ErbB2 status in transitional carcinoma of the bladder? *Eur Urol* 2006;49:1035-1043.
258. Duzcan F *et al.* Caner Y; Turk NS. No strong association between HER2/neu protein overexpression and gene amplification in high grade invasive urothelial carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2008;146:261-266.
259. Leal CB; Schmitt FC; Bento MJ, *et al.* Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 1995;75:2123-2133.
260. Tokunaga A; Onda M; Okuda T, *et al.* Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer* 1995;75:1418-1425.
261. Press MF; Hung G; Godolphin W, *et al.* Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in the immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54:2771-2777.
262. Gancberg D; Lespagnard L; Rouas G, *et al.* Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol* 2000;113:675-682.



263. Koscielny S; Terrier P; Daver A, *et al.* Quantitative determination of c-erbB-2 in human breast tumors: potential prognostic significance of low values. *Eur J Cancer* 1998;34:476-481.
264. Bermont L; Algros MP; Baron MH, *et al.* Relevance of p185 HER-2/neu oncoprotein quantification in human primary breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2000;63:163-169.
265. Kakar S; Puangsuvan N; Stevens JM, *et al.* HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and correlation with survival. *Mol Diagnosis* 2000;5:199-207.
266. Joensuu H; Weidler J; Lie Y. Quantitative measurements of HER2 homodimer using a novel proximity based assay: comparison with HER2 status by immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization in the FinHer. Study. *Cancer Res* 2009;69 (2 Suppl):Abstract 2007.
267. Schabb B Kostler WJ, Singer C *et al.* Monitoring serum HER2/neu predicts response and progression free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:1618-1624.
268. Yeh IT. Measuring HER-2 in breast cancer. Immunohistochemistry, FISH, or ELISA? *Am J Clin Pathol* 2002;117:S26-S35.
269. Muller V; Thomssen C; Karakas C, *et al.* Quantitative assessment of HER-2/neu protein concentration in breast cancer by enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Biol Markers* 2003;18:13-20.
270. Diez M; Pollan M; Maestro M, *et al.* Prediction of recurrence by quantification of p185neu protein in non-small-cell lung cancer tissue. *Br J Cancer* 1997;75:684-689.
271. Berger MS; Greenfield C; Gullick WJ, *et al.* Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. *Br J Cancer* 1987;56:533-537.
272. Wood Jr DP; Fair WR; Chaganti RS. Evaluation of epidermal growth factor receptor DNA amplification and mRNA expression in bladder cancer. *J Urol* 1992;147:274-277.
273. Gorgoulis VG; Barbatis C; Poulias I, *et al.* Molecular and immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 gene product in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: A study in Greek patients. *Mod Pathol* 1995;8:758-764.
274. Neal DE; Sharples L; Smith K, *et al.* The epidermal growth factor receptor and prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990;65:1619-1625.
275. Mellon K; Wright C; Kelly P, *et al.* Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J Urol* 1995;153:919-925.
276. Chow NH; Liu HS; Lee EI, *et al.* Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. *Anticancer Res* 1997;17:1293-1296.
277. 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.
278. Mellon JK Nutt JE, Qureshi K *et al.* Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in the urine of patients with bladder tumours. *Br J Cancer* 1998;78:215-220.
279. Grimaux M; Mady E; Remvikos Y *et al.* A simplified immuno-enzyme assay of the epidermal growth factor receptor in breast tumours: Evaluation in 288 cases. *Int J Cancer* 1990;45: 255-262.
280. Christensen MME; Engbaek F; Therkildsen MH *et al.* A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay used for quantitation of epidermal growth factor receptor protein in



