

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DEL FACTOR  
DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)  
EN EL CARCINOMA VESICAL Y DE SU RELACIÓN CON  
EL ESTADIO TUMORAL, GRADO CITOLÓGICO,  
RECIDIVAS Y SUPERVIVENCIA

VÍCTOR CARRASCOSA LLORET

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 30 de Setembre de 2003 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Antoni Gelaber i Mas
- Dr. D. Manuel Gil Salou
- Dr. D. Narcís Serrallach Micá
- Dr. D. José María Nerian Polo
- Dr. D. Francisco Javier Romero Fernández

Va ser dirigida per:

Dr. D. Francisco Clar Blanch

Dr. D. Carlos Sanjuán De la Orden

©Copyright: Servei de Publicacions  
Víctor Carrascosa Lloret

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5881-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**Facultat de Medicina i Odontologia**

**Departament de Cirurgia**

**ESTUDIO DE LA CONCENTRACION SERICA DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR ( VEGF ) EN EL  
CARCINOMA VESICAL Y DE SU RELACION CON EL ESTADIO  
TUMORAL, GRADO CITOLOGICO, RECIDIVAS Y  
SUPERVIVENCIA**

**TESIS DOCTORAL**

**PRESENTADA POR:**

**Víctor Carrascosa Lloret**

**DIRIGIDA POR:**

**Dr.D. Francisco Clar Blanch**

**Dr.D.Carlos Sanjuán de Laorden.**

**Valencia 2003.**

# INDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>I. Introducción</b>  | 1  |
| I.1 Aspectos biológicos y genéticos del carcinoma vesical                 | 3  |
| I.1.1 Recidivas en el carcinoma vesical                                   | 5  |
| I.2 Angiogénesis y cáncer   | 6  |
| I.3 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF )                  | 11 |
| I.3.1 Actividades biológicas del VEGF                                     | 12 |
| I.3.2 Organización del gen de VEGF y propiedades de las isoformas de VEGF | 13 |
| I.3.3 Factores de crecimiento relacionados con VEGF                       | 15 |
| I.3.4 Receptores de VEGF  |    |
| I.3.4.1 Flt-1 y KDR   | 17 |
| I.3.4.2 Flt 4   | 18 |
| I.3.5 Regulación de la expresión del de VEGF                              | 18 |
| I.3.6 Papel del VEGF en la angiogénesis tumoral                           |    |
| I.3.6.1 Expresión de VEGF y sus receptores en tumores Humanos             | 20 |
| I.3.6.2 Inhibición de la actividad de VEGF in vivo                        | 25 |
| <b>II. Hipotesis de trabajo</b>   | 27 |
| <b>III. Material y métodos</b>  | 28 |
| III.1 Material  |    |
| III.1.1 Pacientes con tumores vesicales primarios                         | 29 |

|   |           |
|---|-----------|
| III.1.1 Grupo Control   | 29        |
| III.2 Métodos   | 30        |
| III.2.1 Resección transuretral  | 30        |
| III.2.2 Seguimiento   | 30        |
| III.2.3 Determinación de los niveles séricos de VEGF  | 31        |
| III.2.4 Variables   | 32        |
| III.2.4.1 Estadio tumoral y grado citológico  | 34        |
| III.2.4.1.1 Estadio tumoral   | 34        |
| III.2.4.1.2 Grado Citológico  | 35        |
| III.2.4.2 Intervalo libre de enfermedad   | 35        |
| III.2.4.3 Progresión  | 35        |
| III.2.4.4 Supervivencia   | 35        |
| III.2.4.5 Síndrome irritativo miccional   | 36        |
| III.2.5 Estudio estadístico   | 36        |
| <b>IV. Resultados</b>   | <b>37</b> |
| IV.1 Estadística descriptiva  | 38        |
| IV.1.2 Descripción general de las variables en los grupos de estudio                                      | 38        |
| IV.2 Estadística analítica  | 44        |
| IV.2.1 Relaciones entre los niveles séricos de VEGF y el resto<br>de variables en ambos grupos de estudio | 46        |
| IV.2.2 Estudio de la supervivencia  | 53        |
| <b>V. Discusión</b>   | <b>57</b> |

**VI. Conclusiones** 62

**VII. Bibliografía** 64

# **I. INTRODUCCION.**

## **I. INTRODUCCION.**

El cáncer de vejiga supone, aproximadamente el 2% de todos los tumores malignos, es el quinto tumor más frecuente de los varones occidentales y es el segundo tumor maligno en frecuencia dentro del aparato urinario. En Estados Unidos se cifra una incidencia anual de cáncer vesical de 54300 casos, produciendo 12400 muertes anuales.<sup>1</sup>

En nuestro país se estima una incidencia de 20 casos por cada 100.000 habitantes y año, siendo el segundo tumor urológico más frecuente por detrás del cáncer de próstata.

En 1998 provocó 3702 defunciones en España y 361 en la Comunidad Valenciana.<sup>2</sup> La variante histológica más frecuente del cáncer vesical es el carcinoma transicional. La mayoría de tumores vesicales, entorno a un 70%, son superficiales limitando su extensión a la mucosa.<sup>3,4</sup> De éstos únicamente el 15 % tiene probabilidades de progresar provocando riesgo de muerte.

Del 30% de los tumores vesicales que se diagnostican como neoplasias infiltrantes en el momento de su presentación más de la mitad se asocia a desarrollo de metástasis y a un elevado riesgo de muerte.<sup>5</sup>

La evolución natural del cáncer vesical se puede correlacionar con diversos factores pronósticos reconocidos como son el grado citológico y el estadio o profundidad de penetración del tumor en la pared vesical, la existencia de invasión vascular o linfática y la presencia de carcinoma in situ (CIS). Estos factores histológicos si bien tienen una gran utilidad clínica, son insuficientes para determinar el potencial biológico específico de un cáncer determinado.<sup>5</sup>

Los modelos tradicionales de la carcinogénesis proponen una secuencia de estadios que indican la progresión desde una lesión superficial hasta una invasiva con afectación de la capa muscular.

No obstante, la disparidad de expresiones clínicas del cáncer vesical sugiere la existencia de un amplio espectro de procesos patológicos diferentes pero relacionados entre sí que da lugar a una gran variedad de diátesis tumorales con potenciales biológicos característicos.



## **I.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS Y GENÉTICOS DEL CARCINOMA VESICAL .**

El primer paso en el desarrollo de una neoplasia vesical consiste en la transformación neoplásica intraepitelial como consecuencia de carcinógenos, que provocan cambios genotóxicos, o de la aparición de accidentes genéticos espontáneos. La proliferación de las células transformadas puede dar lugar a un carcinoma de células transicionales clínicamente detectable, inicialmente confinado a la mucosa.

En el tipo más frecuente de carcinoma transicional la proliferación de las células neoplásicas se continúa con el desarrollo de múltiples capas de células que inducen una neoformación vascular formándose frondas papilares alrededor de un eje fibrovascular central. Los tumores resultantes suelen ser de bajo o moderado grado citológico y sus células permanecen en las capas epiteliales mostrando una escasa propensión a la propagación (<5%).<sup>5</sup> Estos tumores representan aproximadamente el 70% de los tumores vesicales superficiales.<sup>3,4,5,6.</sup>

En la variante menos frecuente de Carcinoma in situ (CIS) la proliferación continua de las células produce una gruesa capa epitelial que se extiende a lo largo de la mucosa vesical manteniendo una conformación plana, i.e no papilar, estando formado, aunque no necesariamente, por células con núcleo grande, irregular e hiper cromático, afectando a todo el espesor del epitelio. Por definición todos los CIS son lesiones de alto grado.<sup>7</sup>

Los tumores papilares superficiales de alto grado y los tumores invasores de alto grado suelen aparecer asociados a CIS.<sup>5</sup>

Se ha observado que el CIS se asocia a rotura de la membrana basal y a extensión a la lamina propia en el 20-30% de los casos.<sup>8</sup> Este hallazgo presagia un mal pronóstico con unas tasas finales de progresión del 30 al 50%.<sup>9</sup>

Así, podemos distinguir, clásicamente, dentro de los tumores vesicales dos grandes grupos: los superficiales papilares y los invasores o infiltrantes.

A su vez dentro del grupo de los tumores superficiales podemos distinguir dos variedades : la primera, compuesta por tumores papilares de bajo grado (estadio pTa)

que se asocia a una tasa de recurrencia elevada (50-75 %) pero con una probabilidad de progresión baja (<5%) , y, la segunda formada por tumores papilares de mayor grado que han infiltrado la lámina propia (pT1) y que pueden asociarse a CIS con una tasa alta de progresión final (30-50%).<sup>5</sup>

Así, aunque las dos variedades de afectación superficial ( pTa y pT1) están confinadas inicialmente a la mucosa, muestran en su evolución patrones de conducta muy diferentes. De este modo la clasificación de los tumores pT1 como superficiales es errónea e imprecisa.<sup>5</sup>

Existe la sospecha que la carcinogénesis vesical puede desarrollarse por vías moleculares diferentes.<sup>5,10,11</sup> En el cáncer de vejiga superficial se han identificado numerosas alteraciones con pérdidas de los alelos del 9q<sup>10</sup> y más recientemente del 9p.<sup>12</sup>

En contraste, las mutaciones del gen supresor p53, localizado en el cromosoma 17, se identifican con más frecuencia en el CIS y en los tumores invasores de la capa muscular.<sup>5, 11</sup>

La proteína p53 no mutada o salvaje actúa sobre el ciclo celular deteniendo el ciclo en G1 y es crucial para la reparación del ADN anormal y para que las células con ADN irreparable se dirijan hacia la apoptosis. Tiene a su vez capacidad de regulación, en sentido negativo, del proceso angiogénico a diferentes niveles: la p53 funcional no mutada inhibe la producción, inducida por la hipoxia, de la sintetasa del óxido nítrico, de la ciclooxigenasa 2 , de VEGF (del inglés vascular endothelial growth factor o factor de crecimiento del endotelio vascular) y de FGF básico (factor de crecimiento fibroblástico básico); pudiendo, además, inducir la producción de trombospondina 1, angioestatina y endostatina que son potentes factores antiangiogénicos.<sup>5</sup>

Las mutaciones y las deleciones del gen de la proteína p53 se encuentran entre los acontecimientos más frecuentes en el desarrollo de muchos cánceres.<sup>13</sup> Las mutaciones del gen supresor p53 permiten la replicación de un ADN anormal y la expansión clonal de las células mutadas.<sup>5</sup>

Aún queda por resolver si se puede utilizar la expresión de p53 como un indicador del pronóstico. El valor de la p53 puede ser sólo un marcador secundario de la mutación o la inactivación, y la sobreexpresión detectada por métodos inmunohistoquímicos o

mediante el polimorfismo de una sola hebra puede no reflejar una pérdida verdadera de su función.<sup>5</sup>

Estudios realizados inicialmente por Sarkis et al en 1995 indicaban que la sobreexpresión de p53 es un factor de riesgo negativo independiente para la supervivencia a largo plazo de pacientes con tumores vesicales tratados con quimioterapia neoadyuvante.<sup>14</sup> Para tratar de determinar el papel funcional de la sobreexpresión de p53, una investigación posterior a la anterior, realizada por Buckholm et al en 1997 en una serie de 212 tumores de mama, de los ejecutores eficientes o moléculas de la transcripción, identifico la proteína p21 como una proteína que inhibía la acción de las cinasas dependientes de las ciclinas (proteínas reguladoras del ciclo celular), impidiendo la progresión por el ciclo celular.<sup>15</sup>

Se ha relacionado la incapacidad relativa para expresar la p21 en presencia de mutaciones del p53 con una supervivencia inferior en los cánceres de mama y de pulmón.<sup>5</sup>

Aunque la proteína p21 participa en la proliferación celular, la apoptosis y las funciones de la proteína p53, estudios realizados por Lipponen et al en 1998 no han observado que posea un valor pronóstico independiente en el cáncer de vejiga.<sup>16</sup>

### **I. 1.1 RECIDIVAS EN EL CARCINOMA VESICAL.**

Se han propuesto dos teorías para explicar tanto la multicentricidad como las recidivas locales (vesicales) del cáncer vesical: la “teoría del cambio de campo” y la teoría de “capacidad de clonación”.<sup>5</sup>

Según la primera teoría (“cambio de campo”) todos los campos, es decir toda la superficie del urotelio está expuesta a carcinógenos, lo que favorece la aparición de numerosos episodios carcinógenos diferentes en múltiples puntos de la superficie urotelial. En teoría esto permitiría el desarrollo de tumores biológicamente diferentes de acuerdo con los cambios aleatorios del ADN, como resultado de la exposición a carcinógenos en el contexto de las circunstancias específicas del huésped. Un ejemplo frecuente es el desarrollo de diferentes variedades de cáncer vesical a lo largo del tiempo, aunque también sea posible encontrar sincrónicamente tumores vesicales múltiples, separados espacialmente y con alteraciones genéticas diferentes.

La teoría de la “capacidad de clonación” sugiere que stem cells o células madre transformadas dan lugar a múltiples células hijas que se diseminan e implantan en diferentes localizaciones de la mucosa vesical, produciendo múltiples tumores que comparten las mismas alteraciones genéticas, aspecto histológico y comportamiento clínico. La siembra de células tumorales durante la resección de un tumor primario ha sido uno de los mecanismos sugeridos para explicar la recurrencia de tumores con las mismas características genéticas e histopatológicas que el tumor primario. Aunque la capacidad de clonación y la implantación pueden ser responsables de la recurrencia, la proliferación puede permitir que surjan nuevas alteraciones genéticas que se manifiesten en una neoplasia biológicamente más agresiva.<sup>5</sup>

Se ha sugerido que la acumulación de cambios genéticos en las células procedentes de la célula madre común, los cuales pueden facilitar sucesivamente la proliferación, es la responsable de la generación de tumores con una actividad biológica variable.<sup>17</sup>

## **I.2 ANGIOGENESIS Y CANCER.**

Hasta que el tumor alcanza un tamaño de 1 a 2 mm<sup>3</sup> recibe todos los nutrientes y el O<sub>2</sub> por difusión simple.<sup>5</sup>

Una vez que el tumor alcanza tamaños clínicamente detectables necesita generar neovascularización que permita el aporte de nutrientes y O<sub>2</sub> necesarios para continuar su desarrollo. En los experimentos llevados a cabo por Folkman et al en la década de 1960 a 1970 inoculando células tumorales en órganos aislados y perfundidos, se demostró que la ausencia de angiogénesis se asociaba a una restricción del crecimiento tumoral a pequeños esferoides de 1 mm<sup>3</sup> o menos. Esta fue la primera vez que se consiguió que tumores viables crecieran como masas tridimensionales en un tejido sin neovascularización. Cuando se trasladaba el pequeño tumor al ratón del que provenía desarrollaba neovascularización y crecía y alcanzaba tamaños 1000 veces superiores al obtenido en el órgano aislado.<sup>18-21</sup> A partir de estos estudios se formuló la hipótesis que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente.

