

ESTUDIO MOLECULAR Y CITOGENÉTICO DEL  
CARCINOMA UROTELIAL:  
DETECCIÓN TEMPRANA DE LA ENFERMEDAD  
Y DE SU DISEMINACIÓN

**Memoria presentada por**  
Mercedes Marín Aguilera  
**Para optar al título de**  
Doctora en Biología

**Tesis realizada bajo la dirección de**  
Dr. Antonio Alcaraz Asensio  
Dra. Lourdes Mengual Brichs  
**Tutor:** Dr. Cristóbal Mezquita Pla



Departamento de Ciencias Fisiológicas I  
Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona

Programa de doctorado:  
Biología Celular  
Bienio 2003-2005

Barcelona, 2008



*A mis padres,*

*A Eva,*

*A Maricar,*



---

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS .....</b>	<b>V</b>
<b>PRESENTACIÓN .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 El tracto urinario.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 El carcinoma urotelial.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Epidemiología .....	4
1.2.2 Factores de riesgo .....	5
1.2.3 Tipos y clasificación .....	6
1.2.3.1 Según patrón de crecimiento.....	6
1.2.3.2 Según histología .....	7
1.2.4 Diseminación tumoral.....	11
1.2.4.1 Diseminación tumoral linfática .....	14
1.2.4.2 Diseminación tumoral sanguínea.....	15
1.2.4.3 Diseminación tumoral linfática vs. sanguínea.....	16
1.2.4.4 Significado clínico de la micrometástasis .....	16
1.2.5 Diagnóstico y estadiaje .....	18
1.2.5.1 Citología urinaria.....	18
1.2.5.2 Técnicas endoscópicas.....	20
1.2.5.3 Técnicas de radiodiagnóstico .....	21
1.2.5.4 Biopsia múltiple normalizada .....	23
1.2.5.5 Técnicas histopatológicas.....	24
1.2.6 Tratamiento .....	24
1.2.6.1 Tratamiento de la enfermedad no músculo-infiltrante.....	25
1.2.6.2 Tratamiento de la enfermedad músculo-infiltrante.....	29
1.2.6.3 Tratamiento de la enfermedad metastásica.....	32
1.2.7 Pronóstico .....	33
1.2.8 Asociación del carcinoma urotelial en el tracto urinario superior con el carcinoma urotelial vesical .....	36

1.2.9	Genética y biología molecular .....	37
1.2.9.1	Citogenética del CU .....	37
1.2.9.2	Biología molecular del CU .....	38
1.2.9.3	Vías moleculares de progresión del CU .....	42
1.2.10	Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico y estadiaje del CU .....	43
1.2.10.1	Técnicas basadas en ácidos nucleicos: DNA y RNA.....	44
1.2.10.2	Técnicas basadas en proteína.....	60
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1</b>	<b>Hibridación <i>in situ</i> fluorescente.....</b>	<b>71</b>
3.1.1	Muestras .....	71
3.1.2	Soluciones de trabajo.....	71
3.1.3	Protocolo .....	73
3.1.3.1	Pre-hibridación.....	73
3.1.3.2	Hibridación .....	74
3.1.3.3	Post-hibridación .....	75
3.1.4	Criterio de valoración .....	76
<b>3.2</b>	<b>Análisis de la expresión génica .....</b>	<b>78</b>
3.2.1	Soluciones de trabajo.....	78
3.2.2	Extracción de RNA total .....	79
3.2.2.1	A partir de tejido ganglionar linfático.....	79
3.2.2.2	A partir de células monomorfonucleares de sangre periférica.....	83
3.2.3	Cuantificación y calidad del RNA .....	84
3.2.3.1	Cálculo de la concentración del RNA .....	84
3.2.3.2	Valoración de la calidad del RNA .....	85
3.2.4	Transcripción reversa.....	86
3.2.5	Preamplificación de cDNA .....	88
3.2.6	PCR cuantitativa a tiempo real.....	90
3.2.7	Sensibilidad en la detección de marcadores en sangre periférica.....	92
3.2.7.1	Disgregación del tejido tumoral.....	92
3.2.7.2	Recuento celular .....	93

---

3.2.7.3	Dispensación celular.....	95
3.2.7.4	Cálculo de la sensibilidad .....	96
3.2.8	Selección de genes marcadores.....	97
3.2.8.1	Análisis de microarrays.....	97
3.2.8.2	Búsqueda bibliográfica.....	97
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>99</b>
4.1	<b>TRABAJO 1: utilidad de la hibridación <i>in situ</i> fluorescente en la detección del carcinoma urotelial no músculo-infiltrante .....</b>	<b>101</b>
4.2	<b>TRABAJO 2: utilidad de la hibridación <i>in situ</i> fluorescente en el diagnóstico no invasivo del carcinoma urotelial en el tracto urinario superior ... ..</b>	<b>111</b>
4.3	<b>TRABAJO 3: utilidad clínica de la hibridación <i>in situ</i> fluorescente en el seguimiento de los pacientes con carcinoma urotelial tratados con la terapia del Bacilo de Calmette-Guérin .....</b>	<b>123</b>
4.4	<b>TRABAJO 4: estadiaje molecular de la diseminación tumoral del carcinoma urotelial: impacto en la supervivencia.....</b>	<b>135</b>
4.5	<b>TRABAJO 5: marcadores moleculares de RNAm en la detección y seguimiento de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con carcinoma urotelial .....</b>	<b>149</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
5.1	<b>Utilidad de la hibridación <i>in situ</i> fluorescente en el diagnóstico temprano y en el pronóstico del carcinoma urotelial .....</b>	<b>173</b>
5.1.1	Detección del carcinoma urotelial vesical no músculo-infiltrante .....	175
5.1.2	Detección del carcinoma urotelial en el tracto urinario superior .....	177
5.1.3	Utilidad de la hibridación <i>in situ</i> fluorescente en el seguimiento de los pacientes con carcinoma urotelial tratados mediante inmunoterapia BCG.....	179

<b>5.2</b>	<b>Detección molecular temprana de la diseminación del carcinoma urotelial</b> .....	<b>184</b>
5.2.1	Detección molecular de la diseminación tumoral linfática y significado clínico .....	185
5.2.2	Detección molecular de la diseminación tumoral sanguínea y significado clínico .....	187
<b>5.3</b>	<b>Discusión general sobre la utilidad de las técnicas de citogenética y biología molecular en el diagnóstico temprano del carcinoma urotelial y de su diseminación</b> .....	<b>191</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>193</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>197</b>



Y después de cinco años y medio, la etapa de doctoranda llegó a su fin! Sin duda alguna llegar a este punto no hubiera sido posible sin la colaboración de mucha gente fenomenal que, tanto desde dentro como fuera del ámbito laboral, han puesto su granito de arena en la realización de este proyecto. Gracias a todos! Y más concretamente...

Gracias al director de esta tesis, el **Dr. Antonio Alcaraz**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación así como también por el positivismo con el que siempre ha encarado este proyecto. Gracias por tu gran profesionalidad, y por todo lo que me has enseñado.

Cómo no, mil gracias a **Lourdes**, la mejor codirectora de tesis que he podido tener. Gracias por convertirme un poquito más en científica, por todos tus sabios consejos tanto en lo laboral como en lo personal, por la confianza que has depositado en mí desde el primer día... También por tantas risas inolvidables en congresos varios (Canadá, París, Milán..., noches de Milán...jeje). Ha sido genial compartir estos años contigo!

Me gustaría agradecer también a **M<sup>a</sup>José Ribal**, porque ha sido una suerte contar contigo todo este tiempo, tanto por tu visión crítica como por tu apoyo constante, mil gracias de verdad!

Gracias por supuesto a la **Dra. Rosa Miró** y al **Dr. Cristóbal Mezquita** por su labor como tutores durante estos años.

En parte, el inicio de esta "aventura científica" se la debo al **Dr. Enric Espel**, del departamento de Fisiología e Inmunología de la Universidad de Barcelona. Mil gracias Enric por tu comprensión, tus enseñanzas y tus consejos, esos que todavía a día de hoy me son de gran ayuda. Gracias también a **Irene Puga**, porque nunca olvidaré lo genial que fue aprender contigo a dar mis primeros pasos en un laboratorio!

Ahora sí, dicha "aventura" se inició en la Fundació Puigvert, en un laboratorio recién nacido bautizado como *labexp*. De allí, tengo que agradecer sinceramente a **Elisabet**, tanto su participación en el proyecto como los buenos momentos compartidos con ella durante estos años. He aprendido muchísimo trabajando a tu lado! También mil gracias a **Cris** (más formalmente Dra. Crisesteva, jeje), por alegrarme el día a día, escucharme, enseñarme, abrirme las puertas de tu casa y tratarme como una hermana... Cris, no tinc gràcies suficients!! Por supuesto mil gracias a **Bárbara** (mi Bar!!), por tu amistad, comprensión, paciencia, sentido del humor, generosidad ilimitada, detallismo, entusiasmo, sabiduría... tanto en la cercanía como en la distancia!!! Eres excepcional Bar y me siento súper afortunada de haberte conocido! Por cierto, lesdanzri!! Gracias también a **Esther**, la reina de la citogenética. Por tu confianza y apoyo infinito! Es todo un honor haber trabajado a tu lado y que hayamos compartido tantos buenos momentos. Ei, que me encanta como vistes ;D! Mil gracias también a **Patricia**, por hacerme estos años un poquito más "dulces" (jo Patricia, qué pasteles!!). También por tu ayuda con las muestras de sangre y porque contigo realmente los pinchazos no duelen! Gracias también a **Moisès**, por los buenos momentos compartidos, por tu contribución en el proyecto y por explicar lo inexplicable! De los primeros años en el labexp, tengo que agradecer también a **Manel**, el rey del telefonillo... vaya paciencia con las muestras eh... mil gracias! Y gracias también a **Lidia**, por echarme una mano cuando lo he necesitado. Gracias y más gracias a **Sheila** (nuestra Xeixu, sí, sí)! por la chispa que trajiste al labexp, por tu apoyo, tu energía positiva y tu cariño. Gracias de verdad! Y siguiendo con el labexp... gracias **Elena**! por tu buen humor, tu naturalidad y tu comprensión. Vaya suerte la de la Fundació en tenerte y la mía en haber compartido contigo aunque sea un año de trabajo! Eres genial! Más gracias a **Fabián**, por elegir el labexp

como lugar de trabajo durante un tiempo, por mimarnos como el que más (a nosotras y a nuestras familias), por el entusiasmo que siempre has mostrado hacia nuestro trabajo y por tu energía inagotable en las noches de baile! Gracias finalmente a las dos últimas visitantes continuas del labexp, **Arancha** e **Irene**, porque ha sido guay volver a encontrarnos en el lugar de trabajo Arancha, y coincidir contigo Irene. Gracias por vuestro apoyo chicas!

Al margen del labexp, aunque muy cercanos a él, quería agradecer al **Dr. Artur Oliver** su participación en el proyecto, a **Silvia**, **Charo** y **Elsa** por su cariño incesante a “las moléculas”, a las técnicas de extracciones por su ayuda con los pacientes (en especial a **M<sup>a</sup> Carmen Jovellanos** por atenderme siempre con una sonrisa) y a **Magda** por su paciencia.

Ya en el otro edificio de la Fundació, quería agradecer sinceramente al jefe del servicio de urología, el **Dr. Villavicencio**, así como la enriquecedora colaboración y el buen trato del **Dr. Algaba**, la **Dra. Arce** y de **Sheila**. Gracias también al personal del laboratorio de andrología, en especial a la **Dra. Ana Mata**. Gracias finalmente a aquellos residentes y adjuntos, que durante esos años en la Fundació colaboraron a que el proyecto avanzara mediante la recogida de muestras.

Un poco más allá de la Fundació, en el Hospital de Sant Pau, quería agradecer a **Alfonso Buil** por su valiosa revisión de algunos de los resultados de este trabajo.

Lo que al principio reconozco me daba un poco de pereza, pasó a ser una gran experiencia, y es el haber finalizado este proyecto en la Facultad de Medicina-Hospital Clínic de Barcelona. De la facultad de Medicina concretamente, tengo que agradecer a la **Dra. Amalia Lafuente** por permitir que nos estableciéramos en el departamento de Farmacología, así como a los vecinos de lab, **Sergi**, **Patricia** y **Santi**, por compartir seminarios, cafés, máquinas... y muchos buenos momentos!

Ya en el “urolab” de este departamento, tengo que dar mil gracias a **Cheles**, por sus palabras de aliento y sus buenos consejos, a **Cristina** por su apoyo incesante y amabilidad extrema, y como no a **Laura**, porque tiene un “espíritu blanco” que no le cabe en el pecho y una “elegancia” que quita el sentío! En serio, ha merecido la pena acabar el proyecto en la facultad sólo por haber compartido este tiempo con vosotras!

Del servicio de Urología del Hospital Clínic me gustaría dar las gracias sinceramente a **Cristina Coder** y a **Maite Dalet**, por echarme mil manos en todo y siempre con una sonrisa! Mil gracias! También me gustaría agradecer a los residentes-adjuntos del servicio, especialmente a **Mireia Musquera** por su participación en el proyecto y a **Lluís Peri** por su buen humor y por arreglar alguno de mis despistes...;D

También del Hospital Clínic, aunque de otros departamentos, me gustaría agradecer a la **Dra. Dolors Colomer**, por guiarnos tan amablemente en nuestros inicios con la qPCR, y a **José Ríos**, por ayudarnos con la estadística siempre con su toque de humor particular.

No puedo dejar de agradecer el trabajo del personal de enfermería, endoscopia, quirófano, archivos, administración... tanto de la Fundació Puigvert como del Hospital Clínic, por la parte que les toca (que no es poca) en hacer de este proyecto una realidad.

Otro apoyo crucial y constante durante estos años han sido mis amigos fuera del ámbito laboral. Por ello, gracias a los amigos de la facultad, **Chemita**, **Silvia**, **Vero**, **Laura**, **Reyes**, **Ana**, **Dani**... a los del korbal **Roos**, **Nico**... a los del inglés, **Jar**, **Rosa**, **Elvira**, **Sandra**, **Conchi**, **Raquel**... a los de la prospe, **Irene**, **Eze**, **Robert**... a los de actividades varias, **jeje**, **Ramón** y **Sergi**... Y muy especialmente quería agradecer a **Digna**, por la complicidad que nos une desde hace más de 20 años! También a **Vero**,

por su dulzura inagotable. A **Montse**, por ayudarme a no perder la “esencia”;D! A **Natalia**, por su comprensión y apoyo en todo momento. A **Gisela**, por los ratos de risas y lágrimas al volver de inglés, por alentarme y aconsejarme en relación a todo! por tu amistad. También a **Alfons**, mi vechinito de casa y de lab... por transmitirme energía positiva y ganas de continuar en este, a veces desalentador, mundo de la ciencia. Muchas gracias a **Rebeca**, por tus buenos consejos, tu saber hacer, por ser un ejemplo a seguir. A **Álex**, por tantos momentos de risas entre música, retos, pi-pa-tis... más música... “qué te voy a decir, si yo acabo de llegar...”. También por presentarme a **Alexita** y dejarme cuidar de ella! A **Isa**, por tu incesante cariño y confianza! Gracias especialmente también a **Cris** y a **Joan**, porque a vosotros os debo, no sólo el genial diseño de la portada de esta tesis, sino un sinfín de momentos inolvidables! Cómo no, mil gracias a **Maricar**, porque no me imagino vivir sin tu amistad! Me haces la vida más fácil y mucho más divertida... No tengo gracias suficientes, en serio.

Desde el otro lado del charco, quería agradecer al **Dr. Kevin C. Halling**, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de la *Mayo Clinic*, y contribuir a que esa experiencia fuera una de las mejores de mi vida. Gracias también a **Lisa M. Peterson**, por ocuparse personalmente de que mi tiempo en la Mayo fuera productivo, y gracias a **Paula**, porque fue una suerte compartir la experiencia americana a tu lado!

Quisiera agradecer también a mi familia, por estar siempre ahí! Especialmente al interés de mi tía **Carmen** y mis primos **Tomás** y **Montse**. También gracias a **Paqui**, por las mañanas de bici que siempre me han ayudado a desconectar. Gracias al interés de **Óscar** y sobre todo a mi hermanita **Eva**, porque pese a su desconocimiento en el campo, siempre ha seguido la carrera de su hermana pequeña, confiando en mí como la que más! Por supuesto gracias infinitas a mis padres, **Tomás** y **Araceli**, por mimarme y por dejarme hacer, pese a no acabar de entender lo que hago.

Finalmente me gustaría agradecer a las fuentes de financiación de este proyecto (IDIBAPS, Laboratorios Indas, Fondo de Investigaciones Sanitarias y Asociación Española de Urología), y muy especialmente a todos aquellos pacientes incluidos en este trabajo, así como a sus familias.



**ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS**

BCG	<i>Bacillus</i> de Calmette-Guérin
BMN	Biopsia múltiple normalizada
BTA	Antígeno del tumor de vejiga ( <i>bladder tumour antigen</i> )
Cels.	Células
CEP	Sonda de enumeración cromosómica ( <i>chromosome enumeration probe</i> )
cDNA	DNA copia
Cis	Carcinoma <i>in situ</i>
cm	Centímetro
C <sub>T</sub>	<i>Cycle Threshold</i>
CU	Carcinoma urotelial
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico ( <i>desoxiribonucleic acid</i> )
EDTA	Etilen-diamino-tetra-acético
EGF	Factor epidérmico de crecimiento ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	Receptor del factor epidérmico de crecimiento ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico básico
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente ( <i>fluorescent in situ hybridization</i> )
H/E	Hematoxilina-eosina
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Agua oxigenada (o peróxido de hidrógeno)
H <sub>2</sub> Od	Agua destilada
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
LOH	Pérdida de heterocigosidad ( <i>loss of heterozygosity</i> )
LSI	Sonda locus-específica ( <i>locus-specific indicator</i> )
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MHC I	<i>Major histocompatibility complex class I</i>
min	Minuto/s
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinasas de la matriz

MSP	PCR específica de metilación ( <i>methylation specific PCR</i> )
M-VAC	Metotrexato-vinblastina-doxorubicina-cisplatino
NFQ	<i>Quencher</i> no fluorescente
NK	<i>Natural killer</i>
NMP22	<i>Nuclear matrix protein-22</i>
ns	No significativo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Preamplificación
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pg	Picogramos
PUNLMP	<i>Papillary urothelial neoplasm of low malignant potencial</i>
qPCR	PCR cuantitativa ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
qRT-PCR	Transcripción reversa-PCR cuantitativa ( <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
RM	Resonancia Magnética
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAm	RNA mensajero
RT	Transcripción reversa ( <i>reverse transcription</i> )
RTU	Resección transuretral
seg	Segundo/s
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TA	Temperatura ambiente
TAC	Tomografía axial computarizada
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
TMA	<i>Microarrays</i> de tejido ( <i>tissue microarrays</i> )
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
TUS	Tracto urinario superior
U	Unidades de enzima
UIV	Urografía intravenosa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )

## PRESENTACIÓN

Esta tesis es una contribución a la mejora del diagnóstico temprano del carcinoma urotelial (CU) y de su diseminación. Parte de estudios previos en el grupo de investigación del Dr. Alcaraz, en los que se observó que estudiando el RNAm del gen marcador de urotelio *KRT20*, mediante *nested* RT-PCR, era posible identificar pacientes con metástasis linfáticas que no habían sido detectadas mediante las técnicas histológicas convencionales. En el presente trabajo se ha mejorado el método de detección utilizando la técnica PCR cuantitativa a tiempo real, y ampliando el número de marcadores estudiados, identificados gracias a la técnica de *microarrays*. Por otro lado, en esta tesis también se ha estudiado la utilidad de la técnica FISH para el diagnóstico y seguimiento del CU tanto vesical como localizado en el tracto superior mediante el kit UroVysion (Laboratorios Abbott).

Esta tesis se organiza en seis bloques principales. En primer lugar hay una *Introducción* general, donde se pretende reflejar los conceptos clínicos y biológicos básicos del CU. El siguiente apartado es *Hipótesis y objetivos*, donde se describen tanto el objetivo global como los objetivos concretos del estudio. A continuación se detalla la sección *Materiales y Métodos*, donde se explican los protocolos y la base de las técnicas utilizadas. Posteriormente se encuentra el apartado *Resultados*, donde se incluye un resumen de los resultados obtenidos así como una copia de los artículos científicos publicados. Estos resultados son discutidos en la sección *Discusión*, de manera individual y global. Finalmente, en el apartado *Conclusiones* se concretan las conclusiones obtenidas de este estudio.

Este proyecto ha sido realizado en el laboratorio de Biología Molecular de la Fundació Puigvert y en el laboratorio de Urología del Hospital Clínic de Barcelona. Las muestras utilizadas proceden de pacientes de ambos centros.





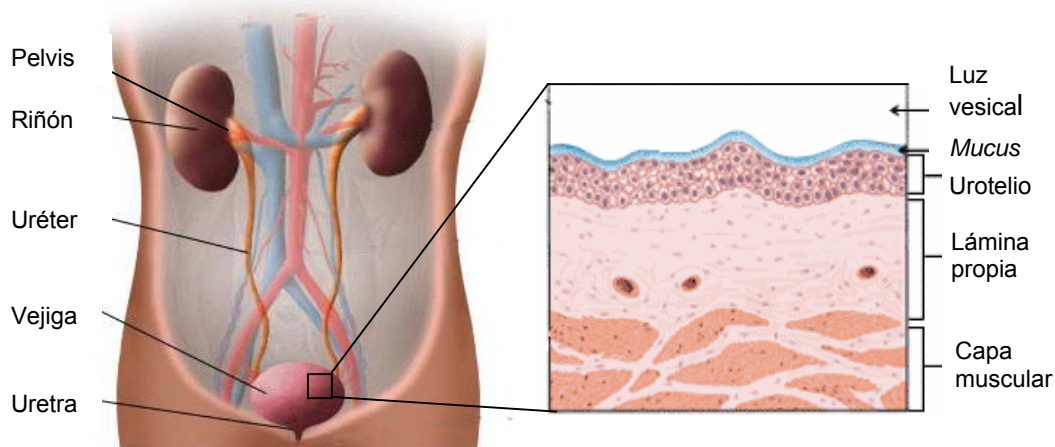
# 1 INTRODUCCIÓN

---



## 1.1 EL TRACTO URINARIO

El sistema urinario humano se compone fundamentalmente de dos partes: los órganos secretores (riñones) que se encargan de producir la orina, y el tracto urinario o vías excretoras (pelvis renales, uréteres, vejiga urinaria y uretra) que básicamente conducen y almacenan la orina para que posteriormente sea evacuada al exterior (Figura 1). De entre los componentes del tracto urinario, las pelvis renales y los uréteres constituyen el tracto urinario superior (TUS), mientras que la vejiga y la uretra forman el tracto urinario inferior.

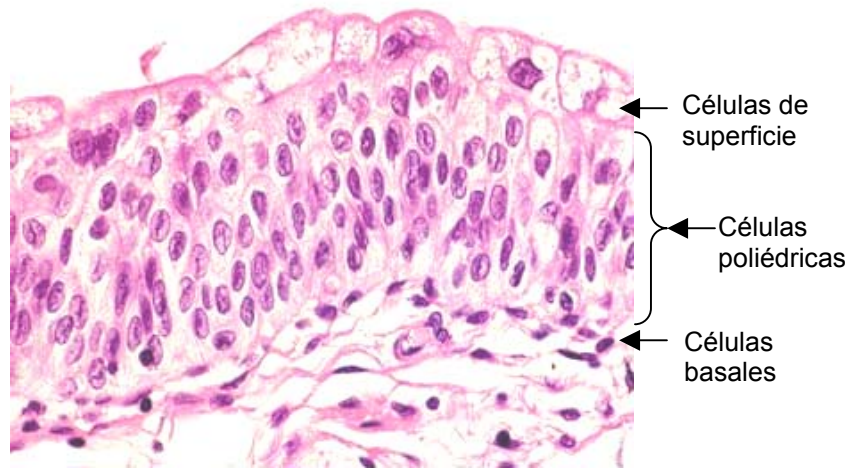


**Figura 1:** Estructura e histología del tracto urinario.

Todo el tracto urinario comparte una estructura histológica similar, la cual está compuesta básicamente por tres capas (Figura 1):

- **Urotelio o epitelio de células transicionales:** está formado habitualmente por seis capas que se agrupan en tres tipos celulares: las células basales (localizadas en la base del urotelio), las células poliédricas (situadas sobre las basales) que se organizan en un número variable de capas dependiendo de la zona del tracto urinario de la que se trate, y las células de superficie o “en paraguas” (las más superficiales) que son células aplanadas de gran tamaño (Figura 2). Además de estos tres tipos celulares, a lo largo del urotelio pueden encontrarse de manera normal nidos de Brunner y focos dispersos de metaplasia escamosa o glandular.

A excepción de una parte de la uretra, todo el tracto urinario está revestido por este epitelio especializado que es capaz de soportar el contacto con la orina, líquido de composición variable que contiene numerosas sustancias tóxicas.



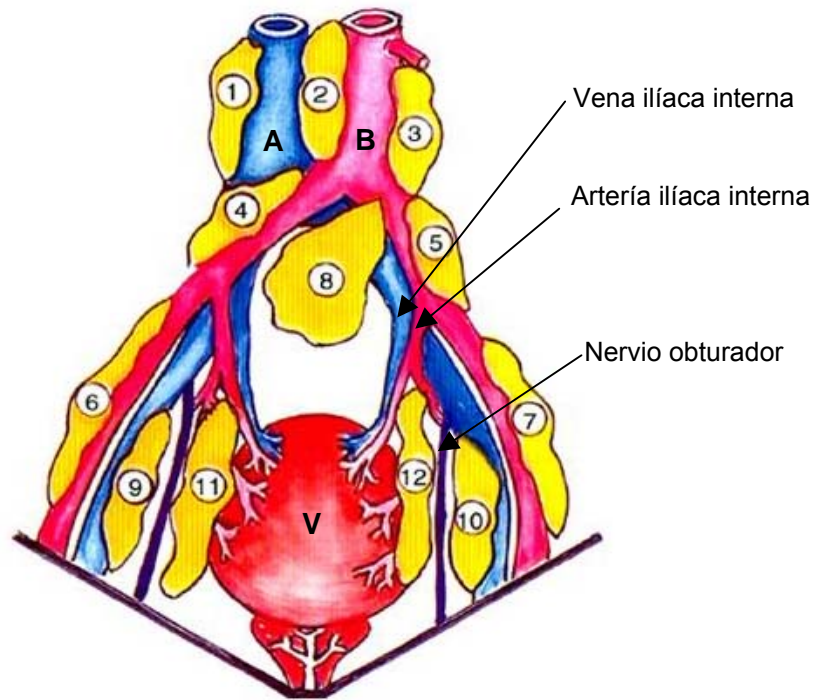
**Figura 2:** Corte histológico teñido con hematoxilina-eosina de un epitelio de células transicionales.

- **Lámina propia:** es la capa sobre la que descansa el urotelio. Consiste en una capa de tejido conectivo fibroelástico relativamente gruesa que permite una distensión considerable. Esta capa es atravesada por numerosos vasos sanguíneos y contiene fibras de músculo liso.
- **Capa muscular:** está formada por haces de músculo liso que se ramifican y entrelazan de manera laxa configurando tres capas: la longitudinal externa, la circular media y la longitudinal interna. Esta malla muscular es responsable del peristaltismo del tracto urinario y permite el vaciado de la vejiga. La estructura y composición de esta musculatura varía ligeramente a lo largo del tracto urinario así como en función del sexo.

Externa a la capa muscular se encuentra una capa de grasa perivesical.

La irrigación sanguínea de la vejiga se realiza a través de arterias originadas de la arteria ilíaca interna. Las venas que surgen de la vejiga desembocan también en la vena ilíaca interna. A nivel linfático, la mayor parte del drenaje pasa a los ganglios linfáticos ilíacos externos, aunque también existe drenaje a los ganglios obturadores, ilíacos internos y comunes (Figura 3).

Finalmente, la inervación de la vejiga corresponde tanto al sistema nervioso simpático como al parasimpático.



**Figura 3:** Irrigación sanguínea y drenaje linfático de la vejiga (Ghoneim y Abol-Enein, 2004): A) vena cava; B) arteria aorta; V) Vejiga urinaria; 1) ganglios paracavales derechos; 2) ganglios interaortocavales; 3) ganglios para-aórticos izquierdos; 4) ganglios ilíacos comunes derechos; 5) ganglios ilíacos comunes izquierdos; 6) ganglios ilíacos externos derechos; 7) ganglios ilíacos externos izquierdos; 8) ganglios presacros; 9) ganglios obturadores izquierdos; 10) ganglios obturadores derechos; 11) ganglios ilíacos internos izquierdos; 12) ganglios ilíacos internos derechos.

## 1.2 EL CARCINOMA UROTELIAL

El carcinoma urotelial (CU), también llamado carcinoma de células transicionales, es una enfermedad neoplásica que se origina en el urotelio. La interiorización en el cuerpo de carcinógenos, ya sea mediante ingesta, inhalación o absorción por la piel, hace concentrar la orina de residuos tóxicos que pueden ejercer un papel citotóxico en las células de la pared. Esta toxicidad en ocasiones da lugar a una desregulación del ciclo celular y a una proliferación masiva de las células uroteliales, constituyendo así una masa tumoral.

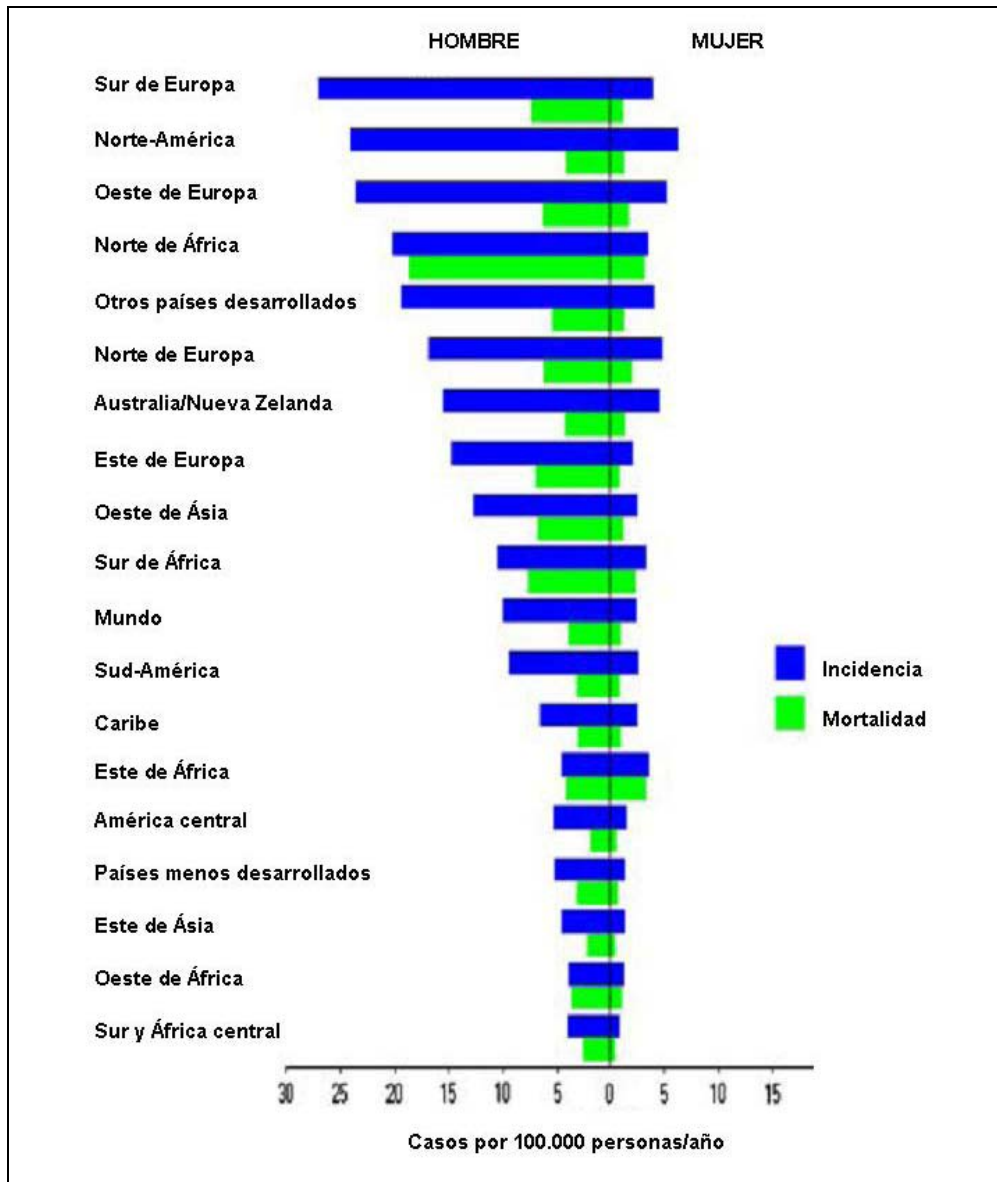
La localización más frecuente del CU es la vejiga (>90%), aunque puede aparecer en cualquier nivel del tracto urinario (el 5% de los casos aparecen en el TUS y 1% en la uretra). Dentro del TUS, los tumores se encuentran localizados en una ratio 3:1 en la pelvis renal respecto a los uréteres (Oosterlinck y cols., 2004).

### 1.2.1 Epidemiología

El CU es el séptimo tumor maligno más frecuente del mundo en el sexo masculino (Figura 4), con un número aproximado de 350.000 nuevos casos diagnosticados por año (Murta-Nascimento y cols., 2007). En países industrializados, es la cuarta neoplasia en orden de frecuencia tras los tumores de pulmón, próstata y colon. Dentro de los tumores urogenitales es el cáncer más frecuente en mujeres y el segundo más frecuente en hombres, después del de próstata.

Las divergencias de frecuencia entre géneros se han atribuido a la diferente exposición a los factores de riesgo. De hecho, aunque es más frecuente en el sexo masculino, se observa un aumento claro de la incidencia en el sexo femenino sobre todo a partir de la década de los 50, coincidiendo con la implantación entre las mujeres del hábito del tabaco. Su frecuencia aumenta en ambos sexos de forma directamente proporcional a la edad, presentando la máxima incidencia entre la sexta y séptima década de la vida.

Dados los avances en el diagnóstico y tratamiento en los últimos años, la supervivencia de esta enfermedad se sitúa entre el 50-60% a los 5 años.



**Figura 4:** Incidencia y mortalidad del CU en el mundo, en 2002 (Murta-Nascimento y cols., 2007).

### 1.2.2 Factores de riesgo

Aunque son numerosas las causas que pueden dar lugar a esta enfermedad, a continuación se resumen algunos factores que implican una mayor predisposición:

- **Tabaco:** es el factor de riesgo más relacionado con esta patología. Se calcula que su consumo aumenta el riesgo entre 2-4 veces, con un periodo de latencia de unos 20 años. Este riesgo aumenta con el número de cigarrillos y la duración del hábito. La toxicidad del tabaco en este aspecto viene dada por la inhalación de aminas aromáticas, las cuales son excretadas por la orina y son tóxicas para las células con las que entran en contacto.

- **Exposición ocupacional a productos químicos:** este factor de riesgo se debe fundamentalmente a la inhalación de anilinas en industrias químicas relacionadas con el caucho y con diferentes tipos de colorantes (tintes, pinturas, barnices, etc.). Otro agente químico relevante son los hidrocarburos policíclicos aromáticos, relacionados con el tratamiento del aluminio, carbón, hierro y acero. Se calcula que alrededor del 25% de los casos de cáncer vesical en Estados Unidos son de origen ocupacional.
- **Algunos medicamentos:** los analgésicos, por su contenido en fenacetina, han demostrado un incremento en el riesgo de presentar un CU en el TUS. Sin embargo, este riesgo no se muestra con el consumo de paracetamol, principal metabolito de la fenacetina (Piper y cols., 1985). Otro ejemplo es la ciclofosfamida, quimioterápico ampliamente utilizado para el tratamiento de algunas neoplasias hematológicas, que también ha sido identificado como agente causal del CU.
- **Factores genéticos:** se ha observado que existe un incremento en el riesgo de aparición del CU en individuos con historia de este tumor en sus familiares de primer grado. Por otro lado, se ha visto que polimorfismos genéticos en genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de carcinógenos uroteliales (p. ej. en el gen que codifica para la glutathion S-transferasa M1, implicada en la detoxificación de las aminas aromáticas), también contribuyen a incrementar la susceptibilidad a padecer esta enfermedad (Engel y cols., 2002).
- **Factores ambientales:** el consumo de agua potable con niveles altos de cloro y arsénico, la exposición de manera crónica a bajas dosis de radiación ionizante y el uso terapéutico de algunos isótopos radioactivos (como el I-131 en el tratamiento del hipertiroidismo) incrementan el riesgo de aparición del CU (Piper y cols., 1986; Edmonds y Smith, 1986; Brenner y cols., 2000).
- **Dieta:** se ha comprobado que dietas con bajo contenido en frutas y/o alto contenido en grasas incrementan el riesgo de padecer cáncer vesical 1,4 veces (Steinmaus y cols., 2000).

### 1.2.3 Tipos y clasificación

#### 1.2.3.1 Según patrón de crecimiento

El CU puede ser de varios tipos según el patrón de crecimiento que presente:

- **Papilar:** este patrón aparece en un 75-80% de los CUs. Los tumores papilares se caracterizan por presentar, tal y como su nombre indica, papilas, que consisten en



prolongaciones tapizadas por células uroteliales que contienen un estroma fibrovascular en su interior. Tienden a ser lesiones multifocales y a recurrir. Este patrón de crecimiento también es característico de una forma benigna de cáncer vesical llamada **papiloma**, que representa el 2,5% de todos los tumores papilares de la vejiga. En este caso las papilas están formadas por un eje fibroconjuntivo vascular revestido de un epitelio de células transicionales normal.

- **Sólido:** este patrón se da aproximadamente en el 10% de los CUs. Supone una lesión formada por islotes celulares que contienen grandes núcleos hiper cromáticos. La presencia de este patrón implica un mal pronóstico de la enfermedad.
- **Mixto:** aparece en el 20% de CUs. Los tumores con este patrón de crecimiento presentan características papilares y sólidas al mismo tiempo.
- **Plano:** al CU con este patrón de crecimiento se le confiere una identidad propia de manera que pasa a llamarse carcinoma *in situ* (CIS o Tis). Queda limitado al urotelio y tiene una elevada capacidad invasiva y metastásica. Puede presentarse asociado a lesiones papilares.

#### 1.2.3.2 Según histología

A nivel histológico, el CU se clasifica teniendo en cuenta básicamente dos aspectos: el estadio de invasión del tumor en las capas del tracto urinario y el grado de desdiferenciación celular. A continuación se explica más detalladamente cada uno de estos aspectos.

##### 1.2.3.2.1 *Estadio*

El estadio indica el nivel de extensión del tumor entre las capas del tracto urinario e incluso si alcanza otros órganos. El sistema para clasificarlo se denomina TNM (del inglés, *Tumor, Node, Metastasis*) y hace referencia a los siguientes parámetros:

- **T:** indica el grado de infiltración del tumor en las capas del tracto urinario.
- **N:** indica la presencia o ausencia de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales.
- **M:** informa de la presencia o ausencia de metástasis a distancia.

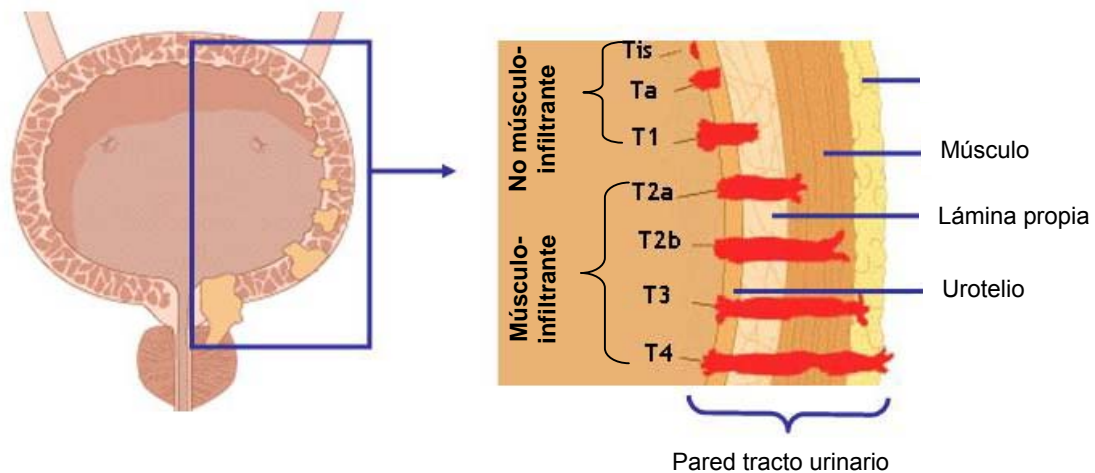
La clasificación TNM queda resumida en la tabla 1 y esquematizada en la figura 5.

**Tabla 1:** Clasificación TNM del CU (Sobin y Wittekind, 2002).

<b>T: Tumor primario</b>	
<b>Tx</b>	No se puede evaluar el tumor
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> : "tumor plano"
<b>Ta</b>	Carcinoma papilar no infiltrante
<b>T1</b>	Tumor que invade el tejido conjuntivo subepitelial
<b>T2</b>	Tumor que invade la capa muscular
<b>T2a</b>	Tumor que invade la capa muscular superficial (mitad interna)
<b>T2b</b>	Tumor que invade la capa muscular profunda (mitad externa)
<b>T3</b>	Tumor que invade la grasa perivesical
<b>T3a</b>	Microscópicamente
<b>T3b</b>	Macroscópicamente (masa extravesical)
<b>T4</b>	Tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: próstata, útero, vagina, pared pélvica o abdominal
<b>T4a</b>	Tumor que invade la próstata, el útero o la vagina
<b>T4b</b>	Tumor que invade las paredes pélvica o abdominal
<b>N: Ganglios linfáticos regionales</b>	
<b>Nx</b>	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
<b>N0</b>	No se demuestran metástasis ganglionares regionales
<b>N1</b>	Metástasis en un único ganglio linfático, de diámetro máximo menor o igual a 2 cm
<b>N2</b>	Metástasis en un único ganglio linfático, de diámetro máximo mayor de 5 cm, o en varios, ninguno de ellos mayor de 5 cm de diámetro máximo
<b>N3</b>	Metástasis en un ganglio linfático de diámetro máximo mayor de 5 cm
<b>M: Metástasis a distancia</b>	
<b>Mx</b>	No se puede evaluar las metástasis a distancia
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia

Estos parámetros pueden evaluarse a partir del tejido extraído en la resección transuretral del tumor (estadaje clínico) y/o después de la cirugía radical en la que se

extirpa la vejiga (estadiaje patológico). Cuando se habla de estadiaje patológico a las categorías T, N y M se les pasa a llamar pT, pN y pM, respectivamente.



**Figura 5:** Clasificación del CU según el estadio tumoral (Sobin y Wittekind, 2002).

Según el estadio, el CU puede recibir diferentes denominaciones. Cuando el tumor no llega a invadir la capa muscular (Tis, Ta y T1) se le denomina comúnmente carcinoma **no músculo-infiltrante** aunque también **tumor no invasivo de la capa muscular** o **superficial** (este último término está en desuso). En cambio, cuando el tumor llega a infiltrar el músculo o las capas exteriores a éste (T2 o más) se le denomina carcinoma **músculo-infiltrante**.

