

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia.

Utilidad de marcadores genéticos en el seguimiento de pacientes con antecedentes de carcinoma urotelial no músculo infiltrante

Memoria presentada por
Ana Belén Galván Pérez

Para optar al título de
Doctora en Biología

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Antoni Gelabert Mas (Departament de Urologia, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar; Departament de Cirurgia, Universitat Autònoma de Barcelona) y la tutoría de la Dra. Maria Dolors Coll (Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona)

Director

Doctoranda

Dr. Antoni Gelabert Mas

Ana Belén Galván Pérez

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2013

Sólo cerrando las puertas detrás de uno

se abren ventanas hacia el porvenir

Françoise Sagan

Llega el momento de cerrar un importante episodio de mi vida, tanto profesional como personal. Pero en este camino hacia delante, me tomo la libertad de mirar hacia el pasado para poder agradecer a los que me han ayudado, me han guiado e incluso a los que me han empujado, ya que sin ellos, esta puerta no estaría a punto de cerrarse.

Cuando llegué por primera vez al laboratorio, una gran ilusión se apoderaba de mí y cuando salí de allí a las pocas horas, ya sabía que aquella iba a ser una gran oportunidad para aprender. Tengo mucho que agradecer a la persona que me apoyó y creyó en mi desde el primer momento (ya tu sabe') y me motivó para emprender un nuevo rumbo. Allí llegó la oportunidad de poder realizar este estudio gracias al apoyo de Kiko y del Dr. Gelabert que en un momento muy importante abrieron la puerta que me ha permitido llegar hasta donde estoy hoy.

Agradezco a Kiko las infinitas oportunidades que me ha regalado durante todo este tiempo, todo su apoyo y su preocupación por mí y por todas las personas que hemos pasado por su lado. Muchas gracias! Blanca, muchas gracias por tus sabios consejos y por motivarme a ser cada vez mejor persona. Dr. Gelabert, no cabe duda de que sin tu colaboración no hubiese llegado hasta donde estoy hoy. Gracias por confiar en mi para realizar este proyecto y gracias, sobre todo, por la motivación y el apoyo en los momentos en los que todo era un poco negro (It cannot be accepted). También por tu paciencia y disponibilidad para ayudarme.

Muchas gracias a la Dra. Coll por vincularse tanto en esta tesis y haberme ayudado tanto a mejorar.

También quiero agradecer a Lourdes, Ana, Leo, Encarna, etc. su ayuda y paciencia. A todas las técnicas también por su inestimable ayuda y por su paciencia cuando llegó *La invasión del sobre marrón*. Muchas gracias Carme, tú me enseñaste la técnica de la citogenética, de la FISH y sobre todo lo que es trabajar! Rosa Mari gracias a ti, estoy

escribiendo estas líneas, cuántas preguntas resueltas y sobretodo te acordaste de mí cuando te preguntaron por alguien que quisiera trabajar en dermatología, ese fue el principio. Muchas gracias Ester porque tú me enseñaste la FISH en parafina y sobre todo por esa sonrisa constante. Muchas gracias Erica por ayudarme siempre tan rápido con los cortes de parafina y hacerme un huequito en tu apretada agenda. Gracias Bea por dejarme infiltrarme en Molecular tantas y tantas tardes. Muchas gracias Gemma, por esa sonrisa amable al final del pasillo!

Muchas gracias, a todos “los del otro lado”, Lara por ayudarme con la citología y por facilitarme el trabajo en otros proyectos, Mónica y Yolanda por ayudarme en la preparación de las muestras.

Muchas gracias a Ramon Pujol, Marta Ferran y Lluís Santamaría por haberme dejado colaborar en su interesante investigación en psoriasis. Gracias Marta por haberme enseñado muchas cosas de las que hoy sé y por haberme facilitado tanto este camino y haberme permitido compaginar ambos proyectos de una manera tan cómoda.

Finalmente, quiero agradecer más allá del tema profesional a mis compañeras de sufrimientos, que me han motivado, ayudado y compartido conmigo muchos momentos. De estos años en el Mar me llevo muchas cosas... Me llevo viejas amigas que me han seguido apoyando en los nuevos tiempos, aún cuando creían que se habían librado de mí! Muchas gracias Luche (quicir Luz) por haber estado siempre a mi lado con mis incesantes preguntas y mi teoría de la relatividad! y Mallo por haber sido mi compañera de sufrimiento en tantas ocasiones (te acuerdas en el Tate!!!) y también de muchas risas...

También he compartido muchos momentos con compañeras que me han enriquecido a nivel científico y personal: Olaya (que me introdujo en el mundo de los BACs), Eulàlia (con su incesante sonrisa), Sílvia y Laia con las que he podido compartir más que trabajo y me alegro de ello, Anna P (la nueva subterránea), Vera (de excursión en moto hasta Can Caralleu! Me lo salto eh?), Alma y su apoyo en importantes momentos. Y Pepi muchas gracias de parte de “La cabeza pollo”.

Subterráneas, que os voy a decir, que no sepáis ya! Marta, María, Raquel, Rocío (y las nuevas generaciones, eh? Sara? ;)). Cuantos momentos duros, pero también muchos

divertidos! Cuánto me habéis ayudado en todo este camino en el plano laboral y en el personal! Marta me has hecho crecer como profesional y como persona. Te debo muchas cosas: la ayuda constante, el creer en mí y todo el apoyo que me has proporcionado, eres “la Marta” de los subterráneos”. María, hola tú... Que hubiese hecho sin ti Packitaaaa. Gracias por ese eterno humor, por ser tan buena gente, por aceptarme a tu lado y por aguantarme!!!! RoNi SaLSa, ¿tú ves dos o tres?... A veces no lo veía claro, pero contigo sí! Eres mu grande! Cómo te echo de menos. No sé como podría agradecer lo fácil que me lo has puesto siempre. Reich gracias por haberme facilitado tanto el trabajo con mis amigos ARN y cuanti, y sobre todo por los buenos momentos que hemos pasado y por ser la más mejor. Muchas gracias a todas por los momentos pasados y los que todavía quedan!!!!!! Para siempre Puños Fuera!

Muchas gracias a todas mis chicas de Althia que han sufrido tanto en este camino a mi lado y a las que tanto tiempo he tenido en vilo. Sí, ya he acabadooouoooooooo!!!!!! (Baile Carlton). Muchas gracias por esas horas de trabajo compartidas, por ese ánimo constante y por tenderme la mano en todo momento, y sobretodo (aunque a alguna no le guste) por esas horas de la comida taaaaaaaan divertidas. He aprendido muchas cosas a vuestro lado ☺ y las que quedan porque sois una caja de sorpresas!!!

Nada de esto hubiese sido posible sin lo más importante! Muchas gracias a mis padres y a mis hermanas por aguantarme en los momentos más críticos, por arrastrarme al optimismo cuando todo era negro, motivarme en los momentos difíciles y por intentar entenderme aún cuando no lo consigo ni yo. Por esos abrazos, por ser como sois!!!. Estoy orgullosa de ser una de vosotros! Gracias a mis Tobis por haber alegrado mi vida y hacerme disfrutar como una niña! Os quiero.

Muchas gracias Rubén por haberme hecho esta tortura mucho más fácil. Por haber sido taaaan paciente y comprensivo, por haber compartido este camino conmigo con tanto respeto y optimismo. Por sacarme una sonrisa cuando lo necesitaba! Eres mi K ☺!!!!!! Ya sabes que YO NOOOOO!!!!!! ;)

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación para la Investigación en Urología (Asociación Española de Urología), beca FIU 2006.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
TABLAS	VII
FIGURAS	XI
ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La vejiga.....	3
1.2. Cáncer de vejiga.....	6
1.2.1. Epidemiología	6
1.2.2. Factores de riesgo	7
1.2.2.1. Sexo, edad, población.....	7
1.2.2.2. Estilo de vida y factores ambientales	7
Tabaquismo.....	7
Exposición ocupacional	8
1.2.2.3. Infecciones crónicas del tracto urinario	8
1.2.2.4. Cáncer familiar.....	9
1.2.3. Clasificación del cáncer de vejiga	10
1.2.3.1. Estadio del cáncer de vejiga.....	11
1.2.3.2. Clasificación del cáncer urotelial (OMS)	14
Clasificación de los CCUMI	15
Clasificación de los CCUNMI.....	15
1.2.4. Predicción de recurrencia y progresión en el carcinoma de células uroteliales no músculo infiltrante.....	18
1.2.5. Genética del cáncer de vejiga	21
1.2.5.1. Citogenética del cáncer vesical	22
1.2.5.2. Genes asociados al cáncer de vejiga	27
Genes supresores de tumores.....	27
Oncogenes.....	29
1.2.5.3. Modelos de tumorigenesis	32
1.2.6. Diagnóstico y seguimiento del cáncer de vejiga.....	35
1.2.6.1. Signos y síntomas.....	35
1.2.6.2. Técnicas de diagnóstico y seguimiento	35
Citología	35
Cistoscopia convencional	37

Cistoscopia fluorescente	39
Marcadores tumorales.....	40
1.2.7. Tratamiento	44
1.2.7.1. Tratamiento del carcinoma urotelial no músculo infiltrante	44
Re-resección transuretral (Re-RTU)	45
Terapia intravesical.....	45
1.2.7.2. Tratamiento del carcinoma urotelial músculo infiltrante.....	48
Cirugía	49
Quimioterapia sistémica	50
1.3. Técnica de FISH	51
1.4. Kit Urovysion®.....	55
1.4.1. Diseño de la sonda de FISH multicolor y aprobación por la FDA.....	55
1.4.2. Criterio de valoración y criterios de positividad del kit UroVysion®.....	57
1.4.3. Importancia y utilidad.....	58
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
2.1. Hipótesis.....	65
2.2. Objetivos	66
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
3.1. Pacientes	69
3.2. Métodos	72
3.2.1. Cistoscopia.....	72
3.2.2. Citología.....	72
3.2.2.1. Protocolo de preparación de muestras de orina mediante citología líquida.....	73
Reactivos	73
Procedimiento	73
3.2.3. RTU	74
3.2.4. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	75
3.2.4.1. Protocolo de hibridación	75
Reactivos	75
Soluciones	76
Procedimiento	77
3.3. Interpretación de los resultados de FISH	79

3.3.1. Análisis de la muestra. Valoración en el microscopio de fluorescencia.....	79
3.3.2. Criterio de valoración y criterio de positividad	80
3.4. Estadística.....	85
3.4.1. Definición parámetros estadísticos de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP.....	85
3.4.2. Análisis estadístico a distintos momentos del estudio	86
3.4.3. Métodos estadísticos.....	88
4. RESULTADOS.....	91
4.1. Muestras analizadas.....	93
4.2. Análisis con diferentes técnicas.....	93
4.2.1. FISH	93
4.2.2. Cistoscopia y citología	94
4.3. Detección de recidivas	97
4.3.1. Detección de recidivas en el momento de inclusión en el estudio	97
4.3.2. Detección de recidivas dentro del plazo de un año después de la inclusión en el estudio.....	99
4.4. Análisis estadísticos.....	100
4.4.1. Análisis estadístico en el momento de inclusión en el estudio	100
4.4.2. Análisis estadístico en el primer año después de la inclusión en el estudio	103
4.4.3. Comparación análisis en el momento de inclusión en el estudio y análisis en el primer año.	106
4.4.4. Análisis según la histología de la recidiva	107
4.4.5. Análisis estadístico de la combinación de técnicas	108
4.4.6. Correspondencia entre la cistoscopia, la FISH y la recidiva	112
5. DISCUSIÓN	115
5.1. Utilidad de la FISH en cáncer	117
5.2. Utilidad de la FISH en el cáncer vesical	117
5.3. Desarrollo del estudio	118
5.4. Criterios de valoración y criterios de positividad de LA FISH	119
5.4.1. Criterios de valoración.....	120
5.4.2. Criterio de positividad	121
5.5. Sensibilidad y especificidad de la citología y la FISH.....	123
5.6. Sensibilidad y especificidad de la cistoscopia y la FISH.....	127

5.6.1. Comparación con el estudio de Gudjónsson <i>et al.</i> [2008]	130
5.6.2. Comparación con el estudio de Fritsche <i>et al.</i> [2010]	131
5.6.3. Comparación con el estudio de Karnwal <i>et al.</i> [2010]	132
5.7. Valor predictivo negativo y positivo de la cistoscopia, citología y FISH	134
5.8. Combinación de técnicas.....	135
5.9. Ventajas y limitaciones de las técnicas	136
5.9.1. Ventajas y limitaciones de la cistoscopia.....	136
5.9.2. Ventajas y limitaciones de la citología.....	137
5.9.3. Ventajas y limitaciones de la FISH	139
5.9.4. Limitaciones en la detección de carcinomas de alto grado	141
6. CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXOS	175
Anexo 1: Características clínicopatológicas de los pacientes 222 analizados en el estudio.	
Resultado de las técnicas analizadas.	177
Anexo 2: Publicación.....	191

TABLAS

<i>Tabla 1: Clasificación histológica de los tumores del tracto urinario según la OMS 2004 [Eble et al., 2004]</i>	11
<i>Tabla 2: Clasificación 2002 TNM cáncer de vejiga [Greene, 2002]</i>	13
<i>Tabla 3: Características histológicas de las lesiones uroteliales papilares [Epstein et al., 1998]</i>	17
<i>Tabla 4: Ponderación utilizada para calcular las puntuaciones de recidiva y progresión [Sylvester et al., 2006]</i>	20
<i>Tabla 5: Probabilidad de recidiva y progresión según la puntuación total [Sylvester et al., 2006]</i>	21
<i>Tabla 6: Alteraciones genéticas comunes detectadas por HGC [Mhawech-Fauceglia et al., 2006]</i>	26
<i>Tabla 7: Genes supresores de tumores involucrados en la tumorigénesis del cáncer vesical [Mhawech-Fauceglia et al., 2006]</i>	30
<i>Tabla 8: Oncogenes involucrados en la tumorigénesis del cáncer vesical [Mhawech-Fauceglia et al., 2006]</i>	31
<i>Tabla 9: Resumen de los marcadores. Adaptado de Parker and Spiess [2011], Shariat et al. [2008] y Jacobs et al. [2010]</i>	42
<i>Tabla 10: Quimioterápicos e inmunoterápicos para la administración intravesical [Sexton et al., 2010]</i>	48
<i>Tabla 11: Revisión bibliográfica realizada por Fritsche et al., [2010] respecto a la utilización del kit UroVysion®</i>	60
<i>Tabla 12: Características histopatológicas del último tumor previo a la inclusión en el estudio.</i>	70
<i>Tabla 13: Características histológicas de las recidivas histológicamente confirmadas tras la RTU y los resultados proporcionados por las diferentes técnicas analizadas</i>	98
<i>Tabla 14: Características de las recurrencias histológicamente confirmadas durante el seguimiento y los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas</i>	100
<i>Tabla 15: Tablas de 2x2 obtenidas mediante el programa SPSS para el cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPP (en el momento de inclusión en el estudio) para cada una de las técnicas</i>	101