Estudios posteriores realizados en la década de los años 70 aportaron pruebas, la mayoría de carácter indirecto, de la veracidad de la hipótesis:

1. El crecimiento tumoral en la córnea (avascular) del conejo tiene lugar de manera muy lenta y de manera lineal mientras esta se mantiene avascular; tras la vascularización se aprecia un crecimiento exponencial de la población tumoral.<sup>22</sup>
2. Los tumores suspendidos en el humor acuoso de la cámara anterior del ojo del conejo permanecen viables y limitados en su crecimiento (  $1 \text{ mm}^3$ ). Estos son capaces de inducir neovascularización en los vasos del iris pero están demasiado distantes para ser invadidos por ellos. Una vez que el esferoide tumoral es implantado contiguamente a los vasos neoformados el tumor puede crecer 16000 veces su volumen original en un plazo de dos semanas.<sup>23</sup>
3. Los tumores cultivados en el humor vítreo del ojo del conejo permanecen viables pero limitan su desarrollo a menos de 0,5 mm de diámetro durante al menos 100 días. Una vez el tumor alcanza la superficie de la retina se neovasculariza y en un plazo de dos semanas puede experimentar un crecimiento volumétrico 19000 veces superior a su volumen original.<sup>24</sup>
4. Los retinoblastomas humanos que metastatizan al vítreo son viables, avasculares y de crecimiento limitado.<sup>25</sup>
5. Los tumores implantados en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo tienen limitado su crecimiento durante la fase avascular pero crecen rápidamente una vez se vascularizan.<sup>26</sup>
6. En las experiencias desarrolladas por Thompson y colaboradores se apreció que las células neoplásicas inyectadas subcutáneamente desarrollaban tumores que se vascularizaban cuando alcanzaban un volumen de  $0,4 \text{ mm}^3$ . Conforme aumentaba el tamaño tumoral los vasos eran envueltos por el tumor infiltrante. Los vasos llegaban a ocupar el 1,5% del volumen tumoral. Esto implica un aumento de un 400% respecto a la densidad vascular normal del tejido celular subcutáneo.<sup>27</sup>
7. La fase vascular de los tumores de colon que aparecen espontáneamente en las ratas tras la administración de carcinógenos se puede subdividir a su vez en dos. En una etapa precoz (diámetro inferior a 3,5 mm ) el tumor está alimentado por los capilares preexistentes del huésped que están dilatados y ensanchados. En una etapa posterior (diámetro superior a 5 mm ) se aprecia una proliferación capilar para conseguir una densidad microvascular superior a la normal.<sup>28</sup>

Del mismo modo en la última década se han acumulado pruebas directas que demuestran que la neovascularización es necesaria para el crecimiento tumoral:

1. Un inhibidor de la angiogénesis el AGM -1470, un análogo sintético de la fumagilina, inhibe el crecimiento tumoral in vivo pero no in vitro.<sup>29</sup> Esta sustancia inhibe la proliferación de células endoteliales in vitro e in vivo.
2. El factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-b) es un potente agente angiogénico y tiene la capacidad de inducir mitosis en las células endoteliales. Está producido por las células endoteliales, teniendo éstas, además, receptores para él.<sup>30</sup>
3. En las experiencias llevadas a cabo por Gross y colaboradores se apreció crecimiento tumoral de un cáncer de colon humano, cuyas células carecían de receptores afines para el FGF-b y para las que el FGF-b no fue mitógeno in vitro. Cuando fue implantado en un ratón desnudo, la inyección sistémica de FGF-b estimuló un aumento en la densidad y ramificación de los vasos sanguíneos así como una duplicación del tamaño del tumor. Se demostró la existencia de receptores para el FGF-b en el endotelio vascular. Cuando el ratón portador del tumor recibió anticuerpos monoclonales contra el FGF-b el crecimiento tumoral se retardó de manera significativa.<sup>31</sup> Esta experiencia mostró que los cambios en el crecimiento del lecho capilar de un tumor influyen de manera directa en el crecimiento tumoral.
4. Las experiencias llevadas a cabo por Hori y colaboradores demostraron la importancia del FGF-b en la angiogénesis y la progresión tumoral. Realizaron una transfección de DNA complementario (DNAc) de FGF-b humano a fibroblastos normales de ratón. Estos fibroblastos exportaban FGF-b y eran potentes inductores de angiogénesis. Cuando eran implantados en ratones inducían grandes tumores de evolución letal. Se demostró que la angiogénesis estaba inducida principalmente por el FGF-b liberado por estos tumores al realizar una mutación lugar específica del FGF-b de manera que dos serinas

quedaran substituidas por cisteínas de tal forma que el FGF-b resultante fuera neutralizado por un anticuerpo específico que no tenía actividad sobre el FGF-b natural. Cuando se administraba el anticuerpo al ratón al que se le había injertado la neoplasia se apreció una significativa reducción en la neovascularización y en el volumen tumoral.<sup>32</sup>

5. Kim y colaboradores desarrollaron una experiencia similar inhibiendo la actividad de otro potente agente angiogénico, el VEGF o factor de crecimiento del endotelio vascular también conocido como VPF o factor de permeabilidad vascular, con ayuda de un anticuerpo monoclonal específico contra VEGF. El anticuerpo fue administrado a ratones desnudos a los que se les había implantado líneas celulares de rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma o glioblastoma multiforme de origen humano. En los ratones tratados el crecimiento vascular se vio afectado (existiendo una menor densidad capilar tumoral que en ratones no tratados), apreciando reducciones tumorales, en ocasiones, superiores al 90%.

La utilización del anticuerpo in vitro no tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento en los cultivos celulares.<sup>33</sup>

En relación con las neoformaciones vesicales, la angiogénesis, expresada como densidad vascular en las preparaciones histopatológicas de las piezas quirúrgicas, ha mostrado tener relación con la supervivencia e intervalo libre de enfermedad<sup>34,35,36</sup> así como con la existencia de afectación ganglionar.<sup>37</sup>

La hipótesis que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente parece así tener solidez con la salvedad que ésta es necesaria, pero no suficiente para un crecimiento tumoral mantenido. Así la ausencia de neovascularización limitará significativamente el crecimiento tumoral, y el inicio de la actividad angiogénica en un tumor permitirá, pero no garantizará, su continua expansión.<sup>30</sup> De este modo para que una célula tumoral pueda metastatizar tiene que acceder a la vascularización de la neoplasia primaria, sobrevivir en el torrente circulatorio, detenerse en la microcirculación del órgano diana,<sup>38,39</sup> salir del torrente circulatorio<sup>40</sup>, crecer en el órgano diana, e inducir

angiogénesis.<sup>41,42</sup> La angiogénesis es necesaria tanto al principio como al final de la cascada metastásica.<sup>43</sup>

No obstante existen estudios recientes que parecen mostrar que existen excepciones a esta afirmación. Vermeulen et al han descrito recientemente tres patrones de crecimiento de las metástasis hepáticas de adenocarcinoma colorrectal: desmoplásico, compresivo y de reemplazo.<sup>44</sup> Los dos primeros patrones se caracterizan por la destrucción del parénquima hepático, sin embargo, en el tercero o de reemplazo existe una conservación del patrón de reticulina hepático, en el interior de las metástasis, a nivel de la interfase tumor-hígado expandiéndose con un desarrollo angiogénico mínimo, cooptando o coutilizando el estroma y la vascularización sinusoidal hepática.<sup>44</sup>

Este estudio no es único. Pezzela et al estudiaron el patrón de vascularización de una serie de 500 carcinomas pulmonares en estadio I. La inmunotinción de células endoteliales mostró la existencia de cuatro patrones diferentes de vascularización que denominaron: basal, papilar, difuso y alveolar o no angiogénico. Los tres primeros tenían en común la destrucción del parénquima pulmonar normal y la producción de nuevos vasos y estroma. Sin embargo el patrón alveolar, que fue observado en un 16% de la serie estudiada, se caracterizaba por una falta de destrucción parenquimatosa y una ausencia de neoangiogénesis y de estroma tumoral. Los únicos vasos presentes eran los de los septos alveolares, y su presencia mostraba, a través de todo el tumor, los alveolos ocupados por células neoplásicas.

Esta observación sugiere que en presencia de un lecho vascular adecuado algunos tumores son capaces de utilizarlo y crecer sin inducir neoangiogénesis.<sup>45</sup>

Holash et al han propuesto un nuevo modelo de neovascularización tumoral, en el que existiría un balance dinámico entre regresión y crecimiento vasculares mediado por angiopoyetinas y VEGF. En sus estudios han apreciado que las células neoplásicas coutilizan o “cooptan” la vascularización existente del huésped rápidamente para formar una masa tumoral inicialmente bien vascularizada.

Paradójicamente la vascularización coutilizada no sufre un desarrollo para sostener al tumor en crecimiento, sino que disminuye (posiblemente como parte de un mecanismo de defensa del huésped) a través de un proceso que incluye la alteración de la relación



entre la célula endotelial y las células musculares lisas, y la apoptosis de células endoteliales.

Esta regresión vascular provoca una necrosis en la parte central del tumor. No obstante, en la parte periférica de la tumoración se aprecia una neoangiogénesis vigorosa capaz de mantener al tumor superviviente y de sustentar un crecimiento posterior.

La angiopoyetina 2 (antagonista natural del receptor angiogénico Tie 2) y el VEGF parecen estar directamente implicados en los procesos anteriores. La angiopoyetina 2 se induce intensamente en los vasos cooptados o “cooptados”, anteriormente a que se produzca una inducción de VEGF en las células tumorales, marcando así a los vasos cooptados favoreciendo su regresión. La activación posterior del VEGF se asocia con una importante neoangiogénesis.<sup>46</sup>

### **I.3 VEGF (FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR)**

El VEGF también conocido como VPF (factor de permeabilidad vascular) o vasculotropina es una glicoproteína básica homodimérica de 34-42 kDa, ligadora de heparina, formada por polipéptidos con extremo N terminal idénticos unidos por puentes disulfuro que es secretada y expresada por múltiples células tumorales de origen humano y animal<sup>47</sup> incluyendo entre otros carcinomas vesicales y renales<sup>48</sup>, carcinomas pulmonares<sup>49</sup>, angiosarcomas<sup>50</sup>, tumores intracraneales<sup>51,52,53</sup>, tumores tiroideos<sup>54</sup>, tumores ováricos<sup>55</sup> y de cérvix uterino<sup>56</sup>, neoplasias mamarias<sup>57</sup>, tumores del tracto gastrointestinal<sup>58</sup> y por células no tumorales como macrófagos activados<sup>59</sup>, queratinocitos<sup>60</sup>, células mesangiales y glomérulos renales<sup>61</sup>, hepatocitos<sup>62</sup>, células musculares lisas<sup>63</sup>, células de Leydig y de la corteza suprarrenal<sup>64</sup>.

### **I.3.1 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL VEGF.**

VEGF es un potente mitógeno para las células endoteliales procedentes de arterias, venas y linfáticos pero carece de actividad mitogénica sobre otros tipos celulares.<sup>65,66,67</sup>

VEGF induce la neoangiogénesis estimulando la proliferación, permeabilidad y migración capilares.<sup>68</sup>

El descubrimiento de que VEGF es difusible y específico para las células endoteliales llevó a la hipótesis que esta sustancia jugase un papel fundamental en la regulación del crecimiento capilar, tanto en situaciones fisiológicas como en procesos patológicos.<sup>65, 69</sup>

El hallazgo de que la sola pérdida de un alelo de VEGF produzca una vascularización embrionaria defectuosa que induce la muerte del embrión señala el papel fundamental que juega este factor en el desarrollo del aparato circulatorio.<sup>70,71</sup>

Así mismo, VEGF ha resultado ser un mediador clave de la neovascularización asociada a determinados tumores<sup>33</sup> y algunos procesos patológicos oculares.<sup>72</sup>

VEGF induce la expresión tanto de activadores del plasminógeno como del inhibidor del activador plasminógeno PAI-1 en cultivos de células endoteliales.<sup>73</sup>

Mandriota et al mostraron que VEGF favorece la expresión de receptores de uroquinasa en las células endoteliales vasculares.<sup>74</sup>

Dvorak postuló que el aumento de la permeabilidad vascular era un paso crucial en la angiogénesis asociada a la cicatrización de heridas y a la apreciada en el desarrollo tumoral.<sup>75</sup> De acuerdo con esta hipótesis, una de las principales funciones de VEGF en el proceso angiogénico es la inducción de un aumento de la permeabilidad vascular a macromoléculas produciendo una filtración o pérdida transvascular de proteínas plasmáticas que da lugar a la formación de un “gel” extravascular de fibrina. Este “gel” constituiría el substrato sobre el que puedan desarrollarse tanto las células endoteliales como las células tumorales.

Estudios recientes sugieren que VEGF induce fenestraciones en las células endoteliales. Roberts et al demostraron que la administración tópica de VEGF producía la fenestración del endotelio de pequeñas vénulas y capilares incluso en regiones en las que, en condiciones naturales, estos vasos no son fenestrados, como son los del cremáster o la piel.<sup>76</sup>

VEGF provoca un rápido (5 minutos) pero transitorio (alrededor de 30 minutos) aumento de la permeabilidad microvascular sin provocar daños celulares endoteliales ni degranulación de los mastocitos y su acción no se ve bloqueada por los antihistamínicos.<sup>47</sup>

Así VEGF puede ser considerado como una citosina multifuncional que, por un lado modifica la matriz extracelular promoviendo la extravasación de plasma, con la resultante aparición de fibrina, y por otro estimula directamente la proliferación de células endoteliales.<sup>47</sup>

VEGF también induce vasodilatación dosis dependiente *in vitro*<sup>77</sup> y produce taquicardia transitoria e hipotensión cuando se administra vía sistémica.<sup>78</sup> Estos efectos parecen estar mediados por el óxido nítrico derivado de las células endoteliales.<sup>77,78</sup>

### **I.3.2 ORGANIZACIÓN DEL GEN DE VEGF Y PROPIEDADES DE LAS ISOFORMAS DE VEGF.**

El gen humano del VEGF está organizado en ocho exones separados por siete intrones, teniendo una extensión de unas 14 kilobases (kb).<sup>79,80</sup> El gen humano del VEGF ha sido localizado en el cromosoma 6p21.3<sup>81</sup>.

El análisis de secuencial de ADNc (ADN complementario) de un surtido de clones de VEGF humano indicó que el factor de crecimiento del endotelio vascular podía tener hasta cuatro formas moleculares diferentes teniendo respectivamente 121,165, 189 y 206 aminoácidos (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>).<sup>69,79,80,82</sup> La unión alternante de exones de un único gen de VEGF es la base de esta heterogenicidad molecular.<sup>68</sup>

VEGF<sub>165</sub> carece de los residuos codificados por el exon 6, mientras que VEGF<sub>121</sub> carece de los residuos codificados por los exones 6 y 7. VEGF<sub>189</sub> tiene una inserción de 24 aminoácidos ricos en restos básicos y VEGF<sub>165</sub> es la isoforma predominantemente secretada tanto por células normales como anormales ( Figura 1).<sup>79,80</sup>

Las transcripciones de VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>189</sub> se pueden detectar en la mayoría de células que expresan el gen VEGF.<sup>79, 80</sup> Por el contrario VEGF<sub>206</sub> es una isoforma de presentación poco habitual.<sup>80</sup>

Como ya se ha mencionado previamente el VEGF nativo es una glicoproteína de unos 42kDa homodimérica, básica y ligadora de heparina. Estas propiedades se corresponden con las de VEGF<sub>165</sub>.<sup>68</sup>

VEGF<sub>121</sub> es un polipéptido ácido que no liga heparina. VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> son más básicos y se fijan a la heparina con mayor afinidad que VEGF<sub>165</sub>.<sup>83</sup>

VEGF<sub>121</sub> es una proteína soluble; no obstante existe un porcentaje significativo de VEGF<sub>165</sub> que, una vez segregada, queda unido a la superficie celular y a la matriz extracelular.<sup>84</sup> VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> quedan secuestradas casi por completo en la matriz extracelular pero pueden ser liberadas a una forma soluble mediante heparina o heparinasa<sup>84</sup>. Estas formas largas también pueden ser liberadas por la plasmina tras realizar una división a nivel del extremo carboxiterminal.<sup>83, 84</sup>

La activación del plasminógeno y la generación de plasmina han mostrado tener un papel importante en la cascada angiogénica.<sup>85</sup> Estos procesos también juegan un papel importante en la progresión local y en la capacidad metastásica de las células tumorales.<sup>86</sup>

Existen evidencias experimentales que apoyan la teoría que los factores de crecimiento “almacenados” en la matriz extracelular y liberados tras la degradación de la misma juegan un papel fundamental en los procesos citados.<sup>86</sup>

Así, la proteólisis de VEGF también parece tener lugar in vivo de una manera similar. La generación de VEGF bioactivo por división protelítica parece tener especial importancia en el microambiente tumoral donde el aumento de expresión de las proteasas, incluyendo los activadores del plasminógeno, está bien documentada.<sup>85</sup>

Estudios relativamente recientes, realizados por Keyt y colaboradores a mitad de la década de los noventa, realizando una proteólisis de VEGF mediante plasmina mostraron que ésta escindía VEGF<sub>165</sub> en un fragmento de 110 aminoácidos sin afinidad por la heparina (VEGF<sub>110</sub>) y en un fragmento de 55 aminoácidos (constituido por el extremo carboxiterminal) con capacidad para unirse a la heparina.

Los mismos autores demostraron que el producto con actividad biológica de la acción de la plasmina se compone de los primeros 110 aminoácidos del extremo NH<sub>2</sub> terminal de VEGF, careciendo el polipéptido del extremo carboxi terminal de afinidad por los receptores de VEGF. No obstante, la pérdida de la capacidad fijadora de heparina (que reside en el extremo carboxiterminal, aminoácidos 111-165) conllevaba una pérdida notable de la capacidad de inducir mitosis de las células endoteliales. La potencia mitogénica VEGF<sub>110</sub> era cien veces menor que la que posee VEGF<sub>165</sub>.<sup>86</sup>

### **I.3.3 FACTORES DE CRECIMIENTO RELACIONADOS CON VEGF.**

Además de VEGF, la familia de factores VEGF abarca a otras proteínas de gran parentesco estructural como: el factor de crecimiento placentario (placenta growth factor, PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E.<sup>87</sup> (Figura 1 )

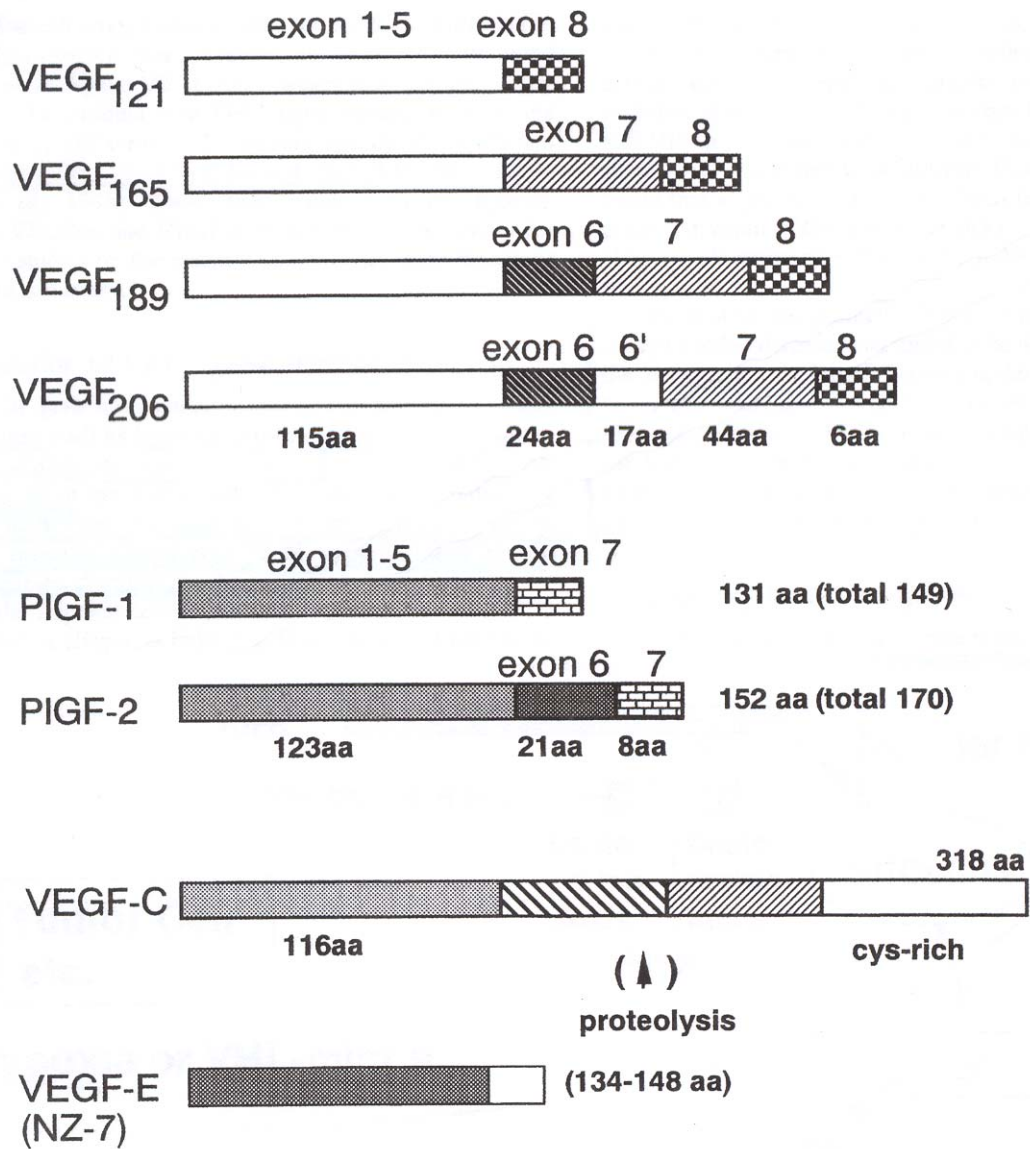
Como describiré posteriormente VEGF se une a dos receptores, ambos tirosincinasas<sup>88-93</sup> : Flt-1 también denominado VEGFR-1, y KDR (kinase-insert domain containing receptor) conocido también como VEGFR-2.<sup>87</sup>

PlGF y VEGF-B se unen y activan a Flt-1(VEGFR-1) exclusivamente.