- head and neck carcinomas: evaluation, interpretations and limitations. *Br J Cancer* 1995;72:1487-1493
281. Hurtt MR; Moossy J; Donovan-Pelusso M et al. Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Histopathology and prognosis. J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51:84-90.
282. Hembrough T; Thyprambil S; Liao WL et al. Selected reaction monitoring (SRM) analysis of epidermal growth factor receptor in formalin fixed tumor tissue. *Clin Proteomics* 2012;9:1-10.
283. Chen YF; Pan GZ; Hou X, et al. Epidermal growth factor and its receptors in human pancreatic carcinoma. *Pancreas* 1990;5:278-283.
284. Kopp R; Rothbauer E; Ruge M, et al. Clinical implications of the EGF receptor/ligand system for tumor progression and survival in gastrointestinal carcinomas: evidence for new therapeutic options. *Recent Results Cancer Res* 2003;162:115-132.
285. Valente S; Souto B; Balter H, et al. Interaction of a monoclonal antibody against hEGF with a receptor site for EGF. *Nucl Med Biol* 1999;26:937-942.
286. Mishra AK; Iznaga-Escobar N; Figueredo R, et al. Preparation and comparative evaluation of ^{99m}Tc-labeled 2-iminothiolane modified antibodies and CITC-DTPA immunoconjugates of anti-EGF-receptor antibodies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24:653-656.
287. Nestor M; Ekberg T; Dring J et al. Quantification of CD44v& and EGFR expression in head and neck squamous cell carcinomas using a single-dose radioimmunoassay. *Tumor Biol* 2007;28:253-256.
288. Nugent A; Gallagher J; Dolan J, et al. Assay of the c-erbB-2 oncogene encoded protein by ELISA and immunocytochemistry in human breast cancer. *Ann Clin Biochem* 1994;31:171-173.
289. Sanfilippo JS; Miseljic S; Yang AR, et al. Quantitative analyses of epidermal growth factor receptors, HER-2/neu oncoprotein and cathepsin D in nonmalignant and malignant uteri. *Cancer* 1996;77:710-716.
290. Pfeiffer P; Nexø E; Bentzen. Enzyme-linked immunosorbent assay of epidermal growth factor receptor in lung cancer: Comparisons with immunohistochemistry, clinicopathological features and prognosis. *Br J Cancer* 1998;78:96-99
291. Lacombe L; Gauthier J; Lafleur L, et al. Interet clinique de l'etude d'antigenes de proliferation et d'activation cellulaire par cytométrie en flux dans le cancer de la vessie. *Prog Urol* 1996;6:907-912.
292. Brockhoff G; Endl E; Minuth W, et al. Options of flow cytometric three-colour DNA measurements to quantitate EGFR in subpopulations of human bladder cancer. *Anal Cell Pathol* 1996;11:55-70.
293. Neal DE; Smith K; Fenelly JA, et al. Epidermal growth factor in human bladder cancer: A comparison of immunohistochemistry and ligand binding. *J Urol* 1989;141:517-521.
294. Verma M; Srivastava S. New cancer biomarkers deriving from NCI early detection research. *Recent Results Cancer Res* 2003;163:72-84.
295. Winget MD; Baron JA; Spitz MR et al. Development of common data elements: the experience of and recommendations from the early detection research network. *Int J Med Inform* 2003;70:41-48.
296. Youssef R; Kapur P; Shariat SF; Arendt T; Kabbani W; Mosbah A; Abol-Enein H; Ghoneim M; Lotan Y. Prognostic value of apoptotic markers in squamous cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU Int* 2012;110.
297. Rajjayabun PH; Keegan PE; Lunec J, et al. erbB receptor expression patterns in human bladder cancer. *Urology* 2005;66:196-200.



298. Sanguedolce F; Bufo P; Carrieri G; Cormio L. Predictive markers in bladder cancer: do we have molecular markers ready for clinical use? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014;51:291-304.
299. Younes M; Sussman J; True LD. The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 1990;64:543-548
300. Smits G; Schaafsma E; Kiemeney L et al. Microstaging of pT1 transitional cell carcinoma of the bladder: identification of subgroups with distinct risk of progression *Urology*. 52 1998;1009-1013
301. Orsola A; Trias I; Raventos CX et al. Initial high-grade T1 urothelial cell carcinoma: feasibility and prognosis significance of lamina propria microstaging (T1 a/b/c) in BCG-treated and BCG-non treated patients *Eur Urol* 2005;48:231-238
302. Cheng L; Weaver AL; Neumann RM et al. Substaging of T1 bladder carcinoma based on the depth of invasion as measured by micrometer: a new proposal. *Cancer* 1999 86:1035-1043.
303. et al Sauter G; Algaba F; Amin M. Tumours of the urinary system: non- invasive urothelial neoplasias. WHO classification of classification of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press; 2004:29-34.
304. Murphy WM; Takezawa K; Maruniak Na. Inter-observer discreancy using the 1998 World Health Organization/International Society of Urologic Pathology classification of urothelial neoplasms: practical choices for patient care. . *J Urol* 2002;168:963-972
305. Montironi R; López Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol* 2005;13:143-153.
306. Vickers AJ; Jang K; Sargent D et al. Systematic review of statistical methods used in moleular markers studies in cancer. *Cancer* 2008;112:1862-1868.
307. LA Kluth, Black PC, Bochner BH. . Prognostic and prediction tolos in bladder cáncer: a comprehensive review of the literature. *Eur Urol* 2015;68:238-253.
308. Holmång S; Ströck V. Should follow-up cystoscopy in bacillus Calmette-Guerin-treated patients continue after five tumour-free years? . *Eur Urol* 2012;61:503–507.
309. Moreno Sierra J; Maestro de las Casas ML; Redondo González E, *et al*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el pronóstico del carcinoma vesical. Experiencia a 5 años. *Arch Esp Urol* 2000;53:323-331.
310. Moreno Sierra J; Maestro de las Casas ML; Fernandez Perez C, *et al*. Quantification of p53 oncoprotein in bladder carcinoma: 5-year experience. *Arch Esp Urol* 1999;52:220-227.
311. Moreno Sierra J; Maestro de las Casas ML; Ortega Heredia MD, *et al*. New quantitative method for determining p53 protein in bladder carcinomas. *Arch Esp Urol* 1997;50:347-353.
312. Moreno Sierra J; Maestro de las Casas M; Ortega Heredia M, *et al*. Dosificación cuantitativa del receptor urotelial del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en carcinomas vesicales superficiales e invasivos. *Actas Urol Esp* 1994;18:215-220.
313. Grossman HB; Schmitz-Drager B; Fradet Y, *et al*. Use of markers in defining urothelial premalignant and malignant conditions. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000;205:94-104.
314. McShane LM; Altman DG; Sauerbrei W; Taube SE; Gion M and Clark GM for the Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics. Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK) *British Journal of Cancer* 2005;93:387–339.
315. Kiemeney LALM; Coebergh JWW; Koper NP, *et al*. Bladder cancer incidence and survival in the south-eastern part of the Netherlands, 1975-1989. *Eur J Cancer* 1994;30:1134-1137.