<i>Tabla 16: Resumen de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (en el momento de inclusión en el estudio) de la cistoscopia, FISH y citología</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 17: Valores P de la comparación de la sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas obtenidas en el momento de inclusión en el estudio</i>	<i>103</i>
<i>Tabla 18: Tablas de 2x2 obtenidas mediante el programa SPSS para el cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPP (tras el seguimiento) para cada una de las técnicas</i>	<i>104</i>
<i>Tabla 19: Resumen de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (obtenidos tras el seguimiento) de la cistoscopia, FISH y citología.</i>	<i>105</i>
<i>Tabla 20: Valores P de la comparación de la sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas (seguimiento un año).....</i>	<i>106</i>
<i>Tabla 21: Sensibilidad de los métodos de seguimiento según el estadio y grado tumoral</i>	<i>108</i>
<i>Tabla 22: Tablas de 2x2 obtenidas mediante el programa SPSS para el cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPP (tras el seguimiento) para la combinación de las técnicas</i>	<i>109</i>
<i>Tabla 23: Resumen de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (obtenidos tras el seguimiento) de la combinación de técnicas.....</i>	<i>110</i>
<i>Tabla 24: Valores P de las comparaciones realizadas (técnicas aisladas y combinación de técnicas).....</i>	<i>112</i>
<i>Tabla 25: Concordancia entre la cistoscopia, la FISH y la recidiva de la enfermedad.....</i>	<i>113</i>
<i>Tabla 26: Estudios comparativos de cistoscopia, citología y FISH.</i>	<i>129</i>

FIGURAS

<i>Figura 1: Esquema de la vejiga</i>	3
<i>Figura 2: Esquema que representa cada uno de los estadios presentados en la clasificación TNM 2002</i>	12
<i>Figura 3: Correlación entre la clasificación de la OMS 1973 y la clasificación OMS/ISUP 2004 para los tumores papilares [Miyamoto et al., 2010]</i>	18
<i>Figura 4: Vías moleculares de desarrollo tumoral de los tumores no músculo infiltrantes y los músculo infiltrantes. Adaptada Netto and Cheng [2012] y Sexton et al. [2010].</i>	34
<i>Figura 5: A) Visualización de citología urinaria con tinción de Papanicolau. B) Visualización de tumor papilar mediante cistoscopia. C) Visualización de CIS mediante cistoscopia. D) Misma imagen que la C mediante cistoscopia fluorescente.</i>	37
<i>Figura 6: A) Esquema de cistoscopia flexible. B) Cistoscopio flexible. C) Cistoscopio rígido. D) Resectoscopio empleado en la resección transuretral.</i>	39
<i>Figura 7: Protocolo de la técnica de hibridación in situ</i>	53
<i>Figura 8: Principales tipos de sondas: a) Sondas de locus específico. b) Sondas centroméricas. c) Sondas de pintado.</i>	54
<i>Figura 9: Esquema de la sonda UroVysion</i>	57
<i>Figura 10: A) Diseño del estudio. Todos los pacientes incluidos en el estudio se encuentran en seguimiento por antecedentes de CCUNMI. En el momento de inclusión en el estudio se incluye la técnica de FISH en su seguimiento. Una vez finalizado el estudio, se siguen de la manera habitual. B) Esquema del tiempo de seguimiento de los pacientes tras su inclusión en el estudio: Tiempo tras la detección de recidiva tumoral a) en el momento del estudio y b) en el plazo de un año tras la inclusión en el estudio o c) hasta el último control de seguimiento conocido.</i>	71
<i>Figura 11: A) Procesador ThinPrep 2000. B) Esquema de la transferencia de las células desde el vial al portaobjetos. 1. El filtro rota en el interior de la muestra para homogeneizar la solución. 2. Una leve aspiración arrastra las células hasta la membrana del filtro. El ThinPrep® supervisa la velocidad del flujo a través del filtro. 3. Después de la recolección de las células, el filtro se invierte y se produce una ligera presión contra el portaobjetos de microscopio ThinPrep®. Gracias a la tensión superficial y a la presión de aire las células se adhieren al portaobjetos, resultando en una suspensión celular de distribución circular.</i>	74
<i>Figura 12: Plantilla utilizada en la valoración de las muestras (con un ejemplo hipotético)</i>	82

<i>Figura 13: Esquema de rastreo. Valoración de las células epiteliales.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 14: Representación de núcleos con morfología normal o sospechosa (Abbot Molecular).....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 15: A) Ejemplo hipotético de tabla de contingencia de 2x2 obtenida con el programa SPSS para el cálculo de los diferentes parámetros estadísticos. Valores presentados en porcentaje. B) Cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN según la definición según los datos del ejemplo A. Valores representados en tanto por uno</i>	<i>89</i>
<i>Figura 16: Resumen de los resultados obtenidos en la cistoscopia, en la citología, en la FISH y en la anatomía patológica de la biopsia tras la RTU.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 17: Imágenes de hibridación in situ fluorescente de células uroteliales (x1000) A) Célula morfológicamente normal y genéticamente anormal con 3 copias del cromosoma 3 (señales rojas). B) Célula que muestra un patrón cromosómico alterado con aneuploidía de los cromosomas 3, 7, 9 y 17. C) Células morfológica y genéticamente alteradas con aneuploidía de los cromosomas 3, 7, 9 y 17. D) Células morfológica y genéticamente alteradas con aneuploidía de los cromosomas 3, 7 y 17 y delección homocigota del locus 9p21 (no presentan señales amarillas). E) Células morfológicamente y genéticamente normales con 2 cromosomas 3 (señales rojas), 2 cromosomas 7 (señales verdes), 2 cromosomas 17 (señales aguamarina) y 2 loci 9p21 (señales amarillas)</i>	<i>96</i>
<i>Figura 18: Resumen de los resultados incluidos en la publicación de Hajdinjak et al. [2008] y los del presente estudio</i>	<i>126</i>

ABREVIATURAS

5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ADN	Ácido desoxidorribonucleico
BCG	Inmunoterapia intravesical con el <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
CC	Citogenética convencional
CCU	Carcinoma de células uroteliales
CCUMI	Carcinoma de células uroteliales músculo infiltrante
CCUNMI	Carcinoma de células uroteliales no músculo infiltrante
<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEP	Sonda centromérica (<i>chromosome enumeration probe</i>)
CIA	Análisis de intervalos de confianza (<i>Confidence Interval Analysis</i>)
CIS	Carcinoma <i>In situ</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
<i>EAU</i>	Asociación Europea de Urología (<i>European Association of Urology</i>)
EORTC	Organización Europea para la investigación y el tratamiento del cáncer (<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>)
Esp	Especificidad
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
GST	Gen supresor de tumores (<i>tumor suppressor gene</i>)
HAL	Hexalaminolevulinato
HGC	Hibridación genómica comparada (<i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
IARC	Agencia Internacional para la investigación en cáncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IC	Intervalo de confianza
ISCN	Sistema Internacional para la Nomenclatura Citogenética Humana (<i>International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature</i>)
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica (<i>International Society of Urological Pathology</i>)

LOH	Perdida de heterocigosidad (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
LSI	Sonda de locus específico
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
NUBPM	Neoplásia urotelial de bajo potencial maligno
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
Rb	Retinoblastoma
RB1	Retinoblastoma
RTU	Resección transuretral
Sens	Sensibilidad
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSC	Solución cloruro de sodio-citrato de sodio (<i>sodium chloride-sodium citrate buffer</i>)
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
TNM	Sistema de clasificación de tumores, afectación de ganglios y presencia de metastasis
TP53	Proteína tumoral p53 (<i>tumor protein p53</i>)
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer (<i>Union for International Cancer</i>)
VN	Verdadero negativo
VP	Verdadero positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA VEJIGA

La vejiga urinaria es un órgano hueco músculo-membranoso que forma parte del tracto urinario y que recibe la orina a través de los uréteres, la almacena y la expulsa por la uretra al exterior del cuerpo durante la micción.

La vejiga limita con el recto por la parte posterior, con la próstata y las vesículas seminales en el hombre; y con el útero, los ovarios y las trompas de Falopio en la mujer (**Figura 1**).

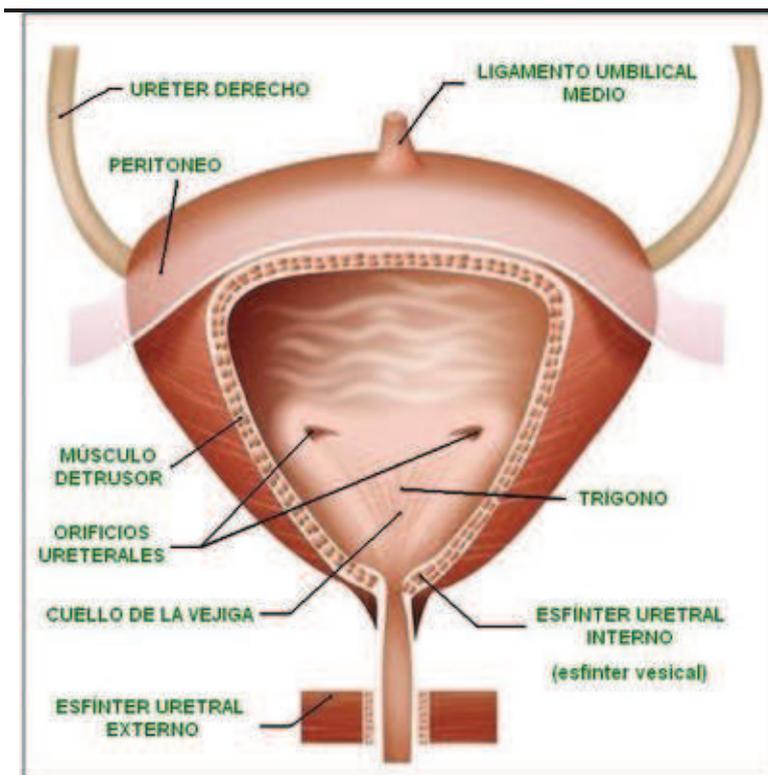


Figura 1: Esquema de la vejiga

La vejiga urinaria cuando está llena tiene forma esférica, y cuando está vacía se asemeja a un tetraedro. Se pueden distinguir diferentes partes:

- Vértice anterosuperior en el que se fija el uraco
- Vértice anteroinferior que corresponde al orificio uretral
- Vértices superoexternos en los que desembocan los uréteres

La vejiga está compuesta por cuatro capas:

- Urotelio: Es un epitelio altamente especializado [Sun 2006; Khandelwal *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009] que recubre las vías urinarias (uréter, vejiga urinaria, uretra) y se encuentra en contacto con la orina. El urotelio se encuentra situado estratégicamente entre la orina y los vasos sanguíneos. La función del urotelio es de barrera fisiológica y mecánica. Por un lado, protege al organismo de las sustancias tóxicas excretadas en la orina, y por otro lado, su área se ajusta activa y reversiblemente durante los ciclos de micción [Negrete *et al.*, 1996; Lewis, 2000]. Histológicamente, el urotelio está formado por un único tipo celular, con diferencias fenotípicas entre las diferentes capas, atribuibles a diferentes grados de diferenciación [Wu, 2009]. Se encuentran entre seis y ocho estratos celulares (células basales, células intermedias, células en sombrilla) [Apodaca, 2004]. La capa basal se encuentra aislada físicamente de los potenciales carcinógenos excretados en la orina por las capas uroteliales superficiales [Messing, 1992]. Las células basales son pequeñas y cúbicas con núcleo redondeado. Las células basales se diferencian en células intermedias formando entre tres y cuatro capas de células más alargadas [Wu *et al.*, 2009]. Finalmente, se encuentra la capa más superficial e histológicamente más

diferente. Esta capa está formada por las llamadas células paraguas o Dogiel. Las células paraguas son poliédricas, frecuentemente binucleadas, que presentan especialización de membrana. La característica principal de este epitelio es la capacidad para el cambio de la geometría y la superficie de sus células en respuesta a tensiones.

- Lámina propia: Bajo el epitelio se encuentra la lámina propia, una capa de tejido conectivo y vasos sanguíneos. La lámina propia de la vejiga se puede subdividir en dos capas: una capa más superficial de tejido conectivo colagenoso denso de distribución irregular; y una capa más profunda y más laxa de tejido conectivo compuesto por una mezcla de colágeno y fibras elásticas.
- Muscular propia: La cubierta muscular de la vejiga urinaria está compuesta por tres capas de músculo liso entrelazadas, que se pueden separar sólo en la región del cuello de la vejiga. Aquí están distribuidas como una capa longitudinal interna delgada, una capa circular media gruesa y una capa longitudinal externa delgada. La capa circular media forma el músculo esfínter interno alrededor del orificio interno de la uretra.
- Tejido perivesical: La adventicia de la vejiga esta compuesta por un tejido conectivo de tipo colagenoso denso de distribución irregular que contiene una cantidad generosa de fibras elásticas. Ciertas regiones de la adventicia están cubiertas por una serosa, que es una reflexión peritoneal sobre la pared de la vejiga, en tanto que otras regiones están rodeadas por grasa.