Sin embargo no se han identificado agonistas selectivos, en el ser humano, para KDR (VEGFR-2); aunque recientemente Ogawa y colaboradores han identificado un ligando que denominaron VEGF-E<sub>NZ-7</sub> (codificado en el genoma del parapoxvirus Orf NZ7) que se une y activa específicamente al receptor KDR (VEGFR-2) pero no al receptor Flt-1(VEGFR-1).<sup>94</sup>

VEGF-C y VEGF-D se unen a un tercer receptor denominado Flt-4 o VEGFR-3 y en determinadas situaciones a VEGFR-2 ó KDR.<sup>87</sup>

Estos dos últimos factores (VEGF-C y VEGF-D) han demostrado ser importantes reguladores de la linfangiogenesis.<sup>95-96</sup>



Otros: VEGF-B, VEGF-D.

**Figura 1. Comparación de las estructuras de la familia VEGF.**

### **I.3.4 RECEPTORES DE VEGF**

#### **I.3.4.1 Flt -1 y KDR**

Inicialmente, en el período de 1990 a 1992, se identificaron dos receptores, ambos tirosin cinasas, para VEGF.<sup>88-93</sup>

Fueron denominados Flt-1 (fms-like tyrosine kinase) y KDR (kinase-insert domain containing receptor). Ambos se unen a VEGF con gran afinidad.

Flk-1, el homólogo murino de KDR, comparte un 85% de su secuencia con el KDR humano.<sup>93</sup>

Todos (Flt-1 ,KDR y Flk -1) tienen siete dominios inmunoglobulina (Ig) like en el dominio extracelular, una única región transmembrana y una secuencia tirosincinasa que es interrumpida por un dominio de inserción cinasa.<sup>88-93</sup>

Flt-1 tiene la mayor afinidad por rhVEGF<sub>165</sub> , con un  $K_d$  de aproximadamente 10 pM, pero su actividad tirosin cinasa es muy baja.<sup>87,88</sup>

KDR tiene menor afinidad por VEGF con un  $K_d$  de 75 -125 pM<sup>89</sup>, no obstante su actividad cinasa es tan potente como la de otros receptores tirosin cinasas representativos como la del receptor de EGF<sup>87</sup>.

El gen *flt-1* codifica dos polipéptidos. Así se ha identificado una forma soluble de Flt-1, en las células endoteliales de la vena umbilical humana, que carece del séptimo dominio Ig –like, de la secuencia transmembrana y de dominio citoplásmico.<sup>97</sup> Este receptor soluble Flt-1 es capaz de inhibir la mitogénesis inducida por VEGF y es posible que sea un regulador fisiológico (inhibidor) de la actividad de VEGF.<sup>97</sup> Este forma soluble se genera por una terminación precoz del *flt -1* RNAm debida a una poliadenilación aberrante en el intrón 13.<sup>87</sup>

Estudios realizados por Davis-Smith y colaboradores demostraron a mitad de la década de los años noventa que el segundo dominio Ig –like de KDR y Flt -1 tiene una gran importancia para permitir la unión con VEGF ya que su supresión impide la unión del mismo a estos receptores.<sup>98</sup>

Se ha demostrado que VEGF induce la fosforilación de al menos 11 proteínas en las células endoteliales de aorta bovina.<sup>99</sup>

La fosfolipasa C-gamma es fosforilada en presencia de VEGF. Además VEGF provoca la fosforilación de la fosfatidilinositol 3-cinasa, de la GTPasa ras y otras sustancias.<sup>100</sup>

Al parecer la interacción entre VEGF y Flk-1/KDR es una condición limitante para conseguir que VEGF pueda desarrollar todas sus funciones biológicas. Esta afirmación esta sustentada por estudios realizados por Keyt y colaboradores, que generaron mutantes de VEGF con afinidad selectiva por un tipo de receptor.<sup>101</sup> Así los mutantes que se unían selectivamente a Flk-1/KDR conseguían inducir mitosis en las células endoteliales, mientras que aquellos mutantes de VEGF que se unían Flt-1 pero no a KDR veían muy reducida su capacidad mitogénica sobre las mismas.

#### **I.3.4.2 Flt4**

Posteriormente, en 1993, el grupo de Alitalo y colaboradores describieron la secuencia completa de un tercer receptor tirosincinasa que denominaron Flt4 o VEGFR-3 .<sup>102</sup> VEGF no se une a este receptor, siendo sus agonistas VEGF-C y VEGF-D.<sup>87</sup>

#### **I.3.5 REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE VEGF.**

Son varios los mecanismos que han mostrado estar implicados en la regulación de la expresión del gen de VEGF, entre otros: la hipoxia, factores de crecimiento, mutaciones de p53, estrógenos, TSH y el óxido nítrico.<sup>87</sup>

Entre todos ellos la presión parcial de oxígeno juega un papel fundamental. Se ha apreciado un aumento en la expresión de RNA m de VEGF cuando se someten diversos tipos de cultivos celulares a pO<sub>2</sub> bajas.<sup>103, 104-106</sup>

En los glioblastomas multiformes y en otros tumores con un componente necrótico importante, el VEGF RNA<sub>m</sub> está expresado en células tumorales que están yuxtapuestas a áreas de necrosis,<sup>103</sup> sugiriendo que la hipoxia es uno de los inductores principales de la expresión de génica de VEGF en el contexto de un microambiente tumoral.<sup>68</sup>



Posteriormente se describió el mecanismo mediante el que la hipoxia es capaz de inducir la transcripción de VEGF. Bajo condiciones hipóxicas los factores de transcripción HIF1  $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor 1) son estabilizados y trasladados al núcleo donde en colaboración con otro factor relacionado denominado HIF $\beta$  activan el gen de VEGF a través de un elemento específico denominado HRE (Hypoxia response element).<sup>87</sup>

Frank y colaboradores mostraron que la expresión de VEGF RNA<sub>m</sub> puede ser inducida, en cultivos de queratinocitos, por varias citosinas como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) o el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF).<sup>107</sup>

El tratamiento de cultivos latentes de líneas celulares epiteliales y fibroblásticas con TGF- $\beta$  provocó una inducción de la expresión de VEGF RNA<sub>m</sub> así como liberación de la propia glicoproteína (VEGF) en el medio de cultivo, sugiriendo que VEGF pueda comportarse como un mediador paracrino para agentes angiogénicos de acción indirecta como el TGF- $\beta$ .<sup>108</sup>

La interleukina 1 $\beta$  induce la expresión de VEGF en las células musculares lisas aórticas de la rata.<sup>109</sup>

Tanto la interleucina 1 $\alpha$  como la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) han mostrado, en las experiencias realizadas por Ben-Av y colaboradores, tener la capacidad de inducir la expresión de VEGF en cultivos de fibroblastos sinoviales, postulándose así la participación de estas sustancias en la angiogénesis de los procesos inflamatorios.<sup>110</sup>

También la interleucina 6 ha demostrado ser capaz de inducir expresión de VEGF en varias líneas de células cultivadas.<sup>111</sup>

Del mismo modo se ha probado que algunas mutaciones son capaces de inducir la expresión génica de VEGF. Así, los trabajos de Kieser y colaboradores, mostraron que una forma mutada del gen supresor p53 murino induce la expresión de VEGF RNA<sub>m</sub>.<sup>112</sup> Otro hallazgo similar fue descrito por Rak y colaboradores y por Grugel y colaboradores que identificaron que tanto la mutación como la amplificación del gen *ras* estimulaban la expresión de VEGF.<sup>113,114</sup> Este efecto se veía anulado cuando se utilizaban inhibidores de *ras* como la farnesiltransferasa.

También la sobreexpresión de *v-raf* y de *v-Src* lleva a una estimulación de la expresión de VEGF.<sup>114-115</sup>

Por todo lo anteriormente expuesto queda patente que diversas alteraciones en los mecanismos de regulación celulares, no relacionadas entre sí, conllevan una estimulación de la expresión de VEGF, sugiriendo que éste sea una vía final común para una proliferación incontrolada *in vivo*.<sup>68</sup>

### **I.3.6 PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR EN LA ANGIOGENESIS TUMORAL.**

#### **I.3.6.1 Expresión de VEGF y sus receptores en tumores humanos:**

Estudios de hibridación *in situ* realizados por varios grupos de investigación han demostrado que el VEGF mRNA está activado en un gran número de tumores humanos incluyendo: neoplasias pulmonares<sup>49</sup>, tumores tiroideos<sup>54</sup>, cánceres de mama<sup>57</sup>, tumores del tracto gastrointestinal<sup>58</sup>, carcinomas hepatocelulares<sup>116</sup>, neoplasias renales y vesicales<sup>48</sup>, tumores ováricos<sup>55</sup>, carcinomas de cérvix uterino<sup>56</sup>, angiosarcomas<sup>50</sup> y tumores intracraneales<sup>51-53</sup>.

El VEGF mRNA está expresado en las células tumorales pero no en las células endoteliales. Por el contrario el mRNA para Flt-1 y para KDR está expresado en las células endoteliales.<sup>51,58,116</sup> Esta distribución apoya la hipótesis que afirma que VEGF es un regulador paracrino primario.<sup>117</sup>

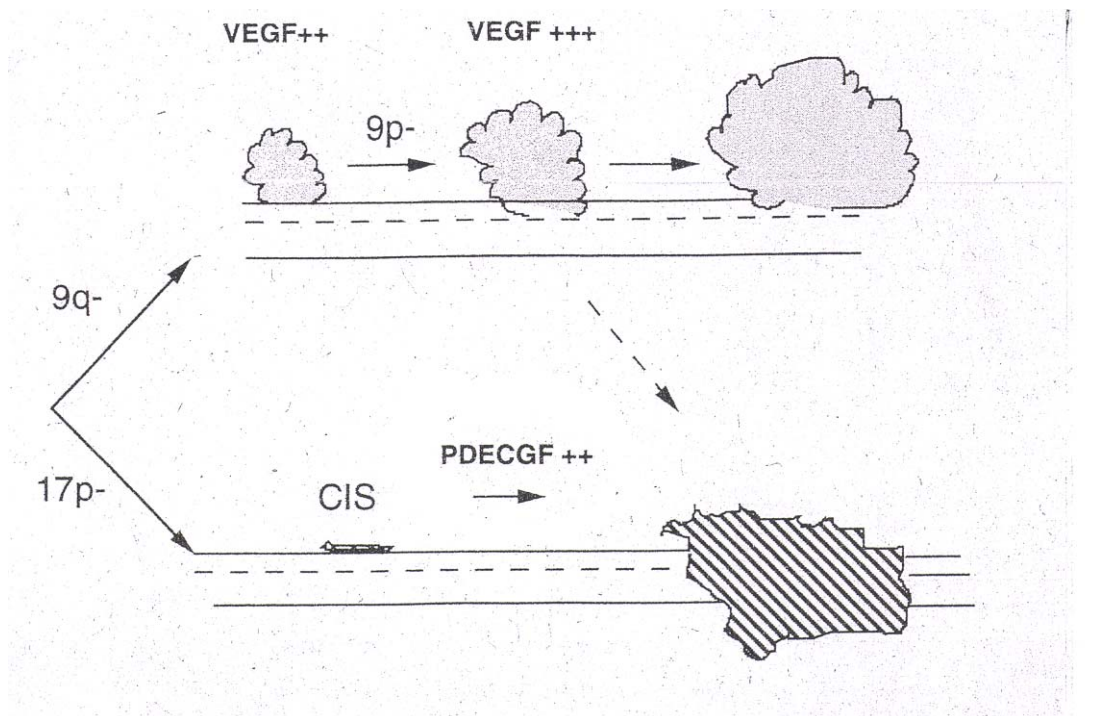
Una excepción es el angiosarcoma cuyas células expresan tanto el mRNA para VEGF como para Flt-1, señalando la posibilidad que en esta neoplasia VEGF sea un factor autocrino.<sup>50</sup>

Se ha demostrado la existencia de una correlación entre la expresión de VEGF y la densidad microvascular en preparaciones histopatológicas de cáncer de mama, así como la existencia de una asociación entre la expresión de VEGF y el intervalo libre de enfermedad, siendo este menor en tumores ricos en VEGF.<sup>118</sup>

Estudios realizados por Maeda y colaboradores muestran una asociación similar en una serie de ciento veintinueve carcinomas gástricos, en la que la positividad de VEGF en

las laminillas histológicas se correlacionaba con la afectación vascular, metástasis ganglionares y hepáticas.<sup>119</sup>

En relación con los tumores vesicales O'Brien y colaboradores estudiaron una serie de 45 tumores vesicales (28 neoplasias superficiales y 17 infiltrantes) analizando la expresión de VEGF y de PDEGF mediante análisis de protección de RNasa, determinando que la expresión de VEGF en tumores superficiales era cuatro veces mayor que en tumores infiltrantes y diez veces mayor que en vejigas normales. Por el contrario, en los tumores infiltrantes, la expresión de PDEGF era 33 veces superior a la existente en tumores superficiales y 260 veces superior a la existente en vejigas normales. Estos autores postularon, basándose en estos resultados, la existencia de dos patrones angiogénicos en el carcinoma vesical, de tal modo que VEGF fuera una molécula clave en el desarrollo de las lesiones papilares superficiales, (así como que una marcada elevación de la expresión de VEGF implicaría la existencia de un fenotipo más agresivo dentro del grupo de tumores superficiales) y que PDEGF facilitaría la progresión de *Carcinoma in situ* a una tumoración infiltrante<sup>120</sup>. (Figura 2)



**Fig. 2 Representación esquemática del postulado de las vías o patrones de desarrollo genético y angiogénico en el cáncer vesical según O'Brien et al.<sup>120</sup>** Las mutaciones del cromosoma 9q se aprecian en un 80% de los tumores pTa pero son poco frecuentes en los tumores infiltrantes. Los autores proponen que VEGF es una molécula clave en el desarrollo de los tumores superficiales y que una expresión marcadamente elevada de este factor lleve a fenotipo más agresivo dentro del grupo de neoformaciones

superficiales. Las mutaciones de 17 p se aprecian en el 60 % de los CIS. Los autores postulan que una elevada expresión de PDEGF facilite la progresión de carcinoma in situ a lesiones infiltrantes.