Aproximadamente el 75% de los CUs se diagnostican inicialmente como no músculo-infiltrantes. Desafortunadamente estos tumores están caracterizados por unos índices de recurrencia en la vejiga que oscilan entre el 60-85%, una vez que el tumor primario ha sido tratado. Además, entre el 15-30% de los CU no músculo-infiltrantes progresarán a infiltrar la capa muscular, pudiendo llegar a producir el fallecimiento del paciente (Amira y cols., 2002). Así, tanto la naturaleza insidiosa de estos tumores como su variable manifestación clínica han llevado a la mayoría de profesionales clínicos a minimizar la agresividad terapéutica a la hora del seguimiento y tratamiento, pensando en la calidad de vida del paciente (Fernando y Bianco, 2005).

#### 1.2.3.2.2 Grado

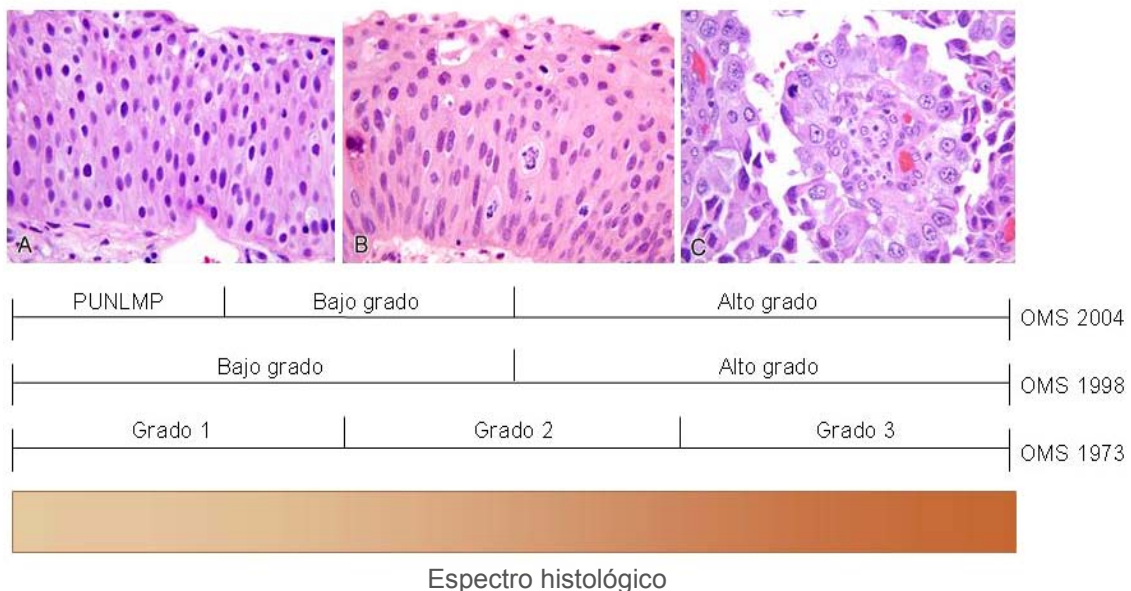
Los sistemas de gradación de los tumores uroteliales más difundidos y ampliamente aceptados han sido los propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Así, en 1973 se estableció una gradación que se ha estado utilizando durante décadas, la cual clasificaba los tumores en 4 categorías: papiloma, grado 1,

grado 2 y grado 3 (Mostofi y cols., 1973). En esta clasificación, los papilomas fueron definidos como lesiones exofíticas no malignas, formadas por un eje fibroconjuntivo recubierto por un epitelio transicional normal. Por otro lado, las categorías 1, 2 y 3 correspondían a los diferentes grados de anaplasia celular, siendo los tumores con grado 3 los que presentaban un grado de anaplasia más severo, suponiendo así un peor pronóstico de la enfermedad. La anaplasia en esta clasificación se definió por la presencia de células grandes, con irregularidad morfológica, polaridad atípica, presencia de figuras mitóticas anormales y con variaciones en los patrones de cromatina nucleares, entre otras características. Una crítica recurrente de este sistema de gradación fue la definición poco exacta de los puntos de corte entre estos tres grados de malignidad.

En 1998 este sistema fue modificado de manera que la clasificación pasó únicamente a considerar tres grupos de lesiones: papiloma, lesiones de bajo grado y lesiones de alto grado.

Posteriormente en 2004 la OMS añadió al sistema de 1998 una nueva categoría que incluye las neoplasias uroteliales papilares con bajo potencial de malignidad o PUNLMP (del inglés, *papillary urothelial neoplasm of low malignant potencial*).

El esquema de estos tres sistemas de clasificación, junto con la histología de los diferentes grados se representa en la figura 6.



**Figura 6:** Comparación entre los diferentes sistemas de gradación de los tumores uroteliales según su histología (MacLennan y cols., 2007). PUNLMP (del inglés, *papillary urothelial neoplasm of low malignant potencial*).

#### 1.2.4 Diseminación tumoral

Las células de los tumores malignos tienen la capacidad de diseminarse por vía sanguínea y/o linfática, y anidar en otros órganos dando lugar a tumores secundarios. Este proceso, denominado metástasis, es de profundo significado clínico ya que supone la principal causa de muerte debida al cáncer.

Las neoplasias uroteliales son biológicamente heterogéneas y están formadas por subpoblaciones de células con diferentes potenciales de crecimiento y diferente capacidad de diseminación y/o metastásica (Fidler, 1995). Además, el proceso metastático de este carcinoma es altamente selectivo e implica una serie de pasos interconectados cuya regulación no se conoce del todo.

En general, los pasos para que se de lugar la metástasis son los siguientes: en primer lugar, las células se desprenderán del tumor primario penetrando la membrana basal del tumor, infiltrarán el estroma subyacente y, desplazándose a través de la matriz extracelular, entrarán en la microcirculación, bien a través de los vasos linfáticos o bien a través de la vascularización sanguínea. Las células viajarán a través del sistema circulatorio (sanguíneo y/o linfático) y se distribuirán pasivamente en órganos distantes, deteniéndose en los vasos más pequeños. En determinadas localizaciones las células se extravasarán de los capilares e invadirán el órgano diana donde adaptarán el microambiente para vivir en ese nuevo tejido (Fidler, 1995).

Durante el transcurso de este proceso metastásico, gran parte de la células diseminadas serán eliminadas por el sistema inmune y parte permanecerán en estado de latencia.

Para que la metástasis crezca localmente en el órgano diana, primero se deberá vascularizar y para ello se deberá romper el equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos secretados por el tumor y el microambiente. Así, bajo la influencia de diversas señales moleculares, las células tumorales proliferarán formando primero micrometástasis y luego metástasis detectables clínicamente.

A continuación se detalla más concretamente y a nivel molecular, dos de los pasos más importantes para que se produzca la metástasis:

1. Disociación e intravasación de las células tumorales.

El epitelio transicional normal se estructura gracias a diversos tipos de uniones intercelulares (uniones estrechas y desmosomas), íntimamente interconectadas con la actina y los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales. Entre los muchos tipos de moléculas que intervienen en esta adhesión,

las caderinas, familia de proteínas transmembrana dependientes de calcio, juegan un papel crítico. Así, para que las células tumorales puedan iniciar el proceso de invasión, deberán romper las fuerzas que mantienen la adhesión celular y seguidamente atravesar el epitelio vascular para introducirse en la circulación. La rotura de estas fuerzas viene dada por la modificación en la adhesión. Uno de los cambios más importantes es la pérdida de adhesión mediada por **E-caderina**, ya sea porque se muta el gen que la codifica o porque se altera su transcripción mediante hipermetilación o reordenamientos cromosómicos en la región promotora (Hirohashi, 1998).

Por otro lado, las células tumorales se intravasan cuando existe un aumento de la actividad proteolítica que permite cruzar la matriz intersticial para llegar al sistema vascular. Las proteasas mejor conocidas que intervienen en este proceso son las **metaloproteinasas de la matriz (MMP)**, aunque también juegan un papel importante el sistema activador del plasminógeno tipo urocinasa y su receptor. Las MMP intervienen además en otras etapas de la progresión tumoral entre las que se encuentra la angiogénesis (Itoh y cols., 1998).

La **interleucina-8 (IL-8)** es otra molécula clave en la progresión tumoral. Sus niveles se regulan por factores microambientales como la hipoxia, la acidosis, el óxido nítrico y la densidad celular, actuando como factor mitogénico y angiogénico frente a estas situaciones. El nivel de expresión de IL-8 regula directamente la neovascularización inducida por el tumor, así como también el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (Inoue y cols., 2000).

Finalmente, Izawa y colaboradores evaluaron la expresión del **receptor del factor epidérmico de crecimiento (EGFR)** en un grupo de cánceres vesicales y encontraron que su sobre-expresión se asocia con la progresión del cáncer a músculo-infiltrante y/o con su diseminación (Izawa y cols., 2001). Este receptor se expresa en la membrana basal del urotelio normal, pero en todo el urotelio, desde la membrana basal hasta la superficie, en el CU. Además, los tumores escasamente diferenciados de alto grado expresan marcadamente EGFR frente a los tumores bien diferenciados de bajo grado. Esto ha llevado a postular que el nivel de expresión de este receptor supone un factor pronóstico independiente al estadio tumoral (Orntoft y Wolf, 1998).

## 2. Angiogénesis

El crecimiento continuo del tumor primario y de la metástasis sólo será posible si se da una neovascularización que asegure la distribución de oxígeno y nutrientes

al tejido creciente, así como un sistema de excreción de productos metabólicos de deshecho.

Como se ha mencionado anteriormente, este proceso está regulado por un balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos producidos tanto por las células tumorales como por las células no malignas de los tejidos adyacentes (Webb y Vande Woude, 2000).

El proceso de la angiogénesis comienza con la degradación de la membrana basal que rodea los capilares locales, y sigue con la invasión del estroma por las células endoteliales bajo la influencia de estímulos angiogénicos. A medida que estas células migran, proliferan en el borde de la columna migratoria y se organizan en estructuras tridimensionales que forman nuevos tubos capilares.

Los vasos tumorales constituidos de nuevo, sin embargo, muestran diferencias respecto a los vasos normales. La arquitectura vascular es más desorganizada e irregular, con áreas de hipoxia relativa y acidosis. También las membranas de las nuevas células endoteliales son más permeables, y presentan variaciones en los marcadores celulares de superficie y en las moléculas de adhesión celular, lo que puede permitir la selección de dianas para el desarrollo de terapias antiangiogénicas (Arap y cols., 1998).

Entre las moléculas responsables de esta neovascularización cabe destacar el **factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**, el **factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb)** y de nuevo el receptor **EGFR**.

La expresión de VEGF aumenta en condiciones de hipoxia, como las que se asocian con el crecimiento rápido de los tumores (Shweiki y cols., 1992). Esta expresión viene relacionada con el estadio tumoral, siendo los tumores músculo-infiltrantes los que expresan más VEGF (Sato y cols., 1998). En el CU, VEGF regula la angiogénesis después de unirse a uno de sus receptores tirosina-quinasa transmembrana relativamente específicos de células endoteliales. La expresión de VEGF en biopsias pre-cistectomía resultó ser un marcador de mal pronóstico independiente en los pacientes con carcinoma vesical músculo-infiltrante tratados con quimioterapia y cistectomía radical (Inoue y cols., 2000).

Por otro lado, el FGFb es un factor de crecimiento multifuncional que puede estimular la proliferación celular, la producción de proteasas y la angiogénesis. Aunque las células neoplásicas pueden sintetizar FGFb, es más frecuente que éste se libere por degradación de membranas basales epiteliales y del músculo

detrusor. FGFb también controla en parte el proceso invasivo del CU mediante la regulación de la producción de MMP (Miyake y cols., 1997).

Por último, EGFR ejerce un papel proangiogénico mediante la estimulación de VEGF y FGFb.

#### 1.2.4.1 Diseminación tumoral linfática

La diseminación tumoral linfática es frecuente en la mayoría de tumores (Tait y cols., 2004; Hong y cols., 2005). En ésta, las células del tumor primario penetran en un vaso linfático que carece de membrana basal y son transportadas por la linfa hasta el ganglio linfático regional dónde pueden proliferar e invadirlo constituyendo una metástasis ganglionar linfática. Desde ahí, pueden seguir el proceso a otros ganglios más distantes.

Las metástasis ganglionares se producen en el sentido de la corriente linfática, por lo que aparecen generalmente de manera ordenada según el territorio de drenaje de la circulación que irriga el tumor primario. En el caso del CU es frecuente encontrar metástasis en los ganglios ilíacos externos y obturadores (Smith y Whitmore, 1981; Vazina y cols., 2004). Sin embargo, se estima que la mayoría de las células tumorales que llegan al ganglio son destruidas por el sistema inmunitario del organismo y no llegan a formar metástasis (Luzzi y cols., 1998; Yokota, 2000; Van Trappen y Pepper, 2002).

Una molécula de la matriz del tejido linfático que juega un papel importante en las metástasis ganglionares es el **hialuronato**. Dada su naturaleza laxa e hidratada, esta molécula mantiene a las células separadas entre sí, lo cual aumenta su capacidad de movimiento y permite su proliferación. Por otro lado, un ambiente rico en **citocinas** favorece la diseminación celular al nódulo linfático y el establecimiento de la metástasis en dicha localización.

Alrededor de un 25% de pacientes sometidos a cistectomía presentan evidencia histológica de afectación tumoral en ganglios linfáticos tras la cirugía (Poulsen y cols., 1998; Stein y cols., 2001; Leissner y cols., 2004; Vazina y cols., 2004; bdel-Latif y cols., 2004). La supervivencia a 5 años de estos pacientes con afectación ganglionar ronda 20% (Smith y Whitmore, 1981). Por otro lado, según un estudio realizado por Stein y colaboradores en una serie de 1054 pacientes, la incidencia de afectación ganglionar tras la cirugía en función el estadio patológico es la que se resumen en la tabla 2.



**Tabla 2:** Incidencia de afectación ganglionar según el estadio patológico. Resultados de un estudio realizado en una serie de 1054 pacientes (Stein y cols., 2001).

Estadio patológico	Incidencia (%)
pT0, pTa, pTis y pT1	5
pT2a	18
pT2b	27
pT3	45
pT4	45

#### 1.2.4.2 Diseminación tumoral sanguínea

En el caso de las metástasis diseminadas por vía sanguínea, las células tumorales invaden los tejidos adyacentes al tumor primario hasta penetrar en la pared de algún vaso sanguíneo pequeño. Allí, pasan a constituir un émbolo tumoral que es transportado hasta un vaso de mayor calibre.

Una vez en la circulación, las células tumorales tendrán que superar básicamente dos obstáculos: la **apoptosis** mediada por la ausencia de unión entre sus integrinas y la matriz extracelular, y la actividad del **sistema inmunitario**. En el primer caso, las células tumorales escapan de la apoptosis ya que sufren alteraciones en las integrinas, en alguna molécula que media la señalización y/o en proteínas reguladoras de la apoptosis. En el segundo caso, las células tumorales circulantes dejarán de ser particularmente susceptibles a la actividad del sistema inmune mediante la activación de la apoptosis de las células T a través de la expresión del ligando Fas. Además, las células tumorales también pueden enmascarar antígenos de superficie reconocidos habitualmente por los linfocitos mediante la modificación de carbohidratos de la superficie celular (Marincola y cols., 2000).

En cuanto al diagnóstico de este tipo de diseminación, aunque se han realizado varios estudios al respecto, actualmente no se utiliza ninguna técnica para detectar la diseminación sanguínea del CU. La mayoría de los trabajos realizados para detectar tal diseminación se han basado en el empleo de técnicas moleculares para detectar marcadores específicos de células epiteliales y/o uroteliales en sangre. Algunos de estos trabajos y sus resultados se describen más detalladamente en el apartado 1.2.10.1.2. (Tabla 9) de la introducción de este trabajo.

#### 1.2.4.3 Diseminación tumoral linfática vs. sanguínea

La mayoría de tumores se extienden vía linfática, siendo los ganglios linfáticos los sitios más comunes donde la neoplasia disemina (Tait y cols., 2004; Hong y cols., 2005). Aunque la razón por la cual existe esta preferencia no está clara, existen evidencias que explican en cierta manera alguna de las causas de esta predilección. Una de ellas es que los nódulos linfáticos son filtros muy eficientes debido a la gran adhesividad para la que están preparados, relacionada con la respuesta inmune de los linfocitos T. Así, este medio para adherirse resulta muy apropiado a las células tumorales para invadir y proliferar (Gendreau y Whalen, 1999). Otra de las razones de esta preferencia podría ser la existencia de diferencias morfológicas y de expresión de marcadores endoteliales entre los capilares sanguíneos y linfáticos (Nathanson, 2003).

Pese a esta mayor facilidad de diseminación vía linfática, la diseminación de células tumorales puede ocurrir de forma sincrónica por vía linfática y vía sanguínea. De hecho, se ha demostrado experimentalmente que células tumorales inyectadas intra-vascularmente se diseminan a ganglios linfáticos locales, e inyectadas en vías linfáticas llegan al torrente sanguíneo. Esto se debe a que las células tumorales pueden circular por vasos veno-linfáticos que comunican ambas vías (Pepper, 2001).

Experimentalmente también se ha visto que el sitio inicial de detención de células tumorales no necesariamente define el destino final dónde se formarán las colonias metastásicas. En cambio, el lugar dónde se establezcan dependerá, no sólo de la adhesión a un endotelio particular, sino también de la susceptibilidad de ciertas células tumorales a factores/inhibidores de crecimiento paracrinos en esa zona.

Curiosamente, la destrucción de células tumorales en el nódulo linfático no parece ser tan exitosa como la destrucción de las mismas en el flujo sanguíneo. Una posible explicación es que las células tumorales en los ganglios linfáticos puedan usar los mismos mecanismos de migración y adhesión que utilizan las células del sistema inmune cuando responden a un antígeno o inflamación (Gupta y Massague, 2006).

#### 1.2.4.4 Significado clínico de la micrometástasis

La teoría más aceptada sobre el desarrollo de la metástasis es que cuando un grupo de células del tumor primario se diseminan, algunas de ellas originarán micrometástasis, y de éstas, posteriormente, algunas darán lugar a metástasis detectables clínicamente.

Las micrometástasis están definidas como agrupaciones tumorales de  $\leq 2\text{mm}$  de diámetro (Hermanek, 1999), de las que sólo una pequeña fracción progresará

(MacDonald y cols., 2002). Antes de convertirse en metástasis detectables clínicamente, estas micrometástasis permanecen latentes de manera que no proliferan pero tampoco entran en apoptosis. En este estado quiescente, las células que forman la micrometástasis son resistentes a terapias que actúan inhibiendo la división celular como la quimioterapia (Luzzi y cols., 1998). Los mecanismos que regulan la transición de la metástasis desde su estado latente e indetectable clínicamente a un estado progresivo de crecimiento constituye una de las áreas más desconocidas en la biología del cáncer (Van Trappen y Pepper, 2002).

Cuando esta diseminación se da en los ganglios linfáticos, pese al alto contenido de células inmunocompetentes que estos contienen, las células diseminadas podrán ser ignoradas por el sistema inmune durante años. La infra-expresión de MHC I (del inglés, *major histocompatibility complex class I*) relacionada con la respuesta mediada por linfocitos T, parece ser una de las vías de escape de las células tumorales al sistema inmune (Shankaran y cols., 2001).

Son diversos los estudios que, mediante técnicas histológicas, demuestran el valor pronóstico de la afectación ganglionar en la supervivencia (Heney y cols., 1983b; Ishida y cols., 1997; Hara y cols., 2001; Hong y cols., 2005). Algunos de ellos incluso lo consideran como un factor pronóstico independiente (Bassi y cols., 1999). La supervivencia a 5 años de pacientes con CU músculo-infiltrante que son sometidos a cistectomía radical y sin hallazgos histológicos de diseminación linfática, oscila entre el 70-80% en estadios pT2 y entre el 40-50% en estadios pT3 y pT4. Estos porcentajes disminuyen hasta el 20-25% cuando se observa afectación ganglionar en al menos un ganglio mediante técnicas histológicas (Stockle y cols., 1996).

Por otro lado, el estadio y la presencia de invasión vascular (evaluados mediante técnicas histológicas) también han demostrado ser factores independientes de predicción de la supervivencia cáncer-específica (Hong y cols., 2005). Estos factores pronóstico, junto a otros, se describen más detalladamente en el apartado 1.2.7 de esta introducción.

No obstante, existen pacientes en los que no se ha detectado diseminación tumoral linfática mediante técnicas histológicas pero que acaban presentando metástasis a medio plazo. Esto es debido a que ciertas micrometástasis son indetectables mediante técnicas histológicas. Se postula que el desarrollo de nuevas metodologías para detectar estas micrometástasis beneficiaría a algunos pacientes que podrían recibir quimioterapia adyuvante de manera temprana (Lehmann y cols., 2002).

Pese a todos los estudios realizados, actualmente el papel de la micrometástasis en el CU sigue siendo confuso. Esto es debido a que no existen estudios con un tiempo de seguimiento lo suficientemente largo y sin interferencias de tratamientos como para deducir qué proporción de micrometástasis progresarán y darán lugar a metástasis detectables clínicamente. Por otro lado, se ha demostrado que la realización de la linfadenectomía como complemento de la cistectomía radical implica un efecto curativo, especialmente en aquellos pacientes en que la diseminación no es detectable por técnicas histológicas (Leissner y cols., 2000; Mills y cols., 2001; Kurahashi y cols., 2005; Fleischmann y cols., 2005; Liedberg y Mansson, 2006; Sanderson y cols., 2006). Finalmente, cabe destacar que existen estudios en autopsias que demuestran la presencia de micrometástasis únicamente ganglionares en un 30-40% de pacientes, lo que sugiere que en una proporción no despreciable de pacientes estas micrometástasis no se extenderán a otros órganos (Stein y cols., 2006).

### 1.2.5 Diagnóstico y estadiaje

Cuando el paciente presenta síntomas o signos sugestivos de CU (la hematuria es el signo más común, aunque también puede darse de manera menos frecuente un síndrome miccional irritativo), las técnicas que se utilizan para el diagnóstico y estadiaje de esta enfermedad son las siguientes:

#### 1.2.5.1 Citología urinaria

La citología urinaria es el método diagnóstico no invasivo de referencia, descrito por Papanicolau y Marshall en 1945 (Papanicolaou y Marshall, 1945). Actualmente, en combinación con la cistoscopia (1.2.5.2.), supone el “*gold estándar*” para la detección y seguimiento del CU vesical aunque también se utiliza en el diagnóstico del CU en el TUS. Es una técnica especialmente útil en la detección del carcinoma *in situ*.

La exfoliación celular del urotelio a la orina sucede en condiciones normales, existiendo, desde un punto de vista citológico, tres tipos celulares reconocibles en la orina que representan los tipos de células que forman en el urotelio: células basales, células intermedias y células superficiales o “en paraguas”. Estas últimas células tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del urotelio y en la impermeabilidad de la pared vesical. Por este motivo, la descamación de células intermedias y/o basales a la luz vesical está bastante limitada.

La citología urinaria se basa en el análisis morfológico de la celularidad de la orina. Consiste en una tinción hematoxilina-eosina (H/E) del sedimento urinario (también llamada tinción Papanicolau). Se considera un método económico, de alta

especificidad en la detección del CU (alrededor del 95%) pero con una sensibilidad media que se encuentra entre el 35-40%. A pesar de alcanzar una sensibilidad del 90% en la detección de tumores de alto grado, ésta puede no llegar siquiera al 15% detectando tumores de bajo grado (Wiener y cols., 1993; Bastacky y cols., 1999). Los criterios que se emplean para determinar la presencia de malignidad consideran, entre otros parámetros, el aumento de la relación núcleo-citoplasma y la presencia de nucleolos.

Normalmente la muestra utilizada para este examen es la orina por micción espontánea, aunque también se pueden utilizar muestras procedentes de lavados vesicales o cateterismo ureteral. Estas últimas pueden ser especialmente útiles en casos de lesiones sospechosas en el uréter y en la pelvis renal. No obstante, estas muestras son menos idóneas para descartar la presencia de un proceso neoplásico ya que, aunque contienen un mayor número de células, éstas pueden presentar cambios morfológicos reactivos. En cualquier caso, la principal ventaja de utilizar orina por micción espontánea es la inexistencia de invasividad en la toma de la muestra.

Según el tipo de tumor de que se trate, se tendrán que tener en cuenta algunas consideraciones con esta técnica. Por ejemplo, los tumores papilares de bajo grado presentan poca exfoliación debido a la alta cohesividad celular que todavía presentan las células “en paraguas” y que mantienen en su lugar a las células proliferantes. Por otro lado, la morfología de sus células es similar a la de las células normales, lo que puede causar confusión en el diagnóstico. En cambio, los tumores papilares de alto grado presentan una proliferación desordenada que implica muchas más anomalías arquitecturales y citológicas, por lo que a menudo en la muestra se aprecian células atípicas que sugieren malignidad.

El carcinoma *in situ* representa la diana principal de la citología urinaria (Koss, 1996). Dado que carece de cohesión, este tipo de tumor es más proclive a exfoliar que los tumores papilares. Por ello, la citología urinaria suele ser más reveladora en la detección de esta lesión que la cistoscopia, la cual falla a menudo en demostrar anomalías planas (Iwasaki y cols., 1979). Otro tipo de lesiones planas que pueden sugerir la presencia de carcinoma son la atipia reactiva o la neoplasia intrauroterial de bajo grado. En estos casos y ante la presencia de hallazgos inconcluyentes normalmente se adopta una terminología conservadora en el informe citológico (p ej. citología sospechosa) para evitar el sobretratamiento.

El estudio citológico es capaz de detectar entre el 25-59% de los casos de CU en el TUS (Chow y cols., 1994). La falta de sensibilidad en estos casos es justificable por

la dificultad en la interpretación de la muestra debido a que las células benignas del TUS suelen tener una morfología atípica (Potts y cols., 1997). La obtención de la orina mediante cateterización ureteral eleva estos valores de sensibilidad hasta el 65-78% (Assimos y cols., 2000).

En general, errores en el diagnóstico citológico también pueden ser debidos a problemas en la preparación técnica de la muestra (p ej. una mala fijación puede ocasionar falta de detalles nucleares) o en la interpretación del observador, ya que se trata de un método subjetivo. El hecho de que las muestras presenten celularidad escasa o que las células estén deterioradas debido a las condiciones en las que se encuentran en la orina también suponen inconvenientes en el diagnóstico. La litiasis del tracto urinario constituye otra posible fuente de error en forma de falso positivo (Highman y Wilson, 1982).

Finalmente, cabe destacar que el hecho de que pueda existir sincronía entre CU vesical y CU en el TUS implica que el resultado positivo de la citología no permita identificar el origen del tumor (vesical o proveniente de las vías urinarias altas).

#### 1.2.5.2 Técnicas endoscópicas

En el caso de CU vesical, y como se ha mencionado anteriormente, los métodos de referencia para el diagnóstico son la citología urinaria y la **cistoscopia**. Esta última consiste en la visualización directa de la vejiga mediante un cistoscopio el cual está formado por una fuente luminosa, un sistema óptico y un aparato de irrigación. La combinación de estos métodos de referencia también es clave para evaluar en controles periódicos a los pacientes con historia previa de CU. La periodicidad de estos controles dependerá del riesgo de recurrencia del tumor.

Aunque se han diseñado cistoscopios flexibles para disminuir la incomodidad que este método diagnóstico supone para el paciente, la cistoscopia es un método altamente invasivo que origina estrés, hematuria y dolor. Es importante destacar que la sensibilidad de la cistoscopia no es del 100% y que, aunque en las mejores series se describen cifras del 95%, a veces no supera el 70%, dependiendo de la proporción de tumores únicos, superficiales o *in situ* estudiados (Glas y cols., 2003; Kausch y cols., 2006). De hecho, el límite de resolución del ojo humano es limitado y puede no permitir detectar tumores de tamaño inferior a 0,5 mm.

Con la finalidad de incrementar el porcentaje de detección de carcinoma *in situ* se ha desarrollado una técnica de **cistoscopia fluorescente**, que consiste en la instilación endovesical de ácido-5-aminolevulínico (5-ALA) o su éster derivado (H-ALA) o la utilización de Hypericin antes de realizar la cistoscopia (D'Hallewin y cols., 2002).

Estos fármacos son agentes fotosensibles precursores fisiológicos de las porfirinas naturales, moléculas que constituirán el grupo hemo de las células. La administración del fármaco de manera intravesical dará lugar a la acumulación local de porfirinas, con carácter fotoreactivo, en las células de las capas internas de la vejiga, especialmente en las células neoplásicas y preneoplásicas, debido a su mayor actividad metabólica. Dado que estos agentes son capaces de emitir una luz roja característica en respuesta a la excitación con luz azul (de longitud de onda entre 380 y 450 nm), las lesiones premalignas y malignas tienden a brillar en color rojo al ser iluminadas con luz azul durante la cistoscopia. Esta técnica puede incrementar la detección de tumores o carcinoma *in situ* hasta en un 30% sobre la técnica habitual de cistoscopia (Schmidbauer y cols., 2004; Witjes y Douglass, 2007).

Otra exploración endoscópica realizada corrientemente en la práctica clínica es la **ureteroscopia**, la cual se utiliza para examinar visualmente el TUS. Aunque se realiza con endoscopios flexibles, no deja de ser un proceso altamente invasivo dado el difícil acceso endoscópico de esta zona del tracto urinario. Además, otro inconveniente de esta técnica es que existe el riesgo de perforación con extravasación del tumor, en el caso de existir, o de eliminación parcial de la capa mucosa del urotelio donde se facilitaría la implantación de células tumorales. Debido a dichos inconvenientes, esta técnica se intenta reservar para aquellas situaciones en que el diagnóstico mediante técnicas de radiodiagnóstico o citología es dudoso y/o el tratamiento realmente se vería afectado por su resultado.

En definitiva, la cistoscopia es una técnica sensible que se utiliza sistemáticamente en el control y seguimiento de los pacientes con CU, pero que implica la realización de múltiples procedimientos invasivos al año en los pacientes con esta enfermedad. Esto ha llevado a un aumento en el interés por buscar nuevos métodos diagnósticos no invasivos que puedan reducir el uso de tan agresiva metodología diagnóstica.

#### 1.2.5.3 Técnicas de radiodiagnóstico

En el diagnóstico y seguimiento del CU, a menudo se utilizan técnicas radiológicas que ayudan a confirmar el diagnóstico. Dentro de estas técnicas la más utilizada es la **ecografía**, la cual permite visualizar, por medio de ondas acústicas de alta frecuencia (1-20 MHz), órganos y tejidos dotados de diferente impedancia acústica.

Esta técnica puede presentar una sensibilidad de hasta el 98% en la detección de CU. Por otro lado, realizada de manera transabdominal, permite detectar tumores

papilares de entre 2 y 3 mm, siendo su sensibilidad menor en tumores planos y localizados en el techo vesical.

La ecografía también puede usarse en el estadiaje tumoral, aunque presenta el inconveniente de tender a sobrestimar los tumores no músculo-infiltrantes (Oleaga, 2004). Cuando es realizada de manera transuretral, esta técnica permite diferenciar los estadios T2 y T3, pero su desventaja radica en que pasa a ser un proceso invasivo (Grups y cols., 1989).

Cuando existe sospecha de CU en el TUS a menudo se utiliza la **urografía**. Esta técnica consiste en inyectar una sustancia de contraste densa y opaca a los rayos X, que se elimina por la orina y permite definir el tamaño y forma de los riñones y del tracto urinario, así como visualizar si existen discontinuidades en el llenado del TUS. La inyección del contraste se puede realizar en vena (urografía intravenosa o UIV), directamente en la pelvis renal (urografía anterógrada) o a través de la uretra (urografía retrógrada). Entre un 50-70% de los pacientes con CU en el TUS presentan defectos de llenado cuando la orina es transportada hasta la vejiga (Oosterlinck y cols., 2004).

Otros sistemas de imagen utilizados frecuentemente en la práctica clínica son la **tomografía axial computarizada (TAC)**, la **resonancia magnética (RM)** y la **gammagrafía ósea**.

La **TAC** permite la obtención de imágenes de órganos y tejidos con una alta resolución, gracias a la reconstrucción computerizada de cortes tomográficos que son escaneados. De esta manera es capaz de proporcionar información de la diseminación pélvica y visceral de la enfermedad con una sensibilidad y especificidad que ronda el 88% y 98%, respectivamente, en la detección de la diseminación linfática. Cuando se trata de invasión del parénquima renal, este método ofrece una sensibilidad del 64% y una especificidad del 97% (Millan-Rodríguez y cols., 1999). Se suele realizar una vez ya diagnosticado el tumor pero antes del tratamiento radical del mismo, para valorar así tratamientos adyuvantes complementarios. En el caso del diagnóstico del CU localizado en el TUS, esta técnica supone una mejora respecto la UIV ya que proporciona imágenes anatómicas virtuales del tracto urinario. La limitación de la TAC básicamente recae en que no detecta depósitos extravasculares de tumor inferiores a 1 cm de diámetro. Así, el porcentaje de pacientes con diseminación tumoral linfática que no son detectados por este método oscila entre un 21-70% (Paik y cols., 2000).

La **RM** es otra técnica de radiodiagnóstico que permite obtener imágenes de órganos gracias a la cinética de protones en el interior del paciente, la cual crea una

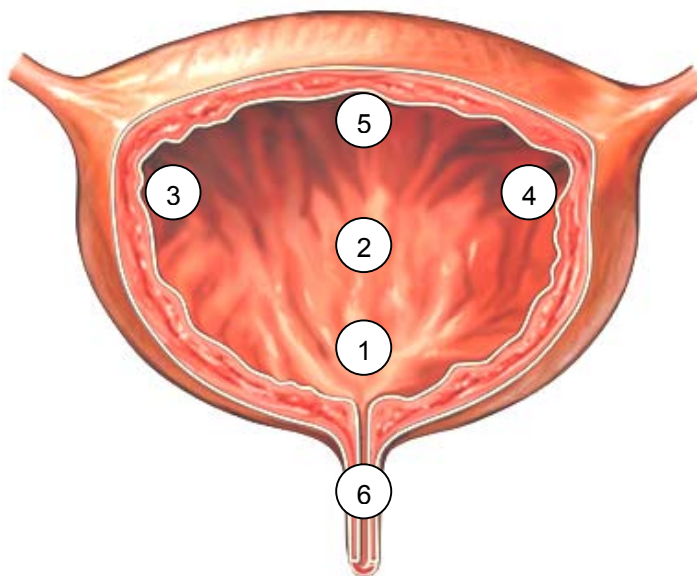


corriente cuya magnitud se relaciona con la intensidad del píxel en la imagen obtenida. A diferencia de la TAC, la RM puede generar imágenes multiplano directas y proporcionar información específica (p. ej. del flujo sanguíneo, líquidos estáticos, etc.) (Walsh y cols., 2004). Esta técnica, sin embargo, falla en la identificación de diseminación tumoral linfática en el 15% de los pacientes que la tienen (Persad y cols., 1993).

Por último la **gammagrafía ósea** es una técnica también basada en rayos X mediante la cual se valora la existencia de metástasis óseas. Para ello se inyecta al paciente un marcador radiactivo, que a medida que se consume emite radiación  $\gamma$ . La radiación emitida puede ser detectada desde el exterior mediante equipos especialmente diseñados para ello. A diferencia de la imagen radiográfica convencional, que proporciona una información anatómica, la gammagrafía aporta una información funcional con lo que es capaz de detectar anomalías que aún no han provocado una alteración morfológica.

#### 1.2.5.4 Biopsia múltiple normalizada

La biopsia múltiple normalizada (BMN) es una técnica de diagnóstico que tiene por objetivo identificar áreas de displasia o carcinoma *in situ* en la mucosa vesical mediante la toma, con pinza fría, de fragmentos mucosos en localizaciones ya definidas. El número de biopsias que se suelen realizar en el mapeo vesical para descartar un Tis varía según el centro, pero en ningún caso debe ser menor de cuatro. Un esquema sobre seis localizaciones frecuentes de donde se obtiene una biopsia vesical en la BMN se ilustra en la figura 7.



**Figura 7:** Esquema de seis localizaciones frecuentes de las que se obtiene muestra al realizar una BMN. 1- Trígono; 2- Pared posterior; 3- Pared lateral derecha; 4 Pared lateral izquierda; 5- Cúpula; 6- Uretra prostática (sólo en varones).

#### 1.2.5.5 Técnicas histopatológicas

La **tinción H/E** es la técnica estándar para el análisis histopatológico de las muestras de tejido. Se basa en la evaluación al microscopio óptico de la morfología celular presente en una biopsia (de tejido vesical o linfático, principalmente). El patólogo examina las preparaciones histológicas y no sólo diagnostica la presencia de células tumorales en la muestra sino que también evalúa el nivel de invasión del tumor en la pared del tracto urinario y el grado de diferenciación celular.

La **inmunohistoquímica (IHQ)** es una técnica complementaria a la tinción H/E en aquellos casos en que la morfología celular pone en duda el diagnóstico del CU y/o de su diseminación. Dado que se trata de una técnica basada en la detección de marcadores moleculares (proteínas), se explica con más detalle en el apartado 1.2.10.2 de esta introducción.

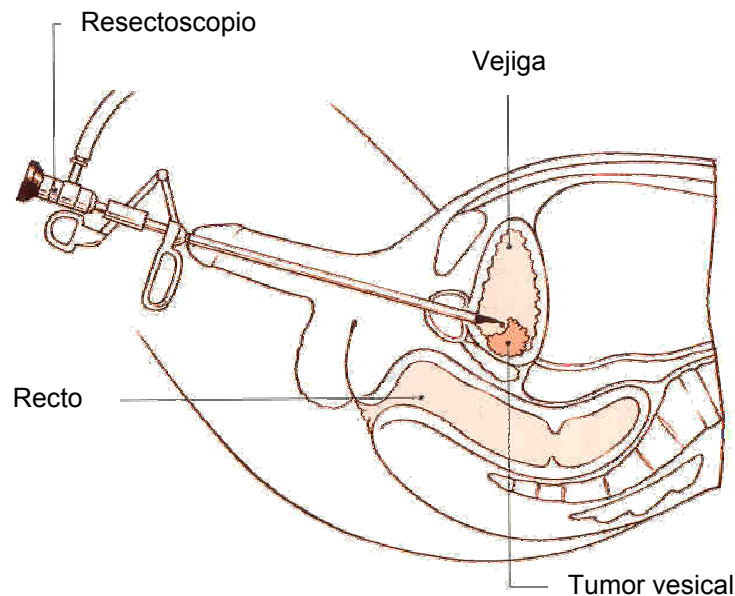
#### 1.2.6 **Tratamiento**

Tras el diagnóstico inicial del CU, se realizará una resección del tumor para establecer su estadiaje y así dictaminar el tratamiento adecuado dependiendo del nivel de infiltración del tumor o de si se encuentra diseminado. En los siguientes apartados se detallan las opciones terapéuticas más frecuentemente utilizadas en cada caso.

### 1.2.6.1 Tratamiento de la enfermedad no músculo-infiltrante

#### 1.2.6.1.1 *Resección transuretral*

La resección transuretral (RTU) es una intervención quirúrgica donde se extirpan las lesiones visibles de tumor vesical en pequeños fragmentos a través de la uretra, mediante un aparato llamado resectoscopio (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema de la realización de la RTU.

Tiene doble finalidad: diagnóstica, ya que permite la gradación y estadificación del tumor, y curativa, ya que al extirpar totalmente el tumor se puede conseguir la curación del paciente.

Es el tratamiento de elección en los pacientes con tumor vesical inicial y en la mayoría de los casos con recidiva tumoral. Sin embargo, como tratamiento aislado, la RTU se utiliza sólo en los pacientes con tumores de bajo riesgo de recurrencia y/o progresión (tumores Ta de bajo grado sin Tis asociado). En el resto de pacientes con tumores no músculo-infiltrante (de riesgo intermedio y elevado de recurrencia y/o progresión; ver apartado 1.2.7) se aconseja la utilización de quimioterapia o inmunoterapia intravesicales adyuvantes, ya que han demostrado ser efectivas para reducir el riesgo de recidiva y de progresión (Millan-Rodriguez y cols., 2000b).

Antes de la RTU se realiza una uretrrocistoscopia, la cual aporta la información sobre el número, tamaño, tipo (papilar o sólido) y la localización de los tumores en la

vejiga y/o en la uretra prostática. Dependiendo de estos parámetros, la RTU puede ser una cirugía sencilla y rápida o muy compleja y tediosa.

Como regla fundamental, para certificar que la RTU se ha realizado correctamente, entre los fragmentos reseccionados tienen que estar representadas todas las capas de la pared vesical incluyendo la capa muscular. Si no existe representación de dicha capa, el tumor deberá catalogarse como Tx y se valorará la realización de una nueva RTU para conseguir una correcta estadificación.

El porcentaje de complicaciones de esta cirugía oscila entre el 4,7% y el 16%, encontrándose relacionado con el tamaño del tumor, con el número de focos y con la preparación técnica del cirujano. La mortalidad intra o post-operatoria es muy baja (entre el 0% y el 1,3%) y parece estar relacionada con la situación clínica del individuo (Collado y cols., 2000).

Varios estudios han publicado que en un número significativo de casos esta cirugía es incompleta (Herr, 1999; Grimm y cols., 2003). Esto podría explicar, en parte, el alto índice de recidivas que se observan post-tratamiento, ya que entre el 50-80% de los pacientes presentan una recidiva del tumor al cabo de 2 años de la cirugía, y entre el 15% y el 23% de los casos progresan a enfermedad músculo-infiltrante (Heney y cols., 1983a; Swana y cols., 1999).

En el caso de los tumores localizados en el TUS, también se puede realizar un tratamiento conservador consistente en la resección del tumor por vía endoscópica. Este tratamiento está indicado principalmente en aquellos casos en que el tumor es de bajo grado sin infiltrar el músculo y en lesiones PUNLMP. También se utiliza cuando la cirugía radical está contraindicada ya sea por la presencia de enfermedad bilateral, porque exista insuficiencia renal o porque el tratamiento únicamente sería paliativo (Mills y cols., 2001).

#### 1.2.6.1.2 Inmunoterapia intravesical con el *Bacillus de Calmette-Guérin*

La inmunoterapia intravesical con el *Bacillus de Calmette-Guérin* (BCG) es aceptada de manera universal en el tratamiento y profilaxis de los pacientes con los siguientes tipos de carcinoma de alto riesgo de recurrencia y/o progresión (Oosterlinck W y cols., 2002):

- Carcinoma Tis
- Carcinoma de carácter papilar no músculo-infiltrante de alto grado
- Carcinoma multifocal

➤ Carcinoma multirecurrente

En estos casos la BCG es utilizada como terapia adyuvante después de la RTU, ya que proporciona una mejora en las tasas de recurrencia y progresión en comparación a cuando se realiza solamente la resección (Sylvester y cols., 2002; Bohle y cols., 2003). En el resto de casos el empleo de esta terapia no está justificado debido a su potencial morbilidad y al gasto económico que implica.