1.2. CÁNCER DE VEJIGA

1.2.1. Epidemiología

El cáncer de vejiga es una enfermedad heterogénea que presenta una historia clínica variable. Es la neoplasia más común del tracto urinario y una de las neoplasias más frecuentes (ocupa el cuarto lugar en orden de frecuencia en el varón y la octava en la mujer) [Jacobs *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2010].

Se estima que el cáncer vesical contó en 2010 con 70.530 nuevos casos y 14.680 muertes relacionadas con la enfermedad durante el 2010 en Estados Unidos [Jemal *et al.*, 2010]. El ratio entre hombres y mujeres que desarrollan cáncer vesical es aproximadamente 3:1 [Jemal *et al.*, 2010]. Más concretamente, en España el año 2008 se presentaron alrededor de 13.000 nuevos casos y se produjeron 4.820 muertes a consecuencia de esta enfermedad, según datos de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC, Globocan 2008) [GLOBOCAN].

Su incidencia aumenta en ambos sexos. Se ha estimado un incremento del 5-20% cada 5 años en el varón. Uno de los motivos de este incremento es que es un tumor fuertemente relacionado con carcinógenos ambientales, como el tabaco o carcinógenos ocupacionales, de gran importancia en algunas áreas (diferencias demográficas en la incidencia del cáncer vesical).

1.2.2. Factores de riesgo

1.2.2.1. Sexo, edad, población

El cáncer vesical es tres veces más frecuente en hombre que en mujeres, aunque existen variaciones geográficas en este ratio [Jemal *et al.*, 2010].

Como muchos otros tipos de cáncer, la frecuencia aumenta con la edad, al igual que la tasa de mortalidad. La media de edad de diagnóstico de cáncer vesical es 70 años.

Respecto a la población, las personas de raza negra tienen una menor incidencia de cáncer vesical. Sin embargo, una vez se ha realizado el diagnóstico, presentan peor pronóstico ya que generalmente presentan tumores más agresivos que los pacientes de raza blanca [Prout *et al.*, 2004].

1.2.2.2. Estilo de vida y factores ambientales

El contacto de sustancias carcinogénicas, excretadas en la orina, con el epitelio vesical puede conducir al desarrollo de cáncer de vejiga. Estas sustancias pueden ser directamente inhaladas o ingeridas, o bien, ser productos del metabolismo del cuerpo. Los factores más importantes en este punto son el tabaquismo y la exposición ocupacional:

Tabaquismo

El tabaco es el factor de riesgo mejor establecido en el cáncer vesical. El riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta en proporción a la intensidad del hábito tabáquico [Knowles *et al.*, 1993; Lopez-Beltran and Cheng 2003]. Los fumadores presentan entre dos y cuatro veces más riesgo de sufrir la enfermedad que la población general

[Wynder and Goldsmith 1977]. El humo de los cigarrillos presenta aldehídos insaturados y aminas aromáticas que parecen ser los principales responsables de este aumento del riesgo.

Exposición ocupacional

Se ha llegado a considerar que la exposición ocupacional es responsable de casi el 20% de los cánceres vesicales que se registran en los Estados Unidos [Vineis and Simonato 1991]. Esta exposición presenta periodos de latencia característicamente largos (20 a 30 años), que se pueden reducir al aumentar la intensidad a dicha exposición [Cole *et al.*, 1972].

Se han descrito una gran variedad de profesiones con riesgo de padecer la enfermedad, generalmente debido al contacto con productos químicos: industria textil, del caucho y del cuero, pintores, etc. [Silverman *et al.*, 1989]. La mayoría de los carcinógenos vesicales son aminas aromáticas (2-naftilamina, 4-aminodifenilo, etc.), metales como el arsénico, etc. [Clapp *et al.*, 2008].

1.2.2.3. Infecciones crónicas del tracto urinario

Las infecciones crónicas del tracto urinario están asociadas con el desarrollo de cáncer vesical, especialmente, de carcinoma escamoso invasivo. Este es un problema para personas con daños espinales o sondadas crónicamente, donde las cistitis crónicas son inevitables. Esto puede resultar en la formación de nitritos y nitrosaminas por la flora bacteriana o procesos inflamatorios, que conducen, a un aumento de la proliferación celular y por lo tanto, aumentan el riesgo de errores genéticos

espontáneos [El-Bolkainy *et al.*, 1981; Kirkali *et al.*, 2005]. El mismo mecanismo es invocado en las derivaciones urinarias internas postcistectomía radical.

Por otro lado, la infección con *Schistosoma haematobium* es el causante no sólo del cuadro clínico de la esquistosomiasis, sino también tiene relación directa con el desarrollo de cáncer vesical de células escamosas en los pacientes que padecen su infección. La respuesta inflamatoria vesical prolongada puede ser clave a la hora de que el epitelio transicional se transforme en escamoso, causando así una metaplasia escamosa. Sobre esta metaplasia pueden producirse cambios displásicos que originen el carcinoma de células escamosas o epidermoide. De hecho hoy se sabe con certeza que las cistitis causadas por *Schistosoma haematobium* se relacionan con la aparición de carcinoma epidermoide de vejiga. En las regiones donde este parásito es endémico, por ejemplo Egipto, el carcinoma epidermoide de la vejiga urinaria es el tumor más frecuente de este órgano [El-Bolkainy *et al.*, 1981].

En nuestro medio la esquistosomiasis es una enfermedad infrecuente, sin embargo, con los flujos migratorios en ascenso desde países endémicos se ha observado un aumento progresivo de la incidencia.

1.2.2.4. Cáncer familiar

El cáncer familiar vesical es una variedad de tumor vesical muy infrecuente comparado con la incidencia de cáncer familiar en otras localizaciones. Se han descrito algunas agrupaciones familiares de cáncer vesical. Algunas demuestran un componente genético dado su temprana aparición, sin embargo, la agregación parece estar fuertemente asociada a la exposición a factores ambientales [Ilic *et al.*, 2011].

1.2.3. Clasificación del cáncer de vejiga

La clasificación realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2004 [Eble *et al.*, 2004] reconoce diferentes variantes morfológicas que se han descrito en los últimos años (**Tabla 1**).

Histológicamente, más del 90% de los tumores de vejiga son carcinomas de células uroteliales (CCU), mientras que el resto (no uroteliales), corresponden a carcinomas escamosos, adenocarcinomas, carcinomas neuroendocrinos, y otros tipos histológicos atípicos [Eble *et al.*, 2004]. Los carcinomas no uroteliales suelen presentar comportamientos más agresivos (estadios más altos en el momento del diagnóstico y peor supervivencia) que los carcinoma uroteliales [Siefker-Radtke *et al.*, 2004].

Por otro lado, el CCU es una enfermedad enormemente heterogénea. Esta heterogeneidad también se manifiesta en la evolución clínica y en consecuencia en el tratamiento a aplicar. Para tratar de definir una clasificación en los CCU se usa la extensión del tumor (estadio) y las características histológicas del tumor (grado).

El estadio del tumor es el factor pronóstico del carcinoma urotelial más importante, sin embargo, la evolución de los pacientes con un CCU no músculo infiltrante (CCUNMI) depende en gran medida del grado histológico [Miyamoto *et al.*, 2010].

Tabla 1: Clasificación histológica de los tumores del tracto urinario según la OMS 2004 [Eble *et al.*, 2004]

<p>Tumores uroteliales (CCU) Carcinoma urotelial infiltrante (CCUMI) con diferenciación escamosa con diferenciación glandular con diferenciación trofoblástica Anidado Microcístico Micropapilar Tipo linfoepitelioma Tipo linfoma Plasmocitoide Sarcomatoide Células gigantes Indiferenciado Neoplasias uroteliales no invasivas (CCUNMI) Carcinoma urotelial <i>in situ</i> (CIS) Carcinoma urotelial papilar no invasivo de alto grado Carcinoma urotelial papilar no invasivo de bajo grado Neoplasia urotelial de bajo potencial maligno (NUBPM) Papiloma urotelial Papiloma urotelial invertido</p> <p>Neoplasias escamosas Carcinoma de células escamosas Carcinoma verrugoso Papiloma de células escamosas</p> <p>Neoplasias glandulares Adenocarcinoma Entérico Mucinoso Células en anillo de sello Células claras Adenoma vellosa</p>	<p>Tumores neuroendocrinos Carcinoma de células pequeñas Carcinoide Paraganglioma</p> <p>Tumores melanocíticos Melanoma maligno Nevus</p> <p>Tumores mesenquimales Rabdomyosarcoma Leiomiosarcoma Angiosarcoma Osteosarcoma Histiocitoma fibroso maligno Leiomioma Hemangioma Otro</p> <p>Tumores hematopoyéticos y linfoides Linfoma Plasmacitoma</p> <p>Tumores miscellaneos Carcinoma de Skene, Cowper Tumores metastáticos</p>
---	--

1.2.3.1. Estadio del cáncer de vejiga

El estadio es una clasificación en la que los tumores se agrupan según su extensión.

Es uno de los factores pronóstico más importantes en el cáncer de vejiga. El sistema

INTRODUCCIÓN

de clasificación del 2002 de Tumor, Nódulo y Metástasis (TNM), aprobado por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), es ampliamente aceptado y usado en la práctica clínica [Greene, 2002] (**Figura 2 y Tabla 2**).

El estadiaje TNM proporciona una herramienta útil para estimar el riesgo de recurrencia y la supervivencia; y para decidir las pautas y tratamiento de estos pacientes. Un correcto estadiaje de los tumores es esencial para un correcto tratamiento de los pacientes [Kirkali *et al.*, 2005].

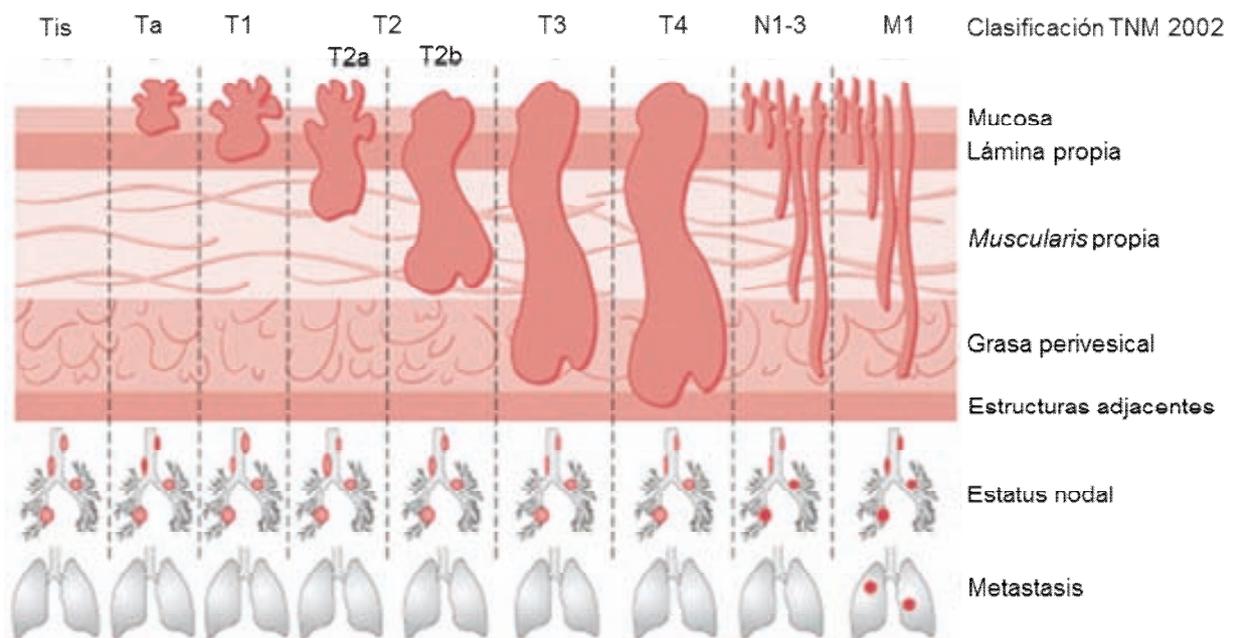


Figura 2: Esquema que representa cada uno de los estadios presentados en la clasificación TNM 2002

Tabla 2: Clasificación 2002 TNM cáncer de vejiga [Greene, 2002]**T: Tumor**

Tx: No se puede evaluar

T0: No hay evidencia de tumor

Ta: Tumor papilar confinado a la mucosa

Tis (CIS): Tumor plano confinado a la lámina propia

T1: Tumor que invade el tejido conectivo subepitelial o la lámina propia

T2: Tumor que invade la capa muscular vesical

T2a: tumor que invade la capa muscular superficial (mitad interna)

T2b: tumor que invade la capa muscular profunda (la mitad externa)

T3: Tumor que invade tejidos perivesicales

T3a: invasión microscópica

T3b: invasión macroscópica

T4: Tumor que invade estructuras adyacentes a la vejiga urinaria

T4a: invasión de la próstata, útero o vagina

T4b: invasión de la pared pélvica o pared abdominal

N: Afectación de los ganglios linfáticos

Nx: No pueden evaluarse los nódulos linfáticos regionales

N0: No se demuestran metástasis ganglionares regionales

N1: Afectación de un único ganglio de un diámetro máximo de 2 cm

N2: Afectación de un solo ganglio de diámetro máximo mayor de 2cm, pero <5cm; o en varios ganglios linfáticos, ninguno de ellos mayor de 5cm

N3: Afectación de algún ganglio mayor de 5 cm

M: Metástasis a distancia

Mx: No pueden evaluarse las metástasis a distancia

M0: No existen metástasis a distancia

M1: Presencia de metástasis a distancia

Según el estadio del tumor primario, el CCU puede clasificarse en:

- CCUNMI: Aquellos tumores que no invaden la muscular propia (Ta y Tis que afectan únicamente a la mucosa y T1 que afecta a la lámina propia).

- CCUMI: Aquellos tumores que invaden la muscular propia (T2), afectan a la grasa perivesical (T3) y aquellos que afectan a otros órganos (próstata, útero, vagina, etc) (T4).