316. Arrizabalaga M; Mora M; Navarro J, *et al.* Epidemiología descriptiva del cáncer vesical en el Área Sanitaria 8 de Madrid. Estudio retrospectivo sobre 315 pacientes. *Actas Urol Esp* 1994;18:258-265.
317. Angulo JC; López JI; Flores N, *et al.* Carcinoma de vejiga: (I). Consideraciones epidemiológicas en el País Vasco. *Actas Urol Esp* 1993;17:473-478.
318. Kunze E; Chang-Claude J; Frentzel-Beyme R. Life style and occupational risk factors for bladder cancer in Germany. A case-control study. *Cancer* 1992;69:1776-1790.
319. Vicente-Rodríguez J; Salvador-Bayarri J; Chechile-Toniolo G, *et al.* Tumores vesicales superficiales iniciales: Nuestra experiencia. Nuestro criterio. *Actas Urol Esp* 2000;24:522-529.
320. Lynch CF; Cohen MB. Urinary system. *Cancer* 1995;75 (suppl):316.
321. Catalona WJ. Tumores uroteliales del tracto urinario. In: PC W, AB R, TA S, *et al.*, eds. *Campbell Urología*. 6ª ed. Buenos Aires. Argentina: Ed Médica Panamericana; 1994:1090-1154.
322. Santos Arrontes D; Páez Borda A; Luján Galán M *et al.* Genitourinary cancer incidence in a health geographic area of 300.000 people. . *Actas Urol Esp* 2004;28:646-649.
323. Urrutia G; Serra C; Bonfill X, *et al.* Incidencia del cáncer de vejiga urinaria en un área industrializada de España. *Gac Sanit* 2005;16:291-297.
324. Kiemeny LA; Witjes JA; Verbeek AL, *et al.* The clinical epidemiology of superficial bladder cancer. Dutch South-East Cooperative Urological Group. *Br J Cancer* 1993;67:806-812.
325. Pagano F; Garbelio A; Milani C, *et al.* Prognosis of Bladder Cancer: Risk Factors In Superficial Transitional Cell Cancer. *Eur Urol* 1987;13:145-149.
326. England HR; Paris AMI; Blandy JP. The correlation of T1 bladder tumour history with prognosis and follow-up requirements. *Br J Urol* 1987;53:593-597.
327. Arrizabalaga Moreno I; García González JI; Díez Rodríguez J, *et al.* Evolución y pronóstico a medio y largo plazo de los tumores vesicales superficiales. *Actas Urol Esp* 2001;25:710-719.
328. Alvarez Kindelán J; López Beltrán A; Requena Tapia MJ. Biología molecular en el cáncer vesical. *Actas Urol Esp* 2000;24:604-625.
329. Caliskan M; Turkeri LN; Mansuroglu B, *et al.* Nuclear accumulation of mutant p53 protein: a possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *Br J Urol* 1997;79:373-377.
330. Sinik Z; Alkibay T; Ataoglu O, *et al.* Correlation of p53 overexpression with clinical and histopathological features of transitional cell bladder cancer. *Int J Urol Nephrol* 1997;29:25-31.
331. Wright C; Mellon KJ; Johnston P, *et al.* Expression of mutant p53, c-erbB2 and epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer* 1991;63:967-970.
332. 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.
333. Goto K; Konomoto T; Hayashi K, *et al.* P53 mutations in multiple urothelial carcinomas: a molecular analysis of the development of multiple carcinomas. *Mod Pathol* 1997;10:428-437.
334. Chow NH; Chan SH; Tzai TS, *et al.* Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001;7:1957-1962.