La inmunoterapia con BCG da lugar a una reacción inmunológica activa (es decir, que el sistema inmune del huésped es el efector) e inespecífica (ya que implica una respuesta inflamatoria independiente de la antigeneidad tumoral) cuyo fundamento es la potenciación de las células efectoras del sistema inmune del paciente portador del tumor. Consiste en la instilación intravesical, de manera periódica, de preparaciones del bacilo Calmette-Guérin obtenidas a partir de cepas modificadas provenientes de una cepa original de *Mycobacterium bovis*. Aunque la pauta y duración del tratamiento óptimas pueden variar, una opción comúnmente utilizada consiste en una instilación/semana durante 6 semanas, con un mantenimiento de una instilación cada 3 meses durante 3 años.

Estas instilaciones desencadenan una reacción inmunológica por parte del paciente contra el agente bacteriano introducido. La interacción de las células del sistema inmune del paciente con las células uroteliales permite el reconocimiento de estructuras extrañas en la superficie de las células transformadas, lo que hace potenciar la respuesta inmune y alterar el curso evolutivo de la neoplasia.

Los mecanismos de activación inmunológica se producen de manera secuencial, pudiéndose resumir en 2 pasos:

1. Contacto y fijación del bacilo al urotelio.

Los bacilos introducidos en la cavidad vesical establecerán uniones con la molécula **fibronectina**, la cual está presente en el urotelio y tiene un papel fundamental en los procesos de cicatrización. Esta proteína se encuentra como parte constitutiva de la membrana basal (forma insoluble) pero también en el plasma como un componente más de la barrera hemato-urinaria del revestimiento vesical (forma soluble). Así, este proceso de fijación del complejo fibronectina-BCG ocurre en cualquier lugar del urotelio y no exclusivamente en áreas de disrupción urotelial.

Tanto en la membrana de las células *natural killer* (NK) como en la pared bacteriana del BCG existen receptores para la fibronectina. El hecho de que estos receptores se encuentren eventualmente ocupados (p. ej. por la presencia de

fármacos que modifican los mecanismos fisiológicos de coagulación) explica en parte las diferencias de respuesta a la terapia observadas entre pacientes (Bohle y cols., 1990).

## 2. Internalización de la BCG.

A pesar de los mecanismos de protección fisiológicos de la mucosa urotelial, que la hacen impermeable frente a la difusión de sustancias potencialmente tóxicas, el complejo fibronectina-BCG se internaliza en la pared vesical. El mecanismo de esta internalización no se conoce exactamente, aunque se acepta que se realiza mediante procesos de transporte activo y fagocitosis por células presentadoras de antígenos (Ratliff y cols., 1987; de Boer y cols., 1991).

Tras el proceso de infiltración en la pared vesical se produce el verdadero procesamiento de los antígenos bacterianos por los monocitos y por la subpoblación de linfocitos T CD4. La amplificación de la respuesta inmunológica implica la expansión de células con capacidad lítica antitumoral (linfocitos T CD8, células NK y macrófagos). Evidencias experimentales demostraron que las subpoblaciones linfocitarias T, CD4 y CD8 son las que están más implicadas en la respuesta antitumoral. De hecho, se comprobó que la activación inducida por BCG en los linfocitos T CD4 era un requisito necesario para inducir células T CD8 citotóxicas específicas (de Boer y cols., 1991).

En toda esta compleja activación y expansión celular es fundamental la actividad de citocinas y moléculas de adhesión, las cuales contribuyen a la regulación del sistema inmunitario. Destacan, entre ellas, las interleucinas (IL) de carácter proinflamatorio (IL1, IL6 e IL8) y otras como la IL2, el interferón  $\gamma$  y los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ . Este aumento de moléculas reguladoras producido durante la inmunoterapia es cuantificable tanto en sangre como en orina.

Una vez desencadenada la respuesta inmune en el tejido urotelial, es necesaria la estabilidad y permanencia de los efectores inmunológicos en el propio tejido. Así, la verdadera respuesta a la terapia está condicionada por las características funcionales de la infiltración y por la eficiencia de los elementos inmunocompetentes.

Básicamente, la limitación de esta terapia recae en la heterogeneidad de la respuesta al tratamiento por parte de los pacientes. El número de elementos celulares inmunocompetentes que alcanzan la pared, su grado de actividad funcional y el tiempo que durará el efecto en función de la persistencia de estas células, son las principales variables que determinarán la eficacia de este tratamiento. La capacidad de

producción y secreción *in situ* de moléculas que permiten la migración tisular también supone una variable dependiente del paciente en la respuesta al tratamiento.

Uno de los factores clave en el éxito de esta inmunoterapia es el grado de toxicidad que provoca en determinados pacientes. Los efectos adversos tóxicos de la BCG parecen depender principalmente de la dosis y el número de instilaciones, aumentando con los programas de mantenimiento. En este aspecto, se estableció como hipótesis la asociación de manifestaciones clínicas sugestivas de inflamación urotelial intensa (fiebre, síndrome miccional irritativo, etc.) con una mayor eficacia clínica del tratamiento. Sin embargo, experimentalmente toxicidad y eficacia no parecen estar relacionadas (Sylvester y cols., 2003). Los efectos adversos más frecuentemente observados incluyen la disuria (75%), nicturia (63%), hematuria (29%) y dolor (12%). Otros efectos adversos más preocupantes incluyen síntomas gripales (24%), artralgia (5%) y complicaciones infecciosas sistémicas que afectan a los pulmones o al hígado (5%) o también al epidídimo, a la próstata o a la uretra (5%). La complicación más temible, aunque minoritaria, es la sepsis, la cual puede llevar al fallecimiento del paciente. Estos efectos adversos son los responsables de que aproximadamente el 20% de los pacientes presenten intolerancia a la terapia y de que el 5% de estos no completen el tratamiento.

Ya sea por el estado de inmunocompetencia del paciente o por su susceptibilidad a los efectos tóxicos de la terapia, existe un porcentaje de pacientes en que la terapia no será efectiva y presentarán recurrencia tumoral a corto plazo.

En el caso de tumores localizados en el TUS, la utilización de la inmunoterapia BCG puede considerarse que se encuentra en fase experimental, no habiéndose replicado por el momento el beneficio proporcionado en el CU vesical (Hayashida y cols., 2004). La realización de estudios más desarrollados es clave para que esta aplicación de la BCG acabe siendo llevada a la práctica clínica.

#### 1.2.6.2 Tratamiento de la enfermedad músculo-infiltrante

##### 1.2.6.2.1 *Cirugía radical*

La cirugía radical realizada dependerá de la localización del tumor y de su grado de invasividad.

Cuando el tumor urotelial se encuentra localizado en la vejiga, y además se trata de un tumor músculo-infiltrante que no ha dado lugar a metástasis según las pruebas de imagen previas, la **cistectomía radical** complementada con la **linfadenectomía** es el tratamiento de elección. En algunas ocasiones este tratamiento también se aplica en

el caso de tumores no músculo-infiltrantes que han presentado frecuentes recurrencias en un corto intervalo de tiempo o han sido refractarios a la terapia BCG realizada tras la RTU.

Este tratamiento quirúrgico consiste en la extirpación de la vejiga urinaria y de los ganglios linfáticos adyacentes. En los hombres la cirugía también incluye la extracción de la próstata y en las mujeres de la matriz. De esta manera se pretende la eliminación de la vejiga afectada así como de la posible enfermedad microdiseminada.

La linfadenectomía como complemento de la cistectomía radical implica una cirugía más compleja pero que no incrementa ni la morbilidad ni la mortalidad del procedimiento (Stein y cols., 2006). Presenta un beneficio terapéutico tanto para los pacientes con ganglios linfáticos clínicamente positivos para metástasis como para los que presentan ganglios negativos (Sanderson y cols., 2004). Además de este beneficio terapéutico, permite un estadiaje más exacto de la enfermedad. Esto es importante ya que en 1999 Vieweg y colaboradores demostraron una correlación entre la supervivencia libre de enfermedad y el estadio N. Así, encontraron una supervivencia libre de recurrencia a los 3 años en el 50,6%, 34,5% y 0% en pacientes N1, N2 y N3, respectivamente (Vieweg y cols., 1999b).

Varios estudios han demostrado la importancia de realizar la linfadenectomía de manera bilateral aunque el tumor no lo sea (Stein y cols., 2001; Mills y cols., 2001; Vazina y cols., 2004; bol-Enein y cols., 2004). Sin embargo, la extensión de la linfadenectomía es un tema más controvertido. Muchos trabajos apoyan la realización de una **linfadenectomía extensa**, la cual consiste en la extirpación de los ganglios interaortocaval, paracaval derechos, para-aortal izquierdos, presacros, ilíacos comunes, ilíacos externos y obturadores (Figura 3). Sin embargo, su realización todavía no está estandarizada en la práctica clínica, siendo la **linfadenectomía estándar** la que se lleva a cabo más frecuentemente y en la que se extirpan los ganglios ilíacos (hasta la bifurcación ilíaca) y obturadores (Stein, 2006).

Una vez extirpada la vejiga es necesaria una derivación urinaria. Los métodos más utilizados para realizar esta derivación son los siguientes:

- **Conducto ileal** (derivación heterotópica): los uréteres se anastomosan a un fragmento de intestino desfuncionalizado y éste a la piel. El paciente llevará un colector para recoger la orina.
- **Neovejiga ileal** (derivación ortotópica): los uréteres se anastomosan a un reservorio construido con un segmento de intestino (sobre todo íleon). Éste a su vez se liga a la uretra.



➤ **Ureterosigmoidostomía:** anastomosis de los uréteres al sigma.

La mayoría de estudios realizados sobre la calidad de vida de los pacientes sometidos a cistectomía radical revelan que el paciente se adapta bien a la vida posterior, independientemente del tipo de derivación urinaria utilizada (Clark y cols., 2005).

Las tasas específicas de supervivencia por cáncer a los 5 años tras la cistectomía varían entre el 48% y el 83% (Ghoneim y cols., 1997; Hautmann y Paiss, 1998; Leissner y cols., 1999; Dalbagni y cols., 2001; Stein y cols., 2001). Por otro lado, alrededor del 50% de pacientes con CU músculo-infiltrante desarrollarán metástasis en los 2 primeros años de seguimiento tras la cirugía radical (Gazzaniga y cols., 2001).

Como es de esperar, los datos de supervivencia a 5 años en pacientes con enfermedad extravesical y/o afectación linfática son peores, rondando el 30% en amplias series de pacientes (Tabla 3).

**Tabla 3:** Tasa de supervivencia global en series de cistectomía radical de pacientes con ganglios histológicamente positivos para diseminación. N+: categoría histológica N con resultado positivo para diseminación tumoral.

Estudio	Número pacientes total	Número pacientes N+	Media seguimiento (años)	% Supervivencia cáncer-específica a 5 años en N+
Ghoneim y cols., 1997	1026	188	4,05	23,4
Stein y cols., 2001	1054	246	10,2	35
Shariat y cols., 2006	888	204	3,25	27,3
Steven y Poulsen, 2007	336	64	6	39
Canter y cols., 2008	356	114	3,8	25
Ghoneim y cols., 2008	2720	555	5,5	27,4

Debido a los avances en la técnica quirúrgica, la anestesia y los cuidados perioperatorios, la mortalidad perioperatoria de la cistectomía radical en los últimos 20 años se ha reducido a niveles que oscilan entre el 2-6% (Stein y cols., 2001).

Cuando el CU se encuentra localizado en TUS, el tratamiento estándar en pacientes con un tumor músculo-infiltrante es la **nefroureterectomía radical**. Este tratamiento consiste en la extirpación de la pelvis renal, el uréter y el riñón del lateral afectado, junto con una resección de entre 1 y 2 cm de la mucosa vesical que rodea el orificio ureteral (Seaman y cols., 1993). El tratamiento radical en estos tumores disminuye el riesgo de recurrencia unilateral, haciendo que el seguimiento del paciente

sea menos complicado. Después de este tratamiento la recurrencia tumoral en la vejiga será del 19-24% (Laguna y de la Rosette, 2001). El hecho de que en la mayoría de los casos se contemple el tratamiento radical es debido a la alta recurrencia de estos tumores, su elevada multicentricidad y la baja incidencia tumoral bilateral. Por ello, se contempla un tratamiento conservativo sólo en aquellos casos de pacientes monorenos, con CU en TUS bilateral o con insuficiencia renal. Los tumores distales de bajo estadio y grado pueden ser tratados de manera exitosa mediante **ureterectomía distal**, es decir, únicamente extrayendo la parte lesionada del uréter y evitando así la extirpación del riñón (Tawfik y Bagley, 1997).

Dado que los ganglios linfáticos regionales también representan la localización más frecuente de metástasis cuando el CU se encuentra localizado en TUS (Arancibia y cols., 2007), la linfadenectomía complementaria a la nefroureterectomía es especialmente importante sobre todo en aquellos pacientes que presentan la enfermedad extendida a lo largo del tracto urinario. La mejora en la supervivencia aportada por esta técnica queda claramente reflejada en un estudio por Brausi y colaboradores donde se observó un incremento en la supervivencia de 31,3 meses en el grupo de pacientes tratados con linfadenectomía (Brausi y cols., 2007).

#### 1.2.6.2.2 Radioterapia

El CU es un tipo de tumor bastante resistente a la radioterapia. Sin embargo, y aunque el tratamiento estándar del CU músculo-infiltrante es la cistectomía radical, la radioterapia representa la opción conservadora más extendida en el tratamiento de esta enfermedad. En la práctica clínica se utiliza en combinación con la RTU y la quimioterapia sistémica, no observándose una mejora en la evolución de los pacientes directamente relacionada con esta terapia (Smith y cols., 1997).

Las cifras de supervivencia observadas a los 5 años en pacientes tratados con radioterapia en exclusiva oscilan entre un 7% y un 35%, dándose los valores más elevados en los casos con estadios inferiores (Shipley y cols., 2003).

#### 1.2.6.3 Tratamiento de la enfermedad metastásica

##### 1.2.6.3.1 Quimioterapia sistémica

El CU es sensible a la quimioterapia, sobre todo cuando se aplica localmente (Nygren y cols., 1999). De forma sistémica, aunque su efectividad es más cuestionable, son muchos los fármacos citotóxicos con diversos mecanismos de acción que han mostrado actividad antitumoral significativa en pacientes con CU

diseminado, siendo los más activos el cisplatino, metotrexate, doxorubicina, vinblastina, gemcitabina, paclitaxel y docetaxel.

La quimioterapia sistémica se emplea en combinación con la cistectomía en diferentes vertientes:

- Como **terapia neoadyuvante**: la quimioterapia se administra precediendo a la cirugía. Da lugar a una retracción o disminución del estadio del tumor, disminuyendo a su vez el riesgo de márgenes quirúrgicos positivos en el momento de la cistectomía. Existen estudios en grandes cohortes que revelan una mejora en la supervivencia de los pacientes tratados bajo este esquema sólo del 5% (1999), mientras que otros trabajos llegan a mostrar una reducción en el riesgo de fallecimiento hasta en un 20% de pacientes con CU músculo-infiltrante, respecto al grupo de pacientes que son tratados únicamente con cistectomía (Grossman y cols., 2003).
- Como **terapia adyuvante**: en este caso la quimioterapia se administra después de la cistectomía. La decisión de emplearla depende del estadio patológico del tumor, aunque por el momento no está muy bien establecido qué pacientes se benefician más de esta terapia (Dimopoulos y Mouloupoulos, 1998; Boccardo y Palmeri, 2006). Diversos estudios retrospectivos han mostrado evidencias sobre la eficacia de la quimioterapia adyuvante en pacientes con ganglios linfáticos positivos para diseminación tumoral (Mills y cols., 2001; Madersbacher y cols., 2003; Konety y cols., 2003; Park y cols., 2007). No obstante, también existen trabajos en los que no se confirma el beneficio en la supervivencia de esta terapia adyuvante (Dimopoulos y Mouloupoulos, 1998; Vieweg y cols., 1999a; Herr, 2003c).

El beneficio de la quimioterapia sistémica neoadyuvante y adyuvante tampoco ha sido demostrado claramente cuando el CU se encuentra localizado en TUS (Zigeuner y Pummer, 2008).

Una tercera vertiente de quimioterapia sistémica no relacionada temporalmente con la cistectomía es la llamada **quimioterapia de rescate**. Ésta se utiliza de manera paliativa cuando la metástasis clínica ya está presente.

### 1.2.7 Pronóstico

El pronóstico de los pacientes con CU se determina principalmente mediante dos factores de riesgo independientes que son el **estadio patológico** y la **afectación ganglionar** (Antunes y cols., 2006). Sin embargo, otros parámetros clínicos y patológicos estándar que han demostrado ser útiles para predecir el pronóstico de los

pacientes con CU, sobre todo cuando se trata de los no músculo-infiltrantes, son los que se muestran a continuación (Millan-Rodriguez y cols., 2000b):

- El grado histológico
- Estadio clínico
- La presencia concomitante de carcinoma *in situ*
- El tamaño tumoral
- El tipo de arquitectura del tumor
- La multifocalidad
- La presencia de recidivas previas

De todos estos factores, el **grado histológico y el estadio clínico** son las variables pronósticas más empleadas para decidir el tratamiento y seguimiento del CU, aunque a menudo fallan en predecir la evolución de la enfermedad, especialmente en los carcinomas T1. Específicamente los casos T1G3 son un claro ejemplo de controversia a la hora de decidir el tratamiento. Para solventar este problema, se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se ha evaluado la capacidad que diversos tests de laboratorio tienen para predecir el curso del cáncer en pacientes individuales. Así, se ha evaluado la utilidad de diferentes marcadores pronósticos como son la detección de los antígenos de grupo sanguíneo ABH, del antígeno Lewis, del antígeno Thomsen-Friedenreich, de los antígenos asociados al carcinoma de células transicionales (M344, T138, 19A211, EMA) mediante anticuerpos monoclonales, de la actividad de la hialuronidasa, de moléculas de matriz extracelular y de adhesión celular (fibronectina, laminina, expresión de factores de crecimiento y sus receptores (receptor de EGF, TGF- $\beta$ 1, PDECGF), de marcadores de proliferación (Ki67, PCNA), etc (Walsh y cols., 2004).

La Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC, del inglés *European Organization for Research and Treatment of Cancer*) desarrolló en 2006 un análisis combinado de múltiples factores pronóstico, en el que se incluyeron 2596 pacientes con CU no músculo-infiltrante, con tal de establecer unas tablas dónde se indicara las probabilidades de recurrencia y progresión de los pacientes sometidos a RTU. Como resultado de este estudio se desarrolló un sistema que considera seis factores clínicos y patológicos: el número de tumores, tamaño del tumor, recurrencias previas, estadio, presencia de carcinoma Tis y grado.

En base a los parámetros considerados por la EORTC, los tumores no músculo-infiltrantes se pueden clasificar en aquellos que presentan un **alto riesgo de**

**recurrencia** (tumores múltiples, multirecurrentes o de más de 3 cm) y/o un **alto riesgo de progresión** (tumores T1, de algo grado y Tis). Por otro lado, los tumores de **bajo riesgo de recurrencia y progresión** son aquellos que son únicos, pequeños, con estadio clínico Ta de bajo grado y sin Tis asociado. Por último, entre los tumores de **riesgo intermedio** estarían incluidos aquellos clasificados como T1 de bajo grado.

Las probabilidades de recurrencia y progresión en un año según el sistema de la EORTC oscilan entre el 15-61% y entre <1-45%, respectivamente (Sylvester y cols., 2006). Este sistema está automatizado en un programa informático el cual está accesible gratuitamente en la página web:

<http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/default.htm>.

Tras la cirugía radical y la linfadenectomía, uno de los parámetros más fiables en la predicción de la supervivencia es el **número total de ganglios linfáticos extraídos**. Así, un mayor número de ganglios extraídos correlaciona con una mejor supervivencia, independientemente de la presencia o no de metástasis en ellos (Ghoneim y cols., 1997; Mills y cols., 2001; Stein y Skinner, 2003; Herr, 2003a). Pese a esta correlación reiterada por varios trabajos, no existe un consenso sobre el número de ganglios mínimo que tienen que ser extirpados para conseguir esta ventaja en la supervivencia (Leissner y cols., 2000; Herr y cols., 2002; Konety y cols., 2003).

Por otro lado, no sólo el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía es importante, sino también la **extensión** de la misma (Ghoneim y cols., 1997; Mills y cols., 2001; Stein y cols., 2001; Madersbacher y cols., 2003; Stein y cols., 2003; Herr, 2003b). Así, la realización de una linfadenectomía extensa (ver apartado 1.2.6.2.) correlaciona con un incremento en la supervivencia especialmente en aquellos pacientes con metástasis positivas en ganglios (Poulsen y cols., 1998; Herr, 2003c).

Un parámetro que considera la relación entre el número de ganglios positivos y el número de ganglios extraídos es la **densidad ganglionar**. Este índice ha demostrado ser el factor predictivo de recurrencia y supervivencia más potente utilizado actualmente (Herr, 2003b).

Otro tipo de factores como la presencia de mutaciones en el gen *FGFR3* se han asociado con un mejor pronóstico de la enfermedad (van Rhijn y cols., 2003). Concretamente, se ha visto que la concurrencia de mutaciones en este gen y la presencia adyacente de carcinoma *in situ* es poco frecuente (van Oers y cols., 2007). En cambio, la sobre-expresión por IHQ de P53 y Ki-67 es frecuente en aquellos tumores que presentan un carcinoma *in situ* adyacente, con lo que va asociada a un peor pronóstico (van Oers y cols., 2007). De todas maneras, aunque la expresión de

algunos de estos marcadores se haya podido relacionar significativamente con la progresión tumoral, todavía no se utilizan en la práctica clínica y no influyen las decisiones de tratamiento en pacientes individuales.

Es menor el número de estudios realizados respecto a los factores pronóstico de CU cuando se encuentra localizado en el TUS. Parece ser que algunos de los factores que influyen en el pronóstico de la evolución de estos tumores son la edad del paciente a la que se diagnosticó la enfermedad, la multiplicidad del tumor, la presencia de márgenes quirúrgicos positivos, la pérdida de expresión de E-caderina, el estadio y grado tumoral, siendo estos dos últimos factores los más estandarizados (Zigeuner y Pummer, 2008). La IHQ para E-caderina es necesaria especialmente en casos con tumor no músculo-infiltrante de bajo grado. Por otro lado, la detección por IHQ de Ki-67, marcador de proliferación celular, supone también un factor pronóstico de recurrencia tumoral aunque menos significativo que E-caderina. La detección por IHQ de survivina, P53, P27 y MSH2 no aportan información adicional sobre el pronóstico de esta enfermedad (Fromont y cols., 2005).

Recientemente Ohtsuka y colaboradores publicaron el valor pronóstico de la pérdida de expresión de UPIII analizada por IHQ, en los pacientes con CU en TUS (Ohtsuka y cols., 2006).

### **1.2.8 Asociación del carcinoma urotelial en el tracto urinario superior con el carcinoma urotelial vesical**

Los tumores localizados en el TUS están fuertemente asociados al CU vesical. Aproximadamente el 20-50% de pacientes con CU en el TUS desarrollarán un CU vesical a lo largo de su vida, aunque sólo entre un 0,7-4% de los pacientes con CU vesical desarrollaran un CU en el TUS (Kirkali y Tuzel, 2003).

Respecto a las recidivas vesicales, se ha observado que en la vejiga y uretra prostática de algunos de los pacientes con CU en el TUS existen cambios preneoplásicos microscópicos, especialmente cuando son de alto grado (Kakizoe y cols., 1980). La mayoría de estas recurrencias suelen darse dentro de los 2 primeros años después del tratamiento quirúrgico del CU, estando la media entre los 5 y los 15 meses posteriores (Kirkali y Tuzel, 2003; Raman y cols., 2005). La multifocalidad asociada al CU en esta localización, el estadio patológico, la historia de tumor vesical en el paciente y el procedimiento quirúrgico (como podría ser una ureterectomía distal incompleta) parecen ser los factores de riesgo más importantes para la recurrencia tumoral en la vejiga (Hisataki y cols., 2000; Raman y cols., 2005).

El alto índice de recidiva vesical derivada de un tumor en el TUS implica la necesidad de un riguroso seguimiento de los pacientes mediante cistoscopia, especialmente de aquellos con historia de tumor vesical.

En la situación contraria, la recurrencia en el TUS tras un tumor vesical, existe la hipótesis de que la presencia de reflujo vesico-ureteral juega un papel activo en la diseminación de células cancerosas desde la vejiga hasta el uréter y la pelvis (Amar y Das, 1985; Torres Mateos y cols., 1987). Los factores más importantes de predicción de recurrencia del tumor en el TUS son la multiplicidad del tumor vesical y el estadio Tis (Millan-Rodriguez y cols., 2000a; Rabbani y cols., 2001).

Finalmente, cabe destacar que los tumores localizados en el TUS suelen presentar mayor estadio y grado que los tumores vesicales, hecho que les confiere más agresividad y peor pronóstico (Stewart y cols., 2005).

## **1.2.9 Genética y biología molecular**

### **1.2.9.1 Citogenética del CU**

Al igual que en otros tumores sólidos, en el CU se dan frecuentemente aberraciones estructurales y numéricas de los cromosomas (aneuploidías, reordenaciones, deleciones, amplificación de genes, etc.), que se expanden de manera clonal entre las células del tumor, indicando así una inestabilidad genética. Estas alteraciones pueden dar lugar a nuevos genes de fusión o a cambios en la región reguladora de algunos genes, que pueden tener un impacto directo en el ciclo celular o en el control de la apoptosis. Las deleciones, duplicaciones, polisomías y monosomías también pueden tener un efecto importante en la dosis génica. Se hipotetiza que las células del epitelio precancerígeno ya presentan este tipo de alteraciones (Koss, 1979; Steidl y cols., 2002).

Los cambios cromosómicos que darán lugar al CU han sido estudiados en diversos trabajos. Algunos de ellos han revelado que en este tipo de tumor existen frecuentes alteraciones en gran número de cromosomas (1, 9, 7, 11, 17, entre otros) (Sandberg y Berger, 1994), siendo la pérdida del cromosoma 9 la alteración más común en el CU vesical (Dalbagni y cols., 1993; Shigyo y cols., 1998; Fadh-Elmula, 2005). En este cromosoma están contenidos varios locus que codifican para genes supresores de tumores como *CDKN2A* (codifica para la proteína P16), *TSC1* (codifica para TSC1) o *CDKN2B* (que codifica para P15), entre otros.

La trisomía del cromosoma 7 se ha relacionado con la recurrencia tumoral (Waldman y cols., 1991), mientras que la polisomía del 17 y ganancias del 8 se han

relacionado con un mayor grado y estadio, es decir, con la progresión tumoral (Sauter y cols., 1995; Pycha y cols., 1997).

En tumores no músculo-infiltrantes de bajo grado se ha comprobado que son infrecuentes las alteraciones genéticas del cromosoma 3 (Presti y cols., 1991). No obstante, este cromosoma se encuentra frecuentemente alterado en tumores de alto grado y músculo-infiltrantes (Presti y cols., 1991; Simon y cols., 2001; Gallucci y cols., 2005).

Además de polisomías, se han detectado deleciones cromosómicas frecuentemente asociadas al CU. Como ya se ha mencionado anteriormente, el cromosoma más frecuentemente delecionado es el 9 (Pycha y cols., 1997; Sauter y cols., 1997), aunque también se encuentran frecuentes deleciones en los cromosomas/regiones cromosómicas 2, 4p, 8p, 11p, 13q y 17p y 18q (Knowles y cols., 1994). Específicamente la región 17p, que contiene el gen *TP53*, se encuentra frecuentemente delecionada en el CU músculo-infiltrante. Deleciones de 4p también han sido asociadas a fenotipos tumorales más agresivos (Fadl-Elmula y cols., 2001).

Respecto al **CU localizado en el TUS**, aunque se han realizado escasos estudios citogenéticos en este tipo de tumor, su perfil citogenético parece ser similar al descrito en el CU vesical, lo que sugiere que estos tumores presentan un comportamiento biológico común y unas anomalías genéticas similares (Fadl-Elmula y cols., 1999; Kirkali y Tuzel, 2003). Concretamente, algunas de las alteraciones más frecuentes encontradas en este tipo de tumores son la ganancia de 1q, deleciones de 1p, 5q, 8p, 14q, y trisomías de los cromosomas 7 y 20. También es frecuente la pérdida parcial o total del cromosoma 9 (Dal Cin y cols., 1999; Fadl-Elmula y cols., 1999; Rigola y cols., 2001). Las únicas diferencias genéticas que parecen variar según la localización tumoral en el tracto urinario son las que comportan la inestabilidad de microsatélites (Catto y cols., 2003).

#### 1.2.9.2 Biología molecular del CU

En general, las lesiones moleculares que dan lugar a la formación de una neoplasia ocurren en las siguientes clases de genes reguladores:

- **Oncogenes:** estimulan el crecimiento celular.
- **Genes supresores de tumores:** inhiben el crecimiento descontrolado celular.
- **Genes reguladores de la apoptosis:** controlan la muerte celular programada.

Existe otra categoría de genes que también pueden considerarse como genes supresores de tumores, ya que regulan la reparación del DNA dañado con lo que



pueden solventar la lesión no letal de los tres grupos de genes mencionados anteriormente.

En el caso del CU la genética es compleja y, a diferencia de en otros tipos de tumores, no hay una vía definida de alteraciones que sirva como guía para el estudio de su evolución. Lo que sí que está claro es que el CU acumula un número importante de alteraciones genéticas en el momento del diagnóstico. Dichas alteraciones no sólo son más abundantes en lesiones músculo-infiltrantes que en las que no alcanzan el músculo, sino que además parecen ser distintas.

A continuación se detallan algunas características de los diferentes grupos de genes reguladores mencionados anteriormente y su relación con el CU.

#### 1.2.9.2.1 *Oncogenes y proto-oncogenes*

La principal función de las proteínas codificadas por los oncogenes es la transmisión de señales desde la superficie celular al citoplasma o al núcleo, así como la generación de una respuesta a dichas señales, a través de la fosforilación de moléculas diana y de inducir la transcripción del DNA. Las mutaciones en estos genes se consideran dominantes ya que sólo con que una copia se inactive es suficiente para desencadenar la transformación celular.

Los primeros oncogenes estudiados relacionados con el CU pertenecieron a la familia **RAS** (**H-RAS**, **K-RAS**, **N-RAS**). Estas proteínas juegan un papel clave en la transducción de señales intracelulares. La sobre-expresión de estos genes se puede dar a partir de alteraciones en su secuencia o de lesiones en proto-oncogenes (genes que activan la expresión de los oncogenes). De entre estos tres grupos de genes de la familia **RAS**, mutaciones en **HRAS** son las menos implicadas en el desarrollo del CU (Knowles y Williamson, 1993).

Otros oncogenes que se han encontrado sobre-expresados en el CU son **EGFR** y **ERBB2**, localizados en 7p y 17q, respectivamente. Estos genes codifican para proteínas que intervienen en la transmisión de señales del exterior al interior celular. Específicamente, la sobre-expresión de estos oncogenes se ha relacionado con el fenotipo músculo-infiltrante de los tumores vesicales (Knowles, 2001; Habuchi y cols., 2005; Wolff y cols., 2005).

Relacionado directamente con los oncogenes de la familia **RAS** se encuentra el gen **FGFR3**. En 1999 se describieron por primera vez mutaciones en este gen relacionadas con el CU (Cappellen y cols., 1999). Existe la hipótesis de que **FGFR3** actúa activando vías de señalización mediadas por **RAS**, siendo las mutaciones en

estos dos genes mutuamente excluyentes (Jebar y cols., 2005). También se ha visto que son excluyentes mutaciones en *FGFR3* y en el gen *TP53* (gen supresor de tumores que codifica para la proteína P53) lo que indica que intervienen en vías alternativas de desarrollo del carcinoma (Bakkar y cols., 2003; Hernandez y cols., 2005). La frecuencia de mutaciones en *FGFR3* es mayor en estadios no músculo-infiltrantes (70% de tumores pTa), en bajos grados (84% de tumores G1) y en papilomas uroteliales benignos (75%). En cambio, mutaciones en este gen son poco frecuentes en el carcinoma *in situ* (Billerey y cols., 2001).

**C-MYC**, localizado en 8q, es un oncogen que codifica una fosfoproteína nuclear. Entre las funciones de esta proteína se incluyen la de promover la replicación del DNA y la de regular la transición G0/G1 en el ciclo celular. Aunque la sobre-expresión de este gen no esté correlacionada con la progresión y/o supervivencia, parece presentarse con más frecuencia en tumores de alto estadio y grado (Lipponen, 1995; Kee y cols., 2001).

Por último, otro oncogen a destacar es **BCL-2**, localizado en 18q y que juega un papel fundamental en la inhibición de la apoptosis, con lo que influye inhibiendo la respuesta a la quimioterapia y radioterapia. Su sobre-expresión está asociada a fenotipos poco agresivos del tumor (Shiina y cols., 1996).

#### 1.2.9.2.2 Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores codifican para proteínas que básicamente controlan y regulan el ciclo celular. Las mutaciones en estos genes se consideran recesivas ya que ambas copias deben inactivarse para dar lugar a la transformación celular.

Los genes **TP53** y **RB1**, localizados en 17p y 13p y que codifican para las proteínas P53 y PRb, respectivamente, son los principales genes supresores de tumores ya que ejercen funciones claves en el control del ciclo celular. Así, por un lado, aproximadamente entre el 50-70% de los CUs músculo-infiltrantes o del alto grado presentan mutaciones somáticas en el gen supresor de tumores *TP53*. Estas mutaciones, en cambio, no son frecuentes en estados iniciales de la enfermedad (Fujimoto y cols., 1992). Por otro lado, se ha observado una pérdida de heterocigosidad en el locus de *RB1* en un 29-33% de los cánceres de vejiga, también con una mayor frecuencia en tumores músculo-infiltrantes (Cairns y cols., 1991), y mutaciones puntuales del mismo gen en aproximadamente el 27% de pacientes (Miyamoto y cols., 1995). El uso de ensayos que detectan la combinación de P53 y PRb mejora la predicción del pronóstico del CU, en comparación con la detección de

las mismas proteínas por separado. De hecho, existen estudios que demuestran una actividad cooperativa de P53 y PRb en la progresión del CU (Chatterjee y cols., 2004).

Otro de los genes supresores de tumores clave por su papel en la regulación del ciclo celular es **CDKN1A**, localizado en 6p y que codifica para la proteína p21. Es un gen supresor tumoral por su capacidad de unión e inhibición de la actividad fosforilasa de las quinasas dependientes de ciclinas que regulan el ciclo celular. Su expresión está regulada de manera directa por P53, siendo junto a ésta, mediador de la parada del ciclo celular cuando se produce un daño en el DNA. Estudios mediante inmunohistoquímica han mostrado que en el carcinoma *in situ*, la existencia de un fenotipo con ambas proteínas mutadas, P53 y P21, está relacionada con un mayor riesgo de recidiva, progresión y mortalidad (Llopis y cols., 2000; Shariat y cols., 2003).

Por último, caben destacar los genes **CDKN2A** y **CDKN2B**, codificantes para las proteínas P16 y P15, respectivamente, y localizados en la región 9p21, la cual se encuentra frecuentemente delecionada en estadios iniciales del CU (Orlow y cols., 1994). Estas proteínas son quinasas dependientes de las ciclinas que regulan el ciclo celular. Concretamente, la pérdida de expresión de P16, un inhibidor de la fosforilación de PRb y por lo tanto inhibidor del ciclo celular, parece presentar un efecto adverso sobre la evolución clínica y la recurrencia del tumor (Cote y Datar, 2003).

#### 1.2.9.2.3 Genes reguladores de la apoptosis

Uno de los principales genes relacionados con apoptosis y con el CU es **BIRC5**, localizado en 17q y que codifica para una proteína llamada **survivina**. Esta proteína es multifuncional ya que juega un papel clave en la inhibición de la apoptosis, interviene en la regulación del ciclo celular y promueve la angiogénesis. Se ha visto sobre-expresada en gran cantidad de tipos de tumores, y dada la diferencia tan marcada de expresión entre tejido tumoral y normal, ha sido estudiada como diana terapéutica (Altieri, 2003) y como marcador tumoral en el CU (Duffy y cols., 2007). El mecanismo por el cual inhibe la apoptosis no está claro, aunque sí que se conoce que lo hace por diferentes vías. Por otro lado, su papel en la proliferación celular se debe a que interviene en la estabilización de microtúbulos y la segregación de cromátidas hermanas en la mitosis (Yang y cols., 2004). Finalmente, el mecanismo por el cual promueve la angiogénesis está relacionado con la inhibición de la apoptosis en las células endoteliales que están formando la nueva vasculatura (Tran y cols., 2002).

Otro gen importante relacionado con la señalización en la apoptosis es el gen **FAS**. Mutaciones en este gen pueden limitar la muerte celular programada favoreciendo el desarrollo del CU (Lee y cols., 1999).

### 1.2.9.3 Vías moleculares de progresión del CU

El CU tiene un comportamiento bastante impredecible, ya que no todos los tumores fenotípicamente idénticos se comportan de la misma manera (Shahin y cols., 2003). Esta discrepancia de comportamientos ha llevado a pensar en la existencia de distintas vías de progresión de la enfermedad con distintos patrones de alteraciones genéticas. La información sobre la genética y la biología molecular del CU que se ha ido obteniendo desde hace años ha ayudado a hipotetizar diferentes modelos sobre el desarrollo de este tumor.

La gran mayoría de los estudios coinciden en que la delección del cromosoma 9, o al menos de su brazo p, suele ocurrir de manera temprana en el desarrollo del CU (Orlow y cols., 1994; Simoneau y cols., 1996). Sin embargo, existen diferentes teorías a cerca de la divergencia genética entre tumores músculo-infiltrantes y los no músculo-infiltrantes.

Por un lado, en 1992, Sandberg postulaba que existe una vía multifásica de desarrollo (Sandberg, 1992). En este modelo se explica la evolución de la carcinogénesis vesical como un proceso lineal de acumulación de alteraciones, donde el cromosoma 9 estaría asociado a estadios iniciales de la tumorigénesis, y posteriores alteraciones en los cromosomas 5, 18 y 6 serían clave para la progresión y metástasis de la enfermedad.

Otro de los modelos a tener en cuenta es el propuesto por Knowles en 1998 (Knowles, 1998). En éste se muestran dos vías que llevarían a la formación de carcinomas no músculo-infiltrantes con diferentes morfologías: uno sería Ta y el otro sería Tis. Mayoritariamente los que se desarrollan como Tis progresarían a la capa muscular, aunque también algunos Ta mediante la alteración de, entre otros genes, *TP53* evolucionarían a músculo-infiltrante. El orden de aparición de las alteraciones genéticas determinaría el fenotipo y la capacidad de progresión de estos tumores. Este modelo se basa en la importancia del papel de los genes supresores de tumores como *TP53* y *RB1*, y de su inactivación como suceso clave en la carcinogénesis.

También en 1998, Richter y colaboradores propusieron un modelo el cual está basado en resultados obtenidos por hibridación genómica comparada (Richter y cols., 1998). Según este modelo, la pérdida del cromosoma 9 y ganancias de 11q13 son significativamente más frecuentes en tumores papilares que en sólidos. Además, delecciones de 5q, 6q y 15q y ganancias de 5p, 7p y Xq se encuentran más frecuentemente en tumores T2-T4 que en T1, de manera que estos loci podrían contener genes importantes para la progresión del CU.

Höglund y colaboradores en 2001 propusieron un nuevo modelo en el que se muestran dos vías de desarrollo del CU (Höglund y cols., 2001). Una de ellas se iniciaría con la pérdida del cromosoma 9 y continuaría con las pérdidas de 11p y ganancias de 1q. Esta sería la vía que seguirían aquellos tumores que empiezan siendo Ta pero que después progresan a músculo-infiltrantes. Por otro lado, una segunda vía comenzaría con ganancias del cromosoma 7 y seguiría con pérdidas de 8p y ganancias de 8q. Esta vía presentaría una correlación con los estadios T1-T3. En pasos posteriores de ambas vías se darían alteraciones genéticas comunes, de manera que estas dos vías serían inicialmente independientes pero convergerían en estadios avanzados, cuando el número de alteraciones genéticas es muy elevado.

Finalmente, uno de los modelos más recientes es el propuesto por Wu en 2005, en el que se plantean también dos vías de evolución (Wu, 2005). Una de ellas se caracterizaría por mutaciones en *FGFR3* (70%) y en *H-RAS* (30-40%) al inicio de la carcinogénesis. Posteriormente y asociadas a progresión, se producirían deleciones en 8p, 11p, 13q y 14q. Una segunda vía, que caracterizaría a los tumores músculo-infiltrantes de alto grado, se originaría a partir de un carcinoma *in situ*, de una displasia severa, o bien *de novo*. La mayoría de los tumores que irían por esta vía tendrían mutaciones en *TP53* o en *RB1*. Además, el 50% de los tumores que seguirían esta vía generarían metástasis, por lo que sería necesaria la intervención de otros factores como alteraciones en moléculas de adhesión, en factores que intervienen en la angiogénesis, etc.

#### **1.2.10 Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico y estadiaje del CU**

Como se ha comentado anteriormente, el CU viene precedido de diversas lesiones secuenciales causadas por cambios genéticos. La creciente cantidad de información en los últimos años sobre estas alteraciones ha hecho que numerosos grupos trabajen en idear nuevas técnicas de diagnóstico y estadiaje que puedan mejorar y/o reemplazar la citología urinaria, la cistoscopia y/o el análisis histopatológico convencional. Sin embargo, aunque el diagnóstico ya se complementa en ocasiones con técnicas moleculares como la IHQ, el estadiaje molecular no se realiza todavía en la práctica clínica ya que ningún marcador molecular ha sido aprobado para tal utilidad.

Muchos de estos estudios se han basado en las células exfoliadas de la orina para identificar marcadores moleculares que puedan ser empleados en el diagnóstico del CU (Hu y cols., 2002; Quek y cols., 2004). Por otro lado, existen estudios basados en la detección de marcadores en tejido que permitan un diagnóstico más preciso

tanto de la enfermedad localizada como diseminada (Thykjaer y cols., 2001; Dyrskjot y cols., 2003).

En cualquier caso, la eficacia de un marcador tumoral dependerá de su capacidad para detectar precozmente la enfermedad de manera sensible y específica, orientar respecto a la toma de decisiones terapéuticas, monitorizar la respuesta al tratamiento y diagnosticar la recurrencia de la enfermedad.

Algunas de las técnicas moleculares que se han testado en búsqueda de estos marcadores se resumen a continuación agrupadas en dos categorías, según la naturaleza molecular del marcador que se está detectando (ácidos nucleicos o proteínas):

#### 1.2.10.1 Técnicas basadas en ácidos nucleicos: DNA y RNA

No existe duda de que el CU, así como el resto de neoplasias, se debe a la acumulación de alteraciones genéticas que acaban afectando a genes que regulan tanto la división como la muerte celular. Las alteraciones que más frecuentemente ocasionan la neoplasia pueden suponer marcadores de la enfermedad, de manera que su detección podría ser clave no sólo en el diagnóstico del CU, sino en su pronóstico (Knowles, 2001; Williams y cols., 2001).