Aproximadamente, el 70-80% de los casos diagnosticados son CCUNMI. A pesar del tratamiento, entre el 50-70% de los pacientes recidivarán y experimentarán posteriores recidivas (habitualmente de características parecidas a las del tumor inicial) en un periodo de tiempo que puede comprender muchos años [Saad *et al.*, 2002; Soloway *et al.*, 2002] (aunque la mayoría de las recurrencias ocurren dentro de los cinco primeros años) [Sylvester *et al.*, 2002]. Sin embargo, aproximadamente un 10-30% de estos tumores progresarán y desarrollarán tumores músculo infiltrantes. Las lesiones de alto grado son las que proporcionan más riesgo de progresión [Jordan *et al.*, 1987]. El CIS es habitualmente agresivo y comporta un mayor riesgo de progresión.

El resto de tumores diagnosticados *de novo*, aproximadamente un 25% del total, infiltran la capa muscular (T2-T4) en el momento de su presentación inicial. En ellos, el curso es con frecuencia muy agresivo, y tras tratamiento mediante cistoprostatectomía radical o terapéutica multimodal con conservación vesical selectiva, se producen metástasis a distancia durante el seguimiento en aproximadamente la mitad de los pacientes [de Braud *et al.*, 2002].

1.2.3.2. Clasificación del cáncer urotelial (OMS)

El grado es uno de los factores pronósticos más relevantes en cualquier patología tumoral.

En el caso de los tumores vesicales, es un factor muy importante de progresión y de mortalidad, pero no de recurrencia [Holmang *et al.*, 1995; 2001; Sylvester *et al.*, 2006]. Los tumores vesicales según la OMS se clasifican según su histología.

Clasificación de los CCUMI

En el caso de los CCUMI se clasifican según su diferenciación tal y como se observa en la (**Tabla 1**). El 60% de los CCUMI presentan diferenciación escamosa focal y un 10% presentan morfología glandular [Jacobs *et al.*, 2010]. Otros pueden presentar morfología con diferentes patrones: sarcomatoide, micropapilar, célula pequeña, plasmocitoide, etc.

Clasificación de los CCUNMI

En el caso de los CCUNMI pueden clasificarse en lesiones planas (CIS) y lesiones papilares.

Hasta el año 1998, se utilizaba la clasificación de la OMS de 1973 para CCUNMI papilares [Mostosfi *et al.*, 1973]. En esta clasificación los tumores se dividen en:

- Papiloma urotelial (benigno)
- Grado 1: Bien diferenciado
- Grado 2: Moderadamente diferenciado
- Grado 3: Pobremente diferenciado

Este sistema fue ampliamente utilizado, sin embargo, la definición de los criterios no era suficientemente detallada y útil. De esta manera, muchos tumores quedaban englobados en la categoría intermedia, con evolución y pronóstico dispar. Posteriormente, la OMS y la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP)

desarrollaron conjuntamente en 1998 un sistema de clasificación consenso. Esta clasificación incluye criterios detallados de las características estructurales (organización celular) y citológicas de las células (tamaño y forma nuclear; presencia de mitosis y nucléolos; etc.) como se muestra en la **Tabla 3**. Fue revisada en el año 2004 [Eble *et al.*, 2004].

En esta clasificación los tumores se dividen en:

- Papiloma urotelial
- NUBPM
- Carcinoma urotelial papilar de bajo grado
- Carcinoma urotelial papilar de alto grado

Esta clasificación no ha sustituido a la clasificación del 1973 porque no ha sido completamente validada. En la actualidad, se siguen utilizando ambas clasificaciones.

En la **Figura 3** se muestra la correlación entre ambas clasificaciones.

Tabla 3: Características histológicas de las lesiones uroteliales papilares [Epstein *et al.*, 1998]

	Papiloma	NUBPM	Carcinoma de bajo grado	Carcinoma alto grado
Arquitectura				
Papilas	Delicada	Delicadas. Fusionadas raras	Fusionadas, ramificadas y delicadas	Fusionadas, ramificadas y delicadas
Organización celular	Idéntica a lo normal	Polaridad normal. Espesor celular cohesivo	Orden aparente, mínimo apiñamiento, mínima falta polaridad. Cohesivo	Desorden fundamental pérdida polaridad. No cohesivo
Citología				
Tamaño nuclear	Idéntica a lo normal	Aumentados uniformemente	Aumentados con variaciones en tamaño	Aumentados con variaciones en tamaño
Superficie nuclear	Idéntica a lo normal	Aumentada, redonda-oval, uniforme	Redonda-oval. Finas variaciones en contorno	Pleomorfismo marcado
Cromatina	Fina	Fina	Variaciones leves dentro y entre células	Variaciones marcadas dentro y entre células. Hiperchromasia
Nucleolos	Ausentes	Ausentes no aparentes	Normalmente no aparentes	Prominentes y múltiples
Mitosis	Ausentes	Raras, basales	Ocasionalmente cualquier nivel	Frecuentes a cualquier nivel
Células paraguas	Presentes uniformemente	Presentes	Normalmente presentes	Pueden estar ausentes

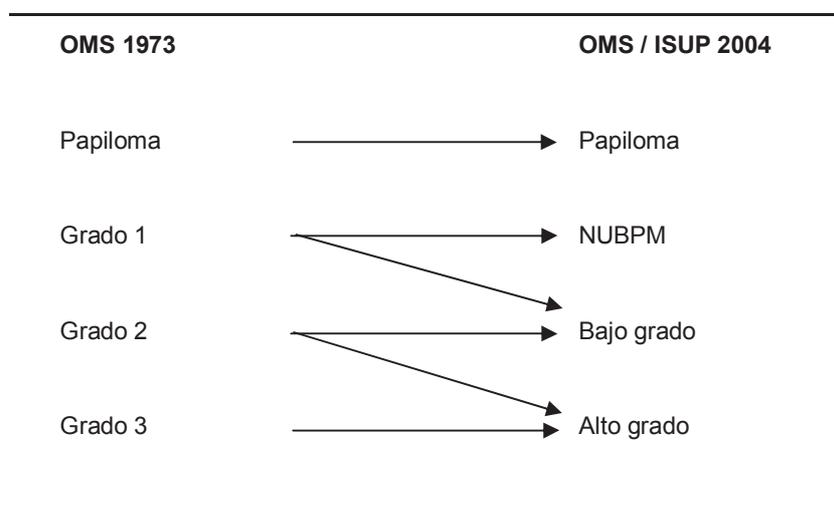


Figura 3: Correlación entre la clasificación de la OMS 1973 y la clasificación OMS/ISUP 2004 para los tumores papilares [Miyamoto *et al.*, 2010]

1.2.4. Predicción de recurrencia y progresión en el carcinoma de células uroteliales no músculo infiltrante

Unas de las características más importantes en la evolución clínica del CCUNMI es su capacidad de recidiva y progresión. Esta característica condiciona su seguimiento y su tratamiento, de modo que es necesario clasificar a los pacientes según su riesgo.

La forma clínica de clasificar a los pacientes con CCUNMI consiste en distribuirlos en grupos de riesgo según diferentes pronósticos derivados de análisis multifactoriales. Teniendo en cuenta estos parámetros, se propone clasificar a los pacientes en tres grupos de riesgo:

- Grupo de riesgo bajo
- Grupo de riesgo intermedio
- Grupo de riesgo alto

Sin embargo, estos grupos no suelen hacer diferencias entre el riesgo de recidiva y el de progresión. Con el objetivo de predecir de manera independiente el riesgo a corto y largo plazo de recidiva y progresión en pacientes concretos, la Organización Europea para la investigación y el tratamiento del cáncer (EORTC) elaboró un sistema de puntuaciones y tablas de riesgo.

Estas tablas se basan en la base de datos de la EORTC que contiene datos de 2.596 pacientes diagnosticados de tumores Ta y T1 que fueron aleatorizados en 7 estudios.

El sistema de puntuación está basado en los seis factores clínicos y anatomopatológicos más relevantes:

- Número de tumores
- Tamaño tumoral
- Frecuencia de recidiva
- Categoría T (TNM)
- Presencia de CIS concomitante
- Grado tumoral

En la **Tabla 4** se recogen las ponderaciones aplicadas a diversos factores para calcular las puntuaciones totales de recidiva y progresión. En la **Tabla 5** se muestran las puntuaciones totales estratificadas, como en el artículo original [Sylvester *et al.*, 2006], en cuatro categorías que reflejan las diversas probabilidades de recidiva y progresión a 1 y 5 años. Mediante una combinación de dos de las cuatro categorías, el grupo de trabajo de la EAU (Asociación Europea de Urología) aconseja usar, tal como

se muestra en la columna situada más a la derecha de la **Tabla 5**, un sistema de 3 niveles que define grupos de riesgo bajo, intermedio y alto de recidiva y progresión.

Tabla 4: Ponderación utilizada para calcular las puntuaciones de recidiva y progresión [Sylvester *et al.*, 2006]

Factor	Recidiva	Progresión
Número de tumores		
Único	0	0
2-7	3	3
≥8	6	3
Diámetro del tumor		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Frecuencia de recidiva anterior		
Primario	0	0
≤ 1 recidiva/año	2	2
> 1 recidiva/año	4	2
Categoría		
Ta	0	0
T1	1	4
CIS concomitante		
No	0	0
Si	1	6
Grado (OMS de 1973)		
G1	0	0
G2	1	6
G3	2	5
Puntuación total	0-17	0-23

Tabla 5: Probabilidad de recidiva y progresión según la puntuación total [Sylvester *et al.*, 2006]

Puntuación de recidiva	Probabilidad de recidiva al cabo de 1 año		Probabilidad de recidiva al cabo de 5 años		Grupo de riesgo de recidiva
	%	IC del 95%	%	IC del 95%	
0	15	10-19	31	24-37	Riesgo bajo
1-4	24	21-26	46	42-49	Riesgo intermedio
5-9	38	35-41	62	58-65	
10-17	61	55-67	78	73-84	Riesgo alto

Puntuación de progresión	Probabilidad de progresión al cabo de 1 año		Probabilidad de progresión al cabo de 5 años		Grupo de riesgo de progresión
	%	IC del 95%	%	IC del 95%	
0	0.2	0-0.7	0.8	0-1.7	Riesgo bajo
2-6	1	0.4-1.6	6	5-8	Riesgo intermedio
7-13	5	4-7	17	14-20	
14-23	17	10-24	45	35-55	Riesgo alto

Nota: Calculadora electrónica para el cálculo de probabilidad de recidiva y progresión en <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator>

Abreviaturas: IC (intervalo de confianza)

1.2.5. Genética del cáncer de vejiga

Existen numerosos estudios que han permitido aumentar el conocimiento de las alteraciones genéticas y epigenéticas que contribuyen al desarrollo del carcinoma vesical. El desarrollo tecnológico ha permitido este aumento del conocimiento y se han

usado multitud de técnicas: citogenética convencional (CC), citometría de flujo, hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación genómica comparada (HGC), arrays, etc.

1.2.5.1. Citogenética del cáncer vesical

Las alteraciones cromosómicas proporcionan conocimiento básico del desarrollo tumoral, ya que pueden traducirse en la desregulación de oncogenes y genes supresores de tumores (GST) involucrados en el inicio, progresión y/o capacidad metastásica del tumor.

La citogenética de los tumores uroteliales es muy compleja. Está descrito que existe una buena correlación entre la ploidía del ADN y el estado tumoral, el grado histológico y la tasa de supervivencia de los pacientes con CCU. Sasaki *et al.* [1992] describieron que entre un 40-50% de los tumores presentan aneuploidía detectada por técnicas de citometría de flujo. En estadios iniciales, los tumores, tienden a ser diploides con pocas alteraciones, mientras que en su evolución adquieren múltiples alteraciones y pasan a presentar cariotipos poliploides.

Entre las anomalías encontramos alteraciones numéricas: +7, -9, -11 o del(11p), del(13q), del(17p) y alteraciones estructurales de los cromosomas 1, 5 y 10 [Sandberg and Berger 1994; Gibas and Gibas 1997; Fadl-Elmula, 2005; Wu, 2005].

Por otro lado, estudios de HGC han permitido detectar numerosas alteraciones no balanceadas en el cáncer vesical. Las más recurrentes son ganancias en 1q, 8q, 20q y 11q; y pérdidas de los cromosomas 8p, 9, 17p y 11p [Kallioniemi *et al.*, 1995; Richter

et al., 1998; 1999; Simon *et al.*, 2000] (**Tabla 6**). Estas alteraciones recurrentes parecen tener un papel importante en la carcinogénesis de los tumores vesicales.

- Cromosoma 1: las alteraciones del cromosoma 1 son frecuentes y aunque aparecen de manera temprana en el cáncer vesical, no lo hacen como anomalía inicial ya que generalmente se acompañan de pérdidas del cromosoma 9. Las ganancias de 1q parecen estar asociadas a progresión tumoral [Fadi-Elmula *et al.*, 2000].
- Cromosoma 3: las pérdidas de 3p se encuentran en aproximadamente el 25% de los tumores. Esta alteración generalmente está asociada a tumores músculo infiltrantes [Dalbagni *et al.*, 1993; Habuchi *et al.*, 1993; Reznikoff *et al.*, 1996; Bernues *et al.*, 1999]. Las pérdidas de 3p, son frecuentes en tumores vesicales y en otros tipos tumorales (renal, mama, pulmón, etc). Esto hace pensar que genes supresores de tumores se encuentren en 3p como el *FHIT*. Se han identificado dos regiones comúnmente implicadas 3p12-14 y 3p21-23 [Li *et al.*, 1996].
- Cromosoma 7: la trisomía del cromosoma 7 es una alteración frecuente en los tumores de vejiga (más frecuente detectada por FISH [Sandberg and Berger 1994]) y aunque, es más frecuente encontrarla acompañada de otras alteraciones, en ocasiones, se ha definido como única alteración [Babu *et al.*, 1987; Berrozpe *et al.*, 1990]. La importancia de la trisomía 7 en el desarrollo tumoral no está clara ya que es una alteración que se ha encontrado en células no neoplásicas [Fadi-Elmula *et al.*, 2000].