335. Rotterud R; Fossa SD; Nesland JM. Protein networking in bladder cancer: immunoreactivity for FGFR3, EGFR, ERBB2, KAI1, PTEN and RAS in normal and malignant urothelium. *Histol Histopathol* 2007;22:349-363.
336. Wagner U; Sauter G; Moch H, *et al.* Patterns of p53, erbB-2, and EGF-r expression in premalignant lesions of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1995;26:970-978.
337. Tetu B; Fradet Y; Allard P, *et al.* Prevalence and clinical significance of HER/2neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol* 1996;155:1784-1788.
338. Kay EW; Walsh CJ; Cassidy M, *et al.* C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol* 1994;47:816-822.
339. Wood DP Jr; Wartinger DD; Reuter V, *et al.* DNA, RNA and immunohistochemical characterization of the HER-2/neu oncogene in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2006;191:5-1398.
340. Bellmunt J; Hussain M; Dinney CP. Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer. Therapy of bladder cancer by blockade of the epidermal growth factor receptor family. *Crit Rev Oncol Hemato* 2003;46:85-104.
341. Junttila TT; Laato M; Vahlberg T, *et al.* Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:5346-5357.
342. Amsellem-Ouazana A; Bièche B; Tozlu S, *et al.* Gene Expression Profiling of ERBB Receptors and Ligands in Human Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *J Urol* 2006;175:1127-1132.
343. Eissa S; Ali HS; Al Tonsi A H; Zaglol A; El Ahmady O. HER2/neu expression in bladder cancer: relationship to cell cycle kinetics. *ClinBiochem* 2005;38:142-148.
344. Ecke TH; Schlechte HH; Schulze G *et al.* Four tumour markers for urinary bladder cancer - tissue polypeptid antigen (TPA), HER2/ne (ERB B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation. *Anticancer Research* 2005;25:635-641.
345. Messing EM; Hanson P; Ulrich P, *et al.* Epidermal growth factor--interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J Urol* 1987;138:1329-1335.
346. Boccafoschi C; Montefiore F; Pavesi M, *et al.* Proliferazione cellulare, espressione di p53, EGFR, ed indice di apoptosi nella mucosa sana di vesiche con TCC; studio immunohistochimico pre e post BCG endovescicale. *Arch Ital Urol Androl* 1997;69:279-281.
347. Baskin LS; Sutherland RS; Thomson AA, *et al.* Growth factors in bladder wound healing. *J Urol* 1997;157:2388-2395.
348. Chow NH; Tzai TS; Lin SN. Reappraisal of the biological role of epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma. *Eur Urol* 1993;24:140-143.
349. Nakopoulou L; Zervas A; Constantinides C, *et al.* Epithelial differentiation antigens and epidermal growth factor receptor in transitional cell bladder carcinoma: correlation with prognosis. *Urol Int* 1995;54:191-197.
350. Korkolopoulou P; Christodoulou P; Kapralos P, *et al.* The role of p53, MDM2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer. *Pathol Res Pract* 1997;193:767-775.
351. Liukkonen TJ; Lipponen PK; Helle M, *et al.* Immunoreactivity of bcl-2, p53, and EGFR is associated with tumor stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. Finnbladder III Group. *Urol Res* 1997;25:1-7.