Para la detección de estos marcadores se han utilizado diversas técnicas moleculares. Dos de ellas, la **hibridación *in situ* fluorescente** y el **análisis de la expresión génica**, se describen más detalladamente en los apartados 1.2.10.1.1 y 1.2.10.1.2, respectivamente, ya que han sido básicas en la realización de este proyecto. Otras de las técnicas que permiten en cierta manera el análisis del genotipo y fenotipo celular, y que por tanto servirían para proporcionar un diagnóstico molecular de la enfermedad, se describen brevemente a continuación:

- **Análisis de polimorfismos:** diversos trabajos se han basado en el estudio de algunos tipos de polimorfismos como los SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphism*) o los microsatélites (repeticiones en tándem de 1-6 nucleótidos) en células descamadas de la orina como método no invasivo de diagnóstico del CU (Mao y cols., 1996; Amira y cols., 2002; Hoque y cols., 2003). El análisis de microsatélites permite detectar, además, la pérdida de heterocigosidad (LOH) (del inglés *loss of heterocigosity*) de regiones cromosómicas que se delecionan de manera frecuente en el proceso de la carcinogénesis, como por ejemplo la región 17p13.1, donde se encuentra localizado el gen *TP53*. La sensibilidad de este tipo de análisis está limitada por la existencia de procesos inflamatorios que acompañan al tumor y que también presentan inestabilidad en estos polimorfismos,

por la necesidad de emplear muchos marcadores diferentes al mismo tiempo y/o por la laboriosidad de la técnica. Estos condicionantes han limitado su incorporación a los protocolos asistenciales rutinarios (Mao y cols., 1996; van Rhijn y cols., 2001; Zhang y cols., 2001).

- **Citometría de flujo:** es una técnica que indica la presencia de poliploidía en una población celular. El análisis de muestras de orina por este método apunta a que la presencia de células tetraploides o aneuploides indican un riesgo mayor de progresión del tumor. Sin embargo, alteraciones genéticas en cromosomas específicos son indetectables por esta técnica lo que limita su utilidad en la práctica clínica (Wheless y cols., 1993; Bittard y cols., 1996).
- **Análisis mutacional:** este tipo de análisis se realiza básicamente mediante secuenciación directa. La secuenciación es un método robusto mediante el cual se detectan mutaciones en genes como *FGFR3*, que permiten identificar aquellos tumores papilares con bajo potencial de malignidad. A diferencia del estadiaje y gradación patológicos, este método es 100% reproducible, ya que no implica variedad interobservador (Rieger-Christ y cols., 2003). Mutaciones en otros genes como *TP53* y *H-RAS* detectadas en células descamadas en la orina también han sido relacionadas con el diagnóstico y la evolución del CU (Fitzgerald y cols., 1995; Schlichtholz y cols., 2004).
- **Análisis de metilación de promotores:** la hipermetilación de algunos promotores génicos se considera una alteración epigenética que produce represión transcripcional debido a un cambio estructural de la cromatina, que la hace inaccesible a los factores de transcripción. De esta manera, se pueden inactivar genes supresores de tumores como *RB*, *P16INK4a* y *P14ARF*. La hipermetilación puede ser estudiada mediante una variante de la PCR, la MSP (del inglés, *methylation specific PCR*). Un ejemplo de gen supresor de tumores en que se ha observado una disminución de su expresión en el CU debido a la metilación de su promotor es el gen *RASSF1A* (Lee y cols., 2001).
- **Determinación de la actividad de la telomerasa:** los telómeros son secuencias de DNA que se encuentran en los extremos de los cromosomas y que se van acortando con las divisiones celulares. La pérdida de los telómeros lleva a la senescencia celular. Así como en el resto de neoplasias, las células tumorales del CU expresan telomerasa, una enzima capaz de mantener la longitud de los telómeros evitando esta senescencia (Lin y cols., 1996). En base a este proceso, se ha visto que la determinación de la actividad de la enzima telomerasa mediante

un protocolo de amplificación (TRAP, del inglés, *telomeric repeat amplification protocol*) muestra una sensibilidad y especificidad del 90% y del 88%, respectivamente, en la detección del CU (Sanchini y cols., 2005). No se ha probado la utilidad de dicho marcador en el seguimiento de la enfermedad.

#### 1.2.10.1.1 Hibridación *in situ* fluorescente

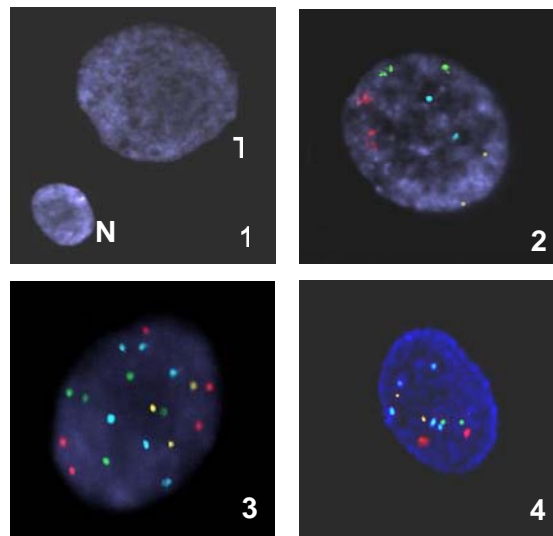
La hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés, *Fluorescent in situ hybridization*) es una técnica que permite la localización de determinadas secuencias de DNA en una extensión celular, permitiendo así la detección de cambios numéricos y/o estructurales en estas regiones. Esta tecnología utiliza sondas de DNA marcadas con un fluorocromo las cuales se hibridarán sobre células tanto en interfase como en metafase.

Existen dos tipos generales de sondas que se utilizan en la FISH: las sondas de enumeración cromosómica (o CEPs, del inglés, *chromosome enumeration probes*) y las sondas locus-específicas (o LSIs, del inglés, *locus-specific indicators*). Las CEPs son sondas diseñadas para ser hibridadas sobre el centrómero de manera que permiten la determinación del número de copias de un determinado cromosoma en una célula. CEPs para diferentes cromosomas combinadas en mezclas multisonda pueden proporcionar información muy interesante sobre la aneusomía celular.

Las sondas LSIs, en cambio, están diseñadas para ser hibridadas sobre locus específicos, generalmente en búsqueda de alteraciones en el número de copias de uno o varios genes de interés.

Básicamente la metodología de la FISH consiste en desnaturalizar el DNA, hibridarlo con la sonda de interés marcada y leer la señal en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas son similares a las de la figura 9.





**Figura 9:** Imágenes de FISH con sondas de regiones pericentroméricas en los cromosomas 3(●), 7(●) y 17(●) y locus específica en la región 9p21 (●); 1- Núcleos interfásicos teñidos con DAPI de una célula con morfología tumoral (T) en comparación con el de una célula epitelial normal (N); 2- Núcleo interfásico diploide para los cromosomas estudiados; 3- Núcleo en interfase polisómico para todos los cromosomas estudiados; 4- Núcleo en interfase con polisomía en el cromosoma 17. Imágenes obtenidas a partir de muestras reales analizadas este trabajo.

Ya hace bastantes años desde que esta técnica se empezó a utilizar para la detección de alteraciones genéticas en el CU (Ramaekers y Hopman, 1993; Wheelless y cols., 1994; Cajulis y cols., 1995; Pycha y cols., 1997; Sauter y cols., 1997; Acar y cols., 2003). En un trabajo más reciente por Sokolova y colaboradores en el año 2000, se buscó la combinación de las alteraciones más frecuentes en el CU, con el fin realizar un ensayo sensible y específico para el diagnóstico del CU mediante FISH. Como regiones candidatas a estudiar se incluyeron sondas CEPs para los cromosomas Y, 3, 7, 8, 9, 11, 15, 17 y 18, y una sonda LSI para la región 9p21. Como resultado de este trabajo se estableció que la detección de 4 alteraciones citogenéticas mediante 3 CEPs para los cromosomas 3, 7, y 17, y una LSI específica para la región 9p21, era la combinación con mayor rentabilidad diagnóstica del CU, tanto en sensibilidad como en especificidad. Además de la selección de sondas, se estableció un **criterio de positividad** que consistía en la detección de 5 o más núcleos con polisomía en 2 o más cromosomas diferentes, o en la detección de 10 o más núcleos con polisomía en uno de los cromosoma marcados, o finalmente en la detección de una delección homocigota para la región 9p21 (como única alteración) en

el 50% o más de las células evaluadas (Tabla 10). La combinación de sondas evaluadas bajo este criterio presentó una sensibilidad del 86,8% y una especificidad del 91,8% en la detección del CU a partir de muestras de orina por micción espontánea (Sokolova y cols., 2000). A partir de estos resultados se desarrolló un kit comercializado con el nombre de *Urovysion Bladder Cancer Recurrence Kit* por parte de la casa comercial *Vysis, Inc.* (que actualmente forma parte de la empresa Laboratorios Abbott), el cual fue aprobado por la americana *Food and Drug Administration* (FDA) en 2001 para su uso en la práctica clínica.

Varios estudios han testado la utilidad de este ensayo basado en la técnica FISH tanto para el diagnóstico inicial del CU vesical como de sus recidivas (Halling y cols., 2000; Bubendorf y cols., 2001; Placer y cols., 2002; Sarosdy y cols., 2002; Halling y cols., 2002). Algunos de ellos, como el de Bubendorf en 2001 o el de Halling en 2002 modificaron ligeramente el criterio de positividad en sus series de pacientes con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica (Tabla 4).

**Tabla 4:** Criterios de positividad del kit UroVysion establecidos por diferentes grupos.

<b>Criterios de positividad</b>	
Sokolova y cols., 2000	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ ≥ 5 núcleos con polisómia en 2 o más cromosomas (3, 7 y/o 17)</li> <li>▶ &gt; 50 % núcleos con pérdida de las 2 señales de 9p21 (sin ninguna otra anomalía)</li> </ul>
Halling y cols., 2000	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ ≥ 5 núcleos con polisómia en 2 o más cromosomas (3, 7 y/o 17)</li> </ul>
Bubendorf y cols., 2001	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ &gt; 2 núcleos con alguna anomalía (ganacia en los cromosomas 3, 7, 9 y/o 17; pérdida de 1 o 2 copias de 9p21)</li> <li>▶ &gt; 5 núcleos tetraploides (4 señales de cada cromosoma)</li> </ul>
Halling y cols., 2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ ≥ 5 núcleos con polisómia en 2 o más cromosomas (3, 7 y/o 17)</li> <li>▶ ≥ 10 núcleos con ganancias en 1 de los cromosomas 3, 7 y/o 17</li> <li>▶ &gt;20% núcleos con pérdida de las 2 señales de 9p21</li> </ul>
Kit UroVysion (prospecto)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ ≥ 4 núcleos con polisómia en 2 o más cromosomas (3, 7 y/o 17), de una evaluación mínima de 25 núcleos con morfología tumoral</li> <li>▶ ≥ 12 núcleos de 25 con morfología tumoral sin ninguna señal de 9p21</li> </ul>

Algunos de estos trabajos también evaluaron la utilidad del kit en muestras de lavado vesical (Bubendorf y cols., 2001). A continuación se detalla una tabla que resume los resultados de sensibilidad y especificidad en las diferentes series de pacientes incluidos en estos trabajos (Tabla 5).



Esta técnica también ha sido evaluada como herramienta de predicción de recidivas tumorales de forma independiente (Bollmann y cols., 2005; Zellweger y cols., 2006; Gudjonsson y cols., 2007; Yoder y cols., 2007; Gofrit y cols., 2008) o en combinación con la citología urinaria (Daniely y cols., 2007), así como para acabar de dictaminar un diagnóstico en aquellas muestras con un resultado sospechoso de la citología urinaria (Skacel y cols., 2003; Lotan y cols., 2008). Una de las más recientes aplicaciones para la que se ha evaluado esta técnica ha sido la comprobación de la efectividad de la terapia BCG en los pacientes con alto riesgo de recurrencia y/o progresión tumoral (Kipp y cols., 2005).

#### 1.2.10.1.2 Análisis de la expresión génica

Las células tumorales presentan un patrón de expresión génica diferente al de las células normales del mismo tejido. Además, este patrón de expresión varía en función del subtipo de tumor. Así, el análisis de la expresión génica no sólo puede permitir el diagnóstico de la enfermedad sino la caracterización de la misma.

En el presente trabajo, las técnicas utilizadas para estudiar la expresión génica han sido las siguientes: **transcripción reversa** (RT, del inglés, *reverse transcription*), **PCR cuantitativa a tiempo real** (qPCR, del inglés, *quantitative polymerase chain reaction*) y **microarrays de expresión**.

La **transcripción reversa** consiste en convertir el RNA mensajero (RNAm) a DNA copia (cDNA), para que así pueda ser amplificado mediante PCR. Este procedimiento en conjunto es comúnmente conocido como **RT-PCR**. Cuando en vez de una amplificación por PCR se realizan dos, de manera que en la segunda se amplifica un fragmento contenido en la secuencia amplificada en primer lugar, la técnica recibe el nombre de **nested RT-PCR**.

Por si solas estas técnicas han sido testadas en la detección de marcadores moleculares en orina y tejido para el diagnóstico del CU (Okamoto y cols., 1998; Leach y cols., 2000; Smith y cols., 2001; Okegawa y cols., 2003; Retz y cols., 2003). Algunas características de estos estudios se detallan en la tabla 7.

**Tabla 7:** Selección de trabajos en la literatura basados en la detección de marcadores moleculares en orina, lavado vesical o tejido mediante RT-PCR o *nested* RT-PCR, para el diagnóstico del CU. N: número de pacientes estudiados.

<b>Autores</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>N</b>	<b>Técnica</b>	<b>Marcador</b>	<b>Sensib. (%)</b>	<b>Especif. (%)</b>
Okamoto y cols., 1998	orina	20	RT-PCR	<i>CD44v8-10</i>	75	100
Klein y cols., 1998	orina	73	RT-PCR	<i>KRT20</i>	91	67
Klein y cols., 1998	orina	68	RT-PCR	<i>CGbeta</i>	42,6	100
Rotem y cols., 2000	orina	95	RT-PCR	<i>KRT20</i>	86,7	96,7
Leach y cols., 2000	lavado vesical	21	RT-PCR	<i>Hmsh2</i>	81	76,9
Smith y cols., 2001	orina	46	RT-PCR	<i>Survivina</i>	100	95
Cassel y cols., 2001	orina	44	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20</i>	81,8	55,17
Chiu y cols., 2002	tumor	80	RT-PCR	<i>HURP</i>	88,8	100
Okegawa y cols., 2003	orina	65	<i>nested</i> RT-PCR	<i>MUC7</i>	68	100
Retz y cols., 2003	orina	50	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20</i> <i>MUC7</i>	78 66	36 80
Melissourgos y cols., 2003	orina	146	RT-PCR	<i>hTERT</i>	92	96
Wang y cols., 2004	orina	30	RT-PCR	<i>Survivina</i>	80	100
Bowles y cols., 2004	orina	43	RT-PCR	<i>hTERT</i>	95	93,5
Ziaee y cols., 2006	orina	20	RT-PCR	<i>Survivina</i>	90	50
Moussa y cols., 2006	orina	161	RT-PCR	<i>Survivina</i>	79	93

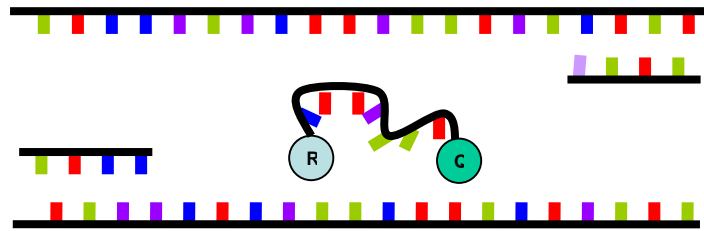
Por otro lado, la **qPCR** es una de las tecnologías más utilizadas en los últimos años para realizar análisis de expresión de uno o de diversos genes de interés. Además, esta técnica también se puede utilizar para el análisis de polimorfismos como SNPs y microsatélites. Cuando antes de la qPCR se realiza una RT recibe el nombre de **qRT-PCR** (del inglés, *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*), y es una técnica ampliamente utilizada en estudios de expresión génica.

Algunas de las principales ventajas de esta técnica respecto a otras tecnologías más tradicionales en el estudio de la expresión génica (como el *Northern Blot*) son: (1) la necesidad de disponer de muy poco material de partida (10 pg de cDNA), (2) la posibilidad de detectar, a tiempo real, y de una manera cuantitativa la amplificación de

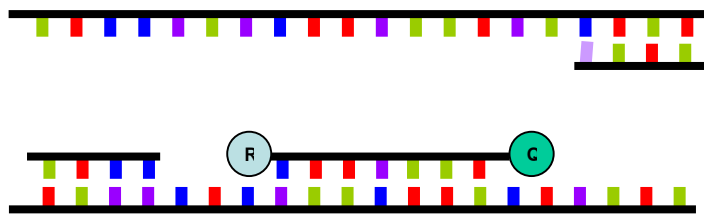
los genes de interés, (3) la obtención rápida (~2 horas) de los resultados, y (4) el hecho de que el método de detección sea fluorescente y por lo tanto no contaminante.

Los dos sistemas de qRT-PCR más utilizados, según el método de detección de la amplificación, son los basados en *SYBR Green* y los basados en sondas *TaqMan*. El método basado en *SYBR Green* consiste en la incorporación a la reacción de una molécula fluorescente capaz de unirse al surco menor de la doble hélice de DNA. Así, a medida que se va produciendo la amplificación y va aumentando el número de moléculas de doble cadena, también va aumentando la fluorescencia emitida. Sin embargo, en el presente trabajo se ha utilizado el método de sondas *TaqMan*. Estas sondas consisten en un fragmento de DNA de 10-12 nucleótidos, complementario al DNA que queremos amplificar, y que llevan adheridas en el extremo 5' una molécula fluorescente (*reporter*) y en el 3' una molécula que impide la emisión de esta fluorescencia (*quencher*), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por la actividad exonucleasa 5'→3' de la DNA *Taq* polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del *quencher* y emite fluorescencia al ser excitada mediante un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando. La fluorescencia emitida en en cada ciclo de amplificación queda registrada en un programa informático conectado al instrumento de PCR. Así, esta metodología implica una amplificación selectiva (al igual que la PCR normal), altamente específica, ya que incorpora un factor más de especificidad con respecto a la PCR normal y al método *SYBR Green* (la sonda marcada situada entre los dos cebadores), y que ofrece un registro a tiempo real de la amplificación, lo que nos permite cuantificar los productos de expresión en cuestión. En la figura 10 se muestra un esquema del funcionamiento de este sistema de amplificación.

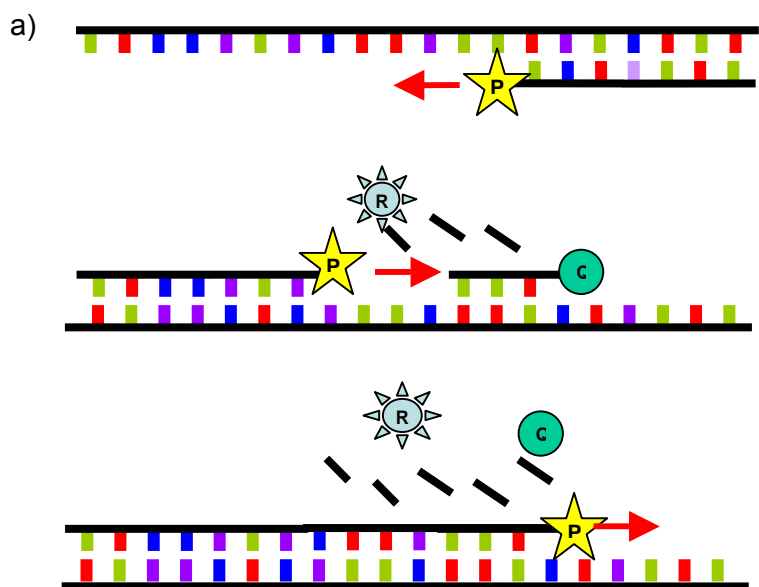
## 1) Desnaturalización



## 2) Hibridación de los cebadores y la sonda

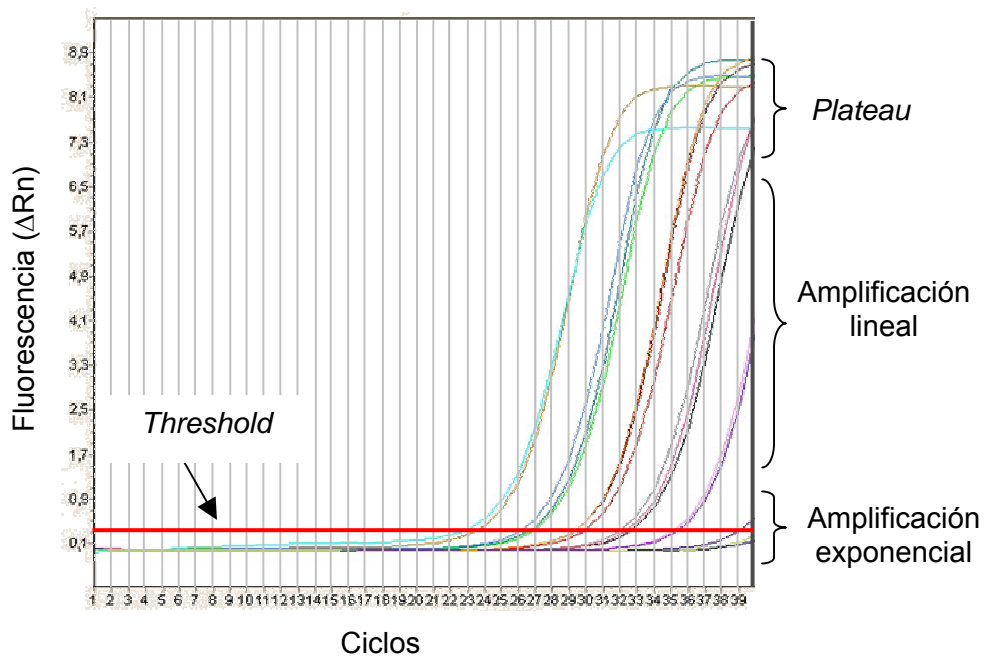


## 3) Extensión



**Figura 10:** Esquema del funcionamiento de la qPCR con sondas *TaqMan*. R: *reporter*, Q: *quencher*, P: DNA *Taq* polimerasa. 1) En primer lugar se desnaturalizan las cadenas de DNA presentes en la reacción. 2) Posteriormente, se da lugar al anillamiento o hibridación de los cebadores y de la sonda a la región complementaria en el DNA molde. 3) Finalmente, la *Taq* polimerasa empieza la extensión. Durante ésta, ejerce una actividad exonucleasa 5'→3' de manera que al encontrar la sonda la degrada. Una vez el *reporter* queda libre, la fluorescencia emitida es indicativa de que se ha producido un ciclo de amplificación.

Una vez finalizada la reacción, el programa informático crea unas curvas de amplificación donde quedan reflejados los valores de fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) en cada ciclo de la PCR. A partir de este gráfico, se establece para cada gen un valor de fluorescencia umbral (o *Threshold*) en la fase exponencial de la amplificación (Figura 11). Para cada muestra, se establecerá un  $C_T$  (del inglés *Cycle Threshold*) correspondiente al número de ciclo en el que la fluorescencia emitida cruza el *Threshold* establecido. Así, los valores de  $C_T$  son inversamente proporcionales a la cantidad de cDNA (o RNA) en la muestra.



**Figura 11:** Perfil de las curvas de amplificación por qPCR.

En un estudio de expresión, además de los genes de interés, será necesario amplificar un gen control endógeno (o *housekeeping*) para normalizar la cantidad de cDNA en la reacción. Este gen referencia tiene que cumplir la condición de expresarse de manera estable en los diferentes tejidos de estudio sin que su expresión esté afectada por la situación “problema” (p.ej. presencia de tumor). Así, el control endógeno a utilizar dependerá del tipo de muestra con la que se trabaje.

La qRT-PCR también ha sido aplicada en diversos trabajos que pretendían detectar marcadores moleculares que proporcionasen un diagnóstico, estadiaje y/o pronóstico eficaz del CU. Algunos de ellos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 8).



**Tabla 8:** Selección de trabajos en la literatura basados en la detección de marcadores moleculares mediante qRT-PCR para el diagnóstico y/o estadiaje y/o pronóstico del CU; N: número de pacientes estudiados; \*: número de marcadores estudiados. Ver artículo original para más detalle.

<b>Autores</b>	<b>Muestra</b>	<b>Marcadores</b>	<b>N</b>
de Kok y cols., 2000	tumor	<i>hTERT</i>	35
Inoue y cols., 2001	orina	<i>KRT20</i>	47
Christoph y cols., 2004	orina, lavado vesical, tumor, urotelio normal	<i>KRT20</i>	33
Amira y cols., 2004	tumor, urotelio normal	65*	30
Kurahashi y cols., 2005	ganglios linfáticos	<i>KRT19</i>	40
		<i>UPK2</i>	40
Weikert y cols., 2005	orina	<i>Survivina</i>	53
msellem-Ouazana y cols., 2006	tumor	15*	73
Christoph y cols., 2006	orina	<i>KRT20</i>	56
Kenney y cols., 2007	orina	<i>Survivina</i>	74
Schultz y cols., 2007	tumor	23*	44
Holyoake y cols., 2008	orina	no concretados	75

Aunque la qRT-PCR sea un método altamente sensible, puede que los niveles de expresión de los genes de estudio estén por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica, o que no se disponga de suficiente cDNA para realizar todos los estudios necesarios. Para solventar estos problemas, se ha desarrollado recientemente un nuevo método de **preamplificación del cDNA** que permite preamplificar específicamente los genes para los que luego se realizará la qRT-PCR. Actualmente se comercializa la *TaqMan preAmp Master Mix*, por la casa comercial Applied Biosystems, que incluye todos los componentes necesarios para esta reacción de preamplificación (Noutsias y cols., 2008; Mengual y cols., 2008).

Todas estas técnicas moleculares no sólo se han testado para el diagnóstico de la enfermedad vesical local sino también para la detección temprana de su diseminación en diversos tejidos extravesicales. De hecho, métodos basados en PCR han demostrado más sensibilidad en la detección de la diseminación linfática de diversos tumores que otras técnicas como la IHQ (Sato y cols., 2001). Algunos de estos trabajos se resumen en la tabla 9.

**Tabla 9:** Selección de trabajos en la literatura basados en la detección de marcadores moleculares indicativos de diseminación tumoral del CU. SP: Sangre periférica; GL: ganglios linfáticos; MO: médula ósea; N: número de pacientes incluidos en el estudio.

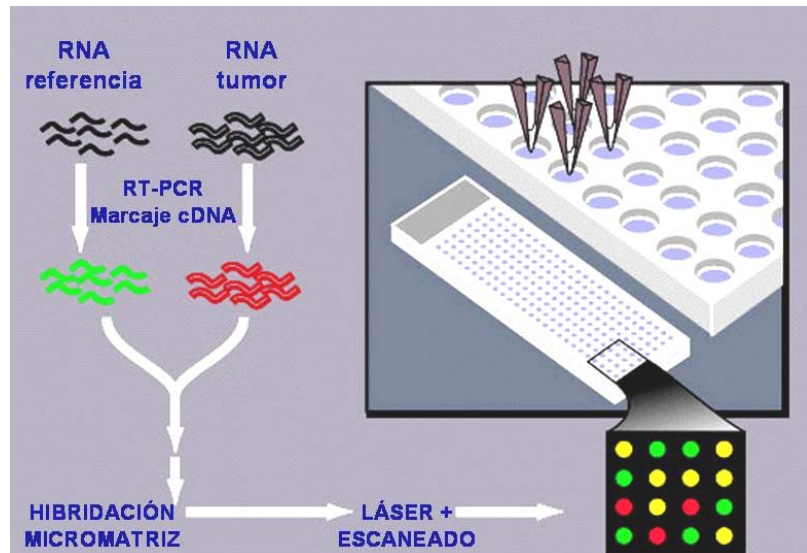
<b>Autores</b>	<b>Muestra</b>	<b>N</b>	<b>Técnica</b>	<b>Marcador/es</b>	<b>Seguimiento</b>
Fujii y cols., 1999	SP	40	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20</i>	no realizado
Li y cols., 1999	SP	60	RT-PCR	<i>UPK2</i>	no realizado
Lu y cols., 2000	SP	56	<i>nested</i> RT-PCR	<i>UPK2</i>	no realizado
Gudemann y cols., 2000	SP	49	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20</i>	no realizado
Seraj y cols., 2001	GL	27	RT-PCR	<i>UPK2</i>	no realizado
Retz y cols., 2001	SP	29	RT-PCR	<i>KRT20</i>	no realizado
	MO	29	RT-PCR	<i>KRT20</i>	no realizado
Gazzaniga y cols., 2001	SP	27	<i>nested</i> RT-PCR	<i>EGFR, UPK2, KRT19, KRT20</i>	20 meses
Seraj y cols., 2001	GL	19	RT-PCR	<i>UPK2</i>	no realizado
Soria y cols., 2002	SP	30	PCR-ELISA	Telomerasa	no realizado
Retz y cols., 2004	GL	25	RT-PCR	<i>MUC7</i>	no realizado
Kinjo y cols., 2004	MO	38	<i>nested</i> RT-PCR	<i>MUC7</i>	no realizado
Okegawa y cols., 2004	SP	108	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20, UPK2</i>	36 meses
Ribal y cols., 2006	SP	57	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20</i>	no realizado
	MO	25	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20</i>	no realizado
	GL	54	<i>nested</i> RT-PCR	<i>KRT20</i>	no realizado
Kurahashi y cols., 2005	GL	40	RT-PCR cuantitativa	<i>KRT19, UPK2</i>	22 meses
Kurahashi y cols., 2005	GL	21	RT-PCR	<i>KRT20, UPK2</i>	no realizado

El método por excelencia que permite el análisis de miles de genes en un solo experimento es el de los **microarrays de DNA**. La tecnología de microarrays ha mostrado su utilidad en una gran variedad de aplicaciones como el genotipado de SNP's, el análisis de mutaciones, la identificación de factores de transcripción o el estudio de alteraciones genéticas estructurales mediante hibridación genómica comparada en formato de *microarrays* (Holloway y cols., 2002). Sin embargo, la variante más extendida de esta técnica son los **microarrays de expresión (de cDNA o de oligonucleótidos)**, los cuales permiten el análisis del perfil de expresión de miles

de genes en un determinado tejido y en un único experimento (Barrett y Kawasaki, 2003). En las enfermedades neoplásicas esta técnica es de gran ayuda para identificar aquellos genes que tienen una expresión diferencial en el tumor respecto al tejido normal.

El principio fundamental de esta técnica es la hibridación de ácidos nucleicos, la cual se basa en la complementariedad de sus bases nitrogenadas. El material obtenido de la muestra problema, convenientemente tratado y marcado (p. ej. mediante fluorescencia) se pone en contacto con una micromatriz donde se encuentran inmovilizados fragmentos de cDNA (de entre 100 y 3000 nucleótidos), u oligonucleótidos (porciones de DNA sintético de cadena simple de entre 25 y 80 nucleótidos), correspondientes a miles de genes. Se dará lugar a una hibridación en aquellas posiciones en que se complemente con las sondas.

Más concretamente, en el caso de los **microarrays de cDNA**, las matrices contienen pequeños fragmentos de cDNA de doble cadena obtenidos por PCR de DNA clonado previamente en una librería genómica. La hibridación de estos arrays se realiza con una mezcla de cDNA de dos muestras (una “referencia” y otra “problema”). Este diseño experimental también se conoce como “hibridación con dos colores”, ya que las muestras que se cohibridan están marcadas con fluorocromos diferentes. La hibridación dará lugar a una competencia entre las moléculas de procedencia distinta de manera que al medir la intensidad de fluorescencia de los dos fluorocromos se obtendrá información de los cambios en la expresión de la muestra “problema” respecto a la “referencia”. Este procedimiento se encuentra esquematizado en la figura 12.



**Figura 12:** Tecnología de *microarrays* de cDNA. El cDNA referencia se marca en verde y el cDNA del tumor en rojo. Una vez escaneada la micromatriz, los puntos verdes indicarían una infra-expresión de unos determinados genes en la muestra tumoral respecto a la muestra referencia; los puntos rojos corresponderían a genes sobre-expresados en la muestra tumoral, respecto a la muestra referencia; los puntos amarillos indicarían una expresión equivalente en ambas muestras.

Por otro lado, una de las principales plataformas especialistas en la fabricación de **microarrays de oligonucleótidos** es Affymetrix. Esta empresa empezó a desarrollar *arrays* a finales de los 80, utilizando técnicas de fotolitografía ya utilizadas en la industria microelectrónica. Así, son capaces de fabricar de manera automatizada *arrays* con cientos de miles de sondas de oligonucleótidos sobre portaobjetos de vidrio. La estrategia utilizada comienza por la modificación de los portaobjetos que harán de sustrato (cubriéndolos con moléculas que permitan la unión de diferentes compuestos). Posteriormente, se saturan los lugares de unión con moléculas fotolábiles. Estas moléculas se desplazan selectivamente (mediante plantillas) al ser excitadas con luz, y a los lugares de unión ahora desprotegidos en el portaobjetos se unen nucleótidos que llevan unido en su extremo otro grupo fotolábil. De esta manera, se repiten una serie de ciclos de fotodesprotección selectiva y adición de nucleótidos, dando lugar a secuencias de oligonucleótidos de unos 25 bp. Para cada gen se sintetizan varias parejas de oligonucleótidos (cada pareja constituida por un oligonucleótido con la secuencia original y el otro con un único nucleótido cambiado respecto a la secuencia original). Este proceso permite determinar la tasa de hibridación específica e inespecífica para cada gen estudiado.

En el caso de los *microarrays* de oligonucleótidos, el proceso de hibridación se basa en un único fluorocromo ("hibridación con un color"). El material de partida es el RNA total de la muestra, el cual se pasa a cDNA de doble cadena y posteriormente a cRNA, que se marca con biotina. El transcrito se fragmenta y se incluye en una solución de hibridación que contiene sustancias bloqueantes (albúmina sérica bovina o esperma de salmón). El *microarray* se hibrida con esta solución durante unas 16 horas y posteriormente se incuba con estreptavidina, molécula afín a la biotina y que a su vez está conjugada con un fluorocromo. Finalmente, el *microarray* se escanea obteniéndose una imagen que refleja la intensidad de fluorescencia emitida (que dependerá de la expresión de cada sonda), la cual se analiza con un software especializado.

Los datos resultantes de un experimento de *microarrays* consisten generalmente en una matriz de valores numéricos que hacen referencia al nivel de expresión de los diferentes genes. Debido a la complejidad de estas matrices, se hace imprescindible el uso de programas especializados que faciliten el análisis de estos resultados. Los resultados obtenidos permitirán establecer grupos de genes diferencialmente expresados entre la muestra y la referencia, los cuales se podrían asociar a determinados fenotipos clínicos y biológicos.

Diversos estudios basados en *microarrays* han sido realizados para la búsqueda de marcadores moleculares que puedan ser utilizados en el diagnóstico del CU. Algunos de ellos se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10:** Selección de trabajos en la literatura basados en la detección de marcadores moleculares para el diagnóstico/pronóstico del CU mediante *microarrays* de expresión. N genes: número de genes analizados en el *array*. -: información no disponible.

<b>Autores</b>	<b>Muestra</b>	<b>Tipo microarray</b>	<b>N genes</b>
Sanchez-Carbayo y cols., 2002	lineas celulares CU	cDNA	8976
Ying-Hao y cols., 2002	tejido	cDNA	12800
Dyrskjot y cols., 2003	tejido	oligonucleotidos	4416
Sanchez-Carbayo y cols., 2003	tejido	cDNA	17842
Modlich y cols., 2004	tejido	cDNA oligonucleotidos	1185 22283
Dyrskjot y cols., 2005	tejido	oligonucleotidos	59619
Sanchez-Carbayo y cols., 2006	tejido	oligonucleotidos	22283
Osman y cols., 2006	sangre periférica	oligonucleotidos	2142
Elsamman y cols., 2006	tejido	cDNA	14551
Ito y cols., 2007	tejido	oligonucleotidos	14069
Dyrskjot y cols., 2007	tejido	oligonucleotidos	-
Sanchez-Carbayo y cols., 2007	tejido	oligonucleotidos	22283

#### 1.2.10.2 Técnicas basadas en proteína

La falta de sensibilidad de la citología urinaria en lesiones de bajo grado, y de la cistoscopia en lesiones planas, ha dado lugar al desarrollo de técnicas basadas en la detección de proteínas (factores de crecimiento, complejos inmunológicos, proteínas específicas del tumor) que puedan ser expresadas, o sobre-expresadas diferencialmente en las células tumorales, y que por lo tanto puedan servir como marcadores de la presencia de tumor. Las técnicas para la detección de estas proteínas se han puesto a punto tanto en tejido como en orina.

Las principales técnicas y ensayos conocidos para la detección de proteínas marcadoras de CU se explican brevemente a continuación:

- **Inmunohistoquímica (IHQ):** la IHQ es la técnica molecular diagnóstica más empleada actualmente. Se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales contra diferentes proteínas marcadoras de la enfermedad (P53, PRb, P21, antígeno Ki-67, etc.). La ventaja de la IHQ frente a otros análisis moleculares es el hecho de poder detectar alteraciones célula por célula, sin que influya la contaminación con células normales (del estroma, linfocitos, etc.). Sin embargo, la

interpretación de las preparaciones puede ser un tanto subjetiva y los resultados pueden estar influenciados por diferencias en los reactivos o el método utilizado.

En el caso de P53, existen estudios que revelan una asociación entre una IHQ positiva y un incrementado riesgo de progresión del CU (Esrig y cols., 1994). Sin embargo, existen estudios que no corroboran estos resultados debido a variaciones en aspectos técnicos (diseño del estudio, criterio para seleccionar los pacientes, anticuerpo utilizado o el uso de diferentes puntos de corte).

El principal marcador utilizado en IHQ es **KRT20**. Esta proteína forma parte de los filamentos intermedios que constituyen el citoesqueleto de las células epiteliales y su expresión básicamente está restringida al epitelio gástrico y urotelial (células superficiales), y a las células de Merkel que se encuentran en la epidermis. Esta molécula es de gran utilidad como marcador ya que mantiene su expresión estable en el CU y en las células metastásicas en ganglio linfático (Moll y cols., 1992). Por otro lado, parece ser que el hecho que esta proteína se sobre-exprese en más del 10% de las células del tumor implica que se trata de una lesión de alto grado y con riesgo elevado de progresar y recurrir (Christoph y cols., 2006). En el carcinoma *in situ* se encuentra expresión de este marcador en la mayoría de las células malignas (McKenney y cols., 2001).

Por otro lado, la IHQ permite establecer patrones de distribución de marcadores proteicos, los cuales pueden caracterizar determinados subgrupos de tumores. Un ejemplo se observa en el trabajo de Barbisan y colaboradores, donde se caracterizan las lesiones PUNLMP al presentar una intensa expresión de FGFR3, una distribución superficial de KRT20 y una baja actividad proliferativa detectada mediante una baja expresión de MIB-1 (Barbisan y cols., 2008).

En general, la IHQ presenta un límite de detección de 1 célula tumoral en 10<sup>5</sup> células normales (Hatta y cols., 1998). En el cáncer de mama se conoce incluso que la utilización de esta técnica puede variar un resultado negativo obtenido mediante tinción H/E a positivo en el 5-20% de las muestras analizadas (Giuliano y cols., 1997).

Basado en la IHQ se encuentra el ensayo comercial **ImmunoCyt** (Laboratorios Bostwick) que detecta mediante tres anticuerpos monoclonales (M344, LDQ10 y 19A211) antígenos específicos del tejido urotelial (dos mucinas y un antígeno carcinoembriogénico) en muestras de orina. Esta prueba ha demostrado sensibilidades alrededor del 85% y 75% para la detección del CU vesical y en TUS,

respectivamente, y una especificidad del 95% (Mian y cols., 1999; Lodde y cols., 2001).

- **Microarrays de tejido (TMA, del inglés, *Tissue microarrays*):** esta técnica permite el estudio simultáneo de múltiples muestras de tejido parafinado mediante IHQ, FISH, hibridación *in situ*, etc. El procesamiento consiste en utilizar una aguja hueca para tomar muestras milimétricas de las regiones de interés en tejidos embebidos en parafina, depositar estas muestras de diámetro aproximado de 0,6 mm de manera ordenada en un nuevo bloque de parafina y se realizan cortes con un micrótopo abarcando todos los cilindros incluidos. Finalmente, sobre estos cortes colocados en portaobjetos de vidrio se realizarán múltiples pruebas a nivel DNA, RNA y proteínas (Kramer y cols., 2007).
- **Ensayo ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*):** basado en la técnica ELISA, existe un ensayo comercial llamado **BTA** (del inglés, *Bladder Tumor Antigen*) test diseñado para el diagnóstico no invasivo del CU. Existen dos versiones de este ensayo, el BTA TRAK y el BTA STAT. Ambos tratan de detectar en orina una proteína relacionada con el factor H del complemento humano (Kinders y cols., 1998). Esta proteína se expresa en células tumorales y macrófagos pero no en epitelio normal. Experimentos *in vitro* muestran que el antígeno BTA interrumpe la cascada del complemento protegiendo a las células que lo expresan de la lisis por complemento. Así, este antígeno confiere una ventaja selectiva de proliferación a las células tumorales permitiéndoles evadirse del sistema inmune. La diferencia entre las dos variantes del ensayo se encuentra en el formato del test. Mientras que el BTA TRAK es un ensayo cuantitativo, el BTA STAT es un inmunoensayo cualitativo que presenta un formato que proporciona un resultado inmediato. Ambos ensayos están aprobados por la FDA americana para su uso en la práctica clínica.

La sensibilidad de esta técnica en la detección del CU oscila entre el 32-58%, rondando su especificidad el 92% (van Rhijn y cols., 2005). Esta prueba también ha sido testada en el diagnóstico de CU en TUS presentando una sensibilidad y especificidad alrededor del 50% y 62%, respectivamente (Siemens y cols., 2003).

- **Inmuno-cromatografía:** basado en esta técnica, se ha diseñado un ensayo comercial llamado **NMP22** test (del inglés, *nuclear matrix protein-22*) para el diagnóstico no invasivo del CU. Este ensayo se basa en la detección cualitativa en orina de la proteína NMP22, la cual forma parte de la matriz nuclear de todos los tipos celulares. Su función es la de colaborar en la distribución de la cromatina en



las células resultantes de la división celular, y es liberada del núcleo durante la apoptosis. Se ha comprobado que los pacientes con CU vesical tienen hasta 25 veces más NMP22 en la orina que individuos sanos (Keesee y cols., 1996). Este test fue aprobado por la FDA americana en el año 2003 para su uso clínico.

La sensibilidad de esta técnica en la detección del CU oscila entre el 49-70%, y su especificidad entre el 86-92% (Soloway y cols., 1996; Stampfer y cols., 1998; van Rhijn y cols., 2005).



## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



En España se diagnostican cada año unos 12.000 nuevos casos de CU. Más concretamente, en Cataluña este tumor representa entre un 9,9 y un 11,7% del total de tumores malignos, dando lugar a una mortalidad cáncer específica del 5,2% en el sexo masculino (Borràs y cols., 2001). Aunque en la mayoría de casos la enfermedad se acaba detectando en su fase más inicial, la alta frecuencia de recidivas y la posibilidad de progresión y diseminación debido a la agresividad de algunas formas limitarán la supervivencia del paciente.

El método estándar para la detección y seguimiento del CU se basa en la combinación de la citología urinaria y la cistoscopia. Sin embargo, la primera de estas técnicas presenta baja sensibilidad en la detección de tumores de estadio inicial y bajo grado, mientras que la segunda es una técnica invasiva que además no es lo suficientemente sensible para detectar todas las lesiones de crecimiento plano.