- Cromosoma 8: en el brazo corto del cromosoma 8 (8p) son frecuentes las pérdidas, mientras que en brazo largo (8q) son más frecuente las ganancias. Las pérdidas de 8p se encuentran entre el 25-50% de los tumores vesicales y parece que están implicadas en el desarrollo tumoral, ya que se encuentran más frecuentemente en estadios y grados altos [Knowles *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1997; Richter *et al.*, 1998; Fadl-Elmula, 2005]. Las ganancias de 8q se asocian con la progresión tumoral [Wagner *et al.*, 1997; Richter *et al.*, 1998; 1999]. La polisomía del cromosoma 8 se ha correlacionado con el estadio y el grado tumoral [Sauter *et al.*, 1995].
- Cromosoma 9: las pérdidas del cromosoma 9 se consideran las alteraciones más frecuentes en el cáncer vesical y aparecen en estadios tempranos [Pollard *et al.*, 2010]. Las pérdidas del cromosoma 9 han sido detectadas como única alteración en tumores de estadios Ta-T1, mientras que en tumores de estadios más avanzados va acompañada de alteraciones concomitantes. Por ello, se concluye que las pérdidas del cromosoma 9 son un evento temprano en la transformación tumoral. Estas pérdidas se pueden producir tanto en el brazo corto (9p) como en el brazo largo (9q) y se han descrito en el 50% de los tumores Ta [Cairns *et al.*, 1993]. Las principales regiones implicadas son 9p21 y 9q34.1.
- Cromosoma 11: algunos estudios demuestran que el cromosoma 11 se encuentra involucrado en el desarrollo del cáncer vesical, aunque acompañado por alteraciones en otros cromosomas, frecuentemente del cromosoma 9 [Fadl-Elmula *et al.*, 2000]. Generalmente, se detectan pérdidas y se encuentran en

todos los estadios pero su proporción aumenta en estadios y grados altos. De esta manera, parece ser un evento temprano pero secundario, asociado a progresión tumoral. Estudios de FISH usando sondas centroméricas muestran ganancias del cromosoma 11 [Fadl-Elmula, 2005]. Por otro lado, se ha observado que el cromosoma 11 puede estar involucrado en diferentes translocaciones en tumores vesicales. Algunas de las translocaciones afectan a 11q15 donde se encuentra el gen *HRAS* involucrado en el 15% de los CCUNMI.

- Cromosoma 13: la delección de 13q se encuentra en un 25% de los casos y generalmente, se asocia a tumores de alto grado [Knowles *et al.*, 1993; Fadl-Elmula, 2005] y con el estadio avanzado [Habuchi *et al.*, 1993; Kallioniemi *et al.*, 1995]. Muchos autores proponen la delección de 13q como una alteración importante en la progresión de tumores no músculo infiltrantes a músculo infiltrantes [Dalbagni *et al.*, 1993; Reznikoff *et al.*, 1993; Fadl-Elmula, 2005]. También es frecuente encontrar pérdidas de 13q en tumores tipo CIS [Rosin *et al.*, 1995]. En 13q14 se encuentra el gen *RB1* en el que se encuentran pérdidas de heterocigosidad (LOH) en un 90% de CCUMI.
- Cromosoma 17: están descritas pérdidas de 17p. La pérdida de *TP53* (localizado en 17p13.1) se encuentra en aproximadamente en un 40% de los tumores de vejiga [Fadl-Elmula, 2005] y se encuentra asociado principalmente a CCUMI. Por otro lado, también se han encontrado ganancias e incluso amplificaciones en 17q. En 17q21 se encuentra el gen *ERBB2*, que se expresa en tumores de estado avanzado [Coombs *et al.*, 1991; Moriyama *et al.*, 1991;

Coogan *et al.*, 2004; Gallucci *et al.*, 2005]. Por otro lado, técnicas de FISH con la sonda centromérica del cromosoma 17 han mostrado un incremento en el número de copias del cromosoma 17 en casos de alto grado y estadioTNM. Parece ser que esta ganancia puede reflejar poiploidización en tumores avanzados más que una implicación directa del cromosoma 17 [Fadl-Elmula, 2005].

Tabla 6: Alteraciones genéticas comunes detectadas por HGC [Mhawech-Fauceglia *et al.*, 2006]

Alteración	Comentarios
Pérdidas de 9 y Y	Todos los estadios y grados
Ganancias de 1p, 8q, 20q Pérdidas de 8p, 9p, 9q, 11p	Alteraciones genéticas más frecuentes en CCU
Pérdidas de 9q y ganancia de 11q13	Tumores papilares Ta
Pérdidas de 9p, 9q, 2q, 11p, 11q, 10q, 17p Ganancias de 1q, 3p, 3q, 5p, 6p, 8q, 10q	Más frecuente en tumores T1
Pérdidas de 5q, 6q, 15q Ganancias de 3q, 5p, 7p, 10p, 18p, 20q	Más frecuente en $\geq T2$
Ganancias 1q y pérdidas 2q, 10q, 11q	Más frecuente en G2T1 que en G2Ta
Ganancias 10p, 6p y pérdidas 5q, 6q, 18q	Más frecuente en G3Ta que en G2Ta
8p22	Más frecuente en tumores T1
8q24	Más frecuente en tumores > T2
Amplificación 1q22-24, 3p22-24, 5p15, 6p22, 8q22.3, 10p12-14, 11q13, 12q15-21, 13q31-33, 17q12, 17q22, 18p11, 19q13, 20q13, Xp21, Xp11-13	

1.2.5.2. Genes asociados al cáncer de vejiga

Diferentes estudios de perfiles de expresión génica [Dyrskjot *et al.*, 2003; Sanchez-Carbayo *et al.*, 2003; Blaveri *et al.*, 2005] que han complementado estudios de HGC [Zhao *et al.*, 2004; Heidenblad *et al.*, 2008] han permitido describir genes involucrados en la tumorigénesis del cáncer urotelial. Los genes involucrados en el desarrollo tumoral son principalmente aquellos con funciones reguladoras en ciclo celular, implicados en transducción de señales, moléculas de adhesión y angiogénesis (**Tabla 7 y Tabla 8**).

Genes supresores de tumores

RB1 (13q14.2)

Este gen codifica para una fosfoproteína nuclear que funciona como reguladora del ciclo celular (pRb) y de la apoptosis. pRb no fosforilada actúa como un regulador negativo de E2F (factor de transcripción), con el que se une. Cuando el complejo ciclina/CDK fosforila pRb, el factor de transcripción E2F se libera y comienza la transcripción de diversos genes involucrados en el ciclo celular.

Se han observado mutaciones de *RB1*, que inactivan Rb [Miyamoto *et al.*, 1995], en el 30% de los carcinomas vesicales, generalmente se asocian a tumores de alto grado.

Algunos estudios atribuyen a *RB1* un papel importante, si bien, no suficiente, en el desarrollo del cáncer vesical [Wu 2009].

TP53 (17p13)

Este gen codifica para un factor de transcripción de 53 kDa con un papel crítico en el control del ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis [Chang *et al.*, 1995; Balint and Vousden 2001]. Las mutaciones de *TP53* son frecuentes en los CCUMI (aproximadamente en un 50%).

Diferentes estudios han relacionado la inactivación de *TP53* con características clínicas concretas, principalmente de alto grado, estadio tumoral avanzado y la asociación a CIS [Holmang *et al.*, 2001; Wu 2005]. Aproximadamente, el 50% de los CCMI presentan mutaciones de *TP53*.

CDKN2A (9p21)

CDKN2A es un gen supresor de tumores que se localiza en 9p21. Este locus codifica para dos proteínas sin homología de secuencia debido al *splicing* alternativo del gen: p16 y p14arf [Sherr 2001]. Tanto p16 como p14arf tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular, participan en la vía de *RB1* y *TP53*. Las mutaciones de este gen son poco frecuentes en los tumores uroteliales, sin embargo, un 30-50% de estos tumores presentan pérdidas heterocigóticas o homocigóticas [Sherr 2001].

FGFR3 (4p16.3)

FGFR3 pertenece a una familia de receptores tirosin cinasa que se une al factor de crecimiento de fibroblastos (EGF). Las mutaciones de *FGFR3* se consideran eventos tempranos en la carcinogénesis [Dai *et al.*, 2001] y son más frecuentes en tumores de bajo grado (74% de tumores Ta, 21% tumores T1, 16% tumores > T2 y 0% en CIS) [Rieger-Christ *et al.*, 2003]. Además, las mutaciones de *FGFR3* han sido asociadas a

una baja tasa de recurrencia de los tumores Ta [Billerey *et al.*, 2001; van Rhijn *et al.*, 2001; van Rhijn *et al.*, 2003]. Las mutaciones de *FGFR3* están asociadas a un número bajo de alteraciones y a cariotipos estables [Junker *et al.*, 2008].

Además de *FGFR3*, otros genes involucrados en la misma vía se encuentran alterados y a menudo sobreexpresados (*EGFR*, *ERBB2*, etc).

Oncogenes

HRAS (11p15.5)

Fue el primer oncogén identificado en los carcinomas uroteliales. Este gen está implicado en el desarrollo y progresión tumoral del cáncer de vejiga y se encuentra alterado en un 30-40% de los carcinomas uroteliales.

Algunos estudios revelan que la sobreexpresión de HRas es suficiente para el desarrollo de CCUNMI [Mo *et al.*, 2007], la activación de esta vía juega un papel muy importante en el desarrollo los de bajo grado.

Tanto *HRAS* como *FGFR3* participan en la vía misma de señalización.

Tabla 7: Genes supresores de tumores involucrados en la tumorigénesis del cáncer vesical [Mhaweck-Fauceglia *et al.*, 2006]

GST	Locus	Alteración genética	Asociación con comportamiento tumoral	Función	Valor pronóstico
<i>CDKN2A</i>	9p21	Deleción	Bajo grado	Regulación del ciclo celular	Favorable, bajo ratio de recurrencias
<i>TP53</i>	17p13	Mutaciones	Alto grado/estadios avanzados	Regulación del ciclo celular y apoptosis	Recurrencias
<i>RB1</i>	13q14	Mutaciones	Alto grado	Regulación del ciclo celular	No suficiente
<i>FHIT</i>	3p11	Deleción/ metilación del promotor	-	Regulación apoptosis	Malo
<i>FGFR3</i>	4p16.3	Mutación	Bajo grado y estadio	Receptor tirosina cinasa	Favorable, bajo ratio de recurrencias
<i>SFRP1</i>	8p12	Metilación promotor	-	Antagonista vía Wnt	-
<i>TSC1</i>	9q34	Mutación	Bajo grado y estadio	Regulador proliferación celular	Recurrencias
<i>KISS1</i>	1q32	Deleción	Estadios avanzados	Supresor de metástasis	Malo?
<i>RAF1</i>	3p25	Deleción	-	Transducción de señales	Progresión a tumores T1
<i>KAI/CD82</i>	11p11	Deleción	Estadios avanzados	Supresor de metástasis	Predictor de recurrencias en tumores Ta/T1
<i>ARHGDI B</i>	12p12	Deleción/ mutación	-	Supresor de metástasis	Muerte relacionada con enfermedad
<i>CD9</i>	12p13	Deleción	-	Regulador de la motilidad celular	Predictor de recurrencias en tumores Ta/T1
<i>ING1</i>	13q34	Deleción	-	Proliferación celular	Desconocido
<i>RAD51</i>	15q15	Deleción	-	Reparación ADN	Desconocido
<i>CDH1</i>	16q22.1	Hipermetilación	Estadios avanzados	Adhesión celular	Malo
<i>Nm23-H1</i>	17q21	Deleción/ mutación	Estadios avanzados	Supresor de metástasis	Resultados no concluyentes

Tabla 8: Oncogenes involucrados en la tumorigénesis del cáncer vesical [Mhawech-Fauceglia *et al.*, 2006]

Oncogén	Locus	Alteración genética	Asociación con comportamiento tumoral	Función	Valor pronóstico
<i>HRAS</i>	11p15	Mutaciones	CIS	Ciclo celular, diferenciación, apoptosis	Desarrollo y progresión
<i>TP63</i>	3q27	Metilación del promotor	-	Maduración celular/ diferenciación	Malo
<i>EGFR1</i>	7p12	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Receptor tirosina cinasa	Malo / Posible diana terapéutica?
<i>ERBB2</i>	17q21	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Receptor tirosina cinasa	Terapia anti-Her2/Neu?
<i>AURKA</i>	20q13	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Duplicación centrosoma	Tiempo libre de metástasis
<i>TRIO</i>	5p15	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Ciclo celular, proliferación, interacción célula-célula	Desconocido
<i>E2F3</i>	6p22	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Ciclo celular, replicación ADN	Desconocido
<i>MET</i>	7q31	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Receptor tirosina cinasa	Malo
<i>MYC</i>	8q24	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Proliferación celular	Desconocido
<i>FGFR1</i>	8p13	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Receptor tirosina cinasa	Desconocido
<i>CCND1</i>	11q13	Amplificación/ sobreexpresión	Bajo grado y estadio	Ciclo celular: progresión G1-S	-
<i>MDM2</i>	12q13	Amplificación/ sobreexpresión	Bajo grado y estadio	Ciclo celular: control TP53	-
<i>TOP2A</i>	17q21	Amplificación/ sobreexpresión	Músculo infiltrante	Replicación ADN	Malo
<i>PIGU</i>	20q11	Amplificación/ sobreexpresión	-	Regulación receptor urocinasa, activación STAT3?	Malo

1.2.5.3. Modelos de tumorigenesis

Las evidencias genéticas y moleculares apoyan la existencia de dos vías para el desarrollo del cáncer vesical (**Figura 4**) y que también correlacionan con el fenotipo biológico y clínico (no músculo infiltrante y músculo infiltrante). La mayoría de las lesiones músculo infiltrantes parecen originarse a partir de la progresión de displasia hasta CIS y lesiones de alto grado no músculo infiltrantes. Por el contrario, las lesiones no músculo infiltrantes parecen evolucionar a partir de proceso de hiperplasia urotelial. La progresión de lesiones no músculo infiltrantes a músculo infiltrantes que ocurre entre el 10-15% de los casos [Netto and Cheng 2012] parece estar relacionada con inestabilidad genética y la acumulación de alteraciones genéticas [Wu 2005; Mitra *et al.*, 2006; Mitra and Cote 2009; 2010].