En otro estudio posterior, de este mismo grupo de investigadores, se realizó una determinación de la expresión de VEGF mRNA, mediante análisis de protección de RNasa, y de los niveles de VEGF (de la glicoproteína) en las células tumorales, mediante una técnica de ELISA, de una serie de 55 tumores vesicales superficiales mostrándose que la expresión de VEGFmRNA se correlacionaba con los niveles de la proteína (VEGF), aunque la ratio VEGFproteína/ VEGFmRNA estaba más elevada en los tumores que en los controles realizados a urotelios normales (no existiendo, no obstante, diferencias entre estadios Ta y T<sub>1</sub>), sugiriendo así la existencia en los tumores superficiales de una regulación posttranscripcional de la síntesis de VEGF. En este mismo estudio VEGFmRNA se mostró, en un análisis multivariante, como un factor pronóstico independiente para la recidiva tumoral precoz.<sup>121</sup>

Estos mismos autores investigaron la concentración urinaria de VEGF, mediante una técnica de ELISA, en una serie de 261 tumores vesicales y la compararon con las concentraciones urinarias de VEGF existentes en 108 pacientes diagnosticados de otras neoplasias no urológicas en estadio avanzado, así como con las concentraciones existentes en 19 controles no oncológicos. Los niveles urinarios más elevados de VEGF se encontraron en el grupo de pacientes con neoplasias vesicales, correlacionándose éstos con las tasas de recurrencia tumoral vesical. No obstante no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles urinarios medios de VEGF en estadios pT<sub>1</sub> y los existentes en estadios T<sub>2</sub> o superiores.<sup>122</sup>

Existen en la literatura 3 estudios de los niveles séricos de VEGF en pacientes con neoplasias vesicales:<sup>123,124,125</sup>

Edgren y colaboradores determinaron las concentraciones séricas de VEGF y FGF-b (factor de crecimiento fibroblástico básico) en pacientes diagnosticados de carcinomas

renales (22 casos), prostáticos (25 casos) y vesicales (22 casos). No apreciaron correlación entre los niveles séricos de los factores de crecimiento y la supervivencia.<sup>123</sup>

Miyake y colaboradores determinaron los niveles séricos de VEGF en 135 pacientes con carcinoma urotelial, así como en 51 controles sanos, apreciando diferencias significativas entre las concentraciones séricas de los controles sanos y las de los pacientes con carcinoma urotelial; sin embargo no apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de los pacientes con carcinomas superficiales y los de los pacientes con tumores infiltrantes. El intervalo libre de enfermedad de los pacientes con cáncer superficial era menor en aquellos con niveles séricos elevados de VEGF, siendo un factor predictivo independiente de la recurrencia de la enfermedad. No se apreció una relación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de VEGF y sexo, edad, citología urinaria, estadio, grado, multifocalidad, afectación ganglionar o metástasis a distancia.<sup>124</sup>

Por último, Bernardini y colaboradores determinaron los niveles séricos de VEGF en una serie de 58 tumores vesicales y 41 controles sanos, apreciando una asociación de los niveles séricos de VEGF con el estadio, grado, existencia de invasión vascular y carcinoma in situ. Sin embargo al realizar un análisis multivariante sólo el estadio pudo ser considerado como un factor pronóstico independiente. En la serie estudiada se apreció que los pacientes con enfermedad metastásica tenían niveles séricos de VEGF significativamente superiores a aquellos con una enfermedad organoconfinada.<sup>125</sup>

Resulta llamativo las diferencias existentes en las concentraciones de VEGF apreciadas en los tres estudios pese a utilizar los tres el mismo kit comercial para la determinación sérica de VEGF ( Human VEGF Quantikine quantitative immunoassay, R&D Systems Inc.). Así en la serie estudiada por Edgren se apreciaron, en el grupo de estudio, concentraciones de VEGF que oscilaron entre 92,7 pg/ml y 1233 pg/ml con una media de 387,9 pg/ml.

En la serie estudiada por Miyake y colaboradores se determinaron concentraciones, en el grupo de estudio, que oscilaron entre 22 pg/ml y 86 pg/ml con una media de  $49 \pm 27$  pg/ml en el grupo de pacientes con tumores superficiales, y de  $51 \pm 35$  en el grupo de pacientes con tumores infiltrantes.

En la serie de Bernardini las concentraciones en el grupo de estudio oscilaron entre 70 pg/ml y 764 pg/ml , con una media de  $194 \pm 116$  pg /ml en los tumores órgano confinados y de  $582 \pm 182$  pg/ml en los pacientes con enfermedad metastásica.

Este hecho no es un fenómeno limitado a los tumores vesicales. En la literatura existen grandes variaciones ínter estudios al determinar los niveles circulantes de VEGF en neoplasias<sup>126-147</sup> atribuyéndose este fenómeno, al menos en parte, a una falta de estandarización en la fase preanalítica.<sup>148</sup>

El VEGF circulante tiene un origen multicompartimental; así procede del tumor, pero puede ser liberado también por plaquetas, granulocitos, monocitos y linfocitos.<sup>149-156</sup>

Se ha demostrado la existencia de una relación directa entre el recuento plaquetario y la concentración sérica de VEGF en varios estudios.<sup>140,149</sup>

Verheul y colaboradores demostraron que VEGF es transportado por las plaquetas y que las concentraciones séricas de VEGF reflejaban más el recuento plaquetario que la carga tumoral.<sup>149</sup>

Maloney y colaboradores así como también Gunsilius et al comunicaron una clara asociación entre la agregación plaquetaria in vitro y las concentraciones de VEGF que demostraba que el VEGF liberado de las plaquetas durante la formación del coagulo es la fuente principal de VEGF en las muestras de suero.<sup>151,155</sup>

El tiempo transcurrido entre la extracción y la centrifugación en los distintos estudios oscilaba entre “inmediatamente” y 30 minutos a temperatura ambiente y de 30 minutos a 4 horas a 4° C. De este modo no resulta sorprendente que las concentraciones séricas de VEGF encontradas en sujetos sanos reflejaban un amplio rango, incluso cuando se utilizaba un mismo método de laboratorio para su determinación, que oscilaba entre 0 y 1750 pg/ml.<sup>126,132,137,149</sup>

Recientemente, Dittadi y colaboradores han mostrado que el VEGF sérico aumentaba de manera variable a lo largo de dos horas durante la coagulación a temperatura ambiente, manteniéndose estable posteriormente.<sup>157</sup>

Una situación similar se ha encontrado cuando se han realizado determinaciones plasmáticas de VEGF, en las que inicialmente parecía existir mayor efectividad para diferenciar a los voluntarios sanos y pacientes con procesos no neoplásicos de los pacientes oncológicos<sup>143,150</sup>. No obstante estudios posteriores realizados por Dittadi y colaboradores, utilizando la misma técnica que Adams et al<sup>143</sup> apreciaron la existencia de niveles plasmáticos altos de factor plaquetario 4 (PF4), por lo que los valores

apreciados en voluntarios sanos por Adams podrían ser debidos a una activación parcial de las plaquetas *in vitro*, haciendo así cuestionable la conclusión de Adams sobre el papel de VEGF plasmático como marcador tumoral.<sup>148</sup>

Así ,hoy por hoy, no existen pruebas de la existencia de un compartimento sanguíneo ideal donde realizar las determinaciones de VEGF, recomendándose, en el segundo consenso internacional para la metodología y criterios de la evaluación de la cuantificación de la angiogénesis en tumores sólidos humanos, la determinación sistemática de VEGF en plasma, suero y sangre total, siendo necesaria la realización de estudios clínicos prospectivos y controlados que clarifiquen en que compartimento sanguíneo deben realizarse las determinaciones de VEGF.<sup>148</sup>

### **I.3.6.2 Inhibición de la actividad de VEGF *in vivo***

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales capaces de inhibir la angiogénesis *in vivo*<sup>158</sup> hizo posible demostrar que VEGF jugaba un papel en el desarrollo tumoral. Las experiencias desarrolladas por Kim<sup>33</sup>, descritas anteriormente, probaron que la supresión de los efectos de VEGF *in vivo* se traducía en una importante disminución de la densidad vascular tumoral que conllevaba una reducción del crecimiento tumoral que oscilaba entre el 70% y superior al 95%. Cuando se realizó la experiencia *in vitro* se vio que ni la administración de VEGF a cultivos celulares ni la utilización de anticuerpos anti VEGF en estos cultivos tuviera efecto sobre la tasa de crecimiento celular.

Posteriormente Warren y colaboradores demostraron, utilizando técnicas similares, que VEGF era un mediador fundamental para el crecimiento de células tumorales HM7 de carcinoma de colon en un modelo murino de metástasis hepáticas.<sup>159</sup>

Otra prueba adicional de la hipótesis que la acción de VEGF es necesaria para la angiogénesis tumoral viene dada por las experiencias de Millauer que mostraron que la expresión de un mutante inhibidor de Flk-1 (mediada por un retrovirus) suprimía el crecimiento del glioblastoma multiforme y otros tumores *in vivo*.<sup>160,161</sup>

## **II. HIPOTESIS**



Los objetivos del tratamiento del carcinoma vesical superficial son erradicar las lesiones existentes, inhibir la recurrencia tumoral y prevenir la progresión de enfermedad.

Hoy sabemos que el estudio histopatológico del tumor vesical, pese a ser insustituible y ser uno de los indicadores pronósticos universalmente reconocidos, no es un factor discriminador lo suficientemente sensible para determinar el potencial biológico específico de un cáncer determinado. Otros factores de predicción de la evolución son determinadas características clínicas como multiplicidad, antecedente de recurrencia y recaída tras una terapia intravesical previa.<sup>162</sup>

Los factores de predicción, cuando se consideran en conjunto, aportan una orientación acerca del curso más probable de la enfermedad. No obstante para definir mejor que tumores deben ser tratados precozmente de manera más intensa es necesario disponer de pronósticos adicionales. La investigación relativa a la angiogénesis puede desempeñar este papel y contribuir al tratamiento aportando una diana terapéutica nueva.

La angiogénesis en el carcinoma vesical ha mostrado tener relación, expresada como densidad vascular en las piezas quirúrgicas, con la supervivencia, intervalo libre de enfermedad y afectación ganglionar.<sup>34-37</sup>

VEGF es una citosina multifuncional que ha mostrado tener gran relevancia en el proceso angiogénico.

Por todo ello nos hemos planteado la siguiente **hipótesis de trabajo**:

Para el desarrollo y progresión del cáncer vesical la angiogénesis es un factor necesario, aunque no suficiente, en el que VEGF pudiera jugar un papel relevante.

Para intentar demostrar esta hipótesis nos hemos planteado los siguientes **objetivos**:

- 1- Cuantificar la concentración sérica de VEGF en una serie de tumores vesicales primarios, así como en un grupo control de pacientes no neoplásicos.
- 2- Comprobar si existe una relación entre los niveles séricos de VEGF (en el momento del diagnóstico inicial) con el estadio tumoral, grado citológico, citología urinaria, número de tumores existentes al diagnóstico, número de recidivas, progresión, intervalo libre de enfermedad existente hasta la primera recidiva y mortalidad en los tres primeros años de seguimiento.

### **III. MATERIAL Y METODOS**

### **III.MATERIAL Y METODOS.**

#### **III.1.MATERIAL**

##### **III.1.1 PACIENTES CON TUMORES VESICALES PRIMARIOS.**

Fueron incluidos 52 pacientes diagnosticados de novo de neoformación vesical procedentes del servicio de urología del Hospital Universitario Dr.Peset de Valencia. Se estudiaron 50 varones y 2 mujeres con rango de edad comprendido entre los 40 y los 89 años.

La selección de pacientes se realizó por muestreo aleatorio entre las neoformaciones diagnosticadas de novo remitidas para recibir tratamiento quirúrgico al servicio de urología del Hospital Universitario Dr. Peset entre 1996 y 1999.

El diagnóstico de neoformación vesical se realizó mediante ecografía integral del aparato urinario, urografía intravenosa y citología urinaria. Previamente se había realizado una anamnesis detallada prestando especial interés a la existencia de historia de episodios de hematuria monosintomática o sintomatología irritativa miccional. La exploración física consistió en una exploración por aparatos prestando especial atención en la palpación abdominal y de fosas renales, exploración de genitales y tacto rectal.

##### **III.1.2 GRUPO CONTROL.**

Fueron seleccionados 26 pacientes sometidos a cirugía prostática, con el diagnóstico previo de hiperplasia benigna prostática, sin antecedentes de neoplasias previas, ni de infección del tracto urinario, cirugía de otra índole, biopsias o sondaje uretral en las 4 semanas previas a la realización de la cirugía prostática, siendo el diagnóstico histopatológico de todos los especímenes quirúrgicos hiperplasia prostática benigna.

La selección del grupo control se realizó, teniendo en cuenta los parámetros anteriores, de forma en que fuera comparable al grupo de estudio.

Los pacientes del grupo control habían sido sometidos, obviamente, a una anamnesis y exploración física por aparatos y a un estudio ecográfico del aparato genitourinario y determinación de PSA.

## **III.2. METODOS.**

### **III.2.1. RESECCION TRANSURETRAL**

A los pacientes del grupo de estudio se les realizó, inicialmente, una resección transuretral de las neoformaciones vesicales que padecían indicando en la hoja operatoria su número, diámetro aproximado, localización y distribución en la vejiga, así como su carácter sólido o papilar.

La porción exofítica de las neoformaciones y la base tumoral se remitieron para estudio histopatológico por separado.

En el mismo acto quirúrgico se realizó una toma de biopsias randomizadas vesicales.

Previamente a la resección transuretral se había tomado una muestra de orina para análisis citológico.

### **III.2.2 SEGUIMIENTO.**

Una vez realizada la resección transuretral y estadiadas las lesiones se realiza una distribución de los pacientes en aquellos con lesiones infiltrantes y en enfermos con lesiones superficiales. A los pacientes con lesiones infiltrantes cuyo estado general condicionado por edad y patología asociada permitían recibir tratamiento quirúrgico radical se les propuso.

Los pacientes con tumores superficiales se dividen en tres grupos de riesgo que condicionan el seguimiento posterior:

Grupo I o bajo riesgo: tumores pTa GI-II únicos sin CIS asociado y pT<sub>1</sub> GI único sin CIS asociado .

Grupo II o de riesgo intermedio: tumores pTa G I-II múltiples, pT<sub>1</sub> GI múltiple y pT<sub>1</sub> GII múltiple, sin CIS asociado.

Grupo III o de alto riesgo: tumores pTa GIII-IV y pT<sub>1</sub> GIII-IV aislados o asociados a CIS.

En el grupo I o de riesgo bajo no se asocia tratamiento endocavitario realizándose un control ecográfico y citológico a los 6 meses de la resección inicial así como una cistoscopia y citología a los 12 meses. Durante el segundo y tercer año el seguimiento es el mismo. El cuarto y quinto año se realiza control anual con ecografía y citología.

En el grupo II o de riesgo intermedio se realiza un tratamiento quimioprolifático endocavitario (Mitomicina C, Adriamicina...) practicándose un control cistoscópico y citológico a los 6 meses y al año. Durante el segundo año de seguimiento se realiza cistoscopia y citología cada 6 meses. El tercer año, así como el cuarto y quinto se realiza ecografía y citología semestral y cistoscopia anual.

En el grupo III o de alto riesgo se realizan 6 instilaciones endocavitarias con BCG de cepa Connaught a dosis de 81 mg. Se realiza revisión endoscópica precoz a los 4 meses con toma de biopsias. Si presenta el paciente intolerancia al tratamiento y/o presenta recidiva con tumoraciones de alto grado citológico (III, IV o CIS) tras dos ciclos completos se plantea cistectomía.

Si la primera revisión resulta negativa se realiza nuevo control citológico y ecográfico 3 meses después y cistoscopia y citología al año de la resección inicial.

Durante los siguientes 4 años se realiza ecografía y citología en el tercer y noveno mes de cada año, y citología y cistoscopia en el sexto y duodécimo mes de cada año.

Todos los grupos son estudiados con urografía intravenosa cada dos años.

### **III.2.3 DETERMINACION DE LOS NIVELES SERICOS DE VEGF.**

Previamente a la realización de la resección transuretral, en el grupo de estudio, o de la cirugía prostática, en el grupo control, se realizó extracción de 15 ml de sangre en tubo seco. Se dejaba formar el coágulo durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaba la muestra a 3000 rpm durante 10 minutos. Se separaba el suero y se repartía en alícuotas de 1,5 ml, congelándose a -70° C hasta su determinación.

Para la determinación cuantitativa de VEGF se utilizó una técnica de ELISA ( Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) en sándwich (Quantikine® Human VEGF Immunoassay de la firma R&D Systems Europe.) según instrucciones del fabricante.

Básicamente la técnica consiste en una reacción colorimétrica mediada por una reacción antígeno- anticuerpo entre VEGF y un anticuerpo específico contra VEGF.

Los estándares, suministrados por el fabricante, y las muestras de suero a estudio se pipetea en los pocillos de la placa, que están revestidos por un anticuerpo monoclonal específico contra VEGF; así cualquier VEGF presente en el suero es inmovilizado en el

pocillo. Después de lavar los pocillos para eliminar cualquier sustancia que no haya sido fijada por el anticuerpo monoclonal se añade un anticuerpo policlonal unido a un enzima. Se vuelve a lavar y se añade una solución substrato desarrollándose color en forma proporcional a la cantidad de VEGF que haya quedado fijada en el pocillo en el primer paso. La reacción colorimétrica es detenida y la intensidad del color se mide con ayuda de un lector de densidad óptica ( fotómetro) a 450nm. La concentración de VEGF en las muestras se determina comparando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar.

**III.2.4 VARIABLES.**

Se efectuó una búsqueda en la historia clínica de cada paciente incluido en el estudio recopilando, en cada caso, los datos referentes a edad al diagnóstico, sexo, diagnóstico histopatológico, número de tumores existentes en la primera resección transuretral, niveles séricos de VEGF y de aquellos de carácter evolutivo ( número de recidivas, intervalo libre de enfermedad, progresión, exitus...) pertenecientes a los tres primeros años de evolución.