Por otro lado, las técnicas histológicas convencionales para el diagnóstico de la diseminación linfática del CU no son lo suficientemente sensibles ya que alrededor del 50% de pacientes sometidos a cirugía radical con linfadenectomía N0, fallecen antes de los 5 años post-cirugía (Madersbacher y cols., 2003). Estos datos sugieren que existe una diseminación tumoral antes de la cirugía que no es detectada mediante estas técnicas histológicas.

Debido a la elevada prevalencia y gravedad de la enfermedad, a la invasividad de las pautas utilizadas en su diagnóstico y a la falta de métodos de estadiaje refinados, el desarrollo de nuevos sistemas diagnósticos que permitan una detección temprana tanto del CU inicial como de sus recidivas y de su diseminación es esencial para mejorar la calidad de vida y el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.

Por consiguiente, el **objetivo global** de esta tesis ha sido evaluar algunos métodos basados en técnicas citogenéticas y moleculares que permitan la detección temprana del CU, de sus recidivas y de su diseminación.

Los **objetivos concretos** de este trabajo han sido los siguientes:

- 1- Evaluar la utilidad de la técnica FISH en el diagnóstico no invasivo del CU de bajo estadio.
- 2- Determinar la utilidad de la técnica FISH en el diagnóstico no invasivo del CU localizado en el TUS.
- 3- Evaluar la utilidad de la técnica FISH en el pronóstico de pacientes con CU de alto riesgo de recurrencia y progresión, tratados mediante inmunoterapia BCG.

4- Detectar la presencia de micrometástasis linfáticas mediante marcadores moleculares en pacientes sometidos a cistectomía y linfadenectomía radical.

5- Detectar la presencia de diseminación sanguínea del CU mediante marcadores moleculares en pacientes sometidos a cistectomía y linfadenectomía radical.

## **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

---





### 3.1 HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE

La hibridación in situ fluorescente (*FISH*) es una técnica que, mediante el uso de sondas de DNA marcadas con fluorescencia, permite la visualización de secuencias de DNA específicas en una extensión celular, detectando así cambios numéricos y/o estructurales en estas regiones. Estas sondas de DNA marcadas se pueden hibridar sobre células tanto en interfase como en metafase.

Específicamente, en el presente trabajo se ha utilizado un ensayo comercial basado en la técnica FISH llamado **UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit** (Laboratorios Abbott), el cual ha sido diseñado para detectar aneuploidías en los cromosomas 3, 7, 9 y 17. Para ello, este ensayo consta de un conjunto de tres sondas CEPs para los cromosomas 3, 7 y 17, y de una LSI para la región 9p21, todas ellas marcadas con diferentes fluorocromos (*Red, Green, Aqua y Gold*, respectivamente).

El tipo de muestras que fueron estudiadas mediante esta técnica, así como el protocolo detallado de trabajo se describen a continuación:

#### 3.1.1 Muestras

En este trabajo se han estudiado mediante FISH dos tipos diferentes de muestras:

1. Orinas obtenidas por micción espontánea.
2. Lavados vesicales obtenidos mediante barbotaje.

De ambos tipos de muestras se obtuvo un volumen mínimo de 30 mL por paciente. En el caso de que las muestras fueran a ser procesadas el mismo día de su recogida, se guardaban a 4°C hasta dicho procesamiento. En caso contrario, se les añadía un volumen equivalente al 33% del volumen de la muestra de un reactivo conservante llamado Carbowax (apartado 3.1.2).

#### 3.1.2 Soluciones de trabajo

##### a. Carbowax

PEG (polietilenglicol) 2%

Etanol absoluto 50%

» *Conservar a temperatura ambiente (TA).*

##### b. Carnoy

Metanol:ácido acético glacial 3:1 (v:v)

» Preparar fresco cada vez que se realice el protocolo.

c. SSC 20X pH=6,3

NaCl 3M

Tri-NaCl 0,3M

» Este tampón viene suministrado con el kit aunque también se puede preparar por cuenta propia. Ajustar el pH con HCl 1M. Se conserva hasta 1 año a TA.

d. SSC 2X pH=7-7,5

» Se prepara a partir de una dilución 1:10 del SSC 20X. Ajustar el pH con HCl. Se conserva hasta 1 mes guardado a 4°C.

e. SSC / NP-40

SSC 2X

NP-40 0,1%

» NP-40 es un detergente no iónico que se utiliza especialmente para desnaturalizar interacciones proteína-proteína. Viene suministrado con el kit.

f. Solución de proteasas para la digestión citoplasmática

Pepsina 5 mg/mL

HCl 1N 1%

» Esta solución se utilizará a 37°C. Atemperar en primer lugar el agua destilada con el HCl y antes de empezar el experimento añadir la pepsina, para así promover que su actividad enzimática sea máxima en el paso de la digestión.

g. PBS 1X

» Conservar a 4°C.

h. Solución fijadora de formaldehído

Formaldehído 1%

PBS 1X

MgCl<sub>2</sub> 50 mM

» Preparar fresco en cada hibridación.

i. Formamida post-hibridación pH=7

Formamida 50%

SSC 2X

» *Ajustar el pH con HCl 1N.*

### 3.1.3 Protocolo

El protocolo de esta técnica se puede subdividir en 3 apartados: pre-hibridación, hibridación y post-hibridación. Estos protocolos se detallan a continuación:

#### 3.1.3.1 Pre-hibridación

1. Anotar en una plantilla las características generales de la muestra (volumen, color y turbidez).
2. Distribuir la muestra en tubos Falcon de 50 mL y centrifugar 10 min. a 600 xg, TA.
3. Decantar el sobrenadante y lavar el sedimento con 15 mL de PBS 1X a 4°C mezclando por inversión.
4. Centrifugar 10 min. a 600 xg a TA.
5. Volver a decantar el sobrenadante y fijar el sedimento celular con 8 mL de la solución fijadora Carnoy que está compuesta por metanol y ácido acético (mirar apartado 3.1.2).

» *El metanol deshidrata las células y el ácido acético precipita las proteínas lo que impide que la actividad enzimática altere la morfología celular. Es importante añadir los primeros 2 mL de fijador gota a gota para que no se forme un agregado celular insoluble.*

6. Realizar una segunda fijación con Carnoy repitiendo los puntos 4 y 5.
7. Centrifugar 10 min. a 600 xg a TA.
8. Almacenar los sedimentos celulares en tubos Eppendorf, resuspendidos en unas gotas de Carnoy (entre 100µl-1mL) a -20°C, si no se puede continuar con el protocolo.
9. Extraer del congelador los portaobjetos necesarios (uno para cada muestra a procesar), secarlos y rotularlos con lápiz.

» Los portaobjetos donde se realizan las extensiones de la muestra celular se deben guardar permanentemente a  $-20^{\circ}\text{C}$  inmersos en metanol absoluto.

10. Centrifugar los tubos con los sedimentos celulares 10 min. a 600 xg, TA.
11. Deshechar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en unas gotas de Carnoy.
12. Con una pipeta Pasteur de vidrio, tirar 2-3 gotas de la suspensión celular en el portaobjetos desde una altura aproximada de un palmo. Seguidamente soplar vigorosamente la muestra por el lateral del portaobjetos para extenderla.
13. Secar los portaobjetos a  $45^{\circ}\text{C}$  en una placa calefactora realizando unos 3 contactos de 2 segundos en la misma.
14. Observar las preparaciones en un microscopio de contraste de fases (objetivo 20X) y seleccionar la zona con una concentración de células adecuada para la hibridación (campo con abundantes células epiteliales que no se superponen entre ellas). Marcar esta zona en la parte posterior del portaobjetos con un lápiz de diamante.
15. Dejar secar los portaobjetos entre 4-24 horas a TA antes de proceder con la hibridación.

#### 3.1.3.2 Hibridación

1. Incubar los portaobjetos 2 min. en tampón SSC 2X previamente atemperado a  $73^{\circ}\text{C}$  en un baño húmedo.
2. Proceder con la digestión citoplasmática, la cual se puede realizar de 2 maneras distintas sin obtener diferencias con respecto a la calidad de la hibridación:
  - a. Mediante una incubación de los portaobjetos en una solución de pepsina (0,5 mg/mL) en medio ácido (HCl 0,01 N) 13 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ .
  - b. Mediante el kit **FISH Pretreatment Reagent** (Laboratorios Abbott) que consiste en una incubación de los portaobjetos en una solución que contiene una mezcla de proteasas, 10 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ .
3. A continuación realizar un lavado de 5 min. con PBS 1X a TA.
4. Introducir los portaobjetos en un couplin con formaldehído 1% 5 min. a TA.

» *El formaldehído permite la fijación celular ya que polimeriza en el interior de la célula y crea enlaces covalentes con las proteínas y ácidos nucleicos.*

5. Deshidratar los portaobjetos en etanol al 70%, 85% y 100%, incubándolos 1 min. en cada uno a TA.
6. Poner entre 1,5 y 3  $\mu\text{L}$  de la mezcla de sondas en cubreobjetos de 12 mm de diámetro y/o 12x12 mm, respectivamente. El volumen de sonda con la que realizar la hibridación depende de la abundancia y distancia entre las células epiteliales observadas previamente en el microscopio de contraste de fases.

» *Realizar este paso en un cuarto con relativa oscuridad para evitar perder fluorescencia.*

7. Inclinando los portaobjetos, dejarlos caer sobre los cubreobjetos correspondientes de manera que la zona de células marcadas entre en contacto directo con la mezcla de sondas.
8. Sellar los cubreobjetos herméticamente untando cola Paniker en todo su alrededor.
9. Incubar las preparaciones en un ambiente húmedo (p. ej. introduciendo papel de celulosa empapado en agua destilada en el incubador) con el siguiente programa de incubación:

73 °C 2 min.

39 °C ~16 horas (una noche)

» *En este trabajo las hibridaciones se realizaron en el incubador HYBrite (Vysis).*

### 3.1.3.3 Post-hibridación

La post-hibridación consiste en realizar una serie de lavados a 45 °C para eliminar la sonda no hibridada específicamente. Todos los pasos se deben realizar en un cuarto con relativa oscuridad para evitar perder la fluorescencia de las preparaciones.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Sacar los portaobjetos del incubador y retirar la cola (con la que se sellaron los cubreobjetos) con unas pinzas de disección.
2. Remojar y agitar suavemente las preparaciones en un *couplin* con formamida 50% a 45°C en un baño húmedo, hasta que los cubreobjetos se deslicen y se desprendan por sí mismos de los portaobjetos. Si después de unos minutos los

cubreobjetos no se han desprendido, utilizar algún instrumento punzante para empujarlos con cuidado de no rasgar la zona hibridada.

3. Realizar tres lavados consecutivos de 10 min, en tres *couplins* diferentes con formamida 50% a 45 °C en un baño húmedo.
4. Realizar un lavado de 10 min. en SSC 2X a 45 °C en un baño húmedo.
5. Realizar un lavado de 5 min. en SSC 2X /NP-40 0,1% a 45 °C en un baño húmedo.

» *Antes de iniciar la post-hibridación, atemperar los couplins de formamida, SSC 2X y SSC 2X/NP-40 a 45°C..*

6. Poner 7 µl del colorante DAPI II en cubreobjetos de 15x15 mm (tantos como portaobjetos tengamos) y colocar los portaobjetos encima de manera que la zona celular marcada entre en contacto directo con el colorante.

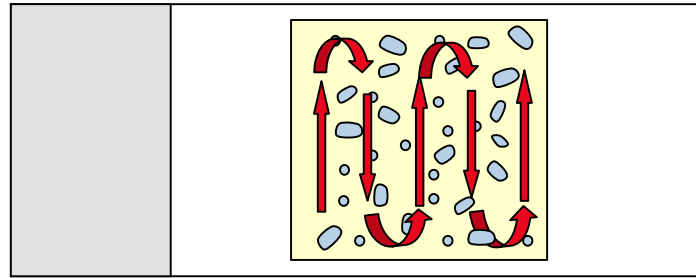
» *DAPI II (4,6-diamidino-2-fenilindol) es un colorante fluorescente intercalante de DNA, que viene suministrado con el kit de hibridación y que servirá para poder localizar las señales lumínicas de las diferentes sondas en el interior de los núcleos celulares.*

7. Guardar las preparaciones a -20 °C un mínimo de 20 min. antes de valorarlas mediante microscopia de fluorescencia.
8. Valorar en un microscopio de fluorescencia con un objetivo 100X de inmersión.

» *El modelo de microscopio de fluorescencia utilizado en este trabajo fue NIKON ECLIPSE E400. Las preparaciones fueron observadas a 1000 aumentos utilizando un objetivo 100X de inmersión.*

#### **3.1.4 Criterio de valoración**

La valoración de las preparaciones se debe realizar explorando los diferentes campos siguiendo un recorrido estandarizado, para así evitar valorar dos veces la misma zona. El recorrido que se realizó en este trabajo se muestra esquematizado en la figura 13.



**Figura 13:** Esquema del rastreo de las preparaciones en el microscopio de fluorescencia. Las flechas rojas indican el movimiento de la preparación que se realizaba para su valoración.

Los criterios de valoración utilizados en este trabajo fueron los descritos por Halling y colaboradores en 2002 (Halling y cols., 2002), y son los que se describen a continuación:

Una preparación es considerada positiva cuando:

- a. Se encuentran 5 o más núcleos que presentan polisomía en 2 o más cromosomas diferentes (3, 7 y/o 17) y/ó
- b. se encuentran 10 o más núcleos que presentan la misma polisomía en uno de los cromosomas 3, 7 o 17 y/ó
- c. se encuentra un 20% de núcleos que presentan una doble deleción del locus 9p21.

Una vez cumplido alguno de los criterios de positividad se daba por finalizada la valoración, y en caso de no llegar a ninguno de los criterios se contaban como mínimo 100 núcleos por preparación. Para el conteo, como **criterio de inclusión** se seleccionaban núcleos con características morfológicas tumorales, en el caso de haberlos (tamaño superior al resto de células epiteliales, irregularidad morfológica y cromatina granulada). Las preparaciones en las que el número de núcleos alterados encontrados estaba en el límite de positividad fueron valorados por un segundo observador.

## 3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El principal material de partida para el estudio de la expresión génica es el RNA mensajero (RNAm). El RNA es una molécula muy lábil, especialmente a elevadas temperaturas (>65°C) y en presencia de álcali. Además, es susceptible de ser degradado por las ribonucleasas (RNasas), proteínas altamente estables y con una localización ubicua (intracelulares, en la superficie corporal, fluidos corporales, polvo, etc.). Estas características implican que trabajar en el laboratorio con este ácido nucleico esté sujeto a tomar una serie de medidas para conseguir un ambiente lo más libre de RNasas posible, así como para inactivar las RNasas intrínsecas de las propias muestras que se están manipulando.

Las medidas básicas tomadas durante la realización de este trabajo para evitar al máximo la degradación del RNA han sido las siguientes:

1. Utilizar guantes sin talco y sustituirlos frecuentemente.
2. Utilizar material fungible estéril, ya que las bacterias y los hongos pueden ser una fuente importante de RNasas.
3. Establecer un material de uso exclusivo para los protocolos en que se manipule RNA.
4. Descontaminar con el reactivo RNaseZap (Ambion) aquella superficie de trabajo destinada exclusivamente a trabajar con RNA.
5. Descontaminar con H<sub>2</sub>O y etanol 100% aquellas superficies de trabajo temporalmente implicadas en el protocolo.
6. Hornear el material de vidrio a 200 °C toda la noche con el fin de liberarlo de RNasas.
7. Descontaminar de RNasas el material de plástico o metacrilato sumergiéndolo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% durante 15 min. y lavándolo posteriormente con H<sub>2</sub>O.
8. Usar reactivos líquidos comerciales calificados como “RNase free” o en su defecto tratarlos con DEPC (Dietilpirocarbonato) que inactiva las RNasas.
9. Utilizar puntas de pipeta con filtro.

### 3.2.1 Soluciones de trabajo

- a. MOPS (Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico) 10X

MOPS 0,2 M pH=7



AcNa 50 mM pH=5,2

EDTA 10 mM pH=7

» *Filtrar con filtro de 0,45  $\mu$ m y conservar a TA resguardado de la luz (botella oscura y tapada con papel de aluminio).*

» *Diluyendo esta solución se obtiene el MOPS 1X.*

b. TE 1X pH=7,5

Tris 10 mM

EDTA 0,2 mM

» *Autoclavar y conservar a 4°C.*

c. TBE 5X pH=8,3

Tris 445 mM

Ácido bórico 445 mM

EDTA 10 mM

» *Diluyendo esta solución se obtiene el TBE 0,5X.*

» *Conservar a TA máximo 3 meses (hasta que se observe que ha precipitado).*

### **3.2.2 Extracción de RNA total**

En este trabajo la extracción de RNA total se ha realizado utilizando el reactivo comercial TRIzol Reagent (Invitrogen). Se trata de una solución de fenol con isotiocianato de guanidinio que lisa las células y desnaturaliza las nucleasas manteniendo la integridad tanto del DNA como del RNA.

Para la extracción de RNA total se ha partido de dos tejidos diferentes: ganglio linfático y sangre periférica. Los protocolos para cada uno de ellos difieren en la manera de obtención de la muestra pero convergen una vez las células han sido tratadas con el reactivo TRIzol.

A continuación se detallan los protocolos utilizados para el procesamiento de cada uno de los tipos de muestra:

#### **3.2.2.1 A partir de tejido ganglionar linfático**

Para una óptima extracción de RNA a partir de cualquier tejido sólido es imprescindible que inmediatamente después de ser extraída, la muestra sea

congelada como mínimo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En este trabajo, la masa de ganglios linfáticos extraídos de los pacientes sometidos a cistectomía radical y linfadenectomía era transportada al departamento de Anatomía Patológica inmediatamente después de su extracción, y una vez allí era analizada por los patólogos, quienes cortaban algunos fragmentos de ganglio linfático, lo introducían en tubos Eppendorf libres de RNasas y los congelaban en nitrógeno líquido. Una vez en el laboratorio las muestras eran conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la extracción de RNA.

El protocolo realizado para la homogeneización del tejido ha sido el siguiente:

1. Preparar el homogeneizador en la campana extractora de gases así como todo el material necesario para realizar el protocolo (gradilla con tubos Eppendorf libres de RNasas rotulados, el reactivo TRIzol, pinzas, pipetas, puntas, etc.)  
*» En este trabajo el homogeneizador utilizado para la disgregación celular de la muestras ha sido el llamado ULTRA-TURRAX T8 (IKA).*
2. Sacar las muestras que se desee procesar del congelador y mantenerlas en un recipiente con nitrógeno líquido.
3. Anotar la cantidad de TRIzol que se añadirá a cada muestra, teniendo en cuenta que es necesario 1mL de reactivo por cada 50-100 mg de tejido. Además, hay que tener en cuenta que el volumen de la muestra no puede exceder el 10% del volumen de TRIzol utilizado para la homogeneización.
4. Preparar tubos de base plana donde quepa la cuchilla del homogeneizador y añadir el TRIzol correspondiente para cada muestra.
5. Introducir la muestra de tejido en el tubo correspondiente con el reactivo.  
*» En el caso de que el fragmento de tejido sea demasiado grande, se puede depositar en un recipiente con nitrógeno líquido (p.ej. una placa de Petri), y se puede seccionar con un bisturí, haciendo uso de unas pinzas para que no salte ningún fragmento de tejido.*
6. Introducir seguidamente el homogeneizador con el interruptor en la posición "off" y la rueda de velocidad en "0". Encender el instrumento rápidamente e ir subiendo de velocidad progresivamente hasta la posición "4", haciendo ligeros movimientos circulares para intentar disgregar al máximo el tejido.  
*» No apagar el instrumento mientras queden fragmentos de tejido visibles en el tubo. La homogeneización de una muestra dura aproximadamente 1 min.*

» *Es fundamental que no se descongele el tejido antes de ser homogeneizado para conseguir una buena calidad del RNA.*

7. Traspasar el reactivo TRIzol con el tejido triturado en un Eppendorf de 2 mL (libre de RNasas). En el caso de haber añadido más de 1 mL del reactivo, traspasar sólo 1 mL por Eppendorf.
8. Desmontar la cuchilla del homogeneizador completamente y lavarla realizando diferentes enjuagues con H<sub>2</sub>O destilada libre de RNasas a presión. Utilizar algún utensilio punzante (como podría ser una aguja de jeringa) para eliminar cualquier mínimo resto que pudiera quedar de tejido.
9. Montar la cuchilla del instrumento de nuevo y homogeneizar la siguiente muestra (volver al punto 5 de este protocolo).
10. Después de homogeneizar todas las muestras de tejido deseadas, guardarlas con el TRIzol a -80°C, o continuar el protocolo en el punto 12.

» *Las muestras con TRIzol pueden permanecer almacenadas a -80°C máximo un mes.*

11. Descongelar las muestras de TRIzol a TA.
12. Añadir 200 µL de cloroformo (en campana de gases) y mezclar suavemente por inversión del tubo unos 15 segundos.
13. Incubar la muestra a TA durante 3 min., en posición horizontal.

» *De esta manera se consigue aumentar la superficie de contacto entre las fases orgánica y acuosa.*

14. Centrifugar 15 min. a 12000 xg, 4 °C.

» *Se formarán 3 fases: una fase superior acuosa en la que se encuentra el RNA, una interfase blanca consistente en restos celulares y DNA, y una fase inferior orgánica que contiene también parte del DNA y las proteínas.*

15. Recoger la fase superior acuosa con pipeta (en campana de gases) y pasarla a un tubo Eppendorf de 2 mL (libre de RNasas).

» *Es importante no apurar demasiado para evitar recoger la interfase blanca donde pudieran quedar algunas proteínas y entre ellas RNasas.*

16. Añadir 500 µL de isopropanol (-20°C) (en campana de gases) y mezclar suavemente por inversión unos 15 segundos.

» *Agitar aproximadamente 20 veces. Si se están procesando más de 5 muestras a la vez, añadir el isopropanol a medida que recogemos cada una de las fases acuosas.*

17. Incubar las muestras a -20 °C durante un mínimo de 10 min.

18. Centrifugar 10 min. a 12000 xg, 4 °C.

19. Decantar el sobrenadante para descartarlo.

» *En este punto se puede dejar de trabajar en campana de gases.*

» *Se debe controlar el sedimento durante la decantación para evitar perderlo.*

20. Añadir 2 mL de etanol 75% conservado a -20°C.

21. Realizar un vórtex a máxima velocidad durante de 2 segundos para lavar el RNA precipitado.

» *En este punto existen 3 opciones: 1) conservar el RNA precipitado en etanol 75% a 4 °C (máximo 1 semana); 2) congelar el RNA precipitado en etanol 75% a -20 °C (máximo 1 año); o 3) continuar con el protocolo.*

» *Si no se va a utilizar el RNA hasta dentro de unos meses es preferible conservarlo en etanol 75% a -20°C.*

22. Centrifugar 15 min. a 7500 xg, 4 °C.

23. Aspirar el sobrenadante con pipeta para descartarlo.

» *Realizar pulsos de centrifuga de segundos (que no superen nunca las 7500 xg) para eliminar todo el etanol 75%.*

24. Dejar 10 min. los tubos Eppendorf abiertos bajo una lámpara para que se evapore el etanol 75%.

» *El etanol 75% se habrá evaporado completamente cuando el precipitado de RNA pase de un color blanquecino a transparente.*

25. Resuspender en H<sub>2</sub>O libre de RNAasas según el tamaño del precipitado (normalmente en 10-30 µL si las muestras de partida eran de sangre o en 50-100 µL si se trataban de muestras de tejido) y mantenerlo en hielo una vez resuspendido.

» *Sin tocar el precipitado con la punta de la pipeta, añadir el H<sub>2</sub>O por encima de la muestra repetidas veces hasta que se disuelva.*

» *En este punto existen 3 opciones: 1) dejar el RNA en hielo si vamos a trabajar con él en el plazo de unas horas; 2) conservar el RNA a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  si vamos a trabajar con él en el plazo de 1 día; y 3) conservar el RNA a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento a medio o largo plazo.*

### 3.2.2.2 A partir de células monomorfonucleares de sangre periférica

Para un óptima extracción de RNA a partir de muestras de sangre, es imprescindible que la sangre sea fresca y no congelada, ya que se hemolizaría y no permitiría aislar las células mononucleares. Además, si el RNA se quiere utilizar para un estudio de expresión, la sangre se tiene que procesar inmediatamente después de su extracción para así evitar al máximo que la expresión génica de las células se descontrole debido al estrés al que están siendo sometidas.

Debido a que algunos de los genes que se han estudiado se expresan en las células de Merkel de la epidermis, era necesaria la extracción en primer lugar de un tubo de sangre de 5 mL el cual se descartaba inmediatamente después de extraerse. El segundo tubo extraído en anticoagulante EDTA (Etilen-diamino-tetra-acético) correspondía a la muestra de 10 mL de sangre venosa, la cual se utilizaba para el estudio. Las muestras fueron procesadas inmediatamente después de ser extraídas.

El protocolo realizado ha sido el siguiente:

1. Añadir a un tubo Falcon de 50 mL la misma cantidad de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) que de sangre en EDTA de la que se parte.
2. Añadir la sangre sobre la capa de Ficoll-Paque PLUS con una pipeta Pasteur de plástico.

» *Dejar caer la sangre por la pared del tubo de manera que cuando llegue al Ficoll-Paque PLUS no se mezcle de golpe con él, sino que se deposite encima formando una capa superior.*

3. Centrifugar 30 min. a  $400\text{ xg}$ , a TA, sin freno.

» *Se formarán 4 fases: una superior amarillenta que corresponde al plasma sanguíneo, una segunda capa blanca en la que se encuentran las células mononucleares de la sangre (linfocitos y monocitos) junto con las plaquetas, una capa transparente equivalente al reactivo Ficoll y una última capa roja intensa que contiene los eritrocitos y las células polimorfonucleares de la sangre.*

4. Recoger la interfase con una pipeta *Pasteur* de plástico (llevando también el plasma) y depositarlo en un nuevo Falcon de 50 mL mantenido en hielo.

» *Es importante intentar recoger el mínimo Ficoll posible ya que es un reactivo que inhibe la retrotranscriptasa, enzima que se utilizará en el siguiente paso para el análisis de la expresión génica (apartado 3.2.4).*

5. Añadir suero fisiológico atemperado a 4°C hasta 50 mL y mezclar suavemente por inversión.

» *También se puede utilizar una solución salina equilibrada como PBS 1X.*

6. Centrifugar 10 min. a 100 xg, 4 °C, sin freno.

7. Decantar el sobrenadante y descartarlo.

8. Añadir 1 mL de TRizol (en una campana de gases) al sedimento de células y mezclar vigorosamente con la pipeta hasta la completa homogeneización de la muestra en el reactivo.

9. Traspasar la muestra a un tubo Eppendorf de 2mL (libre de RNasas) y guardarla con el TRizol a -80°C.

» *La muestras con TRizol pueden permanecer almacenadas a -80°C máximo un mes.*

10. Continuar el protocolo en el punto 11 del apartado 3.2.2.1.

### 3.2.3 Cuantificación y calidad del RNA

#### 3.2.3.1 Cálculo de la concentración del RNA

La concentración del RNA ([RNA]) puede medirse mediante un espectrofotómetro, ya que es proporcional a la absorbancia o densidad óptica (D.O.) de la muestra a una longitud de onda de 260 nm. Según el valor de D.O. obtenido a esta longitud de onda, se aplica la ley de Lambert-Beer:

$$D.O. = \varepsilon \times L \times [RNA]$$

$$[RNA]=D.O./(\varepsilon \times L)$$

Donde “D.O.” hace referencia a la absorbancia a 260nm (sin unidades), “ $\varepsilon$ ” corresponde al coeficiente de extinción molar, es decir, capacidad de una sustancia de absorber radiación electromagnética (para el RNA: 1 / 40  $\mu$ g/mL x cm) y finalmente “L”

hace referencia al grosor de la cubeta de medición del espectrofotómetro (normalmente 1 cm).

La [RNA] vendrá expresada en  $\mu\text{g/mL}$  y tendrá que multiplicarse por el factor de dilución de la muestra de RNA que se está midiendo. En este trabajo, tanto para las muestras de sangre como para las de ganglio linfático, el RNA ha sido diluido en una proporción 1/60, siendo el volumen de medición 60  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.3.2 Valoración de la calidad del RNA

#### 3.2.3.2.1 *Mediante espectrofotómetro*

Cuando se valoran las muestras en un espectrofotómetro se mide la D.O. de una dilución de la muestra de RNA a 260 nm y 280 nm. Así como la densidad óptica a 260 nm valora la presencia de ácidos nucleicos en la muestra, la absorbancia a 280 nm indica la presencia de proteínas, sales y sustancias orgánicas (como restos de fenol). Así, el cociente D.O. 260 nm / D.O. 280 nm debe tener un valor entre 1,6 y 2 para asegurar una buena pureza del RNA.

#### 3.2.3.2.2 *Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante*

La medición de la calidad del RNA mediante este método se basa en desplegar al máximo las moléculas de RNA de la muestra, al mismo tiempo en que está sometida a un campo eléctrico (electroforesis) para que se separen las moléculas en función de su peso molecular.

El gel de agarosa será de 25 mL de volumen final y tendrá una concentración final de agarosa al 1,2%, de MOPS 1X y de Formaldehído 0,6 M.

Para la realización del gel de agarosa desnaturalizante, el protocolo realizado ha sido el siguiente:

1. Mezclar en un tubo Falcon de 15 mL tapado con papel de plata (en campana de gases):
  - 2,5 mL de MOPS 10X (ver apartado 3.2.1)
  - 1,25 mL de Formaldehído 37%
2. Pesar 0,6 g de agarosa y añadir 21,25 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Disolver la agarosa en el microondas evitando que hierva.
3. Atemperar las dos soluciones a 56 °C (p. ej. en una estufa).
4. Mezclar las 2 soluciones (en campana de gases, con luz apagada) y preparar un gel de agarosa con peines de 0,75 mm:

- a. Pesar la cantidad de agarosa necesaria según el porcentaje del gel que se quiera preparar.
  - b. Disolver la agarosa en tampón TBE 0,5X por calentamiento evitando su ebullición.
  - c. Verter la solución de agarosa una vez esté tibia sobre un portageles horizontal y colocar un peine de 0,75 mm en un extremo (formará los pocillos en los que se cargarán las muestras).
  - d. Una vez el gel está solidificado, retirar el peine y sumergir el gel en una cubeta de electroforesis.
5. Llenar la cubeta de electroforesis con tampón MOPS 1X.
  6. Preparar las muestras de RNA en una solución de volumen final 10  $\mu$ L que contenga:
    - Entre 1-2  $\mu$ g RNA
    - Tampón desnaturante para RNA a concentración final 1X
  7. Desnaturalizar las muestras a 75°C (baño seco) durante 5 min.
  8. Realizar la electroforesis a un máximo de 60 V durante 1 hora.
  9. Teñir el gel con una solución de bromuro de etidio (1  $\mu$ g/mL) durante 15 min.
  10. Realizar tres lavados del gel de 10 min. en H<sub>2</sub>O.
  11. Visualización bajo luz ultravioleta del gel de agarosa teñido.

#### 3.2.4 Transcripción reversa

La transcripción reversa (RT) consiste en sintetizar DNA utilizando como molde RNA, obteniéndose el llamado DNA complementario (cDNA) de cadena sencilla. En este trabajo, todas las RTs se han realizado con el kit comercial *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) con *random primers* (cebadores arbitrarios) para así conseguir amplificar todas las moléculas de RNA presentes en la muestra.

Las cantidades de RNA de partida utilizadas en este trabajo fueron las siguientes, dependieron de la muestra:

- a. 5  $\mu$ g de RNA total si la muestra de partida era sangre.
- b. 2  $\mu$ g de RNA total si la muestra de partida era tejido sólido (linfático, tumoral, etc).



El volumen final de la reacción era 20  $\mu\text{L}$ . Al final de la reacción, este volumen se llevaba a 50  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ , de manera que el cDNA retrotranscrito quedaba a una concentración final de: 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ó 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , según si se trataba de muestras iniciales de sangre o de tejido sólido, respectivamente.

El protocolo realizado ha sido el siguiente\*:

1. Calcular el volumen de RNA a retrotranscribir y de  $\text{H}_2\text{O}$  correspondiente hasta 10,5  $\mu\text{L}$ .
2. Descongelar en hielo los componentes de la reacción: RNAs, dNTPs 10 mM, DTT, Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 a temperatura ambiente; 375 mM KCl; 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ) y *random primers* (300 ng/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen).
3. Preparar una mezcla de los reactivos de la reacción RT teniendo en cuenta el número de reacciones a realizar y contando como para 0,2 ó 0,5 reacciones más. El volumen para 1 reacción de cada componente, así como la concentración final a la que quedan en la reacción, se muestran a continuación:

<u>Componentes</u>	<u><math>\mu\text{L}</math> para 1 reacción</u>	<u>Concentración</u>
Buffer 5X	4	0,25X
DTT 0,1 M	2	5 mM
dNTPs 10 mM	1	0,5 mM
Enzima Superscript II (200 U/mL)	1	200 U

4. Preparar tubos de 0,2 mL rotulados (donde se realizará la reacción).
5. Añadir a cada tubo, según los cálculos realizados inicialmente:
  - $\text{H}_2\text{O}$
  - 1,5  $\mu\text{L}$  de *random primers* (300ng/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)
  - Volumen de RNA (obtenido en punto 1 de este protocolo)
6. Centrifugar durante unos segundos a máxima velocidad para que el contenido de los tubos vaya al fondo.
7. Incubar las muestras en un termociclador 5 min. a 70  $^{\circ}\text{C}$ .
  - » *En este paso se desnaturalizan tanto las cadenas de RNA como los primers.*
8. Poner los tubos en hielo durante 2 min.

9. Añadir 8  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reactivos preparada anteriormente a cada tubo.
10. Centrifugar durante unos segundos a máxima velocidad para que los reactivos bajen al fondo del tubo.
11. Incubar las muestras en un termociclador según el siguiente programa:

25 °C 10 min.

42 °C 50 min.

70 °C 15 min.

12. Una vez finalizado el programa poner los tubos en hielo inmediatamente.
13. Añadir 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  a cada tubo para que el volumen final sea 50  $\mu\text{L}$ .\*
14. Congelar y conservar las muestras de cDNA (en realidad se obtiene un híbrido RNA-cDNA) a  $-20^\circ\text{C}$ .

\* Respecto a estas condiciones estándar, en diferentes casos se han dado las siguientes variaciones:

- 1) En aquellos casos en que no se disponía de 5 ó 2  $\mu\text{g}$  de RNA (según correspondía por el tipo de muestra de partida), la reacción se realizaba con la mitad de RNA, es decir, con 2,5 ó 1  $\mu\text{g}$  de RNA, respectivamente, en el mismo volumen final que el resto de los casos normales (20  $\mu\text{L}$ ). Sin embargo, al finalizar la reacción, ésta se llevaba a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  en vez de a 50  $\mu\text{L}$ . Así, la concentración final de cDNA retrotranscrito seguía siendo de 0,1 ó 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente, en ambos casos.
- 2) En aquellos casos en que el RNA se encontraba tan diluido que el volumen para poner los 5 ó 2  $\mu\text{g}$  de RNA superaba los 10,5 $\mu\text{L}$  (que es el volumen permitido en la reacción entre RNA y  $\text{H}_2\text{O}$ ), la RT se realizaba en un volumen final de 40 $\mu\text{L}$  (en vez de 20  $\mu\text{L}$  como en los casos normales), con lo que también se añadía el doble del resto de reactivos y admitía doble cantidad de volumen entre RNA y  $\text{H}_2\text{O}$  (21  $\mu\text{L}$ ). Al finalizar la reacción se llevaba a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ , con lo que la concentración final de cDNA retrotranscrito seguía siendo de 0,1 ó 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en todos los casos.

### 3.2.5 Preamplificación de cDNA

La preamplificación de cDNA en este trabajo se basó en la utilización del kit comercial TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems). Esta reacción permite

preamplificar pequeñas cantidades de cDNA sin introducir un bias en la expresión génica.

Las sondas y los cebadores para todos los genes marcadores (excepto para el gen *FXYD3*) así como para el gen utilizado como control endógeno fueron comprados en forma de ensayos preparados a la casa comercial Applied Biosystems (Tabla 11).

**Tabla 11:** Referencias comerciales de los genes marcadores y del gen utilizado como control endógeno (Applied Biosystems).

Marcador	Referencia comercial
<i>KRT20</i>	Hs00300643_m1
<i>UPK2</i>	Hs00171854_m1
<i>AGR2</i>	Hs00180702_m1
<i>KRT19</i>	Hs00761767_s1
<i>C10orf116</i>	Hs00428992_m1
<i>GUSB</i> (control endógeno)	Hs99999908_m1

Las secuencias de los cebadores y de la sonda utilizadas tanto para la preamplificación como para la qRT-PCR del marcador *FXYD3* fueron las siguientes:

cebador directo: 5' CTGGGCCTGCTTGTGTTC 3'

cebador reverso: 5' GGTCATTGGCGTCCAGGAC 3'

sonda: 5' CTGGCAGGCTTTCCT 3'

El protocolo realizado ha sido el siguiente:

1. Realizar una mezcla con volúmenes equivalentes de los preparados *TaqMan Gene Expression Assays 20X* de los que se quiera realizar la preamplificación (máximo 100 genes) y diluirla en tampón TE 1X de manera que cada assay quede a una concentración final de 0,2X.
2. Descongelar los cDNAs en hielo y preparar tubos de 0,2 mL rotulados.
3. Preparar una mezcla de los reactivos de la reacción teniendo en cuenta el número de reacciones a realizar y contando como para 0,2 ó 0,5 reacciones más. Los volúmenes de cada uno de los componentes para una reacción, así como la concentración final a la que quedan, se muestran a continuación:

<u>Componentes</u>	<u>μL para 1 reacción</u>	<u>Concentración</u>
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	5	-
TaqMan preAmp Master Mix 2X	12,5	0,08X
Mezcla Assays 20X	6,25	0,8X

4. Añadir a cada tubo, según los cálculos realizados anteriormente:

23,75 μL de la mezcla de reactivos

1,25 μL de cDNA (equivalente a 125 ng de cDNA)

5. Centrifugar durante unos segundos a máxima velocidad durante unos segundos a máxima velocidad para que el contenido de los tubos vaya al fondo.
6. Incubar las muestras en un termociclador según el siguiente programa:

95 °C 10 min.	10 ciclos
95 °C 15 seg.	
60 °C 4 min.	
4°C ∞	

7. Añadir a cada tubo 25 μL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

» *En este paso se está diluyendo el producto amplificado a la mitad. Así, el volumen final de que disponemos para la qPCR es de 50 μL.*

8. Pasar el contenido de la reacción a tubos de 0,5 μL y conservar a -20°C.

### 3.2.6 PCR cuantitativa a tiempo real

Como ya se ha comentado en la introducción de este trabajo, la qPCR es una tecnología muy utilizada para realizar análisis de expresión, que consiste en la amplificación de un fragmento de cDNA mediante tres elementos que confieren especificidad (una sonda y los dos cebadores básicos utilizados en cualquier PCR estándar). En este trabajo se utilizaron sondas Taqman MGB (Figura 14). Por un lado, y como se explica más detalladamente en la introducción, la tecnología *TaqMan* implica que únicamente haya emisión de fluorescencia si se están amplificando cadenas de cDNA. Por otro, el grupo MGB confiere la ventaja de poder utilizar sondas pequeñas (≈10-15 pb), lo que mejora la eficiencia de la amplificación. Esto es debido a que el grupo MGB estabiliza la unión de la sonda al DNA ya que se une al surco

menor de éste. Esta unión permite que la temperatura de hibridación sea elevada ( $\approx 60^{\circ}\text{C}$ ) y las sondas puedan ser más pequeñas. En particular, en este trabajo se utilizaron las sondas y cebadores comercializados por la casa comercial Applied Biosystems.



**Figura 14:** Estructura de las sondas Taqman MGB. R: *Reporter*, NFQ: *Quencher* no fluorescente; MGB: *Minor Groove Binder*.

El protocolo realizado ha sido el siguiente:

1. Diseñar una plantilla como esquema de la placa de 96 pocillos, organizando qué muestra y qué gen se amplificará en cada pocillo.
2. Descongelar los cDNAs (preamplificados o sin preamplificar) en hielo.
3. Para cada gen a amplificar, preparar una mezcla de los reactivos de la reacción teniendo en cuenta el número de reacciones a realizar para cada gen y contando como para 0,5 reacciones más. Las cantidades para una reacción de cada uno de los componentes, y la concentración a la que quedan en la reacción se muestran a continuación:

<u>Componentes</u>	<u><math>\mu\text{L}</math> para 1 reacción</u>	<u>Concentración</u>
<i>TaqMan Universal PCR MasterMix 2X</i>	10	0,1X
<i>TaqMan Gene Expression Assay 20X</i>	1	1X
H <sub>2</sub> O	7	-

» *En este trabajo los reactivos utilizados se adquirieron de la casa comercial Applied Biosystems.*

4. Repartir 18  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en los pocillos correspondientes según los genes a amplificar.
5. Añadir a cada pocillo 2  $\mu\text{L}$  de cDNA.
6. Centrifugar para que el contenido de los pocillos vaya al fondo.
7. Incubar las muestras en un termociclador de qPCR según el siguiente programa:

50 °C 2 min.	
95 °C 10 min.	
95 °C 15 seg.	40 ciclos
60 °C 1 min.	
4°C ∞	

» *En este trabajo todos los experimentos de qPCR se realizaron en el instrumento ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).*

### 3.2.7 Sensibilidad en la detección de marcadores en sangre periférica

Para evaluar la sensibilidad del método completo de amplificación de los genes marcadores en sangre periférica (desde el aislamiento de las células mononucleares de la muestra de sangre hasta la amplificación de los genes marcadores) se realizó por triplicado un experimento de “dispensación celular”, más comúnmente conocido en inglés como “*cell spiking experiment*”. El protocolo utilizado para realizar tal experimento se puede dividir en dos partes: la disgregación del tejido tumoral (que será la fuente de células para dispensar en las muestras de sangre) y la dispensación en sí. Los protocolos para estos procedimientos se detallan a continuación:

#### 3.2.7.1 Disgregación del tejido tumoral

La fuente de células tumorales utilizada para realizar el experimento fue un trozo de tejido tumoral extraído de un paciente sometido a RTU. El protocolo utilizado fue el siguiente:

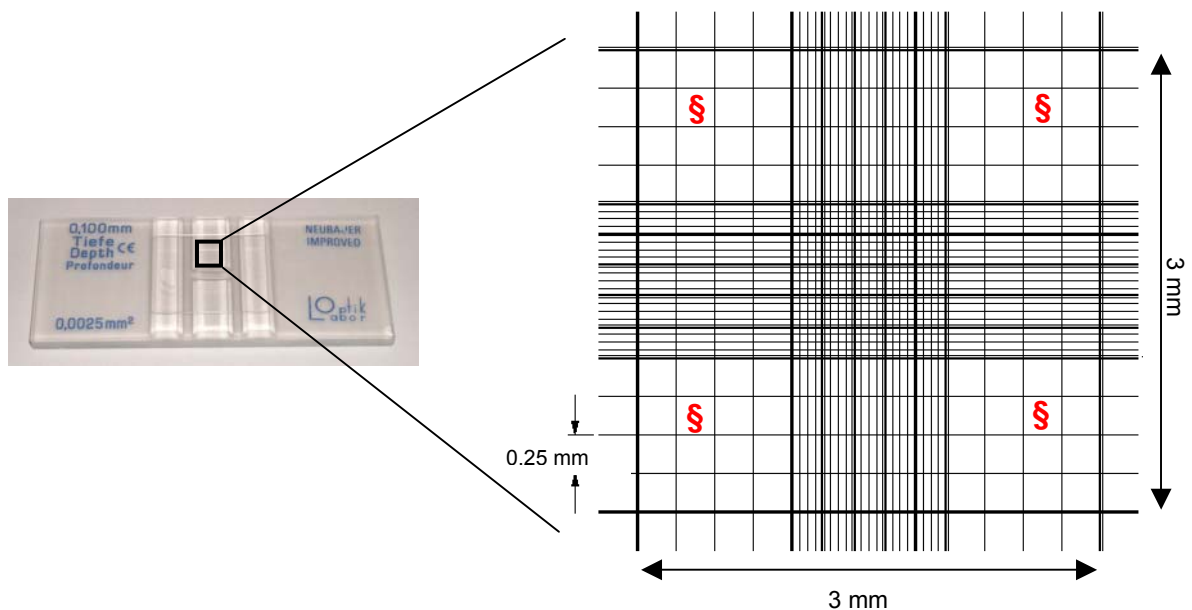
1. Recoger en quirófano un fragmento de tumor, del tamaño de 2 granos de arroz aproximadamente, en una placa de Petri de 60 mm de diámetro que contenga 4 mL de tripsina 1X en PBS.
2. Al mismo tiempo recoger en un tubo Eppendorf otro fragmento del mismo tumor y congelar directamente en nieve carbónica y posteriormente a -80 °C hasta su procesamiento.