352. Ravery V; Grignon D; Angulo J et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res* 1997 25:9-27.
353. Jimenez RE; Hussain M; Blanco F-JJ. Her2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognosis significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2000;2001:2440-2447.
354. Messing EM. Clinical implications of epidermal growth factor receptors in human transitional cell bladder carcinoma. *Cancer Res* 1990;50:2530-2537.
355. Momose H; Kakinuma H; Shariff SY, et al. Tumor-promoting effect of urinary epithelial growth factor in rat urinary carcinogenesis. *Cancer Res* 1987;51:5487-5490.
356. Messing EM; Retznikoff CA. Binding and responsiveness to epidermal growth factor by in vitro transformants of normal urothelium cells. *J Urol* 1990;143:272A.
357. Smith K; Fennelly JA; Neal DE, et al. Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer Res* 1989;49:5810-5815.
358. Mellon JK; Cook S; Chambers P, et al. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factors levels in bladder cancer and their relationship to epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1996;73:654-658.
359. van Nagel JR; Donaldson ES; Hanson MB et al. Biochemical markers in the plasma and tumours of patients with gynaecologic malignancies. *Cancer* 1981;48:495-503.
360. Tormey DC; Davis TE; Walkees TP. Tumor markers. In: Carter SK; Glastein E LR, ed. *Principles of cancer treatment*. New York: Mc Graw-Hill; 1982:170-177.
361. Ilyin SE; Belkowski SM; Plata-Salaman CT. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends Biotechnol* 2004;22:411-416.
362. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.
363. Carvajal-Hausof DE; Schalper KA; Neumeister VM et al. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Lab Invest* 2015;95:385-396.
364. Shariat SF; Lotan Y; Vickers A et al. Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer. *Urol Oncol*;28:389-400.
365. Ramukumar S; Bhuiyan J; Besse JA et al. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* 1999;161:388-394.
366. Lokeshwar VB; Habuchi T; Grossman HB et al. Bladder tumour markers beyond cytology: international consensus panel on bladder tumour markers. *Urology* 2005;66(Suppl 1):35-63.
367. Vrooman OPJL; Witjes JA. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol* 2008;53:909-916.
368. Budman LI; WassimKassouf MS; Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J* 2008 2: 212-221.
369. Kausch I; Böhle A. Molecular aspects of bladder cancer III: Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol* 2002;41:15-29.
370. Zhang ZF; Sarkis AS; Cordon-Cardo C et al. Tobacco smoking, occupation and p53 nuclear overexpression in early stage bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:19-24.
371. Pao W; Miller V; Zakowski M et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancer from "never smokers" and are associated with sensitivity to gefitinib and erlotinib. *Proc Acad Sci USA* 2004;101:13306-13311.
372. Kosaka T; Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer. Biological and clinical implications. *Cancer Res* 2004;15:8919-8923.



373. Paez JG; Janne PA; Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
374. Dogan S; Shen R; Ang DC et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3026 lung adenocarcinomas: Higher susceptibility of women to smoking related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res* 2012;15:6169-6177.
375. Jiménez-Farfán D; Guevara J; Zenteno E. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73:65-71.
376. Henderson GI; Baskin GS; Horbach J. Arrest of epidermal growth factor-dependent growth in fetal hepatocytes after ethanol exposure. *J Clin Invest* 1989;84:1287-1294.
377. Luo J; Miller MW. Ethanol Enhances erbB-mediated migration of human cancer breast cells in culture. *Breast Cancer Res Treat* 2000;63:61-69.
378. Wang SL; Jacober L; Wu-Wang CY. Ethanol-induced structural and functional alterations of epidermal growth factor receptor in buccal mucosa. *Int J Biochem* 1992;24:85-90.
379. Ke Z; Lin H; Fan Z. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int J Cancer* 2006;119:8-16.
380. Kuczyk MA; Serth J; Hervatin C, et al. Detection of P53 tumor-suppressor-gene protein in bladder tumors and prostate cancer: possible clinical implications. *World J Urol* 1994;12:345-351.
381. Al-Abadi H; Nagel R; Neuhaus P. Immunohistochemical detection of p53 protein in transitional cell carcinoma of the bladder in correlation to DNA ploidy and pathohistological stage and grade. *Cancer Detect Prev* 1988;22:43-50.
382. San Miguel P; Antón I; Ortiz JA, 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;27:587-593.
383. Al-Abadi H; Nagel R. Prognostic relevance of ploidy and proliferative activity of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1988;15:271-276.
384. Ye DW; Zheng JF; Qian SX, et al. Expression of p53 product in Chinese human bladder carcinoma. *Urol Res* 1991;21:223-226.
385. Nakopoulou L; Constantinides C; Papandropoulos J, et al. Evaluation of overexpression of p53 tumor suppressor protein in superficial and invasive transitional cell bladder cancer: comparison with DNA ploidy. *Urology* 1995;46:334-340.
386. Kilicli-Camur N; Kilicaslan I; Gulluoglu MG, et al. Impact of p53 and Ki-67 in predicting recurrence and progression of superficial (pTa and pT1) urothelial cell carcinomas of urinary bladder. *Pathol Int* 2002;57:463-469.
387. Tsai YS; Tzai TS; Chow NH, et al. Prognostic values of p53 and HER-2/neu coexpression in invasive bladder cancer in Taiwan. *Urol Int* 2003;71:262-270.
388. Schlechte H; Schnorr D; Löning T, et al. Mutation of the tumor suppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers: investigation by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *J Urol* 1997;157:1049-1053.
389. Salinas-Sánchez AS; Lorenzo-Romero JG; Giménez-Basch JM et al. Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors. *J Urol* 2003;169:492-499.
390. Schmitz-Drager BJ; Goebel PJ; Heydthausen M, et al. p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer: the ISBC combined análisis. . *Suppl.* 1999; 161: 153, abstract 585. *J Urol* 1999;161:153.
391. Tsutsumi M; Sugano K; Yamaguchi K, et al. Correlation of allelic loss of the P53 gene and tumor grade, stage, and malignant progression in bladder cancer. *Int J Urol* 1997;4:74-78.