Con los datos recogidos se establecieron las siguientes variables:

| <b>VARIABLE</b> | <b>CONNOTACION</b>            | <b>CARÁCTER</b>  | <b>SUBDIVISIONES</b>   |
|-----------------|-------------------------------|------------------|--|
| <b>V1</b>       | Edad                          | N (cuantitativa) |  |
| <b>V2</b>       | Edad                          | L (cualitativa)  | 40-50 (1)<br>51-60 (2)<br>61-70 (3)<br>71 -80 (4)<br>>80 (5)                                     |
| <b>V3</b>       | Sexo                          | L                | Varón (1)<br>Mujer (2)   |
| <b>V4</b>       | Grupo                         | L                | Grupo control (1)<br>Grupo de estudio (2)  |
| <b>V5</b>       | Síndrome Irritativo miccional | L                | No (1)<br>Si (2)   |
| <b>V6</b>       | Citología                     | L                | Neg. Cels Malignas (1)<br>Positiva bajo Grado (2)<br>Positiva alto grado (3)<br>No valorable (4) |

|            |  |   |   |
|------------|--|---|---|
| <b>V7</b>  | Citología<br>Inflamatoria                              | L | No (1)<br>Si (2)<br>No valorable (3)  |
| <b>V8</b>  | Grado  | L | Grado I (1)<br>Grado II (2)<br>Grado III (3)<br>Grado IV (4)  |
| <b>V9</b>  | Biopsias<br>Randomizadas                               | L | Urotelio normal (1)<br>Cambios Inflamatorios (2)<br>Displasia leve (3)<br>Displasia moderada (4)<br>Displasia grave (5)<br>Carcinoma de bajo grado (6)<br>Carcinoma de alto grado (7)<br>No realizada (8) |
| <b>V10</b> | Estadio  | L | pTa (1)<br>pT1 (2)<br>pT2 (3)<br>pT3 (4)<br>pT4 (5)   |
| <b>V11</b> | Número total de<br>tumores en la 1 <sup>a</sup><br>RTU | N |   |
| <b>V12</b> | VEGF [pg/ml]   | N |   |
| <b>V13</b> | Recidiva tumoral                                       | L | No (1)<br>Si (2)  |
| <b>V14</b> | Número total de<br>recidivas                           | N |   |
| <b>V15</b> | Progresión   | L | No (1)<br>Si (2)  |
| <b>V16</b> | Intervalo libre de<br>enfermedad [meses]               | N |   |
| <b>V17</b> | Exitus   | L | No (1)<br>Si otras causas (2)<br>Si cáncer (3)  |
| <b>V18</b> | Supervivencia<br>[meses]                               | N |   |
| <b>V19</b> | VEGF   | L | VEGF < 450 pg/ml (1)<br>VEGF 450 – 1200 pg/ml (2)<br>VEGF > 1200 pg/ml (3)  |

### **III.2.4.1 Estadío tumoral y grado citológico.**

#### **III.2.4.1.1. Estadío tumoral.**

El estadío tumoral se clasificó según la clasificación TNM de la International Union Against Cancer de 1997.<sup>163</sup>

**T:** Tumor primario:

T<sub>x</sub>: la existencia de tumor no puede establecerse.

T<sub>0</sub>: no hay evidencia de tumor primario.

T<sub>a</sub>: carcinoma papilar no invasivo.

T<sub>is</sub>: Carcinoma in situ.

T<sub>1</sub>: tumor que invade el tejido conectivo subepitelial.

T<sub>2</sub>: tumor que invade el músculo.

T<sub>2a</sub>: invasión muscular superficial.

T<sub>2b</sub>: invasión de la muscular profunda.

T<sub>3</sub>: Tumor que invade el tejido conectivo perivesical.

T<sub>3a</sub>: microscópicamente.

T<sub>3b</sub>: macroscópicamente.

T<sub>4</sub>: Tumor que invade alguno de los órganos siguientes: próstata, útero, vagina, pared pelviana o abdominal.

T<sub>4a</sub>: Tumor que invade próstata, útero o vagina.

T<sub>4b</sub>: Tumor que invade la pared pélvica o abdominal.

**N:** Ganglios linfáticos regionales.

N<sub>x</sub>: La existencia de adenopatías no puede establecerse.

N<sub>0</sub>: Ausencia de metástasis ganglionares.

N<sub>1</sub>: Metástasis a un único ganglio menor o igual a 2 cm.

N<sub>2</sub>: Metástasis en un único ganglio > de 2 cm pero < de 5 cm o múltiples < de 5cm.

N<sub>3</sub>: Metástasis ganglionares mayores a 5 cm.

**M:** Metástasis a distancia.

M<sub>x</sub>: La existencia de metástasis no puede establecerse.

M<sub>0</sub>: Ausencia de metástasis a distancia.



M<sub>1</sub>: Metástasis a distancia.

#### **III.2.4.1.2. Grado citológico.**

La clasificación del grado citológico se realizó según la clasificación de Ash en 4 grados: I-IV.<sup>164</sup>

**Grado I:** microscópicamente existen frondas papilares compuestas por un eje fibrovascular central recubierto por escasas capas de células transicionales uniformes y muy similares a las identificadas en el urotelio normal. Las mitosis son poco frecuentes o están ausentes.

**Grado II:** microscópicamente la configuración papilar persiste pero existe un mayor número de capas celulares, existiendo crecimiento e hiperchromasia del núcleo, apreciándose mitosis.

**Grado III:** microscópicamente puede persistir la distribución papilar pero está irregularmente distribuida, existe una distribución celular en grupos más pequeños. Las mitosis son frecuentes.

**Grado IV:** ausencia de áreas papilares, existe una marcada atipia y pleomorfismo celular con importantes variaciones en el tamaño y forma celulares hasta el punto en que la naturaleza transicional del tumor puede no distinguirse con claridad. La presencia de mitosis es muy frecuente.

#### **III.2.4.2 Intervalo libre de enfermedad.**

Queda definido como el tiempo transcurrido (medido en meses) entre la resección transuretral inicial y la aparición de la primera recidiva o de progresión de enfermedad.

#### **III.2.4.3 Progresión.**

Queda definida como la existencia de una recidiva vesical de mayor estadio o grado, o bien la aparición de metástasis a distancia.

#### **III.2.4.4 Supervivencia.**

Queda definida como el intervalo de tiempo transcurrido, medido en meses, entre la primera resección transuretral y el exitus o la finalización del seguimiento a tres años.

### **III.2.4.5 Síndrome irritativo miccional.**

Se define como la existencia de disuria intensa o dolor miccional asociado a imperiosidad y urgencia miccionales, así como polaquiuria presentes en ausencia de infección urinaria (urinocultivo negativo).

La existencia de cistalgia, disuria y síntomas irritativos están presentes en 15 al 25% de los tumores vesicales, y se los observa por lo general en el cáncer infiltrante y en el carcinoma in situ.<sup>165</sup>

### **III.2.5 ESTUDIO ESTADISTICO.**

Las variables del estudio fueron codificadas con caracteres alfa- numéricos dispuestos para tabulación, obteniéndose una matriz que se elaboró con un programa Excel.

El proceso estadístico se realizó con programa SPSS en un ordenador compatible.

El análisis estadístico incluyó estadística descriptiva de cada variable, con estadísticos elementales de media, desviación típica y número de casos para variables cuantitativas y aquellas cualitativas ordenadas en sentido creciente decreciente, susceptibles de ser tratadas como cuantitativas y distribución de porcentajes para las variables cualitativas.

La estadística analítica se realizó en tres bloques, dependiendo del tipo de variable a estudiar mediante las siguientes técnicas :

Test de Fischer para el análisis de la varianza y la “t” de Student para la diferencia de medias dos a dos, aplicados al estudio de relaciones entre variables cualitativas y cuantitativas.

Dadas las características de las variables estudiadas se utilizaron tests no paramétricos como el test U de Mann-Whitney para matrices 2 x 2 y Chi cuadrado para matrices superiores a 2x2. Además se realizó correlación de Pearson cuando los valores fueron cuantitativos.

El cálculo de la supervivencia global y la validación pronóstica de la distintas variables del presente estudio se ha realizado por el método actuarial de Kaplan y Meier .

El nivel de significación estadística se consideró con un valor de  $p < 0.05$ .

## **IV. RESULTADOS**

## IV. 1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA.

### IV.1. 1 Descripción general de los grupos.

Grupo de estudio: está formado por 52 pacientes, 50 varones y 2 mujeres, existiendo la pérdida de un caso en el seguimiento.

Grupo control: formado por 26 varones.

### IV.1. 2 Descripción general de las variables en los grupos de estudio.

#### V1: Edad:

Grupo de estudio: Edad media:  $67,01 \pm 11,09$  años.

Grupo Control: Edad media:  $67.30 \pm 8,28$  años.

#### V2: Edad agrupada:

Grupo de estudio: las frecuencias de los diferentes grupos de edad vienen reflejadas en la tabla 2.

**Tabla 2 . Edad cualitativa del grupo de estudio**

| Grupo de edad       | Frecuencia | Porcentaje % |
|---------------------|------------|--------------|
| <b>40-50 años</b>   | 2          | 3.85         |
| <b>51- 60 años</b>  | 12         | 23.08        |
| <b>61 -70 años</b>  | 17         | 32.69        |
| <b>71 -80 años</b>  | 16         | 30.75        |
| <b>&gt; 80 años</b> | 5          | 9.62         |
| <b>Total</b>        | 52         | 100          |

Grupo control : las frecuencias de los diferentes grupos de edad vienen reflejadas en la tabla 3.

**Tabla 3. Edad cualitativa o agrupada del grupo control.**

| Grupo de edad       | Frecuencia | Porcentaje % |
|---------------------|------------|--------------|
| <b>40-50 años</b>   | 0          | 0            |
| <b>51-60 años</b>   | 7          | 26.92        |
| <b>61-70 años</b>   | 9          | 34,62        |
| <b>71-80 años</b>   | 9          | 34.62        |
| <b>&gt; 80 años</b> | 1          | 3.84         |
| <b>Total</b>        | 26         | 100          |

**V5: Síndrome irritativo miccional:**

La incidencia de síndrome irritativo miccional (disuria, polaquiuria, imperiosidad y/o dolor miccional) en el grupo de estudio viene reflejada en la tabla 4. El 23,1% de los pacientes incluidos en el grupo de estudio lo presentó.

**Tabla 4. Sdre. Irritativo miccional en el grupo de estudio.**

| <b>Sdre. Irritativo</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|-------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>No</b>               | 40                | 76,9                |
| <b>Si</b>               | 12                | 23,1                |
| <b>Total</b>            | 52                | 100                 |

**V6: Citología urinaria:**

Los diagnósticos citológicos del grupo de estudio se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5.**

| <b>Citología Urinaria</b>        | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|----------------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>Negativa células malignas</b> | 19                | 36,5                |
| <b>Positiva c.m. bajo grado</b>  | 14                | 26,9                |
| <b>Positiva c.m. alto grado</b>  | 15                | 28,8                |
| <b>No valorable</b>              | 4                 | 7,7                 |
| <b>Total</b>                     | 52                | 100                 |

**V7: Citología con cambios inflamatorios:**

El 3,8% de los pacientes del grupo de estudio mostró cambios inflamatorios en el examen citológico de orina. Los cifras globales se reflejan en la tabla 6.

**Tabla 6. Incidencia de cambios inflamatorios en el estudio citológico urinario.**

| <b>Cambios inflamatorios</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|------------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>No</b>                    | 46                | 88,5                |
| <b>Sí</b>                    | 2                 | 3,8                 |
| <b>No valorable</b>          | 4                 | 7,7                 |
| <b>Total</b>                 | 52                | 100                 |

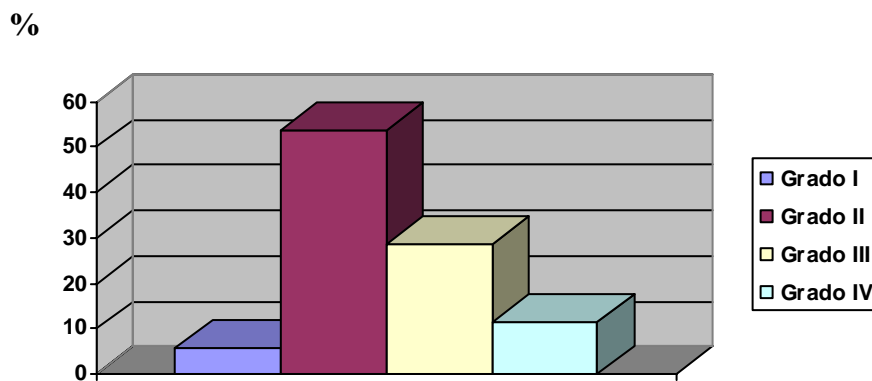
**V8: Grado citológico de los tumores vesicales:**

El grado citológico de los tumores de la serie estudiada viene reflejada en la tabla 7 y figura 3.

**Tabla 7. Grado Citológico.**

| <b>Grado citológico</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|-------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>Grado I</b>          | 3                 | 5,8                 |
| <b>Grado II</b>         | 28                | 53,8                |
| <b>Grado III</b>        | 15                | 28,8                |
| <b>Grado IV</b>         | 6                 | 11,5                |
| <b>Total</b>            | 52                | 100                 |

**Figura 3. Representación gráfica del porcentaje del grado citológico en los tumores vesicales.**



**V9: Biopsia randomizada:**

Los diagnósticos de las biopsias randomizadas, de la serie estudiada y su frecuencia de presentación vienen reflejadas en la tabla 8.

**Tabla 8. Diagnósticos histopatológicos de las biopsias randomizadas vesicales y frecuencia de presentación de los mismos.**

| <b>Diagnóstico</b>             | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|--------------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>Urotelio normal</b>         | 37                | 71,2                |
| <b>Cambios inflamatorios</b>   | 3                 | 5,8                 |
| <b>Displasia leve</b>          | 2                 | 3,8                 |
| <b>Displasia moderada</b>      | 5                 | 9,6                 |
| <b>Displasia grave</b>         | 1                 | 1,9                 |
| <b>Carcinoma de bajo grado</b> | 1                 | 1,9                 |
| <b>Carcinoma de alto grado</b> | 2                 | 3,8                 |
| <b>No realizada</b>            | 1                 | 1,9                 |
| <b>Total</b>                   | 52                | 100                 |

**V10: Estadio:**

Los estadios del grupo de estudio en el momento del diagnóstico vienen reflejados en la tabla 9.

**Tabla 9. Estadio.**

| <b>Estadio</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|----------------|-------------------|---------------------|
| <b>Ta</b>      | 11                | 21,15               |
| <b>T1</b>      | 29                | 55,76               |
| <b>T2</b>      | 10                | 19,24               |
| <b>T3</b>      | 2                 | 3,85                |
| <b>T4</b>      | 0                 | 0                   |
| <b>Tis</b>     | 0                 | 0                   |
| <b>Total</b>   | 52                | 100                 |

**V11: Número de tumores existentes en la primera resección :**

En la tabla 10 se recoge la frecuencia del número tumores existentes al diagnóstico.

**Tabla 10. Número de tumores existentes al diagnóstico.**

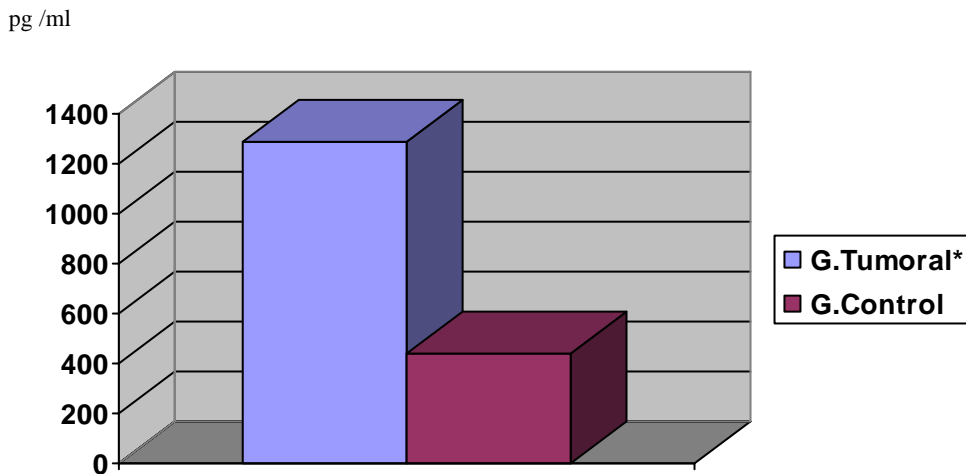
| <b>Número de tumores</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|--------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>Uno</b>               | 35                | 67,3                |
| <b>Dos</b>               | 8                 | 15,4                |
| <b>Tres</b>              | 3                 | 5,8                 |
| <b>Cuatro</b>            | 3                 | 5,8                 |
| <b>Cinco</b>             | 2                 | 3,8                 |
| <b>Seis</b>              | 1                 | 1,9                 |
| <b>Total</b>             | 52                | 100                 |

**V12:Niveles séricos de VEGF (cuantitativos):**

Los niveles séricos medios de VEGF en el grupo de estudio fueron de  $1285,98 \pm 781,69$  pg/ml.\*

En el grupo control se apreciaron unos niveles medios de VEGF de  $439,39 \pm 187,83$  pg/ml.

**Fig. 4. Niveles séricos medios de VEGF en ambos grupos.**



\*p<0.001 versus controles

**V13: Recidiva tumoral:**

En el grupo de estudio se apreció una tasa de recidiva tumoral del 49%. Las frecuencias se reflejan en la tabla 11.