Clínicamente, una proporción significativa CCUNMI (Ta y T1) recidivarán tras la resección transuretral (RTU), y una minoría progresarán a carcinomas de alto grado que en última instancia pueden progresar a CCUMI [Netto and Cheng 2012].

Tres alteraciones primarias parecen estar asociadas de manera consistente con las vías de desarrollo tumoral de los CCUNMI. Los genes involucrados son *FGFR3*, *HRAS* [Oxford and Theodorescu 2003] y *PIK3CA*. Alteraciones en las vías *RAS*-MAPK y *PIK3-AKT1* tienen mucha importancia a la hora de promover el crecimiento celular en la neoplasia urotelial. Las mutaciones de *FGFR3* y *HRAS* son excluyentes ya que tendrían un papel redundante en el proceso tumoral. Sin embargo, las mutaciones de *FGFR3* y *PIK3CA* generalmente, ocurren de manera simultánea, sugiriendo un efecto sinérgico.

La vía patogénica de desarrollo de tumores músculo infiltrantes involucra genes supresores de tumores implicados en control de ciclo celular (*TP53*, *CDKN2* y *RB1*) [Kubota *et al.*, 1995; Wu 2005; Mitra *et al.*, 2006].

La progresión de los tumores no músculo infiltrantes a músculo infiltrantes también parece deberse, en algunos casos, a alteraciones de *TP53* y *RB1* como se observa en la **Figura 4**. Así, la mayoría de tumores infiltrantes no poseen precursor papilar previo conocido, y se asocian con frecuencia a CIS en otras áreas de la vejiga.

Las alteraciones del cromosoma 9 son las alteraciones genéticas iniciales en ambas vías de desarrollo tumoral. Son responsables de proporcionar inestabilidad genética que a su vez permite la acumulación de las alteraciones genéticas posteriores.

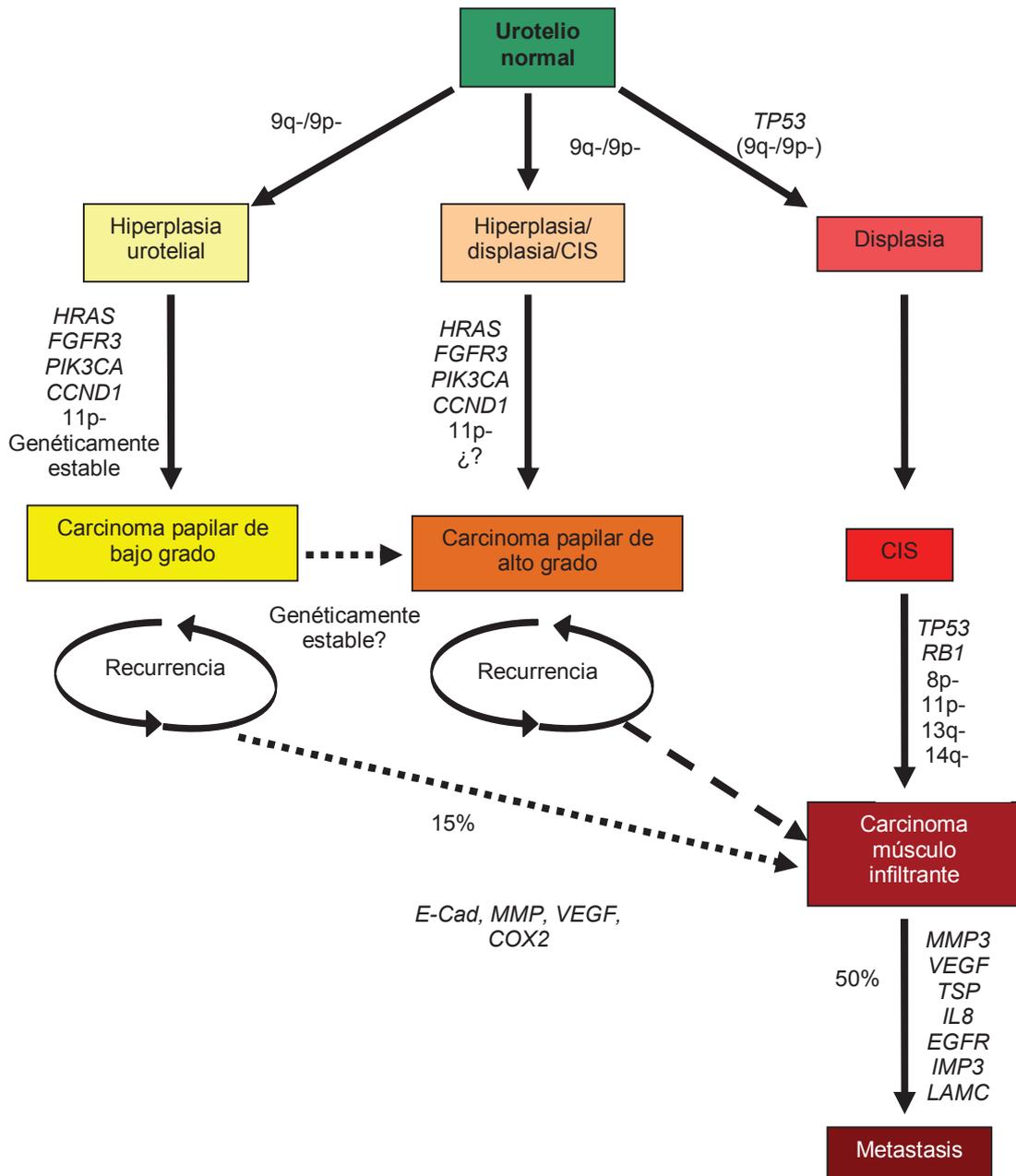


Figura 4: Vías moleculares de desarrollo tumoral de los tumores no músculo infiltrantes y los músculo infiltrantes. Adaptada Netto and Cheng [2012] y Sexton *et al.* [2010]

1.2.6. Diagnóstico y seguimiento del cáncer de vejiga

1.2.6.1. Signos y síntomas

El cáncer vesical se diagnostica fundamentalmente debido a su sintomatología. El síntoma más común de los pacientes con cáncer vesical es la hematuria sin dolor (aproximadamente el 85% de los pacientes) [Wakui and Shiigai 2000]. Cuando la hematuria se presenta de manera asintomática y autolimitada, puede considerarse propiamente como un signo guía. Otros síntomas pueden ser la irritabilidad de la vejiga, la emergencia en la necesidad de orinar y la disuria, especialmente en los casos de CIS. Estos signos y síntomas no son específicos del cáncer vesical, y pueden ocurrir en situaciones no neoplásicas (cistitis, infecciones prostáticas, etc.). También puede diagnosticarse de manera incidental, en contadas ocasiones.

En los pocos casos en los que el diagnóstico se realiza en enfermedad avanzada, los síntomas más frecuentes son: dolor en el costado (causado por la obstrucción uretral), edema de las extremidades inferiores o presencia de una masa palpable en la cavidad abdominal. Muy raramente, los pacientes con enfermedad avanzada presentan pérdida de peso, dolor abdominal u óseo por metástasis distantes.

1.2.6.2. Técnicas de diagnóstico y seguimiento

Citología

La citología urinaria es una técnica que estudia las características morfológicas de las células uroteliales aisladas (**Figura 5A**). Estas células se desprenden del urotelio y se recogen para hacer un análisis citológico. Las células uroteliales pueden obtenerse por

micción espontánea en la orina o mediante maniobras de instrumentación, como el lavado vesical, la cateterización o el cepillado.

La citología es una técnica asequible y no invasiva (si la muestra se obtiene por micción espontánea). Esta técnica presenta una gran especificidad (90%) [Babjuk *et al.*, 2008] de manera que, delante de una citología positiva se puede estar bastante seguro de que existe un tumor e incluso si los estudios de imagen son negativos puede indicar la presencia de un tumor en cualquier localización del tracto urinario (cálices renales, uréteres, vejiga y en la uretra).

Como inconvenientes de la citología se encuentra la subjetividad en la interpretación y la baja sensibilidad en la detección de los tumores de bajo grado [Kirkali *et al.*, 2005]. La interpretación de la muestra puede realizarse de manera inadecuada en caso de una muestra celular escasa, infección del tracto urinario, litiasis o instilaciones vesicales que pueden alterar la morfología de las células, etc. [Kirkali *et al.*, 2005]. La sensibilidad de la técnica varía dependiendo del grado tumoral, ya que presenta una alta sensibilidad en la detección de tumores de alto grado como el CIS, pero disminuye en la detección de tumores de bajo grado [Lotan and Roehrborn 2003].

No debe utilizarse la primera orina de la mañana, porque las células han estado demasiado tiempo sometidas al efecto ambiental de la orina y así evitar la aparición de cambios degenerativos. Preferentemente, debe analizarse orina recién emitida o de menos de dos horas y conservada en nevera hasta su procesamiento. Se recomienda la hidratación previa, y es conveniente la utilización de un mínimo de dos muestras, preferentemente tres, de cada paciente, al menos una de ellas con hidratación.

La citología es una técnica que forma parte del seguimiento estándar tanto en el diagnóstico como en el seguimiento.

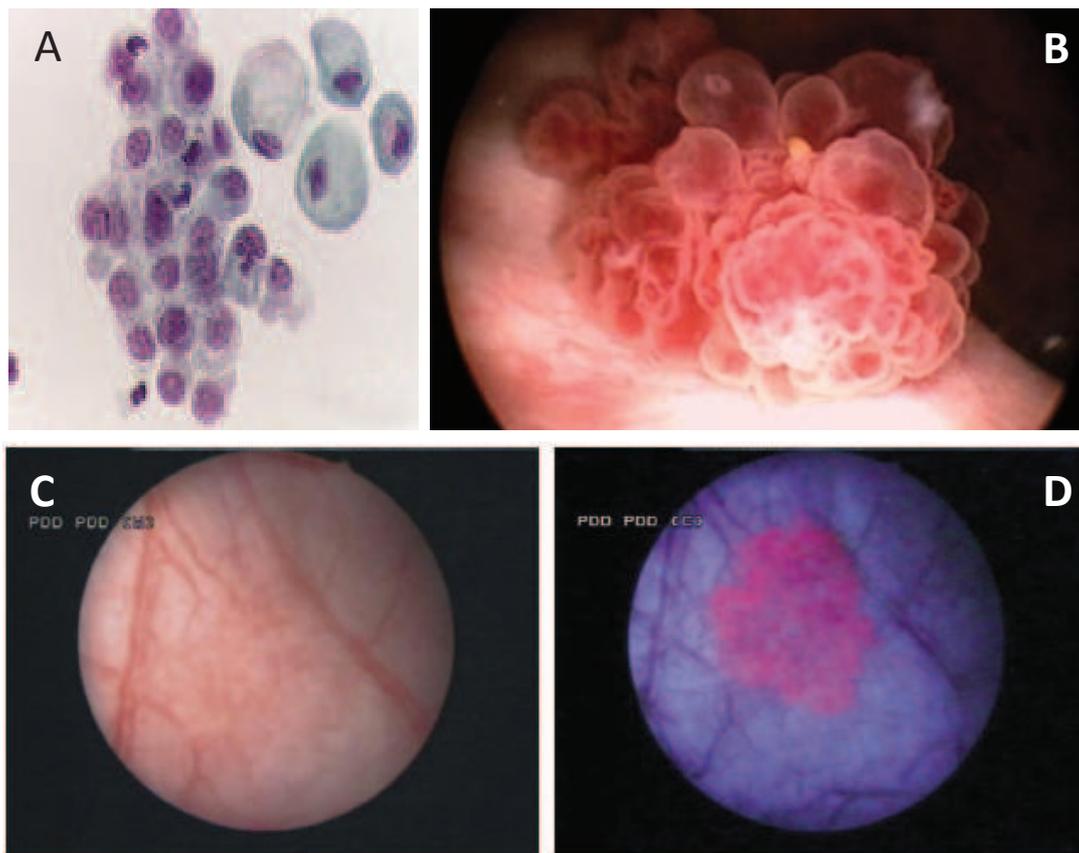


Figura 5: A) Visualización de citología urinaria con tinción de Papanicolau. B) Visualización de tumor papilar mediante cistoscopia. C) Visualización de CIS mediante cistoscopia. D) Misma imagen que la C mediante cistoscopia fluorescente.

Cistoscopia convencional

La cistoscopia convencional (en adelante cistoscopia) es la técnica *gold standard* en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con cáncer vesical [Sharma *et al.*, 2009;

Sexton *et al.*, 2010]. La cistoscopia es un procedimiento médico en el que se utiliza un sistema óptico para la visualización del interior de la vejiga urinaria y la uretra (**Figura 5D y Figura 6**). Consiste en un tubo con una cámara, conectado a un vídeo, que permite ir viendo el interior de la uretra y de la vejiga.

La cistoscopia es una técnica altamente sensible para la detección de muchos tumores y proporciona una información muy relevante para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer vesical: apariencia del tumor, número, tamaño, forma y localización [Sharma *et al.*, 2009]. Cistoscópicamente, los tumores se pueden clasificar según su apariencia, la base tumoral y las características de la superficie.

Aún siendo la técnica de referencia, la cistoscopia, presenta algunas limitaciones prácticas. Puede fallar en la detección de tumores planos como el CIS, que como se ha comentado previamente, presentan una alta tasa de progresión. Por otro lado, aún teniendo en cuenta los avances de la cistoscopia en los últimos años, el procedimiento es frecuentemente percibido como invasivo y puede llegar a ser una fuente de ansiedad para el paciente, sobretodo, teniendo en cuenta que este procedimiento se le aplicará muchas veces durante su seguimiento [Avritscher *et al.*, 2006; Lotan *et al.*, 2006; Svatek *et al.*, 2006]. Además de los inconvenientes para el paciente, esta técnica presenta también un alto coste económico [Lotan and Roehrborn 2002].