» *El tejido congelado fresco se utilizó para comparar el efecto de la disgregación tumoral en la expresión de los genes marcadores que se estudiaron. Se procesó según se detalla en el apartado 3.2.2.1.*

3. Trocear el tejido utilizando 2 cuchillas de bisturí sobre la placa con tripsina mientras se agita suavemente.
4. Valorar el nivel de disgregación de las células en el microscopio óptico con el objetivo 20X, y si es necesario continuar con el proceso de troceado.
5. Para ayudar a disgregar el tejido, aspirar la solución de tripsina con una pipeta serológica y expulsar el contenido otra vez en la placa de manera que la punta de la pipeta está en contacto con la base de la placa, favoreciendo la disgregación de los pequeños grumos celulares.
6. Cuando la mayoría de células esten sueltas, pasar la parte líquida (intentando no coger los grumos visibles) a un tubo Falcon de 15 mL.
7. Añadir PBS 1X hasta 15 mL.
8. Centrifugar 2000 xg, 3 minutos, 4 °C.
9. En una campana de cultivo celular, eliminar el sobrenadante mediante pipetas de vidrio y vacío, o en su defecto mediante pipetas serológicas.
10. Añadir nuevamente PBS 1X hasta 10 mL y volver a centrifugar 2000 xg, 3 minutos, 4 °C.
11. Retirar el PBS sobrenadante y añadir 10 mL de medio de cultivo DMEM.
12. Verter la suspensión celular en una placa de Petri estéril.
13. Preparar una cámara de Neubauer con un cubreobjetos de 20 mm de diámetro para el recuento celular.

#### 3.2.7.2 Recuento celular

La cámara de Neubauer es una herramienta de contaje celular adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual hay dos cuadrículas como la que se esquematiza en la figura 15. Esta cuadrícula consiste en un cuadrado de 3x3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos, éste dista de la superficie 0,1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie de cada uno de los cuadrantes de 1x1 mm y el cubreobjetos es de  $0,1 \text{ mm}^3$ , es decir  $0,1 \text{ }\mu\text{L}$ .



**Figura 15:** Cámara de Neubauer y esquema de la cuadrícula de conteo. El símbolo § indica las cuadrículas donde se realizará el recuento celular.

Para realizar el conteo se siguió el siguiente protocolo:

1. Colocar el cubreobjetos en la cámara y poner 10  $\mu\text{L}$  de suspensión celular en cada una de las 2 cuadrículas de la cámara de Neubauer.

» *La suspensión celular entrará por capilaridad.*

2. Colocar el portaobjetos en el microscopio óptico y contar el número de células epiteliales que se encuentran en las 4 cuadrículas marcadas en el esquema con el símbolo §.

» *Las células epiteliales se diferencian del resto de células sanguíneas por presentar un mayor tamaño y ser menos abundantes.*

3. Realizar la media de los valores obtenidos.
4. Aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular en la suspensión (células / mL)} = 10000 (x/4)$$

Donde x hace referencia a la media de las células calculada en el punto 3 de este protocolo.



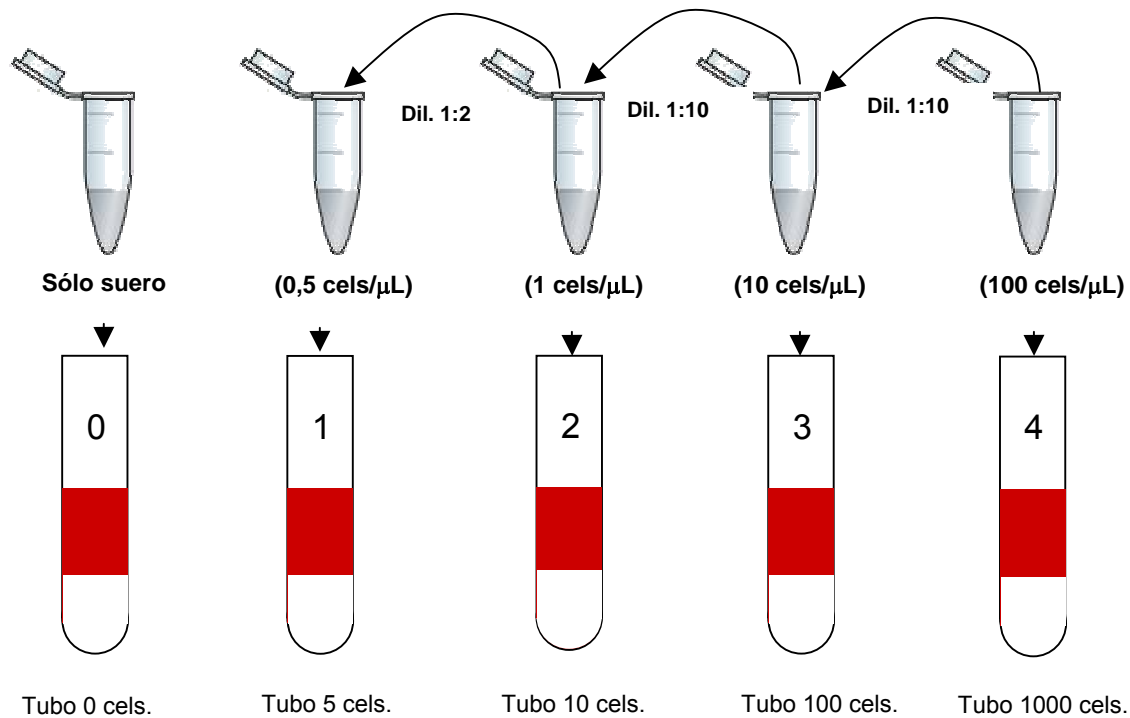
### 3.2.7.3 Dispensación celular

Una vez realizado el recuento celular, el protocolo que ha sido realizado para la dispensación celular ha sido el siguiente:

1. Extraer por persona en primer lugar un tubo EDTA de 2,5 mL y seguidamente 5 tubos EDTA 10 mL (Sarstedt Monovette).
2. Pasar 8 mL de sangre de cada uno de los tubos EDTA de 10 mL, con pipetas serológicas, a tubos Falcon de 50 mL que contienen 8 mL de Ficoll-Paque.
3. Según la concentración de células disgregadas del tejido tumoral (calculada en el apartado 3.2.7.2.), preparar una dilución con suero fisiológico para obtener una concentración celular de 100 cels/ $\mu$ L (DILUCIÓN 100).
4. Preparar una dilución 1:10 de la DILUCIÓN 100 para obtener una concentración celular de 10 cels/ $\mu$ L (DILUCIÓN 10).
5. Preparar una dilución 1:10 de la DILUCIÓN 10 para obtener una concentración celular de 1 cel/ $\mu$ L (DILUCIÓN 1).
6. Preparar una dilución 1:2 de la DILUCIÓN 1 para obtener una concentración celular de 0,5 cels/ $\mu$ L (DILUCIÓN 0,5).
7. De las diluciones 100, 10, 1 y 0,5 añadir 10  $\mu$ L a los tubos de sangre y Ficoll correspondientes de cada control. Estos tubos de sangre corresponderán a las muestras que contengan 1000, 100, 10 y 5 células, respectivamente.
8. Añadir 10  $\mu$ L de solución fisiológica al último de los tubos de sangre y Ficoll de cada control. Estos tubos de sangre corresponderán a las muestras que contengan 0 células (Figura 16)  

» *De esta manera estamos añadiendo siempre el mismo volumen de suspensión celular a las muestras de sangre (10 $\mu$ L).*
9. Una vez diluidas las células necesarias en todos los tubos, recoger la suspensión celular restante en un falcon de 15 mL, centrifugarlo 2000 xg 3 min., decantar el sobrenadante y añadirle 1 mL de TRIzol.
10. A partir del tubo EDTA de 2,5 mL, realizar un hemograma para conocer las proporciones de las diferentes fracciones celulares de cada control, y utilizarlas en el cálculo de la sensibilidad.

11. A partir de las muestras en TRizol, continuar con los protocolos de los apartados 3.2.4 (RT), 3.2.5 (preamplificación) y 3.2.6 (qRT-PCR) para mirar el nivel de expresión génica de los marcadores estudiados.



**Figura 16:** Esquema del protocolo de dispensación celular realizado para obtener la sensibilidad de la detección de genes marcadores en sangre periférica. Cels: células; Dil: factor de dilución.

#### 3.2.7.4 Cálculo de la sensibilidad

Los cálculos que se realizaron para obtener la sensibilidad fueron los siguientes:

$$[\text{leucocitos}] \times \text{vol. sangre} = X \text{ leucos/mL}$$

$$\Psi / X = \text{sensibilidad (num cels. en } 10^6 \text{ leucocitos)}$$

Teniendo en cuenta que los parámetros valorados fueron:

**Vol. sangre:** Volumen inicial de sangre (8 mL)

**[leucocitos]:** Concentración de leucocitos obtenidos del hemograma de cada uno de los controles (leucocitos/mL)

$\Psi$ : Número de células a partir del cual la expresión génica relativa de los marcadores (valor CT del gen endógeno – valor CT del gen diana) aumenta de manera lineal según lo hace el número de células tumorales en la muestra.

### 3.2.8 Selección de genes marcadores

#### 3.2.8.1 Análisis de microarrays

Para determinar un panel de genes marcadores de diseminación del CU altamente específicos, se compararon valores de expresión génica de múltiples genes en tejido vesical (tanto normal como tumoral) respecto a sangre. Estos datos de expresión se obtuvieron mediante *microarrays* de expresión. Específicamente, se realizó una comparación entre los datos públicos procedentes del *array* U133A Affymetrix GeneChip (Affymetrix), en el cual se había hibridado RNA procedente de 16 muestras de sangre (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; código GEO de acceso GSE1343), con los datos obtenidos del *array* U133 plus 2.0 Affymetrix GeneChip (código GEO de acceso GSE7476) en el que fueron hibridados RNA de 3 muestras de tejido sano vesical y de 9 muestras de tumor.

Con el fin de seleccionar genes marcadores altamente expresados en tejido vesical pero muy poco expresados en sangre, se establecieron diferentes puntos de corte según los valores de expresión en sangre y en tejido vesical, respectivamente: 1) <50, >300; 2) <50, >200; 3) <50, >1000; 4) <100, >3000; 5) <100, >2000; 6) <100, >1000; 7) <150, >3000.

De la lista de genes candidatos obtenida, se seleccionaron aquellos 4 genes más diferencialmente expresados entre sangre y tejido vesical, para ser analizados mediante qRT-PCR.

#### 3.2.8.2 Búsqueda bibliográfica

Además de los genes seleccionados mediante *microarrays* de expresión, se utilizaron dos marcadores ampliamente estudiados en la literatura como marcadores de diseminación del CU. Para ello se introdujeron en la base de datos PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>) los términos: *molecular marker*, *transitional cell carcinoma*, *urothelial carcinoma*, *metastasis*, *lymph nodes* y *blood*,

seleccionándose dos de los marcadores más ampliamente estudiados en la literatura científica disponible en aquel momento.

## **4 RESULTADOS**

---



**4.1 TRABAJO 1: utilidad de la hibridación *in situ* fluorescente en la detección del carcinoma urotelial no músculo-infiltrante**

Cancer Genetics and Cytogenetics 173 (Marzo, 2007): 131-135

PMID: 17321328





## UTILIDAD DE LA HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE EN LA DETECCIÓN DEL CARCINOMA UROTELIAL NO MÚSCULO-INFILTRANTE

**Introducción:** La metodología estándar utilizada en el diagnóstico y seguimiento del carcinoma urotelial (CU) consiste en la combinación de la citología urinaria y la cistoscopia. La citología tiene baja sensibilidad en la detección de tumores de bajo grado y estadio, mientras que la cistoscopia es una técnica invasiva que presenta baja sensibilidad en la detección de lesiones planas, como el Tis, y causa estrés al paciente.

**Objetivo:** Evaluar la utilidad de un ensayo no invasivo basado en la técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) para la detección del CU vesical no músculo-infiltrante, en comparación con la citología urinaria.

**Material y métodos:** Se recogió orina por micción espontánea de 74 pacientes con CU no músculo-infiltrante y fue analizada por FISH y por citología urinaria. También se recogieron orinas procedentes de 19 pacientes con CU músculo-infiltrante y de 19 pacientes sanos que se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente. En la técnica FISH se utilizaron sondas marcadas para los cromosomas 3, 7, 9 y 17 (kit Urovysion) que permitieran detectar alteraciones cromosómicas indicativas de malignidad.

**Resultados:** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad global obtenida por FISH y citología urinaria en la detección del CU no músculo-infiltrante (70,3% vs. 35,1%, respectivamente;  $p < 0,0001$ ). Esta diferencia de sensibilidad entre FISH y citología se mantuvo al separar las muestras de CU no músculo-infiltrante en bajo grado (52,8% vs. 13,9%, respectivamente;  $p < 0,0005$ ) y alto grado (86,8 vs. 55,3%, respectivamente;  $p < 0,0015$ ). La especificidad global de la citología urinaria fue del 100% y la de la técnica FISH del 94,7% ( $p = ns$ ). Un 69% de los pacientes con un resultado sospechoso por citología presentaron un resultado positivo por FISH.

**Conclusiones:** En conjunto, estos resultados indican que la técnica FISH basada en los cromosomas 3, 7, 9 y 17 presenta mayor sensibilidad que la citología urinaria, y una especificidad equivalente en la detección del CU no músculo-infiltrante. Así, esta técnica se podría utilizar en la práctica clínica para reducir el número de cistoscopias realizadas en el exhaustivo seguimiento realizado en los pacientes con este tipo de tumor.



**4.2 TRABAJO 2: utilidad de la hibridación *in situ* fluorescente en el diagnóstico no invasivo del carcinoma urotelial en el tracto urinario superior**

European Urology 51 (Febrero, 2007): 409-415

PMID: 17010508



## UTILIDAD DE LA HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE EN EL DIAGNÓSTICO NO INVASIVO DEL CARCINOMA UROTELIAL EN EL TRACTO URINARIO SUPERIOR

**Introducción:** La citología urinaria junto con las técnicas de radiodiagnóstico son los métodos estándar en el diagnóstico y seguimiento del carcinoma urothelial (CU) localizado en el tracto urinario superior (TUS). Sin embargo, las lesiones de bajo grado y estadio, y las lesiones planas, a menudo pasan desapercibidas por estas metodologías. Además, la toma de biopsias en estos casos mediante ureteroscopia para la confirmación del diagnóstico supone una técnica invasiva para el paciente.

**Objetivo:** Evaluar la utilidad clínica de la técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 en el diagnóstico no invasivo del carcinoma urothelial (CU) localizado en el tracto urinario superior (TUS).

**Material y métodos:** Se recogieron orinas por micción espontánea de 30 pacientes consecutivos afectados de un CU en el TUS, y de 19 controles sanos que fueron utilizadas como controles. Estas muestras fueron analizadas por citología urinaria y por FISH. En la técnica FISH se utilizaron sondas marcadas para los cromosomas 3, 7, 9 y 17 (kit Urovysion) que permitieran detectar alteraciones cromosómicas indicativas de malignidad celular. Por un lado se compararon la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas y por otro se determinó la frecuencia de alteraciones cromosómicas encontradas en las células tumorales evaluadas.

**Resultados:** La sensibilidad total obtenida por FISH fue significativamente superior a la obtenida por citología urinaria (76,7% vs. 36%, respectivamente;  $p = 0,0056$ ). La especificidad global de la técnica FISH fue del 94,7% y la de la citología urinaria fue del 100% ( $p=ns$ ). Los valores predictivos positivo y negativo para la técnica FISH fueron 95,8% y 72%, mientras que para la citología urinaria fueron 100% y 54%, respectivamente. De los núcleos encontrados genéticamente alterados, un 67%, 54% y 43% presentaban polisomía en los cromosomas 3, 7 y 17, respectivamente, y un 21% presentaba delección en homocigosis del cromosoma 9.

**Conclusiones:** La técnica FISH basada en los cromosomas 3, 7, 9 y 17 realizada sobre células exfoliadas en la orina presenta una mayor sensibilidad que la citología urinaria en el diagnóstico del CU localizado en TUS, manteniendo una especificidad similar. La naturaleza no invasiva de este ensayo así como su elevada sensibilidad y especificidad podrían contribuir a mejorar el actual diagnóstico del CU en el TUS.



**4.3 TRABAJO 3: utilidad clínica de la hibridación *in situ* fluorescente en el seguimiento de los pacientes con carcinoma urotelial tratados con la terapia del Bacilo de Calmette-Guérin**

European Urology 52 (Septiembre, 2007): 752-759

PMID: 17379395





## UTILIDAD CLÍNICA DE LA HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE EN EL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA UROTELIAL TRATADOS CON LA TERAPIA DEL BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN

**Introducción:** El tratamiento actual para el carcinoma urotelial (CU) no músculo-infiltrante de alto riesgo de recurrencia y progresión es la resección transuretral (RTU) combinada con la terapia del bacilo de Calmette-Guérin (BCG). El seguimiento clínico de estos pacientes se realiza mediante citología urinaria y cistoscopia, y si procede se complementa con biopsias múltiples normalizadas. Pese a este seguimiento, una elevada proporción de tumores recurren y/o progresan a músculo-infiltrantes, lo que indica que en estos casos la inmunoterapia no ha sido exitosa.

**Objetivo:** Evaluar la utilidad de la técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 para determinar la respuesta al tratamiento del BCG en aquellos pacientes con un tumor vesical no músculo-infiltrante de alto riesgo de recurrencia y progresión.

**Material y métodos:** Se recogieron lavados vesicales de 65 pacientes que presentaban un tumor no músculo-infiltrante de alto riesgo antes y después de realizarles la terapia BCG. Estas muestras fueron analizadas mediante la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 (kit Urovysion) para determinar la presencia de alteraciones cromosómicas indicativas de malignidad celular.

**Resultados:** De los 65 pacientes incluidos en el estudio, 55 (85%) presentaron un resultado positivo de la técnica FISH antes del tratamiento con BCG. Por otro lado, 29 (45%) presentaron un resultado positivo y 36 (55%) un resultado negativo de la técnica FISH después de la inmunoterapia. Los pacientes con un resultado positivo después de la terapia presentaban un riesgo de recurrencia tumoral 2,7 veces mayor que los pacientes con un resultado negativo después de la terapia ( $p= 0,017$ ; 95% CI: 1,18-6,15). Además, los pacientes que mantuvieron un resultado positivo antes y después de la terapia presentaban un riesgo de recurrencia tumoral 2,96 veces mayor que aquellos pacientes que cambiaron su resultado de positivo a negativo ( $p= 0,02$ ; 95% CI: 1,17-7,54). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el riesgo de progresión del tumor de los pacientes con un resultado positivo por FISH tras la terapia respecto a aquellos que presentaron un resultado negativo ( $p= ns$ ).

**Conclusiones:** El elevado porcentaje de muestras positivas por FISH antes de la terapia BCG sugiere la necesidad de una terapia adyuvante después de la RTU en los pacientes con un tumor vesical no músculo-infiltrante de alto riesgo de recurrencia y progresión. Además, los pacientes con un resultado positivo de FISH tras la terapia

BCG tienen mayor probabilidad de presentar una recurrencia del tumor. Así, la técnica FISH parece ser útil en el seguimiento de los pacientes con un tumor no músculo-infiltrante de alto riesgo de recurrencia y progresión sometidos a terapia BCG.

**4.4 TRABAJO 4: estadiaje molecular de la diseminación tumoral del carcinoma urotelial: impacto en la supervivencia**

European Urology 52 (Mayo, 2008)

PMID: 18486306



## ESTADIAJE MOLECULAR DE LA DISEMINACIÓN TUMORAL DEL CARCINOMA UROTELIAL: IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA

**Introducción:** El análisis histológico de los ganglios linfáticos para detectar la diseminación tumoral linfática del carcinoma urotelial (CU) no es lo suficientemente sensible, ya que alrededor del 50% de los pacientes con tumores músculo-infiltrantes pT3-4 y con ganglios histológicamente negativos mueren antes de los 5 años tras la cirugía radical.

**Objetivos:** Identificar y estudiar diferentes marcadores moleculares que detecten la diseminación tumoral linfática que no ha sido diagnosticada mediante las técnicas histológicas convencionales. Determinar si existe una correlación entre estos marcadores y la evolución clínica de los pacientes.

**Material y métodos:** Para obtener una lista de genes marcadores expresados en el CU pero no en tejido linfático, se utilizaron datos de *microarrays* de expresión así como información bibliográfica. Se seleccionaron finalmente 5 genes (3 seleccionados a partir de datos de *microarrays* y 2 a partir de la literatura) para ser estudiados mediante qRT-PCR en 181 y 29 muestras de tejido linfático procedentes de 102 pacientes con CU y de 29 controles sin enfermedad neoplásica, respectivamente, recogidos entre los años 2002 y 2004 (mediana de seguimiento de 35 meses). Los valores de expresión de estos marcadores en ganglio linfático fueron comparados estadísticamente con los resultados del análisis histopatológico así como con la evolución clínica de los pacientes.

**Resultados:** Mediante un análisis discriminante se obtuvo que la combinación de los marcadores *FXYD3* y *KRT20* presenta una sensibilidad y especificidad del 100% en la discriminación de muestras de tejido linfático con presencia de diseminación tumoral demostrada histológicamente con respecto a muestras controles. En combinación, estos marcadores detectaron la presencia de células tumorales diseminadas en el 20,5% de pacientes con ganglios negativos por técnicas histológicas. Estos pacientes, sin embargo, no presentaron una supervivencia significativamente menor a la de aquellos con un resultado negativo por qRT-PCR.

**Conclusiones:** La utilización de marcadores moleculares permite mejorar la sensibilidad del análisis histopatológico de los ganglios linfáticos en la detección de la diseminación linfática tumoral. Sin embargo, el hecho de que el 20,5% de pacientes reclasificados como positivos por qRT-PCR no presente una supervivencia significativamente menor que aquellos con un resultado negativo por dicha técnica,

hace suponer que la linfadenectomía tuvo un importante papel curativo eliminando la enfermedad microdiseminada en algunos casos.

**4.5 TRABAJO 5: marcadores moleculares de RNAm en la detección y seguimiento de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con carcinoma urotelial**

European Urology (2008). Manuscrito en preparación.





## MARCADORES MOLECULARES DE RNAm EN LA DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CARCINOMA UROTELIAL

**Introducción:** La detección de la diseminación sanguínea del carcinoma urotelial (CU) es uno de los principales retos en el campo de la urología clínica.

**Objetivos:** Evaluar la utilidad de seis genes marcadores en la detección de la diseminación sanguínea del CU.

**Material y métodos:** Entre los años 2002 y 2004 se recogieron 317 muestras de sangre periférica procedentes de 101 pacientes afectados de CU, sometidos a cistectomía y linfadenectomía, y de 29 controles sanos. En los pacientes con CU se realizó una extracción secuencial de sangre a los 6, 12, 18 y 24 meses post-cirugía. La mediana de seguimiento en estos pacientes fue de 35 meses. La presencia de células diseminadas en sangre fue determinada mediante la cuantificación de la expresión de los genes *KRT20*, *FXVD3*, *C10orf116*, *UPK2*, *AGR2* y *KRT19* mediante preamplificación del cDNA y qRT-PCR. Los datos de expresión obtenidos fueron relacionados con la evolución clínica de los pacientes.

**Resultados:** La combinación del método de preamplificación y qRT-PCR de 6 genes marcadores en sangre periférica permitía la detección de 2 células diseminadas en  $10^6$ - $10^7$  leucocitos, dependiendo del gen marcador. Se observaron diferencias de expresión significativas en los marcadores *FXVD3* ( $p=0,002$ ), *C10orf116* ( $p=0,001$ ), *AGR2* ( $p=0,003$ ) y *KRT19* ( $p<0,001$ ) entre pacientes y controles. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión génica de estos marcadores en sangre de pacientes que desarrollaron metástasis a distancia respecto a los que tuvieron una evolución favorable ( $p= ns$ ). Los valores de expresión génica en sangre de estos marcadores tras la cirugía no incrementaban en el seguimiento de los pacientes que desarrollaron metástasis a distancia.

**Conclusiones:** El análisis de la expresión génica de seis marcadores específicos de tejido vesical en muestras de sangre periférica permite distinguir entre pacientes afectados de CU y controles sanos. Sin embargo, pese a su elevada sensibilidad, esta metodología basada en preamplificación y qRT-PCR no es adecuada para seleccionar a aquellos pacientes que desarrollarán metástasis detectables clínicamente, con lo que debería ser descartada para el estudio de la diseminación sanguínea del CU.



## **5 DISCUSIÓN**

---



El carcinoma urotelial (CU) supone la cuarta neoplasia más frecuente en los países industrializados. Sin embargo, la detección temprana de su aparición, recidivas y/o diseminación de manera altamente sensible y específica todavía constituye uno de los principales retos en la urología clínica.

En el presente trabajo se han utilizado técnicas citogenéticas y moleculares que han sido capaces de mejorar la sensibilidad de las técnicas actuales de diagnóstico (tanto de la enfermedad localizada como de sus recidivas y/o diseminación), manteniendo una especificidad similar.

La utilización en la práctica clínica de estas metodologías, sin embargo, requiere de más estudios que confirmen los resultados obtenidos.

## **5.1 UTILIDAD DE LA HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE EN EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO Y EN EL PRONÓSTICO DEL CARCINOMA UROTELIAL**

El método estándar para la detección y seguimiento del CU consiste en la combinación de la citología urinaria y la cistoscopia (Halling, 2003). Estas técnicas también se utilizan cuando además existen sospechas de CU en el TUS, aunque en estos casos como primera opción se utilizan técnicas de radiodiagnóstico. Ante la duda diagnóstica con las técnicas anteriormente mencionadas se utiliza la ureterorenoscopia. La elevada frecuencia de recurrencia de los tumores uroteliales implica la utilización regular de estas metodologías diagnósticas en el seguimiento clínico de los pacientes durante los primeros años después del diagnóstico. No obstante, aunque estos métodos se utilizan ampliamente en la práctica clínica, presentan ciertos inconvenientes.

Por un lado, la citología urinaria es una técnica no invasiva y de excelente especificidad, pero con limitada sensibilidad sobre todo en la detección del CU de bajo estadio y grado (Varella-Garcia y cols., 2004; Pycha y cols., 2004). Aunque su sensibilidad mejora en la detección de tumores de alto grado, pudiendo llegar a valores del 95% (Oosterlinck y cols., 2004), la media global para la detección del CU en la última década ronda el 60% (Halling y cols., 2000). Cuando además el CU se encuentra localizado en el TUS, los valores de sensibilidad pueden disminuir hasta llegar al 25% (Chow y cols., 1994). En este último caso el valor de sensibilidad puede mejorar hasta un 35-88% cuando la orina no es obtenida por micción espontánea sino recogida mediante cateterización ureteral (Lodde y cols., 2001). Este sistema de

obtención de la muestra, sin embargo, es invasivo ya que causa estrés e incomoda significativamente al paciente.

Independientemente del método utilizado para la obtención de la muestra, uno de los motivos en esta disminución de la sensibilidad puede ser a la dificultosa interpretación de las células del epitelio procedentes del TUS, ya que las células benignas del TUS suelen tener una morfología atípica (Potts y cols., 1997). Otra de las posibles razones, más focalizada al caso de tumores vesicales, es que pueden encontrarse células del urotelio que presenten una morfología sospechosa debido a cambios reactivos ocasionados por los tratamientos aplicados (p.ej. BCG), induciendo confusión con tumores de bajo grado (Bastacky y cols., 1999).

Las técnicas endoscópicas (cistoscopia y ureteroscopia), en cambio, son más sensibles que la citología urinaria en la detección del CU, excepto cuando se trata de un carcinoma *in situ*, el cual puede ser confundido fácilmente con cambios del urotelio debidos a procesos inflamatorios. Por otro lado, el gran inconveniente de estas técnicas es que son invasivas, especialmente cuando se trata de examinar las regiones más proximales del tracto urinario.

El elevado índice de recurrencias que caracteriza el CU vesical no músculo-infiltrante, las limitaciones de la citología urinaria y de las técnicas endoscópicas comentadas anteriormente y el mal pronóstico del CU en el TUS debido al alto grado y estadio que suelen presentar en el momento del diagnóstico (Stewart y cols., 2005) refuerza la necesidad de un diagnóstico temprano, preciso y, si es posible, mínimamente invasivo para poder tratar la enfermedad en sus estadios más iniciales.

Diferentes ensayos basados en orina se han diseñado con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la citología urinaria, y de ahorrar, en aquellos casos en que sea posible, la utilización de técnicas endoscópicas (Mian y cols., 1999; Sokolova y cols., 2000; van Rhijn y cols., 2005). Uno de los que presentaron mejores resultados de sensibilidad y especificidad en la detección del CU fue el kit llamado Urovysion (Laboratorios Abbott), el cual está basado en la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17, y fue aprobado por la FDA en 2001 para su uso en la práctica clínica. Aunque se ha demostrado que esta prueba presenta mayor sensibilidad que la citología en la detección de CU, su utilización en la práctica clínica no está extendida todavía. Esto es debido a que su mayor sensibilidad está demostrada especialmente en la detección de tumores Tis y de alto grado y estadio, no siendo tan evidente en los tumores de bajo grado.

Los cromosomas seleccionados en este ensayo tienen un papel básico en la carcinogénesis urotelial. Por ejemplo, en el cromosoma 3 se ha visto frecuentemente alterado en tumores de alto grado y músculo-infiltrantes (Presti y cols., 1991; Simon y cols., 2001; Gallucci y cols., 2005). También a nivel génico, en el brazo p del cromosoma 7 se encuentra localizado el oncogen *EGFR*, en el cromosoma 9 se encuentran localizados genes supresores de tumores como *CDKN2A* y *CDKN2B* y finalmente en el cromosoma 17 se encuentran localizados oncogenes como *ERBB2*, genes supresores de tumores como *TP53* o genes reguladores de la apoptosis como *BIRC5*.

En el presente trabajo se ha tratado de demostrar la utilidad de la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 en la detección no invasiva del CU vesical no músculo-infiltrante, en la detección no invasiva del CU localizado en el TUS y finalmente en el pronóstico de aquellos pacientes con tumores de alto riesgo de recurrencia y progresión, tratados mediante inmunoterapia BCG.

#### **5.1.1 Detección del carcinoma urotelial vesical no músculo-infiltrante**

En este apartado se discute la utilidad de la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 en la detección no invasiva del CU vesical no músculo-infiltrante en comparación la citología urinaria, a partir de muestras de orina obtenidas por micción espontánea.

Tras comparar 112 muestras de orina analizadas por FISH y por citología urinaria (74 de pacientes con tumor no músculo-infiltrante, 19 de pacientes con tumor músculo-infiltrante y 19 controles sanos), los resultados mostraron una especificidad similar entre ambas técnicas (100% y 94,7% para citología y FISH, respectivamente) la cual es equiparable a la obtenida en otros estudios que incluyeron cohortes más grandes (Sokolova y cols., 2000; Halling y cols., 2000; Sarosdy y cols., 2002). En cambio, en cuanto a sensibilidad, la FISH presentó un valor global significativamente mayor al de la citología (76,3% vs 47,3%) en la detección de CU no músculo-infiltrante, al igual que ya había sido descrito anteriormente (Bubendorf y cols., 2001; Halling, 2003; Skacel y cols., 2003; Varella-Garcia y cols., 2004; Laudadio y cols., 2005). Concretamente la técnica FISH presentó una mayor sensibilidad en la detección de casos con clasificación histológica Ta. Por otro lado, se corroboró que en estadios músculo-infiltrantes (T2 o más) ambas técnicas presentaron una sensibilidad similar (Placer y cols., 2002). Sin embargo, al clasificar las muestras según el grado histológico, se observó que la técnica FISH presentó una mayor sensibilidad en la detección tanto de bajos como de altos grados. Particularmente en los casos pT1 y pTis (estos últimos

caracterizados por su mal pronóstico), la sensibilidad de la técnica FISH fue mayor que la de la citología aunque no de manera significativa. Esto pudo deberse al bajo número de muestras incluidas con esta categoría histológica (n=24).

Pese a la elevada sensibilidad de la técnica FISH en los 74 casos de tumor no músculo-infiltrante, 22 de ellos (29,7%) no fueron detectados por esta técnica. Esta falta de sensibilidad puede explicarse por la elevada proporción de tumores pTa que son diploides, es decir, que no presentan alteraciones en la ploidía de sus células (Bittard y cols., 1996). Por la misma razón se podría justificar que la técnica FISH no detectara algunos casos de bajo grado, ya que, al igual que los tumores pTa, no presentan frecuentemente poliploidías (Degtyar y cols., 2004). Otra de las razones de esta falta de sensibilidad podría deberse al hecho de que esta técnica se basa sólo en la detección de alteraciones numéricas en 4 cromosomas (3, 7, 9 y 17) que, aunque se encuentran entre los más frecuentemente alterados en el CU, no son los únicos que pueden presentar aneusomías (Steidl y cols., 2002).

De los criterios considerados por la prueba para la positividad de las muestras, el que se asignó más frecuentemente fue el de encontrar 5 o más núcleos con 2 o más alteraciones en los cromosomas 3, 7 y 17. En cambio, el que tiene en cuenta la presencia de 10 o más células con ganancias sólo en uno de estos cromosomas no fue aplicado en ningún paciente, excepto en el único caso falso positivo que se obtuvo, en el que se encontraron ganancias del cromosoma 7 en más de 10 núcleos. Por otro lado, sólo el 7% de los casos fueron considerados positivos por el criterio que considera la delección en homocigosis de 9p21 en más del 20% de los núcleos valorados. Las muestras que fueron dadas como positivas por este criterio coinciden en ser muestras procedentes de pacientes con tumores pTa, hecho que concuerda con la teoría de que la pérdida del locus 9p21 sucede en la etapa más inicial de la enfermedad (Theodorescu, 2003). También en relación con este criterio cabe destacar que si se hubieran valorado al menos 100 núcleos en cada preparación, en lugar de dejar de evaluar la preparación cuando algún criterio se cumplía, probablemente el criterio de la pérdida de 9p21 se hubiera dado más frecuentemente.

La principal aplicación clínica de la técnica FISH en función de estos resultados estaría relacionada con la reducción del número de cistoscopias realizadas en el programa de seguimiento de los pacientes con CU no músculo-infiltrante, disminuyendo así las molestias ocasionadas por esta técnica y mejorando la calidad de vida de los pacientes.



Otra posible aplicación de este ensayo diagnóstico estaría relacionada con la obtención de un resultado sospechoso por citología urinaria. Estos resultados en la práctica clínica son interpretados como negativos, es decir, no implican la realización de un procedimiento terapéutico inmediato. La utilidad de la técnica FISH para elucidar resultados ambiguos de la citología ya ha sido sugerido en estudios previos (Halling y cols., 2000; Bubendorf y cols., 2001; Skacel y cols., 2003). En este trabajo, el 69% de las muestras con un resultado incierto por citología fueron dadas como positivas mediante FISH. Así, en estos casos la técnica FISH permitiría corroborar el diagnóstico del tumor y proceder con el tratamiento correspondiente de manera inmediata, sin necesidad de retrasarlo hasta obtener un resultado confirmatorio por citología.

### **5.1.2 Detección del carcinoma urotelial en el tracto urinario superior**

Son escasos los estudios que se han desarrollado hasta el momento respecto al uso de ensayos no invasivos basados en orina para la detección del CU en el TUS. Uno de ellos es el llamado ImmunoCyt (Laboratorios Bostwick), el cual está basado en la detección de marcadores proteicos en orina mediante el uso anticuerpos monoclonales. Esta prueba demostró una mayor sensibilidad que la citología urinaria en la detección de CU en el TUS, aunque la muestra utilizada correspondió a orina obtenida mediante cateterización ureteral, lo cual también implica invasividad para el paciente (Lodde y cols., 2001).

Así, otro de los objetivos del presente trabajo fue el de determinar la utilidad de la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17, en la detección del CU localizado en el TUS y en comparación con la citología urinaria.

Tras el análisis de 30 muestras de orina, la técnica FISH presentó una sensibilidad global en la detección del CU localizado en el TUS del 76,7%, mientras que la de la citología urinaria fue del 36%, valor equiparable a otras sensibilidades obtenidas mediante esta técnica en la detección del CU vesical (Halling, 2003; Varella-Garcia y cols., 2004). Aunque el número de casos que fueron evaluados mediante FISH (n=30) difirió ligeramente de los que fueron evaluados por citología (n=25), cuando sólo se consideraron aquellos casos valorados por ambas técnicas, la FISH siguió superando en sensibilidad a la citología urinaria (p=0,0106). Por otro lado, al desglosar los pacientes según el estadio y el grado del tumor, se observó que esta superior sensibilidad de la técnica FISH respecto a la citología se mantenía en la detección de tumores no músculo-infiltrantes y de bajo grado, aunque no de manera

significativa, probablemente debido al bajo número de casos pertenecientes a estos subgrupos de pacientes.

La técnica FISH presentó un valor predictivo positivo del 95,8%, con el que prácticamente se aseguraba la presencia de tumor en el caso de obtener un resultado positivo. En cambio, un resultado negativo por esta técnica implicaba una frecuencia de acierto en el 72% de los casos (valor predictivo negativo). Cabe destacar que en este estudio todos los casos que no fueron detectados por FISH correspondían a tumores con estadios no músculo-infiltrantes y casi todos de bajo grado, lo que nos hace suponer que probablemente los casos en que la técnica FISH dictamine un resultado falso negativo corresponderán a tumores de bajo riesgo de progresión en los que las consecuencias clínicas adversas de no haber sido detectados serían muy limitadas (Lee y Droller, 2000).

Los resultados de especificidad obtenidos por ambas técnicas fueron equiparables a los ya obtenidos en la literatura en cohortes más grandes.

Respecto al tipo y a la frecuencia de las alteraciones cromosómicas encontradas en el CU localizado en el TUS, cabe destacar que nuevamente la mayoría de casos fueron dados por positivos al cumplirse el criterio de encontrar 5 o más núcleos con ganancias en al menos 2 de los cromosomas 3, 7 y 17. En este caso, sin embargo, ninguna muestra fue dada por positiva por el criterio de encontrar un 20% o más de núcleos que presentaran la delección en homocigosis de 9p21. Este resultado también concuerda con que la delección de 9p21 se da en estados iniciales del desarrollo del tumor, y en este trabajo la población de pacientes incluida estaba formada mayoritariamente por casos con un estado avanzado de la enfermedad, es decir, tumores de alto grado y estadio.

Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con los datos que existen publicados sobre la similitud de las alteraciones genéticas entre el CU a lo largo de todo el tracto urinario (Fadl-Elmula y cols., 1999), refuerzan la utilidad de la orina por micción espontánea para la detección de CU en el TUS. Sin embargo, una limitación tanto de la citología urinaria como de la FISH a la hora de utilizar esta muestra para el diagnóstico es la imposibilidad de conocer la localización del CU, en el caso de haberse detectado células tumorales en la muestra. Esta limitación implica la necesidad de complementar el diagnóstico con técnicas de radiodiagnóstico, si no se han realizado ya inicialmente, que permitan la localización del tumor.

La aplicación diagnóstica que se sugiere de esta técnica en función de los resultados obtenidos se basa en lo siguiente. En la práctica clínica actual, una imagen

sospechosa de tumor en el TUS, obtenida mediante alguna técnica de radiodiagnóstico, debe ser confirmada mediante citología urinaria. En el caso de obtener un resultado negativo por citología, es necesario utilizar las técnicas endoscópicas para descartar/confirmar la presencia de tumor. Dado que en este trabajo todas las muestras positivas por citología urinaria también lo fueron por FISH, e incluso se observó que la técnica FISH mejoraba la sensibilidad de la citología, se puede suponer que la combinación de ambas técnicas (citología urinaria y FISH) en la detección del CU podría implicar una mejora en el diagnóstico. Así, en caso de obtener un resultado positivo o sospechoso mediante técnicas de radiodiagnóstico y posteriormente un resultado sospechoso o negativo mediante citología, la técnica FISH se muestra como candidata para confirmar el diagnóstico del tumor evitando así el uso de la ureteroscopia. Sin embargo, en aquellos casos con un resultado positivo mediante técnicas de radiodiagnóstico pero con un resultado negativo tanto por citología como por FISH, la confirmación mediante ureteroscopia continuaría siendo imprescindible. Una tercera aplicación que sugerimos de esta técnica en el diagnóstico del CU localizado en el TUS está relacionada con el hecho de que el CU en esta zona es frecuentemente multifocal, lo que hace necesaria la realización de un seguimiento exhaustivo de los pacientes, especialmente de aquellos que fueron tratados con un tratamiento conservador. Así, dado que actualmente este seguimiento está basado en las mismas técnicas utilizadas en el diagnóstico, y por lo tanto existen las mismas limitaciones, en este trabajo se apoya la realización de estudios más amplios con el fin de incorporar el ensayo Urovysion en la práctica clínica, pudiendo reducir así el número de procedimientos invasivos realizados durante el seguimiento de la enfermedad.

### **5.1.3 Utilidad de la hibridación *in situ* fluorescente en el seguimiento de los pacientes con carcinoma urotelial tratados mediante inmunoterapia BCG**

Aunque la terapia BCG está ampliamente aceptada para el tratamiento del CU como complemento de la RTU, en aquellos casos de tumor no músculo-infiltrantes de mal pronóstico, el índice de recurrencias y/o progresión post-terapia sigue siendo elevado (Sengupta y Blute, 2006). De hecho, se sabe que esta terapia puede llegar a fracasar en más del 50% de los casos a largo plazo (Kipp y cols., 2005; Sengupta y Blute, 2006).

Actualmente, para valorar si la terapia BCG ha funcionado, se realiza un control post-terapia mediante la combinación de la citología urinaria y la cistoscopia, pudiéndose obtener resultados confusos debido a los cambios reactivos del urotelio

como consecuencia de la terapia. Desde un punto de vista genético, Pycha y colaboradores observaron que tras la terapia con BCG, en la mayoría de casos, persisten células con anomalías cromosómicas numéricas que son probablemente las responsables de que se produzca la recurrencia tumoral (Pycha y cols., 1998). En este caso se ha comprobado que ni la terapia BCG ni otros procesos como la infección del tracto urinario, la hematuria o procesos instrumentales alteran la integridad genética de las células uroteliales (Pycha y cols., 1998; Friedrich y cols., 2003).