**Tabla 11.Recidiva tumoral.**

| Recidiva     | Frecuencia | Porcentaje % |
|--------------|------------|--------------|
| No           | 26         | 51           |
| Si           | 25         | 49           |
| <b>Total</b> | 51         | 100          |



**V14: Número total de recidivas:**

El número de recidivas osciló entre 0 y 6. Las frecuencias de las mismas se reflejan en la tabla 12.

**Tabla 12. Número de recidivas.**

| <b>Recidivas</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje %</b> |
|------------------|-------------------|---------------------|
| <b>0</b>         | 26                | 51                  |
| <b>1</b>         | 16                | 31,3                |
| <b>2</b>         | 5                 | 9,8                 |
| <b>3</b>         | 2                 | 3,9                 |
| <b>4</b>         | 1                 | 2                   |
| <b>6</b>         | 1                 | 2                   |
| <b>Total</b>     | 51                | 100                 |

**V15: Progresión:**

Se apreció una tasa de progresión del 41,2% ( 21 pacientes del grupo de estudio progresaron).

**V16:Intervalo libre de enfermedad:**

La media de intervalo libre de enfermedad fue de  $19,96 \pm 14,06$  meses, con un rango que osciló entre 0 y 36 meses.

**V17: Exitus:**

La mortalidad cáncer dependiente en el grupo de estudio fue del 25,5% siendo la tasa de mortalidad global del 29,4%.

**V18: Supervivencia:**

La supervivencia media fue de  $29,29 \pm 11,45$  meses (rango 5 a 36 meses).

**V19: Niveles séricos de VEGF (cualitativos o agrupados):**

Se clasificaron las concentraciones de VEGF halladas en los pacientes de ambos grupos en tres categorías: (1) < 450 pg/ml, (2) 450- 1200 pg /ml y (3) > 1200 pg/ml.

Las frecuencias y porcentajes hallados para cada categoría se reflejan en la Tabla 13.

**Tabla 13.**

| <b>VEGF</b>            | <b>Grupo control (G.C.)</b>   | <b>Grupo estudio (G.E.)</b>   | <b>Total (G.C.+G.E.)</b> |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
|                        | <b>Frecuencia/ Porcentaje</b> | <b>Frecuencia/ Porcentaje</b> | <b>Frec. / %</b>         |
| <b>&lt;450 pg/ml</b>   | 15 / 57,7 %                   | 7 / 13,5 %                    | 22 / 28,2%               |
| <b>450-1200 pg/ml</b>  | 11 / 42,3 %                   | 20 / 38,5 %                   | 31 / 39,7%               |
| <b>&gt; 1200 pg/ml</b> | 0 / 0 %                       | 25 / 48 %                     | 25 / 32,1%               |
| <b>Total</b>           | 26 / 100 %                    | 52 / 100 %                    | 78 / 100 %               |

#### **IV. 2 ESTADISTICA ANALITICA.**

Se apreció una relación significativa entre estadio y grado (  $p < 0,001$ ) de forma que los tumores infiltrantes tendieron a presentar grados citológicos III y IV mientras que entre los superficiales predominaron los grados I y II.

También se identificó una relación estadísticamente significativa entre grado y progresión (  $p < 0,026$ ) siendo ésta menor en los tumores de grado I y II.

Del mismo modo se determinó la existencia de una relación significativa entre grado y exitus (  $p < 0,005$  ), así como entre estadio y exitus (  $p < 0,046$  ) teniendo lugar la mortalidad cáncer dependiente fundamentalmente entre los tumores que debutaron en la primera RTU con grados III ó IV, y estadios T<sub>2</sub> ó T<sub>3</sub>. (Tabla 14 y tabla 15)

**Tabla 14. Relación entre grado y exitus.**

| <b>Grado</b> | <b>Exitus</b> |                        |                              | <b>Total</b> |
|--------------|---------------|------------------------|------------------------------|--------------|
|              | <b>No</b>     | <b>Si otras causas</b> | <b>Si cáncer dependiente</b> |              |
| <b>I</b>     | 3             | 0                      | 0                            | 3            |
| <b>II</b>    | 24            | 1                      | 2                            | 27           |
| <b>III</b>   | 6             | 0                      | 9                            | 15           |
| <b>IV</b>    | 3             | 1                      | 2                            | 6            |
| <b>Total</b> | 36            | 2                      | 13                           | 51           |

**Tabla 15. Relación entre estadio y exitus.**

| <b>Estadio</b>        | <b>Exitus</b> |                         |                              | <b>Total</b> |
|-----------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|--------------|
|                       | <b>No</b>     | <b>Si, otras causas</b> | <b>Si cáncer dependiente</b> |              |
| <b>pTa</b>            | 11            | 0                       | 0                            | 11           |
| <b>pT<sub>1</sub></b> | 20            | 1                       | 7                            | 28           |
| <b>pT<sub>2</sub></b> | 5             | 1                       | 4                            | 10           |
| <b>pT<sub>3</sub></b> | 0             | 0                       | 2                            | 2            |
| <b>Total</b>          | 36            | 2                       | 13                           | 51           |

Así mismo se objetivó una relación estadísticamente significativa entre estadio e intervalo libre de enfermedad (  $p < 0,028$  ), así como entre estadio y supervivencia (  $p < 0,003$  ) siendo ambos mayores en los tumores superficiales.

Se apreció del mismo modo una relación estadísticamente significativa (  $p < 0,044$  ) entre la citología urinaria y el estadio de manera que los tumores infiltrantes suelen asociarse a una citología urinaria de alto grado.

También se identificó una relación estadísticamente significativa entre la existencia de síndrome irritativo miccional y el grado citológico (  $p = 0.050$  ) de modo que los pacientes con tumores con grado II y III tuvieron mayor incidencia de síndrome miccional.

El síndrome irritativo miccional también tuvo una relación estadísticamente significativa con la progresión (  $p < 0,006$  ) y con el intervalo libre de enfermedad (  $p < 0,001$  ), de tal forma que los pacientes que lo padecían tuvieron una mayor tendencia a la progresión (75 % de los pacientes que lo padecieron progresaron ) (ver tabla 16 ), y, el intervalo libre de enfermedad fue mayor entre aquellos pacientes que no padecieron el síndrome irritativo miccional.

Se apreció una correlación entre el número de tumores y el número de recidivas que resultó ser estadísticamente significativa (  $p < 0,001$  ), de modo que los pacientes con tumores únicos recidivaron menos que aquellos con tumores múltiples (dos, tres o más ) en la primera resección transuretral .( Tabla 17 )

**Tabla 16. Relación entre la existencia de síndrome irritativo miccional y progresión.**

| <b>Sdre. Irritativo miccional</b> | <b>Progresión</b> |               | <b>Total</b> |
|-----------------------------------|-------------------|---------------|--------------|
|                                   | <b>No</b>         | <b>Si</b>     |              |
| <b>No</b>                         | 27<br>(69,2%)     | 12<br>(30,8%) | 39           |
| <b>Si</b>                         | 3<br>(25%)        | 9<br>(75%)    | 12           |
| <b>Total</b>                      | 30                | 21            | 51           |

**Tabla 17. Relación entre número de tumores en la primera resección y número de recidivas.**

|                   | Número de recidivas |     |     |      |        |      |
|-------------------|---------------------|-----|-----|------|--------|------|
| Número de tumores | Ninguna             | Una | Dos | Tres | Cuatro | Seis |
| <b>Uno</b>        | 21                  | 13  | 1   | 0    | 0      | 0    |
| <b>Dos</b>        | 2                   | 1   | 3   | 1    | 0      | 1    |
| <b>Tres</b>       | 1                   | 0   | 1   | 0    | 1      | 0    |
| <b>Cuatro</b>     | 1                   | 1   | 0   | 0    | 0      | 0    |
| <b>Cinco</b>      | 0                   | 1   | 0   | 1    | 0      | 0    |
| <b>Seis</b>       | 0                   | 1   | 0   | 0    | 0      | 0    |

#### **IV.2.1 Relaciones entre los niveles séricos de VEGF y el resto de variables en ambos grupos de estudio.**

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre las edades de ambos grupos ( $p = 0,744$ ), así como tampoco se apreció una relación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de VEGF y la edad ( $p = 0,632$ ). Los niveles séricos de VEGF agrupados (Variable 19) tampoco mostraron una relación estadísticamente significativa con la edad agrupada ( $p = 0,659$ ).

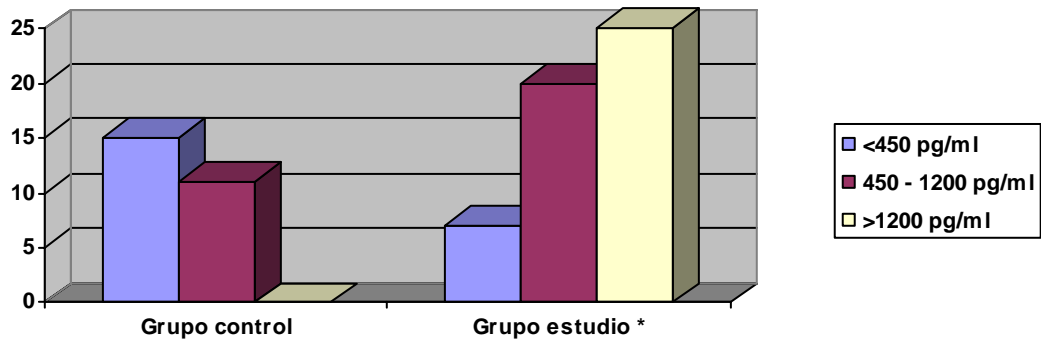
También se comprobó que en la serie estudiada no existe una relación significativa entre el intervalo libre de enfermedad y la edad ( $p = 0,117$ ).

Los niveles séricos de VEGF (tanto los cuantitativos como los cualitativos) fueron significativamente diferentes en el grupo de estudio y en el grupo control determinándose niveles séricos medios superiores en el grupo de estudio ( $p < 0,001$ ). Los niveles en ambos grupos se muestran en las figuras 4 y 5 así como en las tablas 13 y 18.

**Tabla 18. Frecuencia de niveles agrupados de VEGF.**

| Grupo                      | VEGF < 450pg/ml | VEGF 450 -1200 pg/ml | VEGF > 1200 pg/ml | Total | p |
|----------------------------|-----------------|----------------------|-------------------|-------|---|
| Control                    | 15              | 11                   | 0                 | 26    |   |
| Estudio<br>(Tm. Vesicales) | 7               | 20                   | 25                | 52    | * |
| <b>Total</b>               | 22              | 31                   | 25                | 78    |   |

\* p < 0,001 versus controles.



\*p < 0,001 versus grupo control

**Figura 5. Niveles de VEGF (cualitativos o agrupados).**

Los niveles de VEGF no tuvieron una relación estadísticamente significativa con la presencia de síndrome irritativo miccional. ( p = 0,277 )

Del mismo modo tampoco se mostró una relación significativa entre la citología urinaria y los niveles medios de VEGF en cada categoría ( p = 0,494 ) , ni con los niveles agrupados de VEGF ( p = 0,622 ).

Los valores medios de VEGF y su desviación típica encontrados en cada categoría se reflejan en la tabla 19.

**Tabla 19. Niveles de VEGF en relación con la citología urinaria.**

| Citología                | Frecuencia | VEGF [ pg / ml ]      |                   |                       |                    | Total     |
|--------------------------|------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------|
|                          |            | Concentración media * | <450 <sup>#</sup> | 450-1200 <sup>#</sup> | >1200 <sup>#</sup> |           |
| Negativa c. m.           | 19         | 1328,01 ± 814,27      | 2                 | 9                     | 8                  | 19        |
| Positiva c.m. bajo grado | 14         | 1376,72 ± 870,57      | 3                 | 3                     | 8                  | 14        |
| Positiva c.m. alto grado | 15         | 1063,67 ± 694,50      | 2                 | 7                     | 6                  | 15        |
| No valorable             | 4          | 1602,48 ± 666,267     | 0                 | 1                     | 3                  | 4         |
| <b>Total</b>             | <b>52</b>  |                       |                   |                       |                    | <b>52</b> |

\* p = 0,494

# p = 0,622

Así mismo la existencia de cambios inflamatorios en el estudio citológico urinario no tuvo una relación estadísticamente significativa con los niveles de VEGF.( p = 0,546 )

El grado citológico de los tumores de la serie estudiada tampoco mostró una relación significativa con los niveles medios de VEGF ( p = 0,362 ), ni con los niveles agrupados de VEGF ( p = 0,851 ) aunque si se apreció una tendencia de los pacientes con tumores de grado II y III a presentar concentraciones séricas superiores de VEGF. En la tabla 20 se muestran los niveles medios de VEGF según el grado citológico.

**Tabla 20. Niveles de VEGF según el grado citológico.**

| Grado        | Frecuencia | VEGF [ pg / ml ]      |                    |                        |                    |
|--------------|------------|-----------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
|              |            | Concentración media * | < 450 <sup>#</sup> | 450 -1200 <sup>#</sup> | >1200 <sup>#</sup> |
| <b>I</b>     | 3          | 845 ± 632,39          | 1                  | 1                      | 1                  |
| <b>II</b>    | 28         | 1343,65 ± 824,05      | 4                  | 11                     | 13                 |
| <b>III</b>   | 15         | 1421,85 ± 726,08      | 1                  | 5                      | 9                  |
| <b>IV</b>    | 6          | 897,67 ± 746,95       | 1                  | 3                      | 2                  |
| <b>Total</b> | <b>52</b>  |                       |                    |                        |                    |

\* p = 0,362

# p = 0,851

No se apreció la existencia de una relación estadísticamente significativa entre los niveles de VEGF y los diagnósticos de las biopsias randomizadas. Las concentraciones halladas en cada categoría se reflejan en la tabla 21.

**Tabla 21. Niveles de VEGF en función de las biopsias randomizadas.**

| Biopsia randomizada     | Frecuencia | VEGF [pg / ml]        |        |            | Total |           |
|-------------------------|------------|-----------------------|--------|------------|-------|-----------|
|                         |            | Concentración media * | <450 # | 450-1200 # |       | >1200#    |
| Urotelio normal         | 37         | 1250,69 ± 768,62      | 5      | 14         | 18    | 37        |
| Cambios inflamatorios   | 3          | 955,87 ± 742,14       | 1      | 1          | 1     | 3         |
| Displasia leve          | 2          | 1570 ± 608,11         | 0      | 1          | 1     | 2         |
| Displasia moderada      | 5          | 1260,40 ± 1024,96     | 1      | 2          | 2     | 5         |
| Displasia grave         | 1          | 2500                  | 0      | 0          | 1     | 1         |
| Carcinoma de bajo grado | 1          | 2000                  | 0      | 0          | 1     | 1         |
| Carcinoma de alto grado | 2          | 1386,50 ± 1260,77     | 0      | 1          | 1     | 2         |
| No realizada            | 1          | 983                   | 0      | 1          | 0     | 1         |
| <b>Total</b>            | <b>52</b>  |                       |        |            |       | <b>52</b> |

\* p = 0,767 # p = 0,973

En la serie estudiada no se apreció una relación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de VEGF y el estadio tumoral (p = 0,898 ), aunque si se observó una tendencia de los pacientes con tumores superficiales a tener concentraciones séricas superiores de VEGF a las de pacientes con tumores infiltrantes. (Tabla 22)

**Tabla 22. Niveles de VEGF en función del estadio.**

| Estadio         | Frecuencia | VEGF [ pg /ml ]       |       |           | Total |           |
|-----------------|------------|-----------------------|-------|-----------|-------|-----------|
|                 |            | Concentración media * | <450# | 450-1200# |       | >1200#    |
| pTa             | 11         | 1252,71 ± 860,82      | 2     | 3         | 6     | 11        |
| pT <sub>1</sub> | 29         | 1344,69 ± 805,95      | 4     | 12        | 13    | 29        |
| pT <sub>2</sub> | 10         | 1186,60 ± 709,29      | 1     | 4         | 5     | 10        |
| pT <sub>3</sub> | 2          | 1114,50 ± 876,11      | 0     | 1         | 1     | 2         |
| <b>Total</b>    | <b>52</b>  |                       |       |           |       | <b>52</b> |

\* p = 0,898 , # p = 0,976

No se observó la existencia de una correlación entre el número de tumores en la primera resección transuretral y las concentraciones séricas de VEGF (  $p = 0,315$  ), así como tampoco se pudo demostrar una relación significativa entre el número de tumores y los valores agrupados de VEGF (  $p = 0,805$  ). Los valores correspondientes a cada categoría se recogen en la tabla 23.

**Tabla 23. Niveles de VEGF en función del número de tumores.**

| <b>Numero de tumores</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Concentración media de VEGF [ pg / ml ] *</b> |
|--------------------------|-------------------|--|
| <b>Uno</b>               | 35                | 1209,75 ± 788,59                                 |
| <b>Dos</b>               | 8                 | 1112,49 ± 694,84                                 |
| <b>Tres</b>              | 3                 | 2076,67 ± 90,17                                  |
| <b>Cuatro</b>            | 3                 | 1880 ± 687,89                                    |
| <b>Cinco</b>             | 2                 | 1867 ± 188,09                                    |
| <b>Seis</b>              | 1                 | 26   |
| <b>Total</b>             | 52                |  |

\*  $p = 0,315$

En el grupo de estudio no se ha apreciado una correlación estadísticamente significativa entre los valores de VEGF y el número de recidivas (  $p = 0,604$  ). Del mismo modo tampoco existe una relación significativa entre los valores agrupados de VEGF y el hecho de recidivar o no (  $p = 0,620$  ). En la tabla 24 se reflejan los valores medios de los pacientes que recidivaron y de aquellos que no lo hicieron.