392. Schmitz-Dräger BJ; Kushima M; Goebell P, *et al.* p53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer. *Eur Urol* 1997;32:487-493.
393. Vollmer RT; Humphrey PA; Swanson PE, *et al.* Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: its relation to histologic grade and expression of p53, MIB-1, c-erb B-2, epidermal growth factor receptor, and bcl-2. *Cancer* 1998;82:715-723.
394. Plastiras D; Moutzouris G; Barbatis C, *et al.* Can p53 nuclear over-expression, Bcl-2 accumulation and PCNA status be of prognostic significance in high-risk superficial and invasive bladder tumours? *Eur J Surg Oncol* 1999;25:61-65.
395. Staton WJ; Benedict WF; Dinney CPN. p53 in bladder cancer: mechanism of action, prognostic value and target for therapy. *Urology* 2001;57:852-859.
396. Atug F; Turkeri L; Ozyurek M, *et al.* Bcl-2 and p53 overexpression as associated risk factors in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol* 1998;30:455-461.
397. Saidi S; Popov Z; Stavridis S; Janevska V *et al.* Digital quantitative immunofluorescent detection of p53 protein in urinary bladder cancer tissue samples. *Prilozi* 2013;34:167-175.
398. Moriyama M; Morishita Y; Mori S, *et al.* Ultrastructural localization of c-erbB-2 gene product in transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Ultrastruct Pathol* 1990;14:399-405.
399. Latif Z; Watters AD; Dunn I *et al.* HER2/neu gene amplification and protein overexpression in G3 pT2 transitional cell carcinoma of the bladder: a role for anti-HER2 therapy? *Eur J Cancer* 2004;Cancer:56-63.
400. Folkins AK *et al.* Gandour-Edwards R Lara PN. Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer* 2002;95:1009-1015
401. Bolenz C; Shariat SF; Karakiewicz PI; *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 expression status provides independent prognostic information in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BJU Int* 2010;106:1216-1222.
402. Lonn U; Lonn S; Friberg S, *et al.* Prognostic value of amplification of c-erbB-2 in bladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;1:1189-1194.
403. Gandour-Edwards R; Lara PN Jr; Folkins AK, *et al.* Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer* 2006;95:1009-1015.
404. Montie JE. Her-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2005;173:1921-1922.
405. Hammam O; Noir HH; Mosaad M *et al.* The clinical significance of HER2 protein amplification/expression in urinary bladder lesion. *Arab J Urol* 2015;13:146-152.
406. Izawa JI; Slaton JW; Kedar D, *et al.* Differential expression of progression-related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* 2001;8:9-15.
407. Zhou H; Zhang X; Von Eschbach A, *et al.* Amplification and expression of the c-erbB-2/neu proto-oncogene in human bladder cancer. *Mol Carcinog* 1990;3:254-257.
408. Underwood M; Barlett J; Reeves J, *et al.* C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors?. *Cancer Res* 1995;55:2422-2430.
409. Chen PC; Yu HJ; Chang YH; Pan CC. Her2 amplification distinguishes a subset of non-muscle-invasive bladder cancers with a high risk of progression. *J Clin Pathol* 2013;66:113-119.
410. Pich A; Chiusa L; Formiconi A, *et al.* Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder. *Cancer* 2002;95:784-790.