Son numerosos los trabajos que tratan de establecer factores pronósticos significativos para la predicción de la respuesta al tratamiento BCG (Pfister y cols., 1999; Lopez-Beltran y cols., 2004; Saint y cols., 2004; Orsola y cols., 2005). Sin embargo, por el momento no se ha encontrado ningún factor lo suficientemente preciso como para pronosticar qué pacientes presentarán recurrencia/progresión de la enfermedad tras la terapia. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17, para determinar la respuesta de los pacientes con CU sometidos a la terapia BCG y por lo tanto predecir la recurrencia y/o progresión de la enfermedad en estos casos a partir de las alteraciones genéticas encontradas.

Un primer resultado de este trabajo fue que el 85% (55/65) de los pacientes incluidos en el estudio presentaron un resultado positivo por FISH después de haber sido sometidos a la RTU. Este resultado concuerda con los datos ya descritos en la literatura sobre la persistencia de células tumorales después de la RTU, la cual es especialmente frecuente en pacientes con tumor pTis (Herr, 1999; Brauers y cols., 2001). Se ha sugerido que estas células remanentes con alteraciones genéticas, aunque morfológicamente similares al epitelio adyacente normal, podrán seguir desdiferenciándose y dar lugar a una recidiva tumoral (Riedl y cols., 2001). Al respecto, cabe destacar que la técnica FISH permite la detección de alteraciones cromosómicas antes de que se den cambios fenotípicos en las células sugestivos de malignidad (Jones, 2006). Debido a que los pacientes portadores de estas células genéticamente alteradas post-RTU probablemente presentarán mayor riesgo de recurrencia tumoral, el uso de terapias adyuvantes tras la resección se hace estrictamente necesario.

En este estudio se observó que los pacientes con un resultado positivo de FISH después de la terapia BCG tendían a recurrir más y antes que los pacientes con un resultado negativo. Además, los pacientes que presentaban un resultado positivo antes y después de la BCG presentaban un riesgo mayor de presentar recurrencia del tumor que los pacientes cuyo resultado de FISH cambió de positivo a negativo

después de la terapia. De estos resultados se deduce que aunque la terapia BCG reduzca la cantidad de células malignas en la vejiga, no siempre elimina totalmente el tumor. Así, algunas poblaciones de estas células que persisten tras la terapia son capaces de originar la recurrencia del tumor.

Por otro lado, estos resultados confirman los ya descritos previamente por Kipp y colaboradores en 2005 (Kipp y cols., 2005) en una serie menor de pacientes. Sin embargo, a diferencia de este trabajo previo, en el presente estudio no se encontró asociación entre los resultados obtenidos por FISH y el riesgo de progresión a enfermedad músculo-infiltrante. Además, tampoco se encontró asociación entre los resultados de FISH antes de la terapia y el riesgo de fallo de la terapia o de recurrencia tumoral. Estas diferencias con respecto al trabajo de Kipp y colaboradores pueden deberse al mayor número de pacientes incluidos en el presente estudio y/o a las diferencias en el criterio establecido para determinar las recurrencias tumorales.

En el presente trabajo, mediante la técnica FISH se obtuvieron 9 casos con resultados falsos negativos después de la terapia, y mediante la combinación de la citología urinaria y la cistoscopia se obtuvieron 11. Esta falta de sensibilidad por parte de ambas técnicas podría deberse a que no existía una cantidad suficiente de células malignas en la muestra debido quizás a la agresiva exfoliación de la mucosa vesical durante la terapia, con lo que se podría esperar que la carga de células tumorales en la muestra no fuera suficiente para aplicar ninguno de los criterios (Skacel y cols., 2003). Por otro lado, la falta de sensibilidad de la técnica FISH también podría deberse, como se ha discutido en el trabajo sobre la detección del CU no músculo-infiltrante, al número limitado de cromosomas que se estudian en este ensayo (Steidl y cols., 2002).

Existen estudios que ya han demostrado que los pacientes con un resultado categorizado como falso-positivo por FISH pueden presentar recidivas en un rango variable (40-89%) a los pocos meses de dictaminar el resultado negativo mediante cistoscopia (Jung y cols., 1999; Halling y cols., 2000; Bubendorf y cols., 2001; Ishiwata y cols., 2001; Sarosdy y cols., 2002; Friedrich y cols., 2003; Skacel y cols., 2003). Estos datos corroboran que un resultado positivo de FISH combinado con un resultado negativo por cistoscopia no siempre es falso, sino que precisamente al tratarse pacientes con antecedentes de CU, deberían ser monitorizados cuidadosamente para detectar recidivas tempranas por medio de cistoscopias periódicas. En este aspecto, 14 pacientes con un resultado positivo de FISH después de la terapia no desarrollaron recurrencia tumoral en un periodo medio de seguimiento de 15,9 meses (rango: 8,9-26,6 meses), con lo que pueden considerarse como resultados falsos positivos de la

técnica. Sin embargo, este resultado podría estar relacionado con el tiempo que pasa desde el inicio del proceso carcinogénico y su expresión fenotípica (Pycha y cols., 1998) de manera que es posible que este periodo de seguimiento haya sido insuficiente en algunos pacientes para el desarrollo de la recurrencia tumoral. En un meta-análisis realizado con 1421 pacientes tratados con BCG, el 38,6% presentaron recurrencia del tumor al cabo de una media de 26 meses tras la realización de la inmunoterapia (Bohle y cols., 2003). Dado que en nuestro caso el periodo de seguimiento medio fue de 15 meses, parece que el factor tiempo sí que puede ser motivo de esta proporción de resultados, en principio, falsos positivos.

Numerosos grupos han realizado estudios sobre el patrón de alteraciones cromosómicas en los tumores vesicales. Parece ser que aquellos tumores con alteraciones en los cromosomas 7 y 17 poseen una mayor probabilidad de recurrencia y progresión, relacionándose así con un comportamiento más agresivo (Olumi y cols., 1990; Waldman y cols., 1991; Ribal y cols., 2004). Dado que nuestra serie de pacientes se componía de casos con tumores de alto riesgo de recurrencia y/o progresión, ya concuerda con que las alteraciones más frecuentemente encontradas en este trabajo fueran polisomías en los cromosomas 3, 7 y 17. En cambio, únicamente un caso fue dado como positivo al encontrar una delección en homocigosis de la región cromosómica 9p21 en más del 20% de los núcleos evaluados. Esta alteración suele ocurrir de manera temprana en el desarrollo del CU (Orlow y cols., 1994; Simoneau y cols., 1996) con lo que es posible que en nuestra serie de pacientes, en los que predominan los tumores de algo grado, quede oculta por la abundancia de otras alteraciones presentes a esas alturas de desarrollo del tumor.

Teniendo en cuenta que la técnica FISH permite detectar cambios cromosómicos incluso meses antes de que las técnicas convencionales de seguimiento detecten la recidiva, y dada la elevada probabilidad de recurrencia tumoral de los pacientes afectos de CU, la técnica FISH podría utilizarse como método complementario de seguimiento de aquellos pacientes que no presentasen evidencias clínicas de recurrencia por los métodos convencionales tras la terapia. Si se obtuviera un resultado negativo en esta prueba, se podría esperar que el paciente recurriera con poca probabilidad, con lo que podría ser monitorizado según las guías establecidas por la *European Association of Urology* (Babjuk y cols., 2008). Sin embargo, en caso de un resultado positivo se tendría que confirmar la presencia o no de tumor. Algunos autores sugieren que esta comprobación podría consistir en la exploración del tracto urinario superior y en la realización nuevamente de una cistoscopia así como de una BMN en caso necesario (Placer y cols., 2002; Jones, 2006).

Por otro lado, existen autores que han propuesto que el protocolo de seguimiento de los pacientes podría variar en cuanto a intensidad o regularidad en función del patrón de alteraciones citogenéticas encontradas en cada caso. Esto es debido a observaciones que relacionan las diferentes alteraciones genéticas detectadas mediante Urovysion con el riesgo de recidiva tumoral. Así, se ha observado que el riesgo de recidiva que presentan los pacientes con antecedentes de tumores vesicales no músculo-infiltrantes es bajo cuando el resultado de FISH es negativo, cuando sólo detecta pérdidas en el locus 9p21 o cuando sólo detecta ganancias en el cromosoma 3, pese a estar relacionado este último con tumores músculo-infiltrantes y de alto grado. En cambio, aquellos pacientes con antecedentes de tumor no músculo-infiltrante, y que durante el seguimiento presentan polisomías en los cromosomas 7 y 17 al mismo tiempo, tienen un riesgo de recidiva que ronda el 60% (Pycha y cols., 2004; Bollmann y cols., 2005).

## 5.2 DETECCIÓN MOLECULAR TEMPRANA DE LA DISEMINACIÓN DEL CARCINOMA UROTELIAL

La diseminación del CU puede darse a través del sistema linfático y/o a través del sistema sanguíneo. Esta diseminación de células tumorales en tejidos extravesicales es un factor pronóstico negativo de la evolución de la enfermedad. Por ello, es frecuente el uso de terapias adyuvantes que contribuyen a erradicar estas células tumorales diseminadas antes de que originen una metástasis clínicamente evidente. Se hipotetiza que la detección temprana de esta diseminación podría identificar a aquellos pacientes que serían más susceptibles del beneficio de dichas terapias adyuvantes.

Debido a que no existen marcadores bien establecidos que indiquen la diseminación tumoral del CU vesical, en este trabajo se utilizaron datos obtenidos mediante *microarrays* de oligonucleótidos para seleccionar un grupo de genes específicamente expresados en urotelio, cuya expresión se mantuviera, o incluso si fuera posible incrementara, en las células tumorales, pero que a su vez no se expresaran en tejidos extravesicales dianas de hospedaje de las células tumorales diseminadas. Para ello y en base a dicha tecnología, se cruzaron datos de expresión de 16 muestras de sangre con los datos de expresión de 55 muestras de tejido vesical, entre las que se incluían muestras tanto de tejido normal como tumoral. Los genes seleccionados fueron probados inicialmente en tejido ganglionar linfático, ya que es el principal destino de la diseminación del CU, y posteriormente en sangre.

Todos los genes seleccionados mostraron una elevada especificidad en tejido linfático excepto el gen *C10orf116*. La explicación de este resultado es que, según datos bibliográficos, *C10orf116* se expresa en tejido adiposo, el cual está presente inevitablemente en la mayoría de muestras de tejido ganglionar. Por consiguiente, este marcador fue descartado para su uso como marcador de diseminación tumoral en tejido linfático aunque no como marcador de diseminación tumoral sanguínea. Finalmente, los marcadores seleccionados para la detección de la diseminación del CU fueron los genes *AGR2*, *KRT20*, *UPK2*, *FXYD3* y *KRT19*, y para la detección de la diseminación sanguínea además se evaluó la expresión del gen *C10orf116*. Aunque dos de estos marcadores, *KRT20* y *UPK2*, no aparecen en la lista de los 49 genes candidatos más diferencialmente expresados en el CU respecto a sangre (según los datos de los *microarrays*), fueron seleccionados igualmente ya que han sido ampliamente descritos en la bibliografía como marcadores de diseminación del CU



(Gudemann y cols., 2000; Seraj y cols., 2001; Wu y cols., 2005; Kurahashi y cols., 2005; Ribal y cols., 2006).

Hasta el momento no existen trabajos donde se hayan relacionado los genes *AGR2* y *FXYD3* con el CU. Estos genes, sin embargo, ya habían sido relacionados con otras neoplasias. *AGR2* codifica para una proteína secretora que parece ser un buen marcador de cáncer de próstata (Zhang y cols., 2005), y *FXYD3* codifica para una proteína que actúa como canal de cloro y que contribuye con la actividad proliferativa del cáncer de páncreas. Este gen también parece expresarse en el tumor primario de mama y sobre-expresarse en cáncer de próstata (Kayed y cols., 2006; Morrison y cols., 1995; Vaarala y cols., 2000). Por otro lado, los genes *KRT20*, *UPK2* y *KRT19* también han sido relacionados con otros tipos de cáncer (Gazzaniga y cols., 2001; Bosma y cols., 2002; Vlems y cols., 2003; Ismail y cols., 2004; Weigelt y cols., 2004; Kurahashi y cols., 2005; Tao y cols., 2006; Cajulis y cols., 1995). Concretamente, *KRT20* y *KRT19* codifican para proteínas que constituyen los filamentos intermedios, los cuales son responsables de la integridad estructural de las células epiteliales. *UPK2*, por otro lado, se expresa específicamente en el urotelio preservando su expresión en el CU (Wu y cols., 2005). Por último, el gen *C10orf116*, de función desconocida hasta el momento, es un gen expresado en tejido adiposo y en tejido urotelial (según los resultados del presente estudio) que no ha sido relacionado anteriormente con ningún otro tipo de neoplasia.

Es importante remarcar que estos cinco genes finalmente seleccionados no son marcadores específicos de actividad tumoral sino de tejido urotelial. El funcionamiento de estos genes como marcadores en la diseminación linfática y sanguínea del CU se discute a continuación.

### **5.2.1 Detección molecular de la diseminación tumoral linfática y significado clínico**

La presencia de diseminación tumoral en ganglios linfáticos ha demostrado ser uno de los principales factores pronósticos de muchas enfermedades neoplásicas (Pantel y cols., 1999). En el CU vesical el estadio patológico N por si solo, aún considerándose un factor pronóstico importante, no es lo suficientemente preciso para evaluar la diseminación tumoral, ya que hasta un 37% de pacientes con categoría patológica N0 acaba desarrollando metástasis a distancia (Madersbacher y cols., 2003). Se hipotetiza que los depósitos tumorales localizados en cortes del tejido linfático parafinado de 4-5 $\mu$ m de ancho pueden pasar desapercibidos en el examen microscópico realizado por el patólogo al evaluar la diseminación linfática tumoral. En

este sentido, la técnica qRT-PCR implica la ventaja de poder detectar pequeños focos tumorales en una población celular heterogénea, debido a la previa homogenización del tejido que se realiza y a la amplificación de RNAm específico de las células diseminadas con respecto al tejido extravascular.

En este trabajo se analizó la expresión de cinco marcadores de RNAm en 210 muestras de tejido linfático. De estos marcadores hubieron dos (*KRT20* y *FXVD3*) que presentaron, individualmente, un 100% de especificidad y de sensibilidad al diferenciar entre muestras positivas por el análisis histológico (N+) y muestras control. Así, teóricamente cada uno de estos marcadores podría haber sido utilizado individualmente como marcador de diseminación del CU. Sin embargo, al reclasificar las muestras negativas según las técnicas histológicas (N0) mediante el valor de corte de expresión de estos dos genes obtenido en las curvas ROC, el porcentaje de muestras reclasificadas por cada gen difería en gran medida. Probablemente el bajo número de muestras incluidas en esta comparación (muestras N+ y controles) sería responsable de estas diferencias. En cualquier caso, con el fin de obtener una reclasificación más robusta, todos los genes fueron incluidos en un análisis discriminante para combinar el poder discriminatorio de cada uno de ellos. Como resultado de este análisis se obtuvo una función discriminante, la cual sólo consideró dos de los marcadores, *KRT20* y *FXVD3*. Como era de esperar, el punto de corte de la función, obtenido también mediante curvas ROC, presentaba una sensibilidad y especificidad del 100% en la discriminación de las muestras N+ y de controles. Utilizando este punto de corte se pudieron reclasificar un 20,5% de muestras N0 como positivas para diseminación tumoral (equivalentes a 17 pacientes de un total de 83 que presentaron un resultado negativo de diseminación tumoral linfática por técnicas histopatológicas).

En el análisis de supervivencia se encontraron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad cáncer-específica de los pacientes que presentaban un resultado N+ respecto a los que presentaban un resultado N0 por técnicas histológicas ( $p= 0,027$ ). Sin embargo, aunque los marcadores utilizados en este trabajo fueron meticulosamente seleccionados y permitían una precisa discriminación entre las muestras N+ y las muestras control, un resultado positivo por qRT-PCR no implicaba una disminución en la supervivencia de los pacientes con respecto a aquellos pacientes con un resultado negativo por qRT-PCR. Este hallazgo podría explicarse en primer lugar, argumentando que un resultado positivo de diseminación tumoral linfática por qRT-PCR no es relevante. Sin embargo, esta hipótesis no tiene mucho fundamento ya que todas las muestras positivas por histología también lo fueron por

qRT-PCR, lo cual indica que el resultado de esta técnica molecular no sólo no es aleatorio, sino que además proporciona una mayor sensibilidad que las técnicas histológicas en la detección de células tumorales diseminadas. La segunda teoría consistiría en que el efecto terapéutico de la linfadenectomía tendría un efecto positivo en la supervivencia. Dado que el tratamiento con quimioterapia administrado en la serie de pacientes de este estudio se puede considerar equilibrado dentro del grupo de pacientes con ganglios N0 (entre los qRT-PCR+ y los qRT-PCR-), la linfadenectomía sería el principal factor con efecto curativo significativo. Además, existen trabajos que demuestran que la cistectomía radical con linfadenectomía pélvica por sí solas consiguen la curación en un importante porcentaje de pacientes con un resultado N+ (Liedberg y Mansson, 2006). De hecho, como ya se ha comentado en la introducción de este trabajo, existen estudios que demuestran una correlación entre la supervivencia libre de enfermedad y el estadio N. Así, se ha demostrado que existe una supervivencia libre de recurrencia a los 3 años en el 50,6%, 34,5% y 0% en pacientes N1, N2 y N3, respectivamente (Vieweg y cols., 1994). De esta información se puede asumir que los pacientes con ganglios N0 todavía serán más susceptibles del efecto curativo de la linfadenectomía, ya que ésta puede eliminar aquellas micrometástasis no detectadas mediante las técnicas histopatológicas convencionales (Vieweg y cols., 1999a).

Por último, algo a considerar en este trabajo es el hecho de que todavía existe una lista de 45 genes candidatos para ser estudiados como posibles marcadores de diseminación tumoral en futuros estudios, tanto a nivel linfático como a nivel sanguíneo.

### **5.2.2 Detección molecular de la diseminación tumoral sanguínea y significado clínico**

La cistectomía radical complementada con la linfadenectomía parece ser el tratamiento más efectivo para eliminar la posible diseminación linfática. Sin embargo, pese a este tratamiento radical, una parte substancial de los pacientes fallecen debido a la recurrencia tumoral en órganos extravesicales. La diseminación tumoral sanguínea podría ser responsable, en parte, de esta evolución negativa de la enfermedad.

La detección de células tumorales diseminadas en sangre periférica constituiría un paso clave en la urología clínica ya que permitiría monitorizar a los pacientes con CU mientras son tratados con quimioterapia, así como también podría predecir la metástasis tumoral antes de que fuera detectable clínicamente. En base a esta

hipótesis, en este trabajo se ha tratado de desarrollar un ensayo que permitiera detectar células procedentes del CU en sangre periférica, mediante una tecnología altamente sensible como es la combinación de un sistema de preamplificación (PA) de cDNA y la qRT-PCR. Además, este tipo de muestras permitiría evaluar el estado de la enfermedad incluso antes de la cirugía radical, pudiendo correlacionar la detección de células diseminadas con la evolución clínica de los pacientes.

Este trabajo se basó en la utilización de seis marcadores de RNAm seleccionados a partir de datos de *microarrays* de expresión, los cuales estaban muy expresados en tejido vesical (tanto normal como tumoral) pero que no se expresaban, o lo hacían en niveles muy bajos, en las células sanguíneas. Por otro lado, este trabajo también se basó en la utilización de un novedoso sistema de PA de cDNA con el fin de aumentar la sensibilidad de la qRT-PCR estándar, permitiendo una cuantificación precisa de los transcritos seleccionados.

Hasta el momento, en ningún trabajo se habían combinado las anteriormente mencionadas técnicas (PA y qRT-PCR) para la detección y monitorización de la diseminación tumoral sanguínea. Sin embargo, sí que tanto la RT-PCR convencional, la nested RT-PCR y la qRT-PCR por sí solas habían sido utilizadas para determinar la presencia de diseminación tumoral en sangre mediante algunos de los marcadores utilizados en este trabajo como son *KRT20*, *UPK2* y *KRT19* (Fujii y cols., 1999; Gudemann y cols., 2000; Retz y cols., 2001; Gazzaniga y cols., 2001; Okegawa y cols., 2004; Ribal y cols., 2006). Desafortunadamente, la utilidad de estas técnicas en la detección de la diseminación tumoral sanguínea sigue siendo incierta dada la heterogeneidad de resultados obtenidos en los diferentes trabajos. Estas discrepancias podrían venir dadas por la utilización de poblaciones celulares subóptimas (muestras celulares de la línea blanca que incluyen p. ej. granulocitos, los cuales expresan *KRT20*) (Gazzaniga y cols., 2001) o también por la elevada proporción de resultados falsos-positivos, debidos en algunos casos a la utilización de técnicas cualitativas (Calogero y cols., 2000). Además, en ninguno de estos estudios se confirma el significado clínico de las células diseminadas detectadas en sangre así como tampoco se comprueba la utilidad de estos marcadores para monitorizar la evolución de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la utilización combinada de PA y qRT-PCR para la detección de los seis marcadores seleccionados permite diferenciar entre pacientes con CU y controles sanos. Este resultado concuerda con el trabajo realizado por Osman y colaboradores en el que se concluye que el perfil de expresión génica de las células sanguíneas difiere significativamente

entre los pacientes con cáncer y aquellos pacientes con otro tipo de enfermedad genitourinaria o controles sanos (Osman y cols., 2006). La explicación sobre los mecanismos que llevan a estas diferencias de expresión entre las células circulantes de pacientes y de controles no está clara. Se supone que el papel del sistema inmunológico en respuesta a la presencia del tumor vesical podría ser responsable en parte de estas diferencias.

A diferencia del anterior resultado, la expresión génica de los genes seleccionados en sangre obtenidos en el momento de la cirugía no permitió diferenciar entre aquellos pacientes a los que se les detectó clínicamente una metástasis de los que no. Una posible explicación para este resultado podría basarse en la ineficiencia del proceso metastático (Luzzi y cols., 1998). Así, la presencia de células tumorales diseminadas en la circulación no indica que se vaya a dar con éxito una metástasis del tumor, ya que estas células deberán superar tanto barreras producidas por la fuerza hemodinámica como por el sistema inmunológico (Gupta y Massague, 2006). Otra explicación podría ser que la expresión génica de las células metastásicas difiere lo suficiente a la de las células localizadas en el tumor como para no ser detectadas mediante marcadores que fueron seleccionados a partir de células uroteliales no metastásicas (Liang y Pardee, 1992). Esta hipótesis, sin embargo, ha sido descartada ya que estos marcadores mostraron ser útiles para la detección de células tumorales diseminadas en ganglios linfáticos (Marín-Aguilera y cols., 2008). Una última hipótesis que explicaría la falta de correlación entre la expresión génica en sangre con la evolución clínica de los pacientes se basaría en la existencia de una limitación técnica, debido al múltiple número de pasos que se realizan desde la extracción de la muestra hasta obtener los datos de expresión (aislamiento de células mononucleares, extracción del RNA, transcripción reversa, PA y qRT-PCR). Durante este procesamiento, es inevitable que parte del contenido celular de la muestra se pierda. Al respecto, recientemente Nagrath y colaboradores han publicado un trabajo en el que desarrollan una nueva metodología la cual es efectiva en la detección de células tumorales diseminadas en pacientes con tumores epiteliales de pulmón, próstata, páncreas, mama y colon (Nagrath y cols., 2007). Una de las ventajas de esta metodología que describen los autores es el hecho de que la muestra de sangre extraída es analizada siguiendo un protocolo que no implica ninguna manipulación de la muestra, lo que reduce la posibilidad de perder parte del contenido celular durante el procesado.

Con el fin de evaluar la utilidad de los marcadores seleccionados en la monitorización de la diseminación tumoral sanguínea y/o del efecto de la quimioterapia

en el tiempo, se estudiaron 47 muestras de sangre, obtenidas a diferentes tiempos (tras los 6, 12, 18 y 24 meses post-cistectomía), procedentes de 20 pacientes que presentaron una metástasis clínica tras la cirugía. Este análisis de expresión génica indicó que no existía ninguna correlación entre la evolución de los valores de expresión génica en el tiempo y el hecho que los pacientes desarrollaran metástasis. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tumor, que es la fuente primaria de células tumorales diseminadas, ya ha sido extirpado en la cirugía. Por ello, era de esperar que si la carga de células tumorales aumentaba en sangre durante los meses posteriores a la cirugía fuera debido a un segundo foco de tumor del cual se pudieran diseminar estas células.

Finalmente, tampoco se observó un efecto de la quimioterapia (ni de la adyuvante ni de la neoadyuvante) en la expresión génica de los marcadores utilizados, en aquellos pacientes a los que se les aplicó este tratamiento. Dado que la quimioterapia es un tratamiento cuya eficacia está comprobada en los pacientes con CU músculo-infiltrante (Grossman y cols., 2003), en este trabajo no se entiende la falta de efecto de la quimioterapia como un defecto en la eficacia del tratamiento, sino como que la muestra de sangre no es la más apropiada para valorar la respuesta a esta terapia. La evolución clínica del paciente es sin duda, y por el momento, el parámetro más apropiado para evaluar la efectividad de este tratamiento sistémico.

### **5.3 DISCUSIÓN GENERAL SOBRE LA UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DEL CARCINOMA UROTELIAL Y DE SU DISEMINACIÓN**

El ímpetu en la búsqueda de nuevos marcadores moleculares para el diagnóstico del CU proviene principalmente de la idea de poder disminuir el número de cistoscopias realizadas al año, para reducir así la frecuencia en que los pacientes son sometidos a esta técnica invasiva. En el campo de la diseminación tumoral, en cambio, la búsqueda de marcadores tiene como principal objetivo la selección de aquellos pacientes a los que la aplicación de quimioterapia neoadyuvante y/o adyuvante pueda suponerles una mejora en la supervivencia.

Una de las ventajas a tener en cuenta de las técnicas moleculares es la objetividad en la valoración de los resultados. Así, tanto la citología urinaria como la valoración microscópica del tejido linfático se basan en la observación de la morfología celular, lo cual implica una inevitable subjetividad relativa a la experiencia y conocimiento del patólogo. En cambio, las técnicas moleculares eliminan tal subjetividad mejorando la reproducibilidad de los resultados en diferentes laboratorios.

Pese a la evidencia de estas ventajas, hasta el momento ningún marcador molecular o ensayo recientemente estudiados en la literatura ha dado lugar a un cambio en el protocolo clínico. Esto puede ser debido en parte a que todavía no han sido establecidas unas pautas estandarizadas de utilización de estos marcadores, lo que lleva a la confusión de los clínicos sobre qué marcador usar y cuándo. Por otro lado, el beneficio económico que podría suponer el uso de estos marcadores no ha sido claramente demostrado ni adecuadamente estudiado. Concretamente en el caso del diagnóstico temprano del CU, varios análisis coste-eficacia han mostrado que el uso de marcadores moleculares implicaría un coste significativamente menor al que implica el seguimiento exhaustivo mediante cistoscopias (Hong y Loughlin, 2008), pero estos datos son dependientes del centro, con lo que no tienen una aplicación globalizada. Relacionado con estos estudios coste-eficacia, cabe destacar que el factor "calidad de vida" del paciente debería ser tenido en cuenta de manera que la modificación del régimen de seguimiento de los pacientes con CU implicara una ventaja económica pero a la vez mejorara la calidad de vida de los mismos.

Los resultados globales obtenidos de este trabajo indican que mediante el uso de técnicas citogenéticas y moleculares es posible mejorar la sensibilidad tanto en el

diagnóstico del CU como en la detección de su diseminación. Si bien es cierto que los ensayos desarrollados presentan cierto grado de dificultad técnica, también es cierto que estos ensayos moleculares podrían aportar beneficios en cuanto a la calidad de vida de los pacientes, pudiendo reducir el número de procedimientos invasivos en el seguimiento de la enfermedad y asignar tratamientos adyuvantes a pacientes con alto riesgo de recurrir o de presentar metástasis clínicas. Sin embargo, para acabar de establecer una utilidad clínica de estos ensayos son necesarios estudios de validación multicéntricos y randomizados en cohortes mayores de pacientes. Así, es probable que un futuro próximo los métodos utilizados actualmente para el diagnóstico del CU y de su diseminación sean combinados con ensayos moleculares proporcionando así una herramienta mucho más individualizada y fiable en el manejo clínico de CU.



## **6 CONCLUSIONES**

---



1. La superior sensibilidad de la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 respecto a la citología urinaria en la detección del CU no músculo-infiltrante, junto con su similar especificidad, hacen de esta técnica una herramienta útil en el diagnóstico y seguimiento no invasivo del CU. La incorporación de esta metodología en la práctica clínica podría reducir la frecuencia de cistoscopias realizadas actualmente en el seguimiento de los pacientes afectados con CU no músculo-infiltrante.
2. La técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 es capaz de detectar la presencia de tumor en aproximadamente un 70% de pacientes con citologías sospechosas realizadas en el diagnóstico del CU no músculo-infiltrante, permitiendo clarificar así muchos de los casos de tumor que presentan un resultado incierto por citología.
3. La técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 mejora la sensibilidad de la citología urinaria en el diagnóstico del CU localizado en el TUS, manteniendo una especificidad similar. Además, dada su naturaleza no invasiva, este método podría contribuir a un diagnóstico más preciso, y en algunos casos menos agresivo, del CU en dicha localización.
4. La elevada frecuencia de resultados positivos obtenidos mediante la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 tras la RTU, en muestras de lavado vesical procedente de pacientes con un CU de alto riesgo de recurrencia y progresión, confirma la necesidad de un tratamiento adyuvante tras la resección quirúrgica.
5. Un resultado positivo mediante la técnica FISH sobre los cromosomas 3, 7, 9 y 17 es factor pronóstico de recurrencia en pacientes con un CU sometidos a inmunoterapia con BCG. Por lo tanto, esta técnica podría ser de utilidad para complementar las técnicas convencionales utilizadas actualmente en el seguimiento de estos pacientes.
6. La cuantificación de la expresión de los marcadores *FXD3* y *KRT20* mediante qRT-PCR en ganglios linfáticos de pacientes con CU sometidos a cistectomía radical y linfadenectomía permite detectar un 20% de pacientes con diseminación tumoral linfática que no son detectados mediante el análisis histopatológico estándar.
7. La linfadenectomía supone un importante complemento de la cistectomía radical ya que aquellos pacientes en los que la microdiseminación vía linfática sólo fue detectable mediante qRT-PCR no presentaron una evolución clínica significativamente peor a la de los pacientes que presentaron un resultado

negativo para diseminación tanto por técnicas histopatológicas como por qRT-PCR.

8. La expresión génica de *FXVD3*, *C10orf116*, *AGR2* y *KRT19* en sangre periférica de pacientes sometidos a cistectomía radical y linfadenectomía permite distinguir entre pacientes con CU y controles sanos. Sin embargo, la expresión génica en sangre en el momento de la cistectomía de ninguno de los genes *FXVD3*, *C10orf116*, *AGR2*, *KRT19*, *KRT20* y *UPK2* permite discriminar entre pacientes que desarrollarán una metástasis a distancia y los que no lo harán.
9. Dada la elevada sensibilidad del método empleado para la detección de la diseminación tumoral sanguínea y los resultados obtenidos, podemos considerar que las técnicas basadas en PCR no son lo suficientemente sensibles para la detección de células tumorales circulantes en sangre que tendrán una significación clínica.

## **7 BIBLIOGRAFÍA**

---



1. 1999. Neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: a randomised controlled trial. International collaboration of trialists. *Lancet*, 354(9178): 533-540.
2. Acar, Kilinc, Yildirim, Kaynak, y Cenker, 2003. Evaluation of chromosome 8 and 11 aneuploidies in washings and biopsy materials of bladder transitional cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 142(1): 25-29.
3. Altieri, 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer*, 3(1): 46-54.
4. Amar y Das, 1985. Upper urinary tract transitional cell carcinoma in patients with bladder carcinoma and associated vesicoureteral reflux. *J. Urol.*, 133(3): 468-471.
5. Amira, Mourah, Rozet, Teillac, Fiet, Aubin, Cortesse, Desgrandchamps, Le Duc, Cussenot, y Soliman, 2002. Non-invasive molecular detection of bladder cancer recurrence. *Int. J. Cancer*, 101(3): 293-297.
6. Antunes, Nesrallah, Dall'Oglio, Ferreira, Passerotti, Leite, Ortiz, y Srougi, 2006. Analysis of prognostic factors in patients with transitional cell carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy. *Int. Braz. J. Urol.*, 32(1): 35-42.
7. Arancibia, Bolenz, Michel, Keeley, Jr., y Alken, 2007. The modern management of upper tract urothelial cancer: surgical treatment. *BJU. Int.*, 99(5): 978-981.
8. Arap, Pasqualini, y Ruoslahti, 1998. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 279(5349): 377-380.
9. Assimos, Hall, y Martin, 2000. Ureteroscopic management of patients with upper tract transitional cell carcinoma. *Urol Clin. North Am.*, 27(4): 751-760.
10. Babjuk, Oosterlinck, Sylvester, Kaasinen, Bohle, y Palou-Redorta, 2008. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur. Urol.*, 54(2): 303-314.
11. Bakkar, Wallerand, Radvanyi, Lahaye, Pissard, Lecerf, Kouyoumdjian, Abbou, Pairon, Jaurand, Thiery, Chopin, y de Medina, 2003. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.*, 63(23): 8108-8112.
12. Barbisan, Santinelli, Mazzucchelli, Lopez-Beltran, Cheng, Scarpelli, van der, y Montironi, 2008. Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer*, 112(3): 636-644.
13. Barrett y Kawasaki, 2003. Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov. Today*, 8(3): 134-141.
14. Bassi, Ferrante, Piazza, Spinadin, Carando, Pappagallo, y Pagano, 1999. Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort. *J. Urol.*, 161(5): 1494-1497.

15. Bastacky, Ibrahim, Wilczynski, y Murphy, 1999. The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer*, 87(3): 118-128.
16. bdel-Latif, bol-Enein, El-Baz, y Ghoneim, 2004. Nodal involvement in bladder cancer cases treated with radical cystectomy: incidence and prognosis. *J. Urol.*, 172(1): 85-89.
17. Billerey, Chopin, ubriot-Lorton, Ricol, Gil Diez de, Van, Bralet, Lefrere-Belda, Lahaye, Abbou, Bonaventure, Zafrani, van der, Thiery, y Radvanyi, 2001. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am. J. Pathol.*, 158(6): 1955-1959.
18. Bittard, Lamy, y Billery, 1996. Clinical evaluation of cell deoxyribonucleic acid content measured by flow cytometry in bladder cancer. *J. Urol.*, 155(6): 1887-1891.
19. Boccardo y Palmeri, 2006. Adjuvant chemotherapy of bladder cancer. *Ann. Oncol.*, 17 Suppl 5: v129-v132.
20. Bohle, Gerdes, Ulmer, Hofstetter, y Flad, 1990. Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J. Urol.*, 144(1): 53-58.
21. Bohle, Jocham, y Bock, 2003. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J. Urol.*, 169(1): 90-95.
22. bol-Enein, El-Baz, bd El-Hameed, bdel-Latif, y Ghoneim, 2004. Lymph node involvement in patients with bladder cancer treated with radical cystectomy: a patho-anatomical study--a single center experience. *J. Urol.*, 172(5 Pt 1): 1818-1821.
23. Bollmann, Heller, Bankfalvi, Griefingholt, y Bollmann, 2005. Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU. Int.*, 95(9): 1219-1225.
24. Borràs, Borràs, Bosch, Fernández E, Galceran J, y Gilsper R. Càncer a Catalunya 2001. 2001. L' Hospitalet de Llobregat: Institut Català d'Oncologia, Departament de Sanitat i Seguretat Social.
25. Bosma, Weigelt, Lambrechts, Verhagen, Pruntel, Hart, Rodenhuis, y van, V, 2002. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin. Cancer Res.*, 8(6): 1871-1877.
26. Brauers, Buettner, y Jakse, 2001. Second resection and prognosis of primary high risk superficial bladder cancer: is cystectomy often too early? *J. Urol.*, 165(3): 808-810.
27. Brausi, Gavioli, De, Verrini, Peracchia, Simonini, y Viola, 2007. Retroperitoneal lymph node dissection (RPLD) in conjunction with nephroureterectomy in the treatment of infiltrative transitional cell carcinoma (TCC) of the upper urinary tract: impact on survival. *Eur. Urol.*, 52(5): 1414-1418.
28. Brenner, Curtis, Hall, y Ron, 2000. Second malignancies in prostate carcinoma patients after radiotherapy compared with surgery. *Cancer*, 88(2): 398-406.



29. Bubendorf, Grilli, Sauter, Mihatsch, Gasser, y Dalquen, 2001. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am. J. Clin. Pathol.*, 116(1): 79-86.
30. Cairns, Proctor, y Knowles, 1991. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, 6(12): 2305-2309.
31. Cajulis, Haines, III, Frias-Hidvegi, McVary, y Bacus, 1995. Cytology, flow cytometry, image analysis, and interphase cytogenetics by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of transitional cell carcinoma in bladder washes: a comparative study. *Diagn. Cytopathol.*, 13(3): 214-223.
32. Calogero, Timmer-Bosscha, Schraffordt, Tiebosch, Mulder, y Hospers, 2000. Limitations of the nested reverse transcriptase polymerase chain reaction on tyrosinase for the detection of malignant melanoma micrometastases in lymph nodes. *Br. J. Cancer*, 83(2): 184-187.
33. Cappellen, De, Ricol, de, Bourdin, Sastre-Garau, Chopin, Thiery, y Radvanyi, 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat. Genet.*, 23(1): 18-20.
34. Catto, Azzouzi, Amira, Rehman, Feeley, Cross, Fromont, Sibony, Hamdy, Cussenot, y Meuth, 2003. Distinct patterns of microsatellite instability are seen in tumours of the urinary tract. *Oncogene*, 22(54): 8699-8706.
35. Chatterjee, Datar, Youssefzadeh, George, Goebell, Stein, Young, Shi, Gee, Groshen, Skinner, y Cote, 2004. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 22(6): 1007-1013.
36. Chow, Tzai, Cheng, Chan, y Lin, 1994. Urinary cytodiagnosis: can it have a different prognostic implication than a diagnostic test? *Urol. Int.*, 53(1): 18-23.
37. Christoph, Weikert, Wolff, Schostak, Tabiti, Muller, Miller, y Schrader, 2006. Urinary cytokeratin 20 mRNA expression has the potential to predict recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Lett.*
38. Clark, Stein, Groshen, Cai, Miranda, Lieskovsky, y Skinner, 2005. Radical cystectomy in the elderly: comparison of clinical outcomes between younger and older patients. *Cancer*, 104(1): 36-43.
39. Collado, Chechile, Salvador, y Vicente, 2000. Early complications of endoscopic treatment for superficial bladder tumors. *J. Urol.*, 164(5): 1529-1532.
40. Cote y Datar, 2003. Therapeutic approaches to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. *Crit Rev. Oncol. Hematol.*, 46 Suppl: S67-S83.
41. D'Hallewin, Bezdetnaya, y Guillemin, 2002. Fluorescence detection of bladder cancer: a review. *Eur. Urol.*, 42(5): 417-425.
42. Dal Cin, Roskams, Van Poppel, Balzarini, y Van den, 1999. Cytogenetic investigation of transitional cell carcinomas of the upper urinary tract. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 114(2): 117-120.

43. Dalbagni, Genega, Hashibe, Zhang, Russo, Herr, y Reuter, 2001. Cystectomy for bladder cancer: a contemporary series. *J. Urol.*, 165(4): 1111-1116.
44. Dalbagni, Presti, Reuter, Fair, y Cordon-Cardo, 1993. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet*, 342(8869): 469-471.
45. Daniely, Rona, Kaplan, Olsfanger, Elboim, Freiburger, Lew, y Leibovitch, 2007. Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology. *Cancer*, 111(6): 517-524.
46. de Boer, de Jong, van der MEIJDEN, Steerenberg, Witjes, Vegt, Debruyne, y Ruitenbergh, 1991. Leukocytes in the urine after intravesical BCG treatment for superficial bladder cancer. A flow cytofluorometric analysis. *Urol. Res.*, 19(1): 45-50.
47. Degtyar, Neulander, Zirkin, Yusim, Douvdevani, Mermershtain, Kaneti, y Manor, 2004. Fluorescence in situ hybridization performed on exfoliated urothelial cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, 63(2): 398-401.
48. Dimopoulos y Mouloupoulos, 1998. Role of adjuvant chemotherapy in the treatment of invasive carcinoma of the urinary bladder. *J. Clin. Oncol.*, 16(4): 1601-1612.
49. Duffy, O'Donovan, Brennan, Gallagher, y Ryan, 2007. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett.*, 249(1): 49-60.
50. Dyrskjot, Thykjaer, Kruhoffer, Jensen, Marcussen, Hamilton-Dutoit, Wolf, y Orntoft, 2003. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat. Genet.*, 33(1): 90-96.
51. Edmonds y Smith, 1986. The long-term hazards of the treatment of thyroid cancer with radioiodine. *Br. J. Radiol.*, 59(697): 45-51.
52. Engel, Taioli, Pfeiffer, Garcia-Closas, Marcus, Lan, Boffetta, Vineis, Autrup, Bell, Branch, Brockmoller, Daly, Heckbert, Kalina, Kang, Kato, Lafuente, Lin, Romkes, Taylor, y Rothman, 2002. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, 156(2): 95-109.
53. Esrig, Elmajian, Groshen, Freeman, Stein, Chen, Nichols, Skinner, Jones, y Cote, 1994. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N. Engl. J. Med.*, 331(19): 1259-1264.
54. Fadl-Elmula, Gorunova, Mandahl, Elfving, Lundgren, Rademark, y Heim, 1999. Cytogenetic analysis of upper urinary tract transitional cell carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 115(2): 123-127.
55. Fadl-Elmula, Kytola, Pan, Lui, Derienzo, Forsberg, Mandahl, Gorunova, Bergerheim, Heim, y Larsson, 2001. Characterization of chromosomal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyotyping and FISH analysis. *Int. J. Cancer*, 92(6): 824-831.
56. Fadl-Elmula, 2005. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell Chromosome.*, 4(1): 1.