**Tabla 24. Valores de VEGF en relación con la recidiva.**

| <b>Recidiva</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>VEGF [ pg / ml ]</b> |
|-----------------|-------------------|-------------------------|
| <b>No</b>       | 26                | 1324,75 ± 824,89        |
| <b>Si</b>       | 25                | 1197,10 ± 719,98        |
| <b>Total</b>    | 51                |                         |



No se halló una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones de VEGF y la progresión de enfermedad (  $p = 0,886$  ) así como tampoco entre ésta y los valores agrupados de VEGF (  $p = 0,581$  ). Los valores y frecuencias correspondientes a cada categoría se recogen en la tabla 25.

**Tabla 25. Relación entre VEGF y progresión.**

| Progresión   | Frecuencia | VEGF [ pg / ml ]      |                   |                       | Total |                    |
|--------------|------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------|--------------------|
|              |            | Concentración media * | <450 <sup>#</sup> | 450-1200 <sup>#</sup> |       | >1200 <sup>#</sup> |
| No           | 30         | 1276,74 ± 835,40      | 5                 | 12                    | 13    | 30                 |
| Si           | 21         | 1241,34 ± 685,77      | 2                 | 7                     | 12    | 21                 |
| <b>Total</b> | 51         |                       |                   |                       |       | 51                 |

\*  $p = 0.886$  #  $p = 0,581$

En los pacientes del grupo de estudio no se observó una correlación significativa entre las concentraciones de VEGF y el intervalo libre de enfermedad (  $p = 0,688$  ). Tampoco existió una relación estadísticamente significativa entre el intervalo libre de enfermedad y las tasas agrupadas de VEGF (  $p = 0,815$  ).

No se encontró una relación significativa entre las concentraciones de VEGF y la mortalidad (  $p = 0,688$  ). En la tabla 26 se reflejan los valores correspondientes a cada categoría.

**Tabla 26. Valores de VEGF en relación con la mortalidad.**

| Exitus           | Frecuencia | VEGF [ pg / ml ]         |                   |                       | Total |                    |
|------------------|------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|-------|--------------------|
|                  |            | Concentraciones medias * | <450 <sup>#</sup> | 450-1200 <sup>#</sup> |       | >1200 <sup>#</sup> |
| No               | 36         | 1263,42 ± 803,07         | 5                 | 15                    | 16    | 36                 |
| Si, otras causas | 2          | 1704,50 ± 77,08          | 0                 | 0                     | 2     | 2                  |
| Si, cáncer       | 13         | 1190,68 ± 742,99         | 2                 | 4                     | 7     | 13                 |
| <b>Total</b>     | 51         |                          |                   |                       |       | 51                 |

\*  $p = 0,688$  #  $p = 0,617$

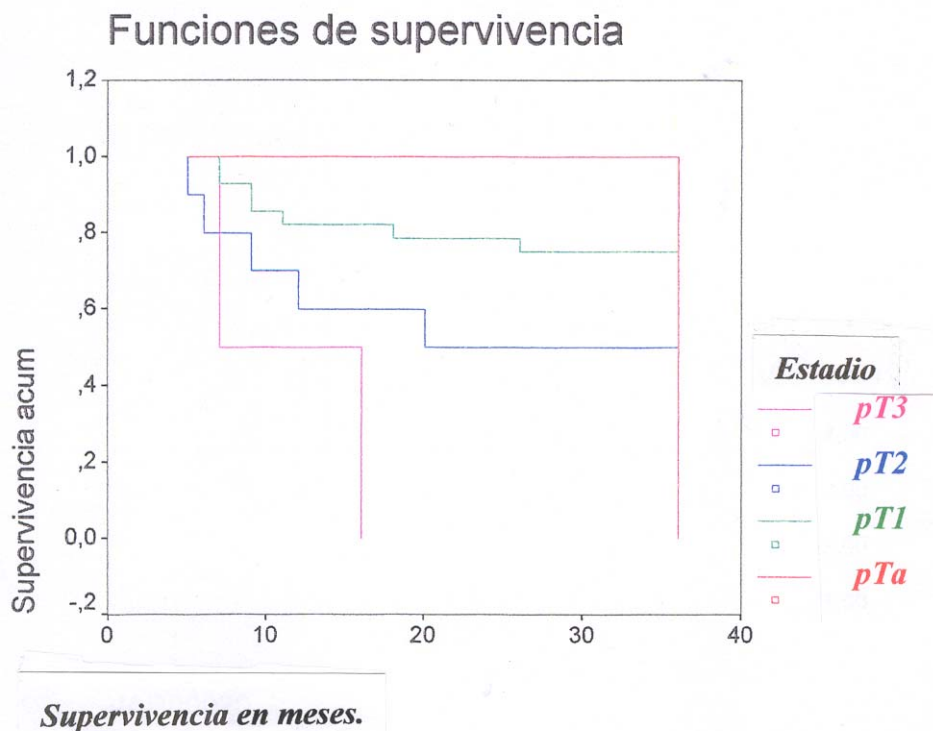
No se ha determinado la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de VEGF y la supervivencia, medida en meses (  $p = 0,989$  ), así como tampoco se apreció una relación estadísticamente significativa entre ésta y los valores agrupados de VEGF (  $p = 0,379$  ).

## IV.2.2 Estudio de la supervivencia.

A continuación se reflejan las curvas de supervivencia para estadio, grado y concentraciones de VEGF .

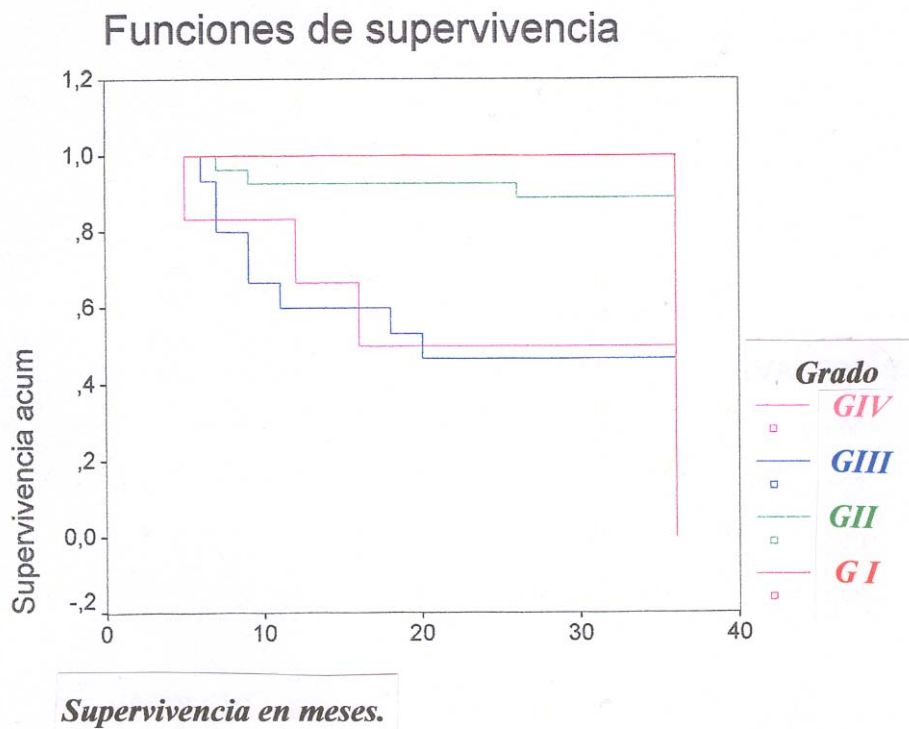
### Estadio:

#### Gráfico 1.



Log Rank  $p < 0,0015$ .

En el gráfico 1 puede apreciarse como existen diferencias significativas ( $p < 0.0015$ ) en la supervivencia en función del estadio. La mayor supervivencia se aprecia entre los pacientes con tumores pTa y la menor entre los pacientes con tumores en estadio pT<sub>3</sub>.

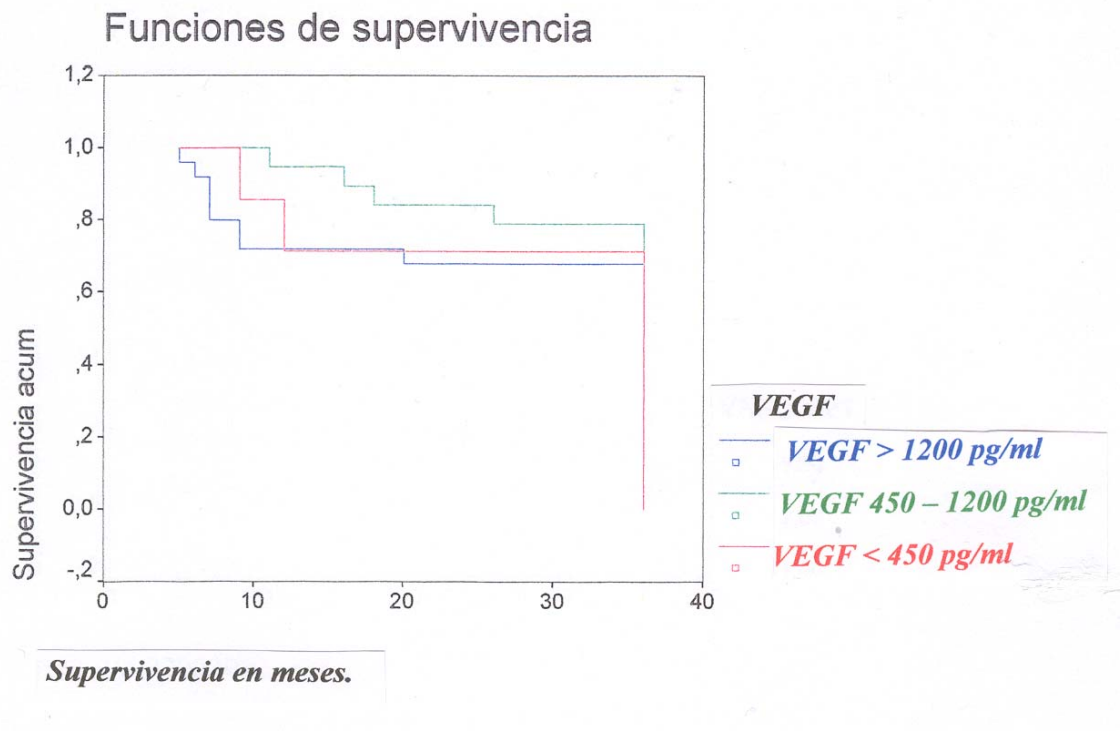
**Grado:****Gráfico 2.**

Log Rank  $p < 0,007$

En el gráfico 2 se aprecian las curvas de supervivencia en función del grado citológico, pudiendo distinguir que existen diferencias significativas ( $p < 0,007$ ) entre las distintas categorías. La supervivencia es significativamente mayor entre los pacientes con tumores de grado I y II que la existente entre los pacientes con grados III y IV.

**VEGF:**

**Gráfico 3.**



Log Rank  $p = 0.516$

En el gráfico 3 puede apreciarse como no existen diferencias significativas en la supervivencia en función de los diferentes niveles de VEGF.

## **V. DISCUSSION**

En la actualidad, los mejores factores de predicción de la evolución de una neoplasia vesical son el estadio y el grado histopatológicos y ciertas características clínicas del tumor como son la multiplicidad, el antecedente de recurrencia y la recidiva tras una terapia intravesical previa.

Estos factores, cuando son considerados en conjunto aportan una orientación bastante aproximada acerca de la evolución más probable que presentará un paciente concreto.

No obstante existen variaciones individuales, que pueden afectar al curso de la enfermedad, y que unidas a las limitaciones de las pruebas diagnósticas no invasivas disponibles en la actualidad convierten a las neoplasias vesicales en una enfermedad oncológica heterogénea, que precisa de una vigilancia estrecha, para evitar su progresión, con pruebas invasivas de morbilidad no desdeñable como la cistoscopia.

Así para mejorar la vigilancia y poder definir mejor que tumores deben ser tratados de forma más intensa precozmente es necesario disponer de factores pronósticos adicionales; es por ello que el desarrollo de otras pruebas diagnósticas y pronósticas sencillas tiene un valor incalculable.

Creemos que la investigación relativa a la angiogénesis tumoral y de los factores de crecimiento celular relacionados con ella puede aportar nuevos elementos de juicio que ayuden a mejorar el seguimiento, pronóstico y tratamiento de los pacientes con tumores vesicales.

En el presente trabajo hemos determinado las concentraciones séricas de VEGF en una serie de tumores vesicales primarios, así como en un grupo de pacientes no oncológicos, y hemos investigado su relación con factores pronósticos reconocidos, realizando un estudio retrospectivo de los tres primeros años de evolución para intentar averiguar si las concentraciones séricas de esta glicoproteína, en el momento del diagnóstico, pueden aportar información pronóstica adicional.

Ambos grupos son de edad similar, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, haciéndolos comparables.

Se ha comprobado que las tasas séricas de VEGF no muestran relación con la edad siendo independientes de ésta.

En la literatura actual se describe que las concentraciones séricas de VEGF son independientes del sexo.<sup>124,125</sup> La escasa muestra de pacientes de sexo femenino en nuestra serie no nos ha permitido realizar un estudio al respecto.

Encontramos concentraciones séricas de VEGF diferentes en ambos grupos (grupo de tumores vesicales y grupo control). La concentración sérica de VEGF fue significativamente mayor con  $p < 0,001$  en el grupo de pacientes diagnosticados de tumor vesical.

Las concentraciones séricas de VEGF en pacientes diagnosticados de neoformaciones vesicales varían considerablemente en los tres estudios publicados hasta la fecha. Edgren et al determinaron una concentración media de VEGF en pacientes con neoplasia vesical de  $387,9 \pm 277,9$  pg / ml.<sup>123</sup>

Bernardini y colaboradores determinaron una media de  $194 \pm 116$  pg / ml en pacientes con enfermedad organoconfinada y de  $582 \pm 182$  pg / ml en pacientes con enfermedad metastásica.<sup>125</sup>

Por último Miyake et al determinaron concentraciones de VEGF que oscilaron entre  $49 \pm 27$  pg / ml en los pacientes con tumores superficiales y  $51 \pm 35$  pg / ml en pacientes con tumores infiltrantes.<sup>124</sup>

En la serie que hemos estudiado hemos determinado una concentración media de VEGF de  $1285,9 \pm 781,6$  pg / ml.

Los cuatro estudios (incluyendo el presente ) han utilizado una técnica de ELISA para la determinación de VEGF del mismo fabricante por lo que las diferencias apreciadas sólo pueden atribuirse a una falta de estandarización de la fase preanalítica.

Edgren et al calificaron los valores de VEGF obtenidos de pacientes con neoplasias vesicales de su serie como “ normales”, sin embargo no describe su grupo control realizando una comparación de los niveles de VEGF en tumores vesicales, prostáticos y renales.

Los otros estudios realizados (incluyendo el presente) encuentran diferencias significativas respecto al grupo control sugiriendo así que VEGF juegue un papel en la biología del tumor vesical.



En el presente estudio no hemos encontrado una relación significativa con el estadio apreciando únicamente una tendencia de los pacientes con tumores superficiales a tener concentraciones séricas de VEGF superiores al resto sin resultar ser éstas estadísticamente significativas.

Este hecho también está controvertido en la literatura actual. Bernardini y colaboradores encuentran en su serie una asociación estadísticamente significativa con el estadio apreciando tasas de VEGF superiores en pacientes con tumores infiltrantes o con enfermedad metastásica, sin embargo Miyake et al no la aprecian, existiendo en su estudio concentraciones séricas de VEGF muy similares en pacientes con tumores superficiales y en enfermos con neoplasias infiltrantes.

Tampoco hemos apreciado una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas de VEGF y grado citológico, hallazgos en la citología urinaria o la presencia de multicentricidad tumoral. En el estudio llevado a cabo por Miyake y colaboradores tampoco la aprecian, sin embargo Bernardini et al no contemplan la citología urinaria en su estudio, y si que observan una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones séricas de VEGF y el grado citológico de los tumores, pero no encontraron una relación significativa entre VEGF y multicentricidad tumoral.

En el presente estudio no hemos apreciado una relación significativa entre los niveles de VEGF y el número de recidivas o el intervalo libre de enfermedad, así como tampoco con la progresión tumoral. Bernardini no aprecia una relación significativa de las concentraciones de VEGF con la recidiva tumoral en su grupo de tumores superficiales, pero si que observa que las concentraciones de VEGF fueron más elevadas en el subgrupo de pacientes con estadio T<sub>1</sub> que experimentó progresión. Miyake por el contrario si aprecia una relación significativa entre los niveles de VEGF y la tasa de recidivas en pacientes con tumores superficiales, pero no en los pacientes con tumores infiltrantes (en su estudio Miyake considera recidiva tanto a la recidiva en el tracto urinario como a la aparición de metástasis), y entre los niveles de VEGF y de progresión siendo éstas más elevadas en aquellos pacientes que tenían concentraciones de VEGF más elevadas.

En el presente estudio hemos apreciado la existencia de una relación estadísticamente significativa entre supervivencia e indicadores pronósticos reconocidos como son el estadio tumoral y el grado citológico siendo ésta menor cuanto mayores fueron los últimos, es decir la supervivencia fue mayor en tumores superficiales y de bajo grado. Por el contrario no hemos podido establecer la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la supervivencia y las concentraciones séricas de VEGF.