La cistoscopia ha ido evolucionando y ha pasado de la cistoscopia rígida a la cistoscopia flexible, con una consiguiente mejora para el paciente. Otras técnicas cistoscópicas han sido desarrolladas para tratar de solucionar las limitaciones de la cistoscopia convencional, como por ejemplo la cistoscopia fluorescente [Schmidbauer *et al.*, 2004].

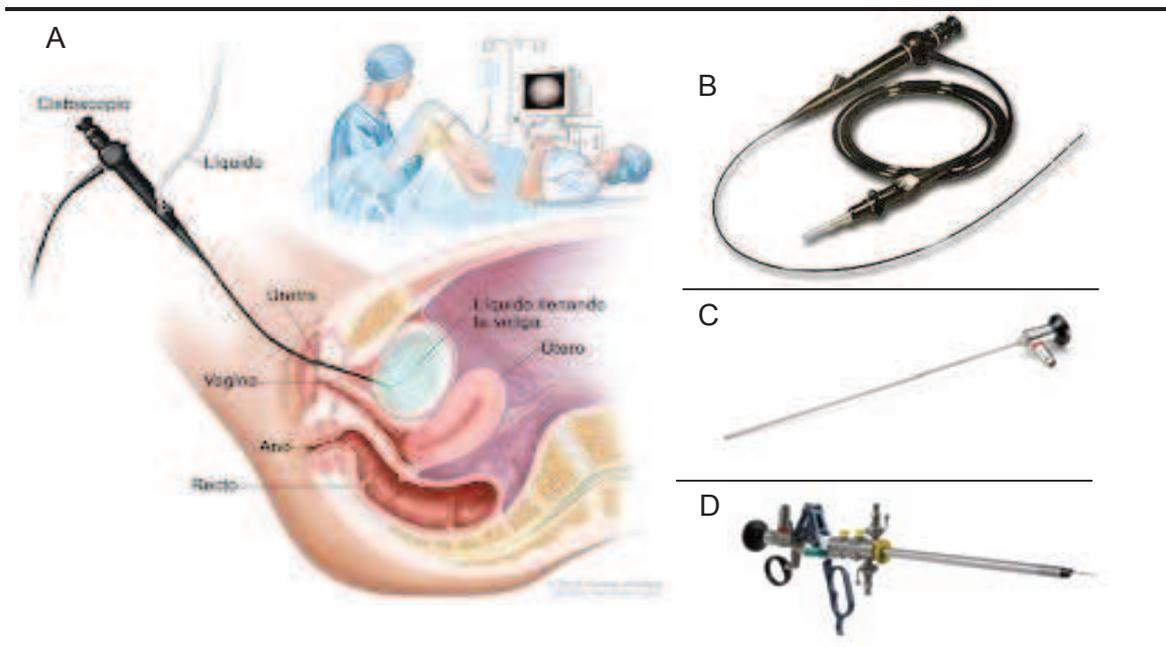


Figura 6: A) Esquema de cistoscopia flexible. B) Cistoscopio flexible. C) Cistoscopio rígido. D) Resectoscopio empleado en la resección transuretral.

Cistoscopia fluorescente

La cistoscopia fluorescente se realiza usando una luz ultravioleta tras la instilación de un fotosensibilizador o su precursor, generalmente ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) o hexalaminolevulinato (HAL). Se ha comprobado que la biopsia y resección guiada por fluorescencia es más sensible que los procedimientos habituales en la detección de tumores malignos, particularmente tipo CIS [Schmidbauer *et al.*, 2004] (**Figura 5D**). Sin embargo, pueden presentarse falsos positivos en procesos inflamatorios, cuando se ha realizado una RTU reciente o por instilaciones vesicales. Varios ensayos clínicos aleatorizados [Denzinger *et al.*, 2007] han demostrado el beneficio de la RTU guiada por fluorescencia en la supervivencia libre de recidiva, pero su valor definitivo en la mejora de los resultados de progresión o supervivencia de los pacientes aún no

se ha demostrado. Se debe considerar el coste adicional del equipamiento necesario y los inconvenientes de la manipulación.

Marcadores tumorales

La cistoscopia y la citología son esenciales para el seguimiento de pacientes con antecedentes de CCUNMI. Como se ha descrito anteriormente, este tipo de tumores tienen gran capacidad de recurrencia y en algunos casos de progresión, motivo por el cuál, los pacientes deben ser seguidos de manera muy continua. Sin embargo, tanto la cistoscopia [Avritscher *et al.*, 2006; Lotan *et al.*, 2006; Svatek *et al.*, 2006] como la citología [Schroeder *et al.*, 2004] tienen desventajas en el seguimiento de los pacientes.

En los últimos años, se han desarrollado marcadores tumorales que permiten la detección de tumores vesicales en el diagnóstico, pero más importante, en el seguimiento de la enfermedad. Una de las características más buscada en estos nuevos marcadores es que sea una prueba no invasiva, además de que presente una gran sensibilidad y especificidad.

En la **Tabla 9** se observa un resumen de los marcadores tumorales actuales, algunos de ellos ya aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) y otros en fase de investigación.

Aunque el campo de los marcadores tumorales en el cáncer vesical está evolucionando rápidamente, no existe todavía un marcador ideal. Ninguno de estos marcadores ha podido demostrar ser capaz de sustituir la necesidad de realizar cistoscopias de control ni tampoco de estratificar a los pacientes en grupos de riesgo.

Para el beneficio de los pacientes, un buen marcador tumoral sería aquel que sin ser invasivo, tuviera una gran sensibilidad y especificidad.

Tabla 9: Resumen de los marcadores. Adaptado de Parker and Spiess [2011], Shariat *et al.* [2008] y Jacobs *et al.* [2010]

Marcador	Sensibilidad	Especificidad	Diana	Comentarios	Aprobado por FDA	Estado Prueba	Referencias
Citología	12.2-79	78.4-99.4	Células uroteliales (morfología)	Escasa sensibilidad en la detección de carcinoma de bajo grado; depende de la experiencia del observador	Sí	Laboratorio	[Poulakis <i>et al.</i> , 2001; Seripa <i>et al.</i> , 2001; Sarosdy <i>et al.</i> , 2002; Mian <i>et al.</i> , 2003; Pfister <i>et al.</i> , 2003; Schroeder <i>et al.</i> , 2004; Grossman <i>et al.</i> , 2005; 2006; Choi <i>et al.</i> , 2010; Lai <i>et al.</i> , 2010; Tritschler <i>et al.</i> , 2010; Yoo <i>et al.</i> , 2010]
FISH	69-92.1	89-94.5	Cromosomas 3, 7, 17 y 9p21	Falta de criterios de positividad estándares ; coste elevado, necesidad de personal entrenado	Sí	Laboratorio	[Sokolova <i>et al.</i> , 2000; Sarosdy <i>et al.</i> , 2002; Friedrich <i>et al.</i> , 2003; Yoo <i>et al.</i> , 2010]
NMP-22	49.5-92.1	66-87.3	Proteína de matriz nuclear involucrada en la distribución de la cromatina durante la replicación	Posibilidad de falsos positivos en condiciones urológicas benignas	Sí	Laboratorio <i>Point of care</i>	[Grossman <i>et al.</i> , 2005; 2006; Jamshidian <i>et al.</i> , 2008; Choi <i>et al.</i> , 2010; Lai <i>et al.</i> , 2010; Yoo <i>et al.</i> , 2010]
BTA stat	50-70	50-70	Proteína relacionada estructuralmente con el factor H del complemento	Especificidad baja en pacientes con condiciones urológicas benignas	Sí	<i>Point of care</i>	[Poulakis <i>et al.</i> , 2001; Lokeshwar <i>et al.</i> , 2002; Sarosdy <i>et al.</i> , 2002; Friedrich <i>et al.</i> , 2003; Schroeder <i>et al.</i> , 2004]
BCLA-4	89-96.4	95-100	Proteína mitótica nuclear	Se encuentra tanto en tumores como en regiones normales de la vejiga	No	Investigación	[Konety <i>et al.</i> , 2000; Van Le <i>et al.</i> , 2005]

Telomerasa							
TRAP	77.4-90	88-93.5	Telomerasa	Protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas			[Erdem <i>et al.</i> , 2003; Sanchini <i>et al.</i> , 2005]
hTERT	84.8-95	43.8-93.5	Transcriptasa telomerasa reversa	Ribonucleoproteína polimerasa que dirige la síntesis de los telómeros			[Melissourgos <i>et al.</i> , 2003; Bowles <i>et al.</i> , 2004; Siracusano <i>et al.</i> , 2005; Khalbuss and Goodison 2006]
Lewis X	79.8-84	80-86.4	Antígeno X de Lewis	Se expresa en células transicionales tumorales			[Golijanin <i>et al.</i> , 1995; Planz <i>et al.</i> , 1998; Pode <i>et al.</i> , 1998]
Ácido hialurónico							
HA	61-83.1	53.6-90.1	Glicosaminoglicano extracelular		No	Investigación	[Lokeshwar <i>et al.</i> , 2000; Kramer <i>et al.</i> , 2010]
HYAL-1	57.6-91	78-100	Hialuronoglucosaminidasa-1		No	Investigación	[Eissa <i>et al.</i> , 2010; Kramer <i>et al.</i> , 2010]
HAase	81.5	83.8	Hialuronidasa		No	Investigación	[Lokeshwar <i>et al.</i> , 2000]
HA/HAase	88.1-94	63-84.4	Glicosaminoglicano extracelular/Hialuronidasa		No	Investigación	[Lokeshwar <i>et al.</i> , 2000; 2002; Schroeder <i>et al.</i> , 2004]
Inmunocyt	66.7-84.9	62.84.7	M344, LDQ10 y 19A211 (antígenos típicos del cáncer vesical)	Necesidad de personal entrenado	No	Investigación	[Pfister <i>et al.</i> , 2003; Tetu <i>et al.</i> , 2005; Mian <i>et al.</i> , 2006]
FDP (Accu- Dx)	52-68.4	79.6-91	Fibrina urinaria/ Producto de degradación de fibrinógeno	Puede reaccionar con fibrinógeno intacto y dar lugar falsos positivos	No	Investigación	[Schmetter <i>et al.</i> , 1997; Ramakumar <i>et al.</i> , 1999]
Survivina	75	100	Inhibidor de la apoptosis	Tiene una sobreexpresión selectiva en los tejidos cancerosos humanos, pero no en los tejidos normales	No	Investigación	[Eissa <i>et al.</i> , 2010]

1.2.7. Tratamiento

Como se ha comentado previamente, el estadio y el grado van a modificar el tratamiento de los pacientes, según presenten CCUNMI o CCUMI.

1.2.7.1. Tratamiento del carcinoma urotelial no músculo infiltrante

La primera maniobra terapéutica en el tratamiento estándar del CCUNMI consiste en la realización bajo anestesia y vía endoscópica de una RTU. En la mayoría de casos se realiza además un tratamiento complementario con terapia intravesical.

Resección transuretral

La RTU es una intervención quirúrgica urológica que consiste en la extirpación endoscópica de tumores macroscópicamente visibles de la vejiga. Se accede a la vejiga introduciendo por la luz uretral un aparato endoscópico llamado resectoscopio (**Figura 6D**).

Actualmente, al resectoscopio se le adapta una cámara endoscópica, un asa metálica de resección y un canal de irrigación y drenaje de líquido que permite observar y controlar las maniobras quirúrgicas bajo visión en pantalla.

La RTU es el paso inicial en el manejo del cáncer vesical y es un procedimiento con finalidad tanto diagnóstica como terapéutica. Por un lado, proporciona información crítica de la lesión como la localización (trígono, base, cúpula o paredes laterales), el tamaño (centímetros de diámetro), el número y la configuración (plana, papilar o mixta). Por otro lado, permite la resección de la lesión y por lo tanto, la obtención de biopsia para confirmar la malignidad.

Tras la realización de la RTU se puede obtener citología de lavado vesical mediante la irrigación de la vejiga con suero salino a través de un catéter o del resectoscopio. En el caso de que durante la RTU el aspecto del urotelio sea normal, es frecuente tomar biopsias randomizadas para su análisis histológico.

Re-resección transuretral (Re-RTU)

Después de la RTU inicial, un porcentaje elevado de pacientes siguen presentando enfermedad residual lo que aumenta el riesgo de recurrencia. Para optimizar el tratamiento, se recomienda realizar una segunda RTU entre las dos y las seis semanas después de la primera RTU en pacientes que presentan tumores Ta de alto grado voluminosos, resección tumoral incompleta y tumor T1 (sobre todo aquellos sin representación de la capa muscular en la biopsia) [Miladi *et al.*, 2003; Babjuk *et al.*, 2008; Montie *et al.*, 2009].

Terapia intravesical

Pacientes con alto riesgo de recurrencia o progresión, según los parámetros clinicopatológicos descritos por la EORTC, reciben terapia intravesical adicional [Chade *et al.*, 2009].

La terapia intravesical se divide en dos modalidades principales que son la quimioterapia intravesical y la inmunoterapia intravesical (**Tabla 10**).

Quimioterapia intravesical

Dentro de los quimioterápicos intravesicales encontramos la mitomicina C (la más utilizada), la oncotiotepa y la adriamicina (doxorubicina), entre otros.

La mitomicina C es un antibiótico antitumoral aislado del *Streptomyces caespitosus* en 1956. Es activado en los tejidos formando un agente alquilante que produce la rotura parcial del ADN en las células cancerosas e inhibe la división de estas células al interferir en la biosíntesis del ADN [Jalon Monzon *et al.*, 2008]. Tiene un peso molecular elevado de 329 KDa y es relativamente hidrofóbica, de manera que origina una difusión endovesical lenta con menor absorción sistémica. No existe una dosis estándar, variando de 20-60 mg por instilación, disueltos en 20-40 mL de agua destilada, instilándose bien en el postoperatorio inmediato o una vez por semana, durante 4 a 8 semanas (existen diferentes pautas). El tratamiento intravesical con mitomicina C es efectivo para la profilaxis del cáncer de vejiga T1 y Ta, y es superior a la RTU sola [Pawinski *et al.*, 1996]. En los ensayos aleatorizados la mitomicina C fue superior a otros agentes como la adriamicina [Jauhainen and Alfthan 1987], la tiotepa [Heney *et al.*, 1988], y equivalente a la epirrubicina [da Silva *et al.*, 1992].