411. Enache M; Simonescu CE; Stepan A. EGFR and HER2/neu immunoexpression in papillary urothelial bladder carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2013;54:137-141.
412. Bolenz C; Lotan Y; Ther I. Translational research in bladder cancer: from molecular pathogenesis to useful tissue biomarkers. *Cancer Biol* 2010;10:407-415.
413. Chakravarti A; Winter K; Wu CL et al . Expression of the epidermal growth factor receptor and Her 2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invasive bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:309-317
414. Nouri AM; Thompson C; Caneel H et al. Profile of epidermal growth factor receptor (EGFr) in human malignancies: effects of exposure to EGF and its biological influence on established human tumour cell lines. *Int J mol Med* 2000; 6:495-500.
415. Chaux A; Cohen JS; Schultz L. High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutation in exons 19 and 21: a study using formalin fixed, paraffin embebed archival tissues. *Hum Pathol* 2012;43:1590-1595.
416. Kiyoshima K; Oda Y; Kinukaea N et al. Overexpression of laminin-5 gamma2 chain and its prognostic significance in urothelial carcinoma of urinary bladder association with expression of cyclooxygenase 2 epidemal growth factor receptor (corrected) andhuman epidermal growth factor receptor (corrected)2. *Hum Pathol* 2005;36:522-530.
417. Naik DS; Sharma S; Ray A et al. Epidermal growth factor receptor expression in urinary bladder cancer. *Indian J Urol* 2011;27:208-214.
418. Mellon JK; Lunec J; Wright C, et al. C-ERBB-2 in bladder cancer molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol* 1996;155:321-326.
419. Nakanishi K; Kawai T; Suzuki M, et al. Growth factors and oncogene products in transitional cell carcinoma. *Mod Pathol* 1996;9:292-297.
420. Serth J; Kuczyk MA; Bokemeyer C, et al. p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 1995;71:201-205.
421. Pfister C; Buzelin F; Casse C, et al. Comparative analysis of MiB1 and p53 expression in human bladder tumors and their correlation with cancer progression. *Eur Urol* 1998;33:278-284.
422. Liukkonen T; Rajala P; Raitanen M, et al. Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary superficial (Stage pTa/T1) bladder cancer: a prospective comparative study. The Finnbladder Group. *Eur Urol* 1999;36:393-400.
423. Santos LL; Amaro T; Pereira SA, et al. Expresión of cell-cycle regulatory proteins and their prognosis in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. . *Eur J Surg Oncol* 2003;29:74-80.
424. Reihner F; Ozer O; Pins M, et al. P53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. *J Urol* 2002;167:1469-1474.
425. Tuna B; Yorukoglu K; Tuzel Z. Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer. *Pathol Res Pract* 2003;199:323-328.
426. Yan Y; Andriole GL; Humphrey PA, et al. Patterns of multiple recurrences of superficial (Ta/T1) transitional cell carcinoma of bladder and effects of clinicopathologic and biochemical factors. *Cancer* 2002;95:1239-1246.



427. George B; Datar RH; Wu L; Cai J; Patten N; Beil SJ; Groshen S; Stein J; Skinner D; Jones PA; Cote RJ. p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2007;25: 5352–5328.
428. Sarkis A; Dalbagni G; Cordon-Cardo C, *et al.* Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder cancer: a marker for disease progression. *J Nat Cancer Inst* 1993;85:53-59.
429. Sarkis A; Dalbagni G; Cordon-Cardo C, *et al.* Association of p53 gene nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994;152:388-392.
430. Stavropoulos NE; Filiadis I; Ioachim E, *et al.* Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3759-3764.
431. Gil P; Allepuz C; Blas M, *et al.* Significance of protein p53 overexpression in the clinical course of high-risk superficial bladder cancer. *Urol Int* 2003;70:172-177.
432. Santos LL; Amaro T; Costa C, *et al.* Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer* 2003;105:267-272.
433. Shariat SF; Bolenz C; Karakiewicz PI *et al.* p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder. *BJU Int* 2010;105:489–495.
434. Malats N; Bustos A; Nascimento CM *et al.* P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet* 2005;6:678-686.
435. Llopis J; Alcaraz A; Ribal MJ, *et al.* p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. *Eur Urol* 2000;37:644-653.
436. Mason RA; Morlok EV; Karagas MR *et al.* EGFR pathway polymorphisms and bladder cancer susceptibility and prognosis. *Carcinogenesis* 2009;30:1155-1160.
437. Russo R; Simonetti S; Giancia G *et al.* Role of polysomy 17 in transitional cell carcinoma of the bladder: immunohistochemical study of HER2/neu expression and fish analysis of c-erbB-2 gene and chromosome 17. *Int J Surg Pathol* 2008;17:198-205.
438. 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.
439. Lae M; Couturier J; Oudard S *et al.* Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann Oncol* 2010;21:815-819.
440. Fleischmann A; Rotzer D; Seiler R *et al.* Her2 amplification is significantly more frequent in lymph node metastases from urothelial bladder cancer than in primary tumours. *Eur Urol* 2011;60:350-357.
441. Sato K; Moriyama M; Mori S, *et al.* An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* 2006;70:2493-2498.
442. Kruger S; Weitsch G; Buttner H, *et al.* HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer* 2002;102:514-518.
443. Tsai YS; Cheng HL; Tzai TS *et al.* Clinical significance of ErbB receptor family in urothelial carcinoma of the bladder: a systematic review and meta-analysis. *Adv Urol* 2012;2012:1-10.
444. Kavanagh BD; Lin PS; Chen P *et al.* Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: a release from inhibition by epidermal growth factor. *Clin Cancer Res* 1995;1:1157–1162.
445. Kroft SH; Oyasu R. Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. *Lab Invest* 1994;78:151-174.