57. Fernando y Bianco, 2005. Clasificación del cáncer vesical. In: Javier Angulo and Antonio Berenguer (Editors), *Cáncer de vejiga. Historia natural, biología, terapéutica*. pp. 68-75.
58. Fidler, 1995. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87(21): 1588-1592.
59. Fitzgerald, Ramchurren, Rieger, Levesque, Silverman, Libertino, y Summerhayes, 1995. Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87(2): 129-133.
60. Fleischmann, Thalmann, Markwalder, y Studer, 2005. Extracapsular extension of pelvic lymph node metastases from urothelial carcinoma of the bladder is an independent prognostic factor. *J. Clin. Oncol.*, 23(10): 2358-2365.
61. Friedrich, Toma, Hellstern, Pantel, Weisenberger, Noldus, y Huland, 2003. Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer. *BJU. Int.*, 92(9): 911-914.
62. Fromont, Roupret, Amira, Sibony, Vallancien, Validire, y Cussenot, 2005. Tissue microarray analysis of the prognostic value of E-cadherin, Ki67, p53, p27, survivin and MSH2 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Eur. Urol.*, 48(5): 764-770.
63. Fujii, Kageyama, Kawakami, Kihara, y Oshima, 1999. Detection of disseminated urothelial cancer cells in peripheral venous blood by a cytokeratin 20-specific nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(7): 753-757.
64. Fujimoto, Yamada, Okajima, Kakizoe, Sasaki, Sugimura, y Terada, 1992. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res.*, 52(6): 1393-1398.
65. Gallucci, Guadagni, Marzano, Leonardo, Merola, Sentinelli, Ruggeri, Cantiani, Sperduti, Lopez, y Cianciulli, 2005. Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J. Clin. Pathol.*, 58(4): 367-371.
66. Gazzaniga, Gandini, Giuliani, Magnanti, Gradilone, Silvestri, Gianni, Gallucci, Frati, y Agliano, 2001. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood: a new marker of circulating neoplastic cells in bladder cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 7(3): 577-583.
67. Gendreau y Whalen, 1999. What can we learn from the phenomenon of preferential lymph node metastasis in carcinoma? *J. Surg. Oncol.*, 70(3): 199-204.
68. Ghoneim y Abol-Enein, 2004. Lymphadenectomy with cystectomy: is it necessary and what is its extent? *Eur. Urol.*, 46(4): 457-461.
69. Ghoneim, el-Mekresh, el-Baz, el-Attar, y Ashamalla, 1997. Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: critical evaluation of the results in 1,026 cases. *J. Urol.*, 158(2): 393-399.

70. Giuliano, Jones, Brennan, y Statman, 1997. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 15(6): 2345-2350.
71. Glas, Roos, Deutekom, Zwinderman, Bossuyt, y Kurth, 2003. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J. Urol.*, 169(6): 1975-1982.
72. Gofrit, Zorn, Silvestre, Shalhav, Zagaja, Msezane, y Steinberg, 2008. The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol.*, 26(3): 246-249.
73. Grimm, Steinhoff, Simon, Spiegelhalder, Ackermann, y Vogeli, 2003. Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study. *J. Urol.*, 170(2 Pt 1): 433-437.
74. Grossman, Natale, Tangen, Speights, Vogelzang, Trump, Vere White, Sarosdy, Wood, Jr., Raghavan, y Crawford, 2003. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N. Engl. J. Med.*, 349(9): 859-866.
75. Grups, Gruss, y Frohmuller, 1989. Evaluation of the T stage of carcinoma of the bladder by transurethral ultrasonography. *Urol. Int.*, 44(3): 132-134.
76. Gudemann, Weitz, Kienle, Lacroix, Wiesel, Soder, Benner, Staehler, y Doeberitz, 2000. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with transitional cell carcinoma. *J Urol.*, 164(2): 532-536.
77. Gudjonsson, Isfoss, Hansson, Domanski, Warenholt, Soller, Lundberg, Liedberg, Grabe, y Mansson, 2007. The Value of the UroVysion((R)) Assay for Surveillance of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.*
78. Gupta y Massague, 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4): 679-695.
79. Habuchi, Marberger, Droller, Hemstreet, III, Grossman, Schalken, Schmitz-Drager, Murphy, Bono, Goebell, Getzenberg, Hautmann, Messing, Fradet, y Lokeshwar, 2005. Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*, 66(6 Suppl 1): 64-74.
80. Halling, 2003. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 3(4): 507-519.
81. Halling, King, Sokolova, Karnes, Meyer, Powell, Sebo, Cheville, Clayton, Krajnik, Ebert, Nelson, Burkhardt, Ramakumar, Stewart, Pankratz, Lieber, Blute, Zincke, Seelig, Jenkins, y O'Kane, 2002. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J. Urol.*, 167(5): 2001-2006.
82. Halling, King, Sokolova, Meyer, Burkhardt, Halling, Cheville, Sebo, Ramakumar, Stewart, Pankratz, O'Kane, Seelig, Lieber, y Jenkins, 2000. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J. Urol.*, 164(5): 1768-1775.
83. Hara, Miyake, Fujisawa, Okada, Arakawa, Kamidono, y Hara, 2001. Prognostic variables in patients who have undergone radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31(8): 399-402.

84. Hatta, Takata, Takehara, y Ohara, 1998. Polymerase chain reaction and immunohistochemistry frequently detect occult melanoma cells in regional lymph nodes of melanoma patients. *J. Clin. Pathol.*, 51(8): 597-601.
85. Hautmann y Paiss, 1998. Does the option of the ileal neobladder stimulate patient and physician decision toward earlier cystectomy? *J. Urol.*, 159(6): 1845-1850.
86. Hayashida, Nomata, Noguchi, Eguchi, Koga, Yamashita, Hayashi, y Kanatake, 2004. Long-term effects of bacille Calmette-Guerin perfusion therapy for treatment of transitional cell carcinoma in situ of upper urinary tract. *Urology*, 63(6): 1084-1088.
87. Heney, Ahmed, Flanagan, Frable, Corder, Hafermann, y Hawkins, 1983a. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J. Urol.*, 130(6): 1083-1086.
88. Heney, Proppe, Prout, Jr., Griffin, y Shipley, 1983b. Invasive bladder cancer: tumor configuration, lymphatic invasion and survival. *J. Urol.*, 130(5): 895-897.
89. Hermanek, 1999. Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res.*, 19(4A): 2771-2774.
90. Hernandez, Lopez-Knowles, Lloreta, Kogevinas, Jaramillo, Amoros, Tardon, Garcia-Closas, Serra, Carrato, Malats, y Real, 2005. FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 11(15): 5444-5450.
91. Herr, 2003c. Surgical factors in bladder cancer: more (nodes) + more (pathology) = less (mortality). *BJU. Int.*, 92(3): 187-188.
92. Herr, 2003b. Superiority of ratio based lymph node staging for bladder cancer. *J. Urol.*, 169(3): 943-945.
93. Herr, 1999. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. *J. Urol.*, 162(1): 74-76.
94. Herr, 2003a. Extent of surgery and pathology evaluation has an impact on bladder cancer outcomes after radical cystectomy. *Urology*, 61(1): 105-108.
95. Herr, Bochner, Dalbagni, Donat, Reuter, y Bajorin, 2002. Impact of the number of lymph nodes retrieved on outcome in patients with muscle invasive bladder cancer. *J. Urol.*, 167(3): 1295-1298.
96. Highman y Wilson, 1982. Urine cytology in patients with calculi. *J. Clin. Pathol.*, 35(3): 350-356.
97. Hirohashi, 1998. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol.*, 153(2): 333-339.
98. Hisataki, Miyao, Masumori, Takahashi, Sasai, Yanase, Itoh, y Tsukamoto, 2000. Risk factors for the development of bladder cancer after upper tract urothelial cancer. *Urology*, 55(5): 663-667.
99. Hoglund, Gisselsson, Mandahl, Johansson, Mertens, Mitelman, y Sall, 2001. Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and

- converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes. Cancer*, 31(2): 156-171.
100. Holloway, van Laar, Tothill, y Bowtell, 2002. Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat. Genet.*, 32 Suppl: 481-489.
101. Hong, Kwak, Jeon, Lee, y Lee, 2005. Do vascular, lymphatic, and perineural invasion have prognostic implications for bladder cancer after radical cystectomy? *Urology*, 65(4): 697-702.
102. Hong y Loughlin, 2008. Economic impact of tumor markers in bladder cancer surveillance. *Urology*, 71(1): 131-135.
103. Hoque, Lee, Begum, Yamashita, Engles, Schoenberg, Westra, y Sidransky, 2003. High-throughput molecular analysis of urine sediment for the detection of bladder cancer by high-density single-nucleotide polymorphism array. *Cancer Res.*, 63(18): 5723-5726.
104. Hu, Sidransky, y Ahrendt, 2002. Molecular detection approaches for smoking associated tumors. *Oncogene*, 21(48): 7289-7297.
105. Inoue, Slaton, Kim, Perrotte, Eve, Bar-Eli, Radinsky, y Dinney, 2000. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res.*, 60(8): 2290-2299.
106. Ishida, Katsuyama, Sugiyama, y Kawasaki, 1997. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer*, 79(6): 1069-1076.
107. Ishiwata, Takahashi, Homma, Tanaka, Kameyama, Hosaka, y Kitamura, 2001. Noninvasive detection and prediction of bladder cancer by fluorescence in situ hybridization analysis of exfoliated urothelial cells in voided urine. *Urology*, 57(4): 811-815.
108. Ismail, Wynendaele, Aerts, Paridaens, Gaafar, Shakankiry, Khaled, Christiaens, Wildiers, Omar, Vandekerckhove, y Van Oosterom, 2004. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumor cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin. Cancer Res.*, 10(1 Pt 1): 196-201.
109. Itoh, Tanioka, Yoshida, Yoshioka, Nishimoto, y Itohara, 1998. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.*, 58(5): 1048-1051.
110. Iwasaki, Enjoji, y Kano, 1979. Nonpapillary carcinoma in situ of the urinary bladder. A histopathologic study and mapping of the urothelial lesions. *Acta Pathol. Jpn.*, 29(4): 623-633.
111. Izawa, Slaton, Kedar, Karashima, Perrotte, Czerniak, Grossman, y Dinney, 2001. Differential expression of progression-related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol. Rep.*, 8(1): 9-15.

112. Jebar, Hurst, Tomlinson, Johnston, Taylor, y Knowles, 2005. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, 24(33): 5218-5225.
113. Jones, 2006. DNA-based molecular cytology for bladder cancer surveillance. *Urology*, 67(3 Suppl 1): 35-45.
114. Jung, Reeder, Cox, Siddiqui, O'Connell, Collins, Yang, Messing, y Wheeless, 1999. Chromosome 9 monosomy by fluorescence in situ hybridization of bladder irrigation specimens is predictive of tumor recurrence. *J. Urol*, 162(6): 1900-1903.
115. Kakizoe, Fujita, Murase, Matsumoto, y Kishi, 1980. Transitional cell carcinoma of the bladder in patients with renal pelvic and ureteral cancer. *J. Urol.*, 124(1): 17-19.
116. Kausch, Doehn, y Jocham, 2006. Recent improvements in the detection and treatment of nonmuscle-invasive bladder cancer. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 6(9): 1301-1311.
117. Kayed, Kleeff, Kolb, Ketterer, Keleg, Felix, Giese, Penzel, Zentgraf, Buchler, Korc, y Friess, 2006. FXYD3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth. *Int. J. Cancer*, 118(1): 43-54.
118. Kee, Lee, y Ro, 2001. Oncoprotein changes in the flat lesions with atypia and invasive neoplasms of the urinary bladder. *Oncol. Rep.*, 8(3): 579-583.
119. Keesee, Briggman, Thill, y Wu, 1996. Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 6(2-3): 189-214.
120. Kinders, Jones, Root, Bruce, Murchison, Corey, Williams, Enfield, y Hass, 1998. Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin. Cancer Res.*, 4(10): 2511-2520.
121. Kipp, Karnes, Brankley, Harwood, Pankratz, Sebo, Blute, Lieber, Zincke, y Halling, 2005. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J. Urol.*, 173(2): 401-404.
122. Kirkali y Tuzel, 2003. Transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis. *Crit Rev. Oncol. Hematol.*, 47(2): 155-169.
123. Knowles, 1998. Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression. *Cancer Surv.*, 31: 49-76.
124. Knowles, 2001. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol. Pathol.*, 54(4): 215-221.
125. Knowles, Elder, Williamson, Cairns, Shaw, y Law, 1994. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res.*, 54(2): 531-538.
126. Knowles y Williamson, 1993. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res.*, 53(1): 133-139.

127. Konety, Joslyn, y O'Donnell, 2003. Extent of pelvic lymphadenectomy and its impact on outcome in patients diagnosed with bladder cancer: analysis of data from the Surveillance, Epidemiology and End Results Program data base. *J. Urol*, 169(3): 946-950.
128. Koss. *Diagnostic Cytology of the Urinary Tract With Histopathologic and Clinical Correlation*. 1996. Philadelphia, Pa, Lippincott-Raven.
129. Koss, 1979. Mapping of the urinary bladder: its impact on the concepts of bladder cancer. *Hum. Pathol.*, 10(5): 533-548.
130. Kramer, Merseburger, Hennenlotter, y Kuczyk, 2007. Tissue microarrays in clinical urology--technical considerations. *Scand. J. Urol Nephrol.*, 41(6): 478-484.
131. Kurahashi, Hara, Oka, Kamidono, Eto, y Miyake, 2005. Detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients undergoing radical cystectomy for focally invasive bladder cancer by real-time reverse transcriptase-PCR for cytokeratin 19 and uroplakin II. *Clin. Cancer Res.*, 11(10): 3773-3777.
132. Laguna y de la Rosette, 2001. The endoscopic approach to the distal ureter in nephroureterectomy for upper urinary tract tumor. *J. Urol*, 166(6): 2017-2022.
133. Laudadio, Keane, Reeves, Savage, Hoda, Lage, y Wolff, 2005. Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. *BJU. Int.*, 96(9): 1280-1285.
134. Leach, Hsieh, Molberg, Saboorian, McConnell, y Sagalowsky, 2000. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer*, 88(10): 2333-2341.
135. Lee, Kim, Byun, Lee, Lee, Kim, Chang, y Chi, 2001. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res.*, 61(18): 6688-6692.
136. Lee y Droller, 2000. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin. North Am.*, 27(1): 1-13, vii.
137. Lee, Shin, Park, Kim, Dong, Pi, Lee, Kim, Jang, Kim, Kim, Lee, y Yoo, 1999. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res.*, 59(13): 3068-3072.
138. Lehmann, Retz, y Stockle, 2002. Chemotherapy in the post-MVAC era: the case for adjuvant chemotherapy. *World J. Urol.*, 20(3): 144-150.
139. Leissner, Ghoneim, bol-Enein, Thuroff, Franzaring, Fisch, Schulze, Managadze, Allhoff, el-Baz, Kastendieck, Buhtz, Kropf, Hohenfellner, y Wolf, 2004. Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J. Urol.*, 171(1): 139-144.
140. Leissner, Hohenfellner, Thuroff, y Wolf, 2000. Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder; significance for staging and prognosis. *BJU. Int.*, 85(7): 817-823.



141. Leissner, Stein, Hohenfellner, Kohl, Riedmiller, Schroder, Lampel, y Thuroff, 1999. Radical cystoprostatectomy combined with Mainz pouch bladder substitution to the urethra: long-term results. *BJU. Int.*, 83(9): 964-970.
142. Liang y Pardee, 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257(5072): 967-971.
143. Liedberg y Mansson, 2006. Lymph node metastasis in bladder cancer. *Eur. Urol.*, 49(1): 13-21.
144. Lin, Miyamoto, Fujinami, Uemura, Hosaka, Iwasaki, y Kubota, 1996. Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2(6): 929-932.
145. Lipponen, 1995. Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *J. Pathol.*, 175(2): 203-210.
146. Llopis, Alcaraz, Ribal, Sole, Ventura, Barranco, Rodriguez, Corral, y Carretero, 2000. p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. *Eur. Urol*, 37(6): 644-653.
147. Lodde, Mian, Wiener, Haitel, Pycha, y Marberger, 2001. Detection of upper urinary tract transitional cell carcinoma with ImmunoCyt: a preliminary report. *Urology*, 58(3): 362-366.
148. Lopez-Beltran, Luque, varez-Kindelan, Quintero, Merlo, Carrasco, Requena, y Montironi, 2004. Prognostic factors in stage T1 grade 3 bladder cancer survival: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27kip1, Cyclin D1, and Cyclin D3) and proliferation index (ki67-MIB1). *Eur. Urol*, 45(5): 606-612.
149. Lotan, Bensalah, Ruddell, Shariat, Sagalowsky, y Ashfaq, 2008. Prospective evaluation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder. *J. Urol*, 179(6): 2164-2169.
150. Luzzi, MacDonald, Schmidt, Kerkvliet, Morris, Chambers, y Groom, 1998. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.*, 153(3): 865-873.
151. MacDonald, Groom, y Chambers, 2002. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays*, 24(10): 885-893.
152. MacLennan, Kirkali, y Cheng, 2007. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur. Urol.*, 51(4): 889-897.
153. Madersbacher, Hochreiter, Burkhard, Thalmann, Danuser, Markwalder, y Studer, 2003. Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J. Clin. Oncol.*, 21(4): 690-696.
154. Mao, Schoenberg, Scicchitano, Erozan, Merlo, Schwab, y Sidransky, 1996. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science*, 271(5249): 659-662.

155. Marín-Aguilera, Mengual, Burset, Oliver, Ars, Ribal, Colomer, Mellado, Villavicencio, Algaba, y Alcaraz, 2008. Molecular Lymph Node Staging in Bladder Urothelial Carcinoma: Impact on Survival. *Eur. Urol.*
156. Marincola, Jaffee, Hicklin, y Ferrone, 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.*, 74: 181-273.
157. McKenney, Desai, Cohen, y Amin, 2001. Discriminatory immunohistochemical staining of urothelial carcinoma in situ and non-neoplastic urothelium: an analysis of cytokeratin 20, p53, and CD44 antigens. *Am. J. Surg. Pathol.*, 25(8): 1074-1078.
158. Mengual, Burset, Marín-Aguilera, Ribal, y Alcaraz, 2008. Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays. *BMC. Res. Notes*, 1(1): 21.
159. Mian, Pycha, Wiener, Haitel, Lodde, y Marberger, 1999. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J. Urol.*, 161(5): 1486-1489.
160. Millan-Rodriguez, Chechile-Toniolo, Salvador-Bayarri, Huguet-Perez, y Vicente-Rodriguez, 2000a. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. *J. Urol.*, 164(4): 1183-1187.
161. Millan-Rodriguez, Chechile-Toniolo, Salvador-Bayarri, Palou, y Vicente-Rodriguez, 2000b. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J. Urol.*, 163(1): 73-78.
162. Millan-Rodriguez, Palou, de, Vayreda-Martija, Villavicencio-Mavrich, y Vicente-Rodriguez, 1999. Conventional CT signs in staging transitional cell tumors of the upper urinary tract. *Eur. Urol.*, 35(4): 318-322.
163. Mills, Turner, Fleischmann, Markwalder, Thalmann, y Studer, 2001. Pelvic lymph node metastases from bladder cancer: outcome in 83 patients after radical cystectomy and pelvic lymphadenectomy. *J. Urol.*, 166(1): 19-23.
164. Miyake, Yoshimura, Hara, Eto, Arakawa, y Kamidono, 1997. Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J. Urol.*, 157(6): 2351-2355.
165. Miyamoto, Shuin, Torigoe, Iwasaki, y Kubota, 1995. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br. J. Cancer*, 71(4): 831-835.
166. Moll, Lowe, Laufer, y Franke, 1992. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.*, 140(2): 427-447.
167. Morrison, Moorman, Kowdley, Kobayashi, Jones, y Leder, 1995. Mat-8, a novel phospholemman-like protein expressed in human breast tumors, induces a chloride conductance in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 270(5): 2176-2182.
168. Mostofi, Sorbin LH, y Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumors. International histological classification of tumors. [Nº 10]. 1973. Geneva, Switzerland, World Health Organization.

169. Murta-Nascimento, Schmitz-Drager, Zeegers, Steineck, Kogevinas, Real, y Malats, 2007. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J. Urol.*, 25(3): 285-295.
170. Nagrath, Sequist, Maheswaran, Bell, Irimia, Ulkus, Smith, Kwak, Digumarthy, Muzikansky, Ryan, Balis, Tompkins, Haber, y Toner, 2007. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173): 1235-1239.
171. Nathanson, 2003. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*, 98(2): 413-423.
172. Noutsias, Rohde, Block, Klippert, Lettau, Blunert, Hummel, Kuhl, Lehmkuhl, Hetzer, Rauch, Poller, Pauschinger, Schultheiss, Volk, y Kotsch, 2008. Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC. Mol. Biol.*, 9: 3.
173. Nygren, Csoka, Larsson, Busch, Wester, y Malmstrom, 1999. Activity of standard and investigational cytotoxic drugs in primary cultures of tumor cells from patients with kidney and urinary bladder carcinomas. *J. Urol.*, 162(6): 2200-2204.
174. Ohtsuka, Kawakami, Fujii, Koga, Saito, Ando, Takizawa, Kageyama, y Kihara, 2006. Loss of uroplakin III expression is associated with a poor prognosis in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *BJU. Int.*, 97(6): 1322-1326.
175. Okamoto, Morisaki, Sasaki, Miyake, Matsumoto, Suga, Ando, y Saya, 1998. Molecular detection of cancer cells by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of specific CD44 variant RNAs. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(4): 307-315.
176. Okegawa, Kinjo, Horie, Nutahara, y Higashihara, 2003. Detection of mucin 7 gene expression in exfoliated cells in urine from patients with bladder tumor. *Urology*, 62(1): 182-186.
177. Okegawa, Kinjo, Nutahara, y Higashihara, 2004. Value of reverse transcription polymerase chain assay in peripheral blood of patients with urothelial cancer. *J Urol.*, 171(4): 1461-1466.
178. Oleaga, 2004. Los métodos de imagen en la estadificación del cáncer vesical. In: *Cáncer de vejiga. Historia natural, biología, terapéutica.* pp. 76-82.
179. Olumi, Tsai, Nichols, Skinner, Cain, Bender, y Jones, 1990. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res.*, 50(21): 7081-7083.
180. Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström P-U, Stöckle M, y Sternberg C, 2002. Guidelines on bladder cancer. *Eur. Urol.*, 41: 105-112.
181. Oosterlinck, Solsona, van der MEIJDEN, Sylvester, Bohle, Rintala, y Lobel, 2004. EAU guidelines on diagnosis and treatment of upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Eur. Urol.*, 46(2): 147-154.

182. Orlow, Lianes, Lacombe, Dalbagni, Reuter, y Cordon-Cardo, 1994. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res.*, 54(11): 2848-2851.
183. Orntoft y Wolf, 1998. Molecular alterations in bladder cancer. *Urol. Res.*, 26(4): 223-233.
184. Orsola, Trias, Raventos, Espanol, Cecchini, Bucar, Salinas, y Orsola, 2005. Initial high-grade T1 urothelial cell carcinoma: feasibility and prognostic significance of lamina propria invasion microstaging (T1a/b/c) in BCG-treated and BCG-non-treated patients. *Eur. Urol.*, 48(2): 231-238.
185. Osman, Bajorin, Sun, Zhong, Douglas, Scattergood, Zheng, Han, Marshall, y Liew, 2006. Novel blood biomarkers of human urinary bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12(11 Pt 1): 3374-3380.
186. Paik, Scolieri, Brown, Spirnak, y Resnick, 2000. Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy. *J. Urol.*, 163(6): 1693-1696.
187. Pantel, Cote, y Fodstad, 1999. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(13): 1113-1124.
188. Papanicolaou y Marshall, 1945. Urine sediment smears as a diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science*, 101(2629): 519-520.
189. Park, Park, Song, Doo, Cho, Ahn, y Kim, 2007. Effectiveness of adjuvant chemotherapy in transitional cell carcinoma of the urinary bladder with lymph node involvement and/or lymphovascular invasion treated by radical cystectomy. *Urology*, 70(2): 257-262.
190. Pepper, 2001. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin. Cancer Res.*, 7(3): 462-468.
191. Persad, Kabala, Gillatt, Penry, Gingell, y Smith, 1993. Magnetic resonance imaging in the staging of bladder cancer. *Br. J. Urol.*, 71(5): 566-573.
192. Pfister, Flaman, Dunet, Grise, y Frebourg, 1999. p53 mutations in bladder tumors inactivate the transactivation of the p21 and Bax genes, and have a predictive value for the clinical outcome after bacillus Calmette-Guerin therapy. *J. Urol.*, 162(1): 69-73.
193. Piper, Matanoski, y Tonascia, 1986. Bladder cancer in young women. *Am. J. Epidemiol.*, 123(6): 1033-1042.
194. Piper, Tonascia, y Matanoski, 1985. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N. Engl. J. Med.*, 313(5): 292-295.
195. Placer, Espinet, Salido, Sole, y Gelabert-Mas, 2002. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur. Urol.*, 42(6): 547-552.
196. Potts, Thomas, Cohen, y Raab, 1997. Diagnostic accuracy and key cytologic features of high-grade transitional cell carcinoma in the upper urinary tract. *Mod. Pathol.*, 10(7): 657-662.

197. Poulsen, Horn, y Steven, 1998. Radical cystectomy: extending the limits of pelvic lymph node dissection improves survival for patients with bladder cancer confined to the bladder wall. *J. Urol.*, 160(6 Pt 1): 2015-2019.
198. Presti, Reuter, Galan, Fair, y Cordon-Cardo, 1991. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res.*, 51(19): 5405-5409.
199. Pycha, Lodde, Comploj, Negri, Egarter-Vigl, Vittadello, Lusuardi, Palermo, y Mian, 2004. Intermediate-risk urothelial carcinoma: an unresolved problem? *Urology*, 63(3): 472-475.
200. Pycha, Mian, Haitel, Hofbauer, Wiener, y Marberger, 1997. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer. *J. Urol.*, 157(6): 2116-2119.
201. Pycha, Mian, Hofbauer, Haitel, Wiener, y Marberger, 1998. Does topical instillation therapy influence chromosomal aberrations in superficial bladder cancer? *J. Urol.*, 159(1): 265-269.
202. Quek, Sanderson, Daneshmand, y Stein, 2004. New molecular markers for bladder cancer detection. *Curr. Opin. Urol.*, 14(5): 259-264.
203. Rabbani, Perrotti, Russo, y Herr, 2001. Upper-tract tumors after an initial diagnosis of bladder cancer: argument for long-term surveillance. *J. Clin. Oncol.*, 19(1): 94-100.
204. Ramaekers y Hopman, 1993. Detection of genetic aberrations in bladder cancer using in situ hybridization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 677: 199-213.
205. Raman, Ng, Boorjian, Vaughan, Jr., Sosa, y Scherr, 2005. Bladder cancer after managing upper urinary tract transitional cell carcinoma: predictive factors and pathology. *BJU. Int.*, 96(7): 1031-1035.
206. Ratliff, Palmer, McGarr, y Brown, 1987. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy for murine bladder tumors: initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of Bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Res.*, 47(7): 1762-1766.
207. Retz, Lehmann, Amann, Wullich, Roder, y Stockle, 2003. Mucin 7 and cytokeratin 20 as new diagnostic urinary markers for bladder tumor. *J. Urol.*, 169(1): 86-89.
208. Retz, Lehmann, Roder, Weichert-Jacobsen, Loch, Romahn, Luhl, Kalthoff, y Stockle, 2001. Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients. *Eur. Urol.*, 39(5): 507-515.
209. Ribal, Alcaraz, Mengual, Carrio, Lopez-Guillermo, Mallofre, Palou, Gelabert, y Villavicencio, 2004. Chromosomal high-polysomies predict tumour progression in T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur. Urol.*, 45(5): 593-599.
210. Ribal, Mengual, Marin, Algaba, Ars, Fernandez, Oliva, Villavicencio, y Alcaraz, 2006. Molecular staging of bladder cancer with RT-PCR assay for CK20 in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes: comparison with standard histological staging. *Anticancer Res.*, 26(1A): 411-419.

211. Richter, Beffa, Wagner, Schraml, Gasser, Moch, Mihatsch, y Sauter, 1998. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.*, 153(5): 1615-1621.
212. Riedl, Daniltchenko, Koenig, Simak, Loening, y Pflueger, 2001. Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer. *J. Urol*, 165(4): 1121-1123.
213. Rieger-Christ, Mourtzinou, Lee, Zagha, Cain, Silverman, Libertino, y Summerhayes, 2003. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. *Cancer*, 98(4): 737-744.
214. Rigola, Fuster, Casadevall, Bernues, Caballin, Gelabert, Egozcue, y Miro, 2001. Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 127(1): 59-63.
215. Saint, Le Frere Belda, Quintela, Hoznek, Patard, Bellot, Popov, Zafrani, Abbou, Chopin, y de Medina, 2004. Pretreatment p53 nuclear overexpression as a prognostic marker in superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Eur. Urol*, 45(4): 475-482.
216. Sanchini, Gunelli, Nanni, Bravaccini, Fabbri, Sermasi, Bercovich, Ravaioli, Amadori, y Calistri, 2005. Relevance of urine telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *JAMA*, 294(16): 2052-2056.
217. Sandberg, 1992. Chromosome changes in early bladder neoplasms. *J. Cell Biochem. Suppl*, 16l: 76-79.
218. Sandberg y Berger, 1994. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J. Urol.*, 151(3): 545-560.
219. Sanderson, Skinner, y Stein, 2006. The prognostic and staging value of lymph node dissection in the treatment of invasive bladder cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 3(9): 485-494.
220. Sanderson, Stein, y Skinner, 2004. The evolving role of pelvic lymphadenectomy in the treatment of bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 22(3): 205-211.
221. Sarosdy, Schellhammer, Bokinsky, Kahn, Chao, Yore, Zadra, Burzon, Osher, Bridge, Anderson, Johansson, Lieber, Soloway, y Flom, 2002. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J. Urol.*, 168(5): 1950-1954.
222. Sato, Shimada, Li, Watanabe, Maeda, y Imamura, 2001. Lymph node micrometastasis and prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Surg.*, 88(3): 426-432.
223. Sato, Sasaki, Ogura, Shimoda, Togashi, Terada, Sugiyama, Kakinuma, Ogawa, y Kato, 1998. Expression of vascular endothelial growth factor gene and its receptor (flt-1) gene in urinary bladder cancer. *Tohoku J. Exp. Med.*, 185(3): 173-184.

224. Sauter, Carroll, Moch, Kallioniemi, Kerschmann, Narayan, Mihatsch, y Waldman, 1995. c-myc copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*, 146(5): 1131-1139.
225. Sauter, Gasser, Moch, Richter, Jiang, Albrecht, Novotny, Wagner, Bubendorf, y Mihatsch, 1997. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol. Res.*, 25 Suppl 1: S37-S43.
226. Schlichtholz, Presler, y Matuszewski, 2004. Clinical implications of p53 mutation analysis in bladder cancer tissue and urine sediment by functional assay in yeast. *Carcinogenesis*, 25(12): 2319-2323.
227. Schmidbauer, Witjes, Schmeller, Donat, Susani, y Marberger, 2004. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J. Urol.*, 171(1): 135-138.
228. Seaman, Slawin, y Benson, 1993. Treatment options for upper tract transitional-cell carcinoma. *Urol. Clin. North Am.*, 20(2): 349-354.
229. Sengupta y Blute, 2006. The management of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, 67(3 Suppl 1): 48-54.
230. Seraj, Thomas, Chin, y Theodorescu, 2001. Molecular determination of perivesical and lymph node metastasis after radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Clin. Cancer Res.*, 7(6): 1516-1522.
231. Shahin, Thalmann, Rentsch, Mazzucchelli, y Studer, 2003. A retrospective analysis of 153 patients treated with or without intravesical bacillus Calmette-Guerin for primary stage T1 grade 3 bladder cancer: recurrence, progression and survival. *J. Urol*, 169(1): 96-100.
232. Shankaran, Ikeda, Bruce, White, Swanson, Old, y Schreiber, 2001. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832): 1107-1111.
233. Shariat, Kim, Raptidis, Ayala, y Lerner, 2003. Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology*, 61(6): 1140-1145.
234. Shigyo, Sugano, Fukayama, Taniguchi, Tobisu, Fujimoto, Doi, Niwakawa, Shimamura, Tsukamoto, Sekiya, y Kakizoe, 1998. Allelic loss on chromosome 9 in bladder cancer tissues and urine samples detected by blunt-end single-strand DNA conformation polymorphism. *Int. J. Cancer*, 78(4): 425-429.
235. Shiina, Igawa, Urakami, Honda, Shirakawa, y Ishibe, 1996. Immunohistochemical analysis of bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Clin. Pathol.*, 49(5): 395-399.
236. Shipley, Kaufman, Tester, Pilepich, y Sandler, 2003. Overview of bladder cancer trials in the Radiation Therapy Oncology Group. *Cancer*, 97(8 Suppl): 2115-2119.
237. Shweiki, Itin, Soffer, y Keshet, 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398): 843-845.

238. Siemens, Morales, Johnston, y Emerson, 2003. A comparative analysis of rapid urine tests for the diagnosis of upper urinary tract malignancy. *Can. J. Urol.*, 10(1): 1754-1758.
239. Simon, Richter, Wagner, Fijan, Bruderer, Schmid, Ackermann, Maurer, Alund, Knonagel, Rist, Wilber, Anabitar, Hering, Hardmeier, Schonenberger, Flury, Jager, Fehr, Schraml, Moch, Mihatsch, Gasser, y Sauter, 2001. High-throughput tissue microarray analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) copy number alterations in urinary bladder cancer. *Cancer Res.*, 61(11): 4514-4519.
240. Simoneau, Spruck, III, Gonzalez-Zulueta, Gonzalzo, Chan, Tsai, Dean, Steven, Horn, y Jones, 1996. Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res.*, 56(21): 5039-5043.
241. Skacel, Fahmy, Brainard, Pettay, Biscotti, Liou, Procop, Jones, Ulchaker, Zippe, y Tubbs, 2003. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J. Urol.*, 169(6): 2101-2105.
242. Smith, Crawford, Paradelo, Blumenstein, Herschman, Grossman, y Christie. Treatment of advanced bladder cancer with combined preoperative irradiation and radical cystectomy versus radical cystectomy alone: a phase III intergroup study. *J.Urol.* 157[3], 805-807. 1997.
243. Smith y Whitmore. Regional lymph node metastasis from bladder cancer. *J.Urol.* 126[5], 591-593. 1981.
244. Smith, Wheeler, Plescia, Colberg, Weiss, y Altieri, 2001. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA*, 285(3): 324-328.
245. Sobin y Wittekind, 2002. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Wiley, New York.
246. Sokolova, Halling, Jenkins, Burkhardt, Meyer, Seelig, y King, 2000. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J. Mol. Diagn.*, 2(3): 116-123.
247. Soloway, Briggman, Carpinito, Chodak, Church, Lamm, Lange, Messing, Pasciak, Reservitz, Rukstalis, Sarosdy, Stadler, Thiel, y Hayden, 1996. Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. *J. Urol*, 156(2 Pt 1): 363-367.
248. Stampfer, Carpinito, Rodriguez-Villanueva, Willsey, Dinney, Grossman, Fritsche, y McDougal, 1998. Evaluation of NMP22 in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol*, 159(2): 394-398.
249. Steidl, Simon, Burger, Brinkschmidt, Hertle, Bocker, y Terpe, 2002. Patterns of chromosomal aberrations in urinary bladder tumours and adjacent urothelium. *J. Pathol.*, 198(1): 115-120.
250. Stein, 2006. Lymphadenectomy in bladder cancer: how high is "high enough"? *Urol. Oncol.*, 24(4): 349-355.



251. Stein, Cai, Groshen, y Skinner, 2003. Risk factors for patients with pelvic lymph node metastases following radical cystectomy with en bloc pelvic lymphadenectomy: concept of lymph node density. *J. Urol.*, 170(1): 35-41.
252. Stein, Lieskovsky, Cote, Groshen, Feng, Boyd, Skinner, Bochner, Thangathurai, Mikhail, Raghavan, y Skinner, 2001. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J. Clin. Oncol.*, 19(3): 666-675.
253. Stein, Quek, y Skinner, 2006. Lymphadenectomy for invasive bladder cancer. II. technical aspects and prognostic factors. *BJU. Int.*, 97(2): 232-237.
254. Stein y Skinner, 2003. Results with radical cystectomy for treating bladder cancer: a 'reference standard' for high-grade, invasive bladder cancer. *BJU. Int.*, 92(1): 12-17.
255. Steinmaus, Nunez, y Smith, 2000. Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *Am. J. Epidemiol.*, 151(7): 693-702.
256. Stewart, Bariol, Grigor, Tolley, y McNeill, 2005. A comparison of the pathology of transitional cell carcinoma of the bladder and upper urinary tract. *BJU. Int.*, 95(6): 791-793.
257. Stockle, Wellek, Meyenburg, Voges, Fischer, Gertenbach, Thuroff, Huber, y Hohenfellner, 1996. Radical cystectomy with or without adjuvant polychemotherapy for non-organ-confined transitional cell carcinoma of the urinary bladder: prognostic impact of lymph node involvement. *Urology*, 48(6): 868-875.
258. Swana, Grossman, Anthony, Weiss, y Altieri, 1999. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N. Engl. J. Med.*, 341(6): 452-453.
259. Sylvester, van der MEIJDEN, y Lamm, 2002. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J. Urol.*, 168(5): 1964-1970.
260. Sylvester, van der MEIJDEN, Oosterlinck, Hoeltl, y Bono, 2003. The side effects of Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of Ta T1 bladder cancer do not predict its efficacy: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur. Urol.*, 44(4): 423-428.
261. Sylvester, van der MEIJDEN, Oosterlinck, Witjes, Bouffloux, Denis, Newling, y Kurth, 2006. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur. Urol.*, 49(3): 466-5.
262. Tait, Dodwell, y Horgan, 2004. Do metastases metastasize? *J. Pathol.*, 203(1): 515-518.
263. Tao, Lefevre, Ricci, Saintigny, Callard, Perie, Lacave, Bernaudin, y Lacau St, 2006. Detection of occult carcinomatous diffusion in lymph nodes from head

- and neck squamous cell carcinoma using real-time RT-PCR detection of cytokeratin 19 mRNA. *Br. J. Cancer*, 94(8): 1164-1169.
264. Tawfik y Bagley, 1997. Upper-tract transitional cell carcinoma. *Urology*, 50(3): 321-329.
265. Theodorescu, 2003. Molecular pathogenesis of urothelial bladder cancer. *Histol. Histopathol.*, 18(1): 259-274.
266. Thykjaer, Workman, Kruhoffer, Demtroder, Wolf, Andersen, Frederiksen, Knudsen, y Orntoft, 2001. Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer Res.*, 61(6): 2492-2499.
267. Torres Mateos, Banus Gassol, Palou, y Morote, 1987. Vesicorenal reflux and upper urinary tract transitional cell carcinoma after transurethral resection of recurrent superficial bladder carcinoma. *J. Urol.*, 138(1): 49-51.
268. Tran, Master, Yu, Rak, Dumont, y Kerbel, 2002. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(7): 4349-4354.
269. Vaarala, Porvari, Kyllonen, y Vihko, 2000. Differentially expressed genes in two LNCaP prostate cancer cell lines reflecting changes during prostate cancer progression. *Lab Invest*, 80(8): 1259-1268.
270. van Oers, Wild, Burger, Denzinger, Stoehr, Rosskopf, Hofstaedter, Steyerberg, Klinkhammer-Schalke, Zwarthoff, van der Kwast, y Hartmann, 2007. FGFR3 mutations and a normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumours. *Eur. Urol.*, 52(3): 760-768.
271. van Rhijn, Lurkin, Kirkels, van der Kwast, y Zwarthoff, 2001. Microsatellite analysis--DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer*, 92(4): 768-775.
272. van Rhijn, van der Poel, y van der Kwast, 2005. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur. Urol.*, 47(6): 736-748.
273. van Rhijn, Vis, van der Kwast, Kirkels, Radvanyi, Ooms, Chopin, Boeve, Jobsis, y Zwarthoff, 2003. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J. Clin. Oncol.*, 21(10): 1912-1921.
274. Van Trappen y Pepper, 2002. Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. *Lancet Oncol.*, 3(1): 44-52.
275. Varella-Garcia, Akduman, Sunpaweravong, Di Maria, y Crawford, 2004. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 22(1): 16-19.
276. Vazina, Dugi, Shariat, Evans, Link, y Lerner, 2004. Stage specific lymph node metastasis mapping in radical cystectomy specimens. *J. Urol.*, 171(5): 1830-1834.
277. Vieweg, Gschwend, Herr, y Fair, 1999b. The impact of primary stage on survival in patients with lymph node positive bladder cancer. *J. Urol.*, 161(1): 72-76.

278. Vieweg, Gschwend, Herr, y Fair, 1999a. Pelvic lymph node dissection can be curative in patients with node positive bladder cancer. *J. Urol.*, 161(2): 449-454.
279. Vieweg, Whitmore, Jr., Herr, Sogani, Russo, Sheinfeld, y Fair, 1994. The role of pelvic lymphadenectomy and radical cystectomy for lymph node positive bladder cancer. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Cancer*, 73(12): 3020-3028.
280. Vlems, Ladanyi, Gertler, Rosenberg, Diepstra, Roder, Nekarda, Molnar, Tulassay, van Muijen, y Vogel, 2003. Reliability of quantitative reverse-transcriptase-PCR-based detection of tumour cells in the blood between different laboratories using a standardised protocol. *Eur. J. Cancer*, 39(3): 388-396.
281. Waldman, Carroll, Kerschmann, Cohen, Field, y Mayall, 1991. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res.*, 51(14): 3807-3813.
282. Walsh, Retik, Darracott Vaughan, y Wein, 2004. *Campbell Urología. Panamericana.*
283. Webb y Vande Woude, 2000. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J. Neurooncol.*, 50(1-2): 71-87.
284. Weigelt, Verduijn, Bosma, Rutgers, Peterse, y van't Veer, 2004. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br. J. Cancer*, 90(8): 1531-1537.
285. Wheelless, Badalament, de Vere White, Fradet, y Tribukait, 1993. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. Report of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry*, 14(5): 478-481.
286. Wheelless, Reeder, Han, O'Connell, Frank, Cockett, y Hopman, 1994. Bladder irrigation specimens assayed by fluorescence in situ hybridization to interphase nuclei. *Cytometry*, 17(4): 319-326.
287. Wiener, Vooijs, y Hof-Grootenboer, 1993. Accuracy of urinary cytology in the diagnosis of primary and recurrent bladder cancer. *Acta Cytol.*, 37(2): 163-169.
288. Williams, Buscarini, y Stein, 2001. Molecular markers for diagnosis, staging, and prognosis of bladder cancer. *Oncology (Williston. Park)*, 15(11): 1461-4, 1476.
289. Witjes y Douglass, 2007. The role of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol*, 4(10): 542-549.
290. Wolff, Liang, y Jones, 2005. Mechanisms of Disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 2(10): 502-510.
291. Wu, Kakehi, Zeng, Taoka, Tsunemori, y Inui, 2005. Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20. *J. Urol.*, 174(6): 2138-42, discussion.
292. Wu, 2005. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat. Rev. Cancer*, 5(9): 713-725.

293. Yang, Welm, y Bishop, 2004. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(42): 15100-15105.
294. Yoder, Skacel, Hedgepeth, Babineau, Ulchaker, Liou, Brainard, Biscotti, Jones, y Tubbs, 2007. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am. J. Clin. Pathol.*, 127(2): 295-301.
295. Yokota, 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3): 497-503.
296. Zellweger, Benz, Cathomas, Mihatsch, Sulser, Gasser, y Bubendorf, 2006. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J. Cancer*, 119(7): 1660-1665.
297. Zhang, Zheng, Fan, Gao, Di, Wang, Xiao, Li, An, y Cheng, 2001. A comparison between microsatellite analysis and cytology of urine for the detection of bladder cancer. *Cancer Lett.*, 172(1): 55-58.
298. Zhang, Gong, Cheville, Smith, y Young, 2005. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes. Cancer*, 43(3): 249-259.
299. Zigeuner y Pummer, 2008. Urothelial carcinoma of the upper urinary tract: surgical approach and prognostic factors. *Eur. Urol.*, 53(4): 720-731.