## **VI. CONCLUSIONES**

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos establecer las siguientes conclusiones:

1-Los pacientes con carcinoma transicional vesical presentan unas concentraciones séricas de VEGF elevadas en relación a las existentes en la población no oncológica.

2- No se han apreciado relaciones significativas de las concentraciones séricas de VEGF con indicadores pronósticos reconocidos del carcinoma transicional vesical.

3- Las concentraciones séricas de VEGF no aportan información pronóstica en el carcinoma transicional vesical.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

1. Eyre J.H. Cancer Statistics. CA Cancer J. Clin.2001 ; 51: 15- 37.
2. Instituto Nacional de Estadística. Base de datos INEbase.<http://www.ine.es/inebase>
3. Kiemeny LA, Witjes JA, Verbeek AL, Heijbroek RP, Debruyne FM. The clinical epidemiology of superficial bladder cancer: Dutch South East Cooperative urological group.Br J Cancer.1993; 67 (4):806-812.
4. Rubben H, Lutzeyer W, Fische N. The pathology of human bladder cancer. Cancer 1980;45:1823-1830.
5. Lee R., Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. En: Loughlin KR, eds. Superficial bladder cancer. New strategies in diagnosis and management. Urologic Clinics of North America. W.B. Saunders Company 2000; 1: 1-13.
6. Messing EM, Young TB, Hunt VB, Gilchrist KW, Newton MA, Bram LL, Hisgen WJ, Greenberg EB, Kuglitsch ME, Wegenke JD. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. Urology 1995; 45(3): 387-396.
7. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK and the Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of urothelial (Transitional Cell) neoplasms of the urinary bladder. American Journal of Surgical Pathology 1998; 22(12): 1435-1448.
8. Farrow GM, Utz DC, Rife CC, Greene LF. Clinical observations on sixty nine cases of in situ carcinoma of the urinary bladder. Cancer Research 1977; 37 (8 Pt 2):2794-2798.
9. Abel PD, Hall RR, Williams G. Should T1 transitional cancer of the bladder still be classified as superficial? Br J Urol.1988;62(3):235-239.

10. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 1993; 342(8869):469-471.

11. Spruck CH 3<sup>rd</sup>, Ohnseit PF, Gozalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang AS, Cote R. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; 54 (3):784-788.

12. Orlow I, Lianes P, Lacombe L, Dalbagni G, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res.* 1994; 54 (11):2848-2851.

13. Nouri AM, Darakhshan F, Cannell H, Paris AM, Oliver RT. The relevance of p53 mutations in urologic malignancies: possible implication for bladder cancer. *Br J Urol* 1996; 78(3):337-344.

14. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang ZF, Schultz PK, Cordon-Cardo C, Scher HI. The prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 1995; 13(6):1384-1390.

15. Buckholm Ik, Nesland JM, Karesen R, Jacobsen U, Borresen AL. Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas. *J Pathol* 1997; 181(2):140-145.

16. Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Expression of p21 (waf1/cip1) protein in transitional cell bladder tumors and its prognostic value. *Eur Urol* 1998; 34(3):237-243.

17. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-767.

18. Folkman J. The intestine as an organ culture. En: Burdette WJ, ed. *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*. Springfield IL, Charles C Thomas 1970; 113-127.

19. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumour behaviour in isolated perfused organs : in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg* 1966;164(3): 491-502.
20. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-1186.
21. Folkman J, Long DM, Becker FF. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 1963;16:453-458.
22. Gimbrone MA Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974;52 (2):413-427.
23. Gimbrone Ma Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136(2): 261-276.
24. Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res* 1976; 36(8):2807-2812.
25. Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974;34(8): 2109-2113.
26. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J. Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. *Br J Cancer*.1977;35(3): 347-356.
27. Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, Mc Intosh LC, Simpson JG. Tumors acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol* 1987;151(4):323-332.
28. Skinner SA, Tutton PJ, O' Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res* 1990; 50(8):2411-2417.



29. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990; 348(6301): 555- 557.
30. Folkman J. Tumor angiogenesis. En Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The Molecular basis of cancer*. W.B. Saunders Company 1995 ; 206-232.
31. Gross JL, Herblin WF, Dusak BA, Czerniak P, Diamond MD, Sun T, Eidsvoog K, Dexter DL, Yayan A. Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(2):121-131.
32. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, Kozai Y. Supression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblastic growth factor. *Cancer Res* 1991;51(22):6180-6184.
33. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor- induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362 (6423):841-844.
34. Bochner HB, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. Angiogenesis in bladder cancer: relation ship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(21):1603-1612.
35. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas.*Br J Urol* 1994;74(6):762-766.
36. Philp EA, Stephenson TJ, Reed NWR. Prognostic significance of angiogenesis in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder.*Br J Urol* 1996;77:352-357.
37. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldmann FM, Carroll PR. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995;154(1):69-71.

38. Netland PA, Zetter BR. Organ – specific adhesion of metastatic tumor cells in vitro. *Science* 1984;224(4653):1113-1115.
39. Nicolson GL .Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev* 1988;7(2):143-188.
40. Boxberger HJ, Paweletz N, Spiess E, Kriehuber R. An in vitro model study of BSp 73 rat tumor cell invasion into endothelial monolayer. *Anticancer Res* 1989; 9(6):1777-1786.
41. Weidner N, Sample JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 324(1):1-8.
42. Weinstat-Saslow D, Stegg PS. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: Basic and applied advances. *FASEB J* 1994;8(6): 401-407.
43. Folkman J. Tumor Angiogenesis. En Holland JF, Frei E, Bast RC, eds. *Cancer Medicine*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, Lea & Febiger 1993;153-170.
44. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, Goovaerts G, Dirix LY, Van Marck E. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol* 2001;195 (3):336-342.
45. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*.1997;151(5):1417-1423.
46. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18(38):5356-62.

47. Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak H. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor Biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993;12: 303-324.
48. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143:1255-1262.
49. Mattern J, Koomagi R, Voom M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73:931-934.
50. Hashimoto M, Oshawa M, Ohnishi A, Naka N, Hirota S, Kitamura Y, Aozasa K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab Invest* 1995;73(6): 859-863.
51. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth is a potential tumour angiogenesis factor in vivo. *Nature*. 1992;359:845-847.
52. Philips HS, Armanini M, Stavrou D, Ferrara N, Westphal M. Intense focal expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human intracranial neoplasms: association with regions of necrosis. *Int J Oncol* 1993;2: 913-919.
53. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH. Expression of the vascular permeability /vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993;91(1): 153-159.
54. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiapetta G, Botti G. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11(8):1569-1579.

55. Olson TA, Mohanraj D, Carso LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994;54:276-280.
56. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(16): 1237-1245.
57. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Conolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Human Pathol* 1995; 26(1): 86-91.
58. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993;53(19): 4727-4735.
59. Fava RA, Olsen NJ, Spencer –Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor / endothelial growth factor (VPF/ VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994; 180 (1):341-346.
60. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, Van De Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176 (5): 1375-1379.
61. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR, Dvorak HF, Rosen S. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int* 1992;42 (6):1457-1461.
62. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993; 264 (4 Pt1):995-1002.

63. Ferrara N, Winer J, Burton T. Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 1991; 5(2):141-148.
64. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993; 91(5): 2235-2243.
65. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Res Commun* 1989; 161:851-859.
66. Ploüet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells. *EMBO J* 1989;8:3801-3807.
67. Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, Montesano R. In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res* 1994;210:298-305.
68. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *European Journal of Cancer* 1996;32A:2413-2422.
69. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
70. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380(6573):435-439.
71. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380(6573):439-442.

72. Aiello LP, Avery R, Arrigg R, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Eng J Med* 1994;331(22):1480-1487.
73. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:557-562.
74. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270(17):9709-9716.
75. Dvorak HF. Tumours: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing. *N Eng J Med* 1986;315:1650-1658.
76. Roberts WG, Palade G. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-2379.
77. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* 1993;265(2 Pt 2):H586-592.
78. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of VEGF on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27(6): 838-844.
79. Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266(18): 11947-11954.

80. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814.
81. Vincenti V, Casano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-1495.
82. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Conolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to platelet derived growth factor. *Science* 1989; 246: 1309-1312.
83. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-26037.
84. Park JE, Keller G-A, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms. Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM – bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4: 1317-1326.
85. Rifkin DB, Moscatelli D, Bizik J, Quarto N, Blei F, Dennis P, Flaumenhaft R, Mignatti P. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ Devel* 1990; 32(3):313-318.
86. Keyt B, Berleau L, Nguyen H, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl terminal domain (111-165) of VEGF is critical for mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996;271(13): 7788-7795.
87. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF–receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function* 2001;26: 25-35.
88. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck KA, Ferrara N, Williams LT. The fms tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.

89. Terman BI, Vermazen MD, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187 (3):1579-1586.
90. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the *fms* family. *Oncogene* 1990;5(4):519-524.
91. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9026-9030.
92. Quinn T, Peters KG, deVries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7533-7537.
93. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risu W, Ullrich A. High affinity binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72(6): 835-846.
94. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor: VEGF-E (NZ-7 VEGF) preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin binding domain. *J Biol Chem.*1998;273:31273-31282.
95. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukura D, Jain RK, Alitalo K. Hiperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276: 1423-1425.
96. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a



ligand for the Flt-4( VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. EMBO J 1996;15:290-298.

97. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial growth factor by an endogenously encoded soluble receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:10705-10709.

98. Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Ferrara N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. EMBO J 1996;15:4919-4927.

99. Guo D, Jia Q, Song HY, Warren S, Donner DB. Vascular endothelial growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contains SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. J Biol Chem 1995;270:6729-6733.

100. Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. Oncogene 1995; 10 (1): 135-147.

101. Keyt BA, Nguyen H, Berleau L, Duarte C, Park J, Chen H, Ferrara N. Identification of VEGF determinants for binding Flt-1 and KDR receptors. Generation of receptor selective VEGF variants by site directed mutagenesis. J Biol Chem 1996;271: 5638-5646.

102. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cells. Cancer Res 1992;52(20): 5738-5743.

103. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia initiated angiogenesis. Nature 1992; 359: 843-845.

104. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* 1995;1(2): 182-193.
105. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and FGFb expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; 90: 649-642.
106. Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994;269: 4355-4361.
107. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995;270: 12607-12613.
108. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor  $\beta$  in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269(9): 6271-6274.
109. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, EndegeWO, Zhou F, Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270 (1): 308- 312.
110. Ben-Av P, Crofford Lj, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin -1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 1995;372:83-87.
111. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-741.

112. Kieser A, Weich H, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994;9:963-969.
113. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Mutant *ras* oncogenes upregulate VEGF/VPF expression : implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55(20):4575-4580.
114. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995;270:25915-25919.
115. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995;55:6161-6165.
116. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T . Expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(13):3004-3009.
117. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrinol Rev* 1992;13:18-32.
118. Toi M, Hoshima S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994;85: 1045-1049.
119. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77(5): 858-863.

120. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1995;55:510-513.
121. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57:5281-5285.
122. Crew JP, O'Brien, Bicknell R, Fuggle S, Cranston D, Harris AL, Loening SA. Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *J Urol* 1999;161(3) 799-804.
123. Edgren M, Lennernäs B, Larsson A, Nilsson S. Serum concentrations of VEGF and b-FGF in renal cell, prostate and urinary bladder carcinomas. *Anticancer Res* 1999;19: 869-874.
124. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S. Elevation of serum level of vascular endothelial growth factor as a new predictor of recurrence and disease progression in patients with superficial urothelial cancer. *Urology* 1999; 53(2):302-307.
125. Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, Henry PC, Adessi G, Bittard H. Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol* 2001;166(4):1275-1279.
126. Yamamoto Y, ToiKondo S, et al. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996;2:821-826.
127. Salven P, Mäenpää H, Orpana A, Alitalo K, Joensuu H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:647-651.
128. Fujisaki K, Mitsuyama K, Toyonaga A, MatsuoK, Tanikawa K. Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1998; 43: 41-45.

129. Heer K, Kumar H, Speirs V, Greenman J, Drew PJ, Fox JN, Carleton PJ, Monson JR, Kerin MJ. Vascular endothelial growth factor in premenopausal women – indicator of the best time for breast cancer surgery? *Br J Cancer* 1998;78(9): 1203-1207.

130. Hyodo I, Doi T, Endo H, Hosokawa Y, Nishikawa Y, Tanimizu M, Jinno K, Kotani Y. Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* 1998;34(13):2041-2045.

131. Kumar H, Heer K, Lee PW, Duthie GS, Mac Donald AW, Greenman J, Kerin MJ, Monson JR. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4(5):1279-1285.

132. Obermair A, Tempfer C, Hefler L, Preyer O, Kaider A, Zeillinger R, Leodolter S, Kainz C. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with suspected ovarian cancer. *Br J Cancer* 1998;77(11):1870-1874.

133. Salven P, Routsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer (Predict Oncol)* 1998;79: 144-146.

134. Balsari A, Maier JAM, Colnaghi MI, Ménard S. Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. *Lab Invest* 1999;79:897-902.

135. Gaducci A, Ferdeghini M, Fanucchi A, Annicchiarico C, Ciampi B, Frontera C, Genazzani AR. Serum preoperative vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian cancer: relationship with prognostic variables and clinical outcome. *Anticancer Res* 1999; 19(2B): 1401-1405.

136. Graeven U, Andre N, Achilles E, Zornig C, Schmiegel W. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999;125:577-581.

137. Hefler L, Tempfer C, Obermair A, Frischmuth K, Sliutz G, Reinthaller A, Leodolter S, Kainz C. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in vulvar cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2806-2809.
138. Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, Unger C, Marme D, Gastl G. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and non-malignant disease. *Cancer* 1999;85(1):178-187.
139. Oehler MK, Caffier H. Diagnostic value of serum VEGF in women with ovarian tumors. *Anticancer Res* 1999;19: 2519- 2522.
140. Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, Weytjens R, Huget P, Van Marck E, Dirix LY. Platelet number and interleukin 6 correlate with VEGF but not with b-FGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer* 1999;80:892-897.
141. Salven P, Perhoniemi V, Tykkä H, Mäenpää H, Joensuu H. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:161-166.
142. Sato K, Tsuchiya N, Sasaki R, Shimoda N, Satoh S, Ogawa O, Kato T. Increased serum levels in of vascular endothelial growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(8):874-879.
143. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, Mac Lennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R, Walker JJ, Cairnduff F, Selby PJ, Perren TJ, Lansdown M, Banks RE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res* 2000; 60(11):2898-2905.
144. Tung-Ping Poon R, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19:1207-1225.

145. Dirix LY, Vermeulen PB, Benoy I, Martin M, Van Oosterom AT. Serum basic fibroblastic growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; 7:843-848.
146. Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinsky A, Prove A, Benoy I, De Pooter C, Martin M, Van Oosterom AT. Elevated levels of the angiogenic cytokines bFGF and VEGF in sera of cancer patients. *Br J Cancer* 1997;76:238-243.
147. Takano S, Yoshii, Kondo S, Suzuki H, Maruno T, Shirai S, Nose T. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res* 1996;56(9):2185-2190.
148. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JAM, de Waal RMW, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second International consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* 2002;38: 1564-1579.
149. Verheul HMW, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor: *Clin Cancer Res* 1997;3(12 Pt1):2187-2190.
150. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets : significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77(6):956-964.
151. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In Vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 2): H1054-H1061.
152. Webb NJA, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PEC. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurements of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci* 1998;94: 395-404.

153. Salven P, Orpana A, Heikki JH. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999;5:487-491.
154. Wynendaele W, Derua R, Hoylaerts MF, Pawinski A, Waelkens E, de Bruijn EA, Paridaens R, Merlevede W, van Oosterom AT. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol* 1999;10(8):965-971.
155. Gunsilius E, Petzer A, Stockhammer G, Nussbaumer W, Schumacher P, Clausen J, Gastl G. Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology* 2000;58(2):169-174.
156. Salgado R, Vermeulen P, Bogers, Dirix L, Van Merck E. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001;4: 37-44.
157. Dittadi R, Meo S, Fabris F, Gasparini G, Contri D, Medici M, Gion M. Validation of blood collection procedures for the determination of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) in different blood compartments. *Int J Biol Markers* 2001;16(2):87-96.
158. Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor proteins. Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth factors* 1992;7:53-64.
159. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillet NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastases. *J Clin Invest* 1995;95: 1789-1797.
160. Millauer B, Schawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth is inhibited in vivo by a negative dominant Flk-1 mutant. *Nature* 1994;367:576-579.



161. Millauer B, Longhi MP, Plate PH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A. Dominant negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res* 1996;56:1615-1620.

162. Witges JA, Kiemey LA, Oosterhof GO, Debruyne FM. Prognostic factors in superficial bladder cancer: a review. *Eur Urol.* 1992;21(2): 89-97.

163. UICC. TNM of bladder cancer. En Sobin LH y Wittekind TNM of malignant tumors 5<sup>th</sup> Ed. Wiley -Liss. New York. 1997:187-190.

164. Ash JE. Epithelial tumor of the bladder. *J Urol* 1940; 44:135-145.

165. Pavone-Macaluso M, Caramia M, Pavone C. Tumores vesicales: manifestaciones clínicas. En: Vicente J, Chéchile G, Salvador J, eds. *Tumores vesicales superficiales.* Accion Médica S.A. 2000; 63-65.