446. Lipponen P; Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as a related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long term prognosis. *Br J Cancer* 1994;69:1120-1125.
447. Imai T; Kimura M; Takada M. Significance of epidermal growth factor receptor and c-erb B-2 protein expression in transitional cell cancer of the upper urinary tract for tumour recurrence at the urinary bladder. *Br J Cancer* 1995;71:69-72.
448. Ravery V; Colombel M; Popov Z, *et al.* Prognostic value of epidermal growth factor receptor, T138 and T43 expression in bladder cancer. *Br J Cancer* 1995;71:196-200.
449. McLeod MR; Michie S; Roberts I *et al.* Biomedical research: increasing value, reducing waste. *Lancet* 2014;383:101-104.



Anexos



10. ANEXOS

El estudio realizado para esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones, comunicaciones, y premios de investigación:

Publicaciones internacionales:

- **Bladder carcinoma data with clinical risk factors and molecular markers: a cluster analysis.** Redondo González E, de Castro LN, Moreno-Sierra J, Maestro de las Casas ML, Vera-González V, Ferrari DG, Corchado JM. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:168682. doi: 10.1155/2015/168682. Epub 2015 Mar 19.

Publicaciones nacionales:

- Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el pronóstico del carcinoma vesical. Experiencia a 5 años. Moreno Sierra J, Maestro de las Casas ML, Redondo González E, Fernández Pérez C, Del Barco Barriuso MT, Sanz Casla V, Blanco Jiménez E, Silmi Moyano A, Resel Estévez L. *Arch Esp Urol.* 53(4): 323-331, 2000.
- Oncoproteína p185 (neu) en el pronóstico del carcinoma vesical. Experiencia a 5 años. Moreno Sierra J, Maestro de las Casas M, Redondo González E, Fernández Pérez C, Del Barco Barriuso V, Sanz Casla MT, Blanco Jiménez E, Silmi Moyano A, Resel Estévez L. *Arch Esp Urol.* 53(3): 238-244, 2000.
- Utilidad de la oncoproteína p53-IHQ en el seguimiento del carcinoma vesical: estudio a 5 años. Moreno Sierra J, López García-Asenjo JA, Redondo González E, Fernández Pérez C, Maestro de las Casas ML, Blanco Jiménez E, Silmi Moyano A, Resel Estévez L. *Arch Esp Urol.* 52 (8): 840-848. 1999.



- Cuantificación de la oncoproteína p53 en el carcinoma vesical: experiencia a 5 años. Moreno Sierra J, Maestro de las Casas ML, Fernández Pérez C, Redondo González E, Sanz Casla MT, Del Barco Barriuso V, Blanco Jiménez E, Silmi Moyano A, Resel Estévez L. Arch Esp Urol. 52 (3): 220-227. 1999.

Comunicaciones nacionales:

- Aplicación práctica de la biología molecular al carcinoma vesical: experiencia a 5 años con p53 IHQ, p53 LIA, EGFR y NEU. Moreno J, Redondo E, Maestro M, Del Barco V, Sanz MT, Asenjo J, Blanco E, Fernández C, Silmi A, Resel L. LXIV Congreso Nacional de Urología. Mayo 1999. Zaragoza.

Comunicaciones internacionales:

- Seguimiento a 5 años de tumores vesicales con p53, EGFR y NEU. Moreno J, Maestro M, Samblás R, Asenjo J, Fernández C, Merino C, Redondo E, Ruiz MA, Blanco E, Silmi A, Resel L. VII Jornadas Internacionales de Actualización Urológica. Noviembre 1998. Madrid.

Premios:

Premio Doctor Peña al mejor trabajo de Investigación Urológica del año 2000.

- ORGANISMO: Real Academia Nacional de Medicina.
- TÍTULO: Experiencia personal de un grupo español, a largo plazo, en biología molecular del carcinoma vesical.
- EQUIPO INVESTIGADOR: Jesús Moreno Sierra, María Luisa Maestro de las Casas, Enrique Redondo González, María Teresa Sanz Casla, Victoria Del Barco Barriuso, Gloria Bocado Fajardo, Cristina Fernández Pérez, José Antonio López García-Asenjo, Enrique Blanco Jiménez, Ángel Silmi Moyano y Luis Resel Estévez.



Finalista de los Premios Pérez Castro del año 2000 por el artículo:

- Cuantificación de la oncoproteína p53 en el carcinoma vesical: experiencia a 5 años. Moreno Sierra, J.; Maestro de las Casas ML, Fernández Pérez C, Redondo González E, Sanz Casla MT, Del Barco Barriuso V, Blanco Jiménez E, Silmi Moyano A, Resel Estévez L. Arch Esp Urol. 52 (3): 220-227. 1999.

I'm never coming back
I'm never giving-in
I'll never be the shine in your spit

An Ode To No One
William Patrick Corgan Jr
Mellon Collie And The Infinite Sadness