Existen diferentes efectos secundarios menores como la irritación, el dolor y la inflamación vesical.

Los pacientes tratados inicialmente con terapia intravesical presentan una alta probabilidad de conseguir la remisión completa en un corto plazo de tiempo, sin embargo, está en discusión el riesgo de progresión a largo plazo.

Inmunoterapia intravesical

La inmunoterapia basada en el *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) es la terapia más efectiva en el tratamiento del CCUNMI de alto grado [Sylvester *et al.*, 2005; Han and Pan 2006]. Los tratamientos con BCG son preceptivos para los tumores de alto grado y el CIS, es decir, aquellos que tienen un mayor riesgo de progresión [Hall *et al.*,

2007]. En el CIS se ha objetivado hasta un 70% de respuestas completas, retrasando la necesidad de cistectomías posteriores [Han and Pan 2006].

La instilación con BCG se inicia aproximadamente entre 2-4 semanas después de la RTU. Nunca se aplica en el momento de la RTU.

La instilación intravesical de BCG estimula la respuesta inmunológica celular local y libera una gran variedad de citocinas como la interleucina-2 (IL2), factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón gamma (IFN). La estimulación inmunológica persiste durante meses y favorece la destrucción del tumor, probablemente por mecanismos de defensa no específicos. La BCG se une a receptores específicos (fibronectina e integrina) de las células tumorales y penetra en la pared vesical y es transportado a los ganglios regionales. El mecanismo de acción es lento, se necesitan unas seis semanas para la instilación óptima y unos seis meses para la destrucción inmunológica del tumor.

Actualmente se ha generalizado y consensuado la pauta de instilación de quimioterapia intravesical en el momento inmediato post RTU disminuyendo las recidivas de manera significativa [Sexton *et al.*, 2010].

La cistectomía radical es el tratamiento estándar en los casos de tumor difuso múltiple que se escapan a control o CIS que no remiten con el tratamiento con BCG. Existe controversia sobre la necesidad de realizar este tratamiento en tumores G3 (alto grado) T1, dada la alta tasa de progresión a enfermedad invasiva. La cistectomía parcial, actualmente no es aceptada, estaría indicada en casos muy limitados de tumores únicos localizados en la calota vesical, debido al carácter multicéntrico de este tumor.

Los efectos secundarios de las instilaciones intravesicales incluyen las toxicidades locales basadas en la instilación misma y en la acción sistémica del medicamento. Así, los perfiles de toxicidad son similares, con irritabilidad vesical, dolor al orinar, mielosupresión y dermatitis de contacto como síntomas más frecuentes.

Tabla 10: Quimioterápicos e inmunoterápicos para la administración intravesical [Sexton *et al.*, 2010]

Quimioterapia	Mecanismo de acción
Mitomicina C	Antibiótico. Inhibe la síntesis de ADN
Tiotepa	Agente alquilante
Doxorubicina, valrubicina	Inhibidor de la topoisomerasa; inhibe la síntesis de ADN; agente intercalante
Inmunoterapia	Mecanismo de acción
<i>Bacille Calmette-Guérin</i>	Activa la respuesta inmunitaria T-helper tipo I (aumento de interleucina-2 e interferón gamma)
Interferon *	Activación linfocitaria, potencia la respuesta mediada por los linfocitos T-helper tipo I (inhibe la producción de interleucina-10 y citocinas inhibitorias); antiangiogénico, antiproliferativo.
* Usado en combinación con <i>Bacille Calmette-Guèrin</i>	

1.2.7.2. Tratamiento del carcinoma urotelial músculo infiltrante

El tratamiento del CCUMI es controvertido, por la posibilidad de elección de varias opciones terapéuticas. Las opciones locales (cistectomía, radioterapia) usadas de forma exclusiva, prácticamente se han abandonado, por lo que actualmente se practican en combinación con quimioterapia, de forma adyuvante (poco frecuente por no haber demostrado beneficio clínico) o neoadyuvante (quimioterapia de elección la

que se inicia antes de cualquier tratamiento quirúrgico o de radioterapia). Factores relacionados con las condiciones de edad avanzada y enfermedades concurrentes de los pacientes con CCUMI, a veces impiden realizar cirugías radicales amplias, y limitan el número de pacientes candidatos a esquemas de poliquimioterápicos de elevada toxicidad. La tendencia actual es la disminución de la agresividad quirúrgica.

Cirugía

El tratamiento quirúrgico de elección es la cistectomía radical con derivación urinaria. Esta cirugía incluye en el hombre: vejiga, próstata, vesículas seminales, deferente proximal y uretra proximal, con un margen de tejido adiposo y peritoneo; en la mujer: vejiga, uretra, útero, trompas de Falopio, ovarios, pared vaginal anterior y fascia circundante. El flujo urinario se dirige a través de un segmento intestinal de desviación o un reservorio del contenido, un sustituto de la vejiga. Los tipos de derivación son:

- Externa: tipo Bricker donde la orina se vacía directamente desde los uréteres a través de un segmento aislado de íleon a la superficie de la piel donde es recogida en bolsas de urostomía.
- Interna: uretero-sigmoidostomía (prácticamente abandonada)
- Ortotópicos: Studer, Koch, Camey, sigmoidoplastia detubulizada, entre las más realizadas. Consisten en la elaboración de neovejigas anastomosando segmentos de intestino.

Entre las complicaciones derivadas de la cirugía destacamos las propias de toda cirugía mayor (pérdida de sangre, infección, etc.) y las específicas de esta cirugía,

entre las que se encuentran las fístulas urinarias, incontinencia y estenosis de las anastomosis del asa intestinal con la uretra.

La cistectomía parcial se indicaría en casos muy limitados, debido al carácter multifocal de este tumor.

Quimioterapia sistémica

El tratamiento habitual de los pacientes con CCUMI es la cistectomía radical. Sin embargo, este tratamiento de referencia sólo depara supervivencia a los 5 años en alrededor del 50 % de los casos [Stein and Skinner 2006]. Los antineoplásicos sistémicos pueden usarse en tratamiento de tumores infiltrantes, no susceptibles de ser efectivamente tratados con terapias intravesicales. El objetivo es tratar la enfermedad clínica o subclínica que microscópicamente afecta a grupos ganglionares regionales o a órganos a distancia. Generalmente, se usa en combinación de drogas: cisplatino en combinación de varios agentes quimioterápicos (poliquimioterapia) como plactaxel, gemcitabina y otros. Las combinaciones de fármacos más comúnmente utilizadas son:

- CISCA: Cisplatino, ciclofosfamida, adriamicina
- M-VAC: Adriamicina, metrotexate, vinblastina, cisplatino
- MVC: Metrotexate, vinblastina, cisplatino

La quimioterapia se ha utilizado como tratamiento neoadyuvante con la intención de mejorar el control local del tumor y de destruir la enfermedad metastásica subclínica (micrometástasis), siendo utilizada antes de la cirugía y de la radioterapia en tumores localmente avanzados. Los estudios randomizados realizados no han demostrado

ventaja alguna sobre los tratamientos locales exclusivos y tampoco la terapia adyuvante [Sylvester *et al.*, 2006; Calabro and Sternberg 2009].

1.3. TÉCNICA DE FISH

La técnica de FISH es una técnica molecular que permite localizar un determinado fragmento de la secuencia de los ácidos nucleicos y pone de manifiesto la presencia o ausencia de secuencias génicas específicas. Se puede aplicar sobre núcleos interfásicos de extensiones celulares o cortes de tejido o directamente en cromosomas [Pinkel D *et al.*, 1981]. La utilización de las técnicas de FISH ha aumentado en los últimos años como complemento de las técnicas de CC. La posibilidad de poder utilizar las técnicas de FISH sobre células que no están dividiéndose es importante en aquellas neoplasias con baja tasa de división celular. Para ello utiliza sondas marcadas con fluorocromos. Dependiendo del tipo de sonda utilizada es posible evaluar la presencia de distintas alteraciones en los núcleos.

Las técnicas de FISH consisten en utilizar pequeñas secuencias marcadas de ADN de cadena sencilla complementarias a la zona de interés. Estas pequeñas secuencias reciben el nombre de sondas y están previamente marcadas directa o indirectamente con moléculas fluorescentes.

La técnica de FISH se basa en la capacidad de desnaturalización y renaturalización del ADN. Ambos son procesos reversibles mediados por cambios de temperatura y consta de una serie de pasos que se detallan a continuación y se resumen en la **Figura 7:**

- Preparación de la muestra a estudiar para hacerla accesible a la sonda (fijación y pretratamiento que varían dependiendo del tipo de material) y por otro lado, el marcaje fluorescente de la sonda.
- Desnaturalización del ADN tanto de la muestra como de la sonda a utilizar. Este proceso de desnaturalización se basa en la rotura de los puentes de hidrógeno que unen la doble hélice del ADN mediante la utilización de temperaturas elevadas (70-80°C). En esta parte del proceso se obtienen dos hebras de ADN de cadena única.
- Renaturalización (hibridación) del ADN de la muestra y de la sonda al incubarlos a una temperatura de 37-39°C. A esta temperatura se produce la unión entre ambos ADN por complementariedad de bases.
- Lavado posthibridación de la muestra y contratinción. El lavado se realiza con soluciones astringentes para eliminar exceso de sonda y uniones no perfectamente complementarias entre los dos ADN. También se realiza una contratinción que permite visualizar las estructuras genéticas (cromosomas y núcleos) y así facilitar la valoración.
- Valoración de la muestra en el microscopio de fluorescencia.

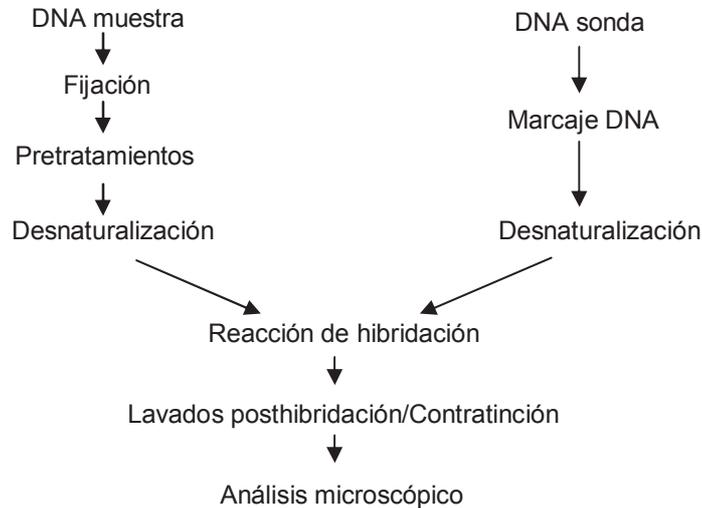


Figura 7: Protocolo de la técnica de hibridación *in situ*

Las sondas para la FISH pueden ser centroméricas, de pintado cromosómico y de secuencia única o también llamadas de locus específico [Chen *et al.*, 1992] (Figura 8). Cada una va a proporcionar información diferente. En esta tesis, únicamente se ha procedido a la hibridación con sondas centroméricas y de locus específico.

- Sondas centroméricas o ADN satélite: están formadas por secuencias repetitivas de ADN que hibridan con el ADN de la región centromérica del cromosoma. Éstas permiten detectar alteraciones cromosómicas numéricas tanto sobre metafases como sobre núcleos en interfase.
- Sondas de secuencia única o locus específico: hibridan con el ADN de una región genómica concreta, correspondiente a un gen o a una banda

cromosómica. Con ellas es posible detectar alteraciones numéricas y estructurales tanto en metafases como en núcleos interfásicos.

- Sondas de pintado cromosómico: contienen una librería de secuencias genómicas que abarcan todo un cromosoma o una determinada región. Con estas sondas podemos detectar alteraciones estructurales o numéricas de los cromosomas, pero sólo en células en metafase. Es muy útil cuando tenemos cromosomas de mala calidad.

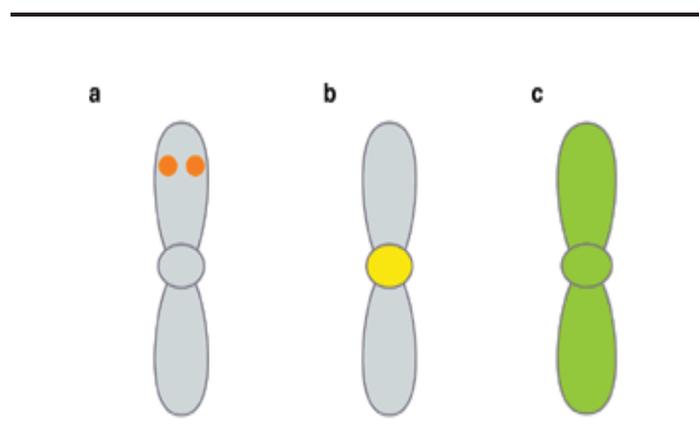


Figura 8: Principales tipos de sondas: a) Sondas de locus específico. b) Sondas centroméricas. c) Sondas de pintado

1.4. KIT UROVYSION®

1.4.1. Diseño de la sonda de FISH multicolor y aprobación por la FDA

El aumento en el conocimiento de las alteraciones genéticas asociadas a la aparición de tumores malignos ha conducido al desarrollo de técnicas genéticas que permiten diagnosticar, seguir y/o establecer el pronóstico del paciente con cáncer. De la misma manera, en los últimos 30 años ha crecido el conocimiento de las alteraciones genéticas asociadas a la aparición y progresión del carcinoma urotelial.

En el año 2000 Sokolova *et al.* [2000] proponen desarrollar un kit de FISH multicolor para la detección de carcinoma urotelial en muestras de orina. En la primera parte del estudio, realizada en 21 pacientes con cáncer urotelial y 9 donantes normales, se testaron 9 sondas centroméricas para los cromosomas: Y, 3, 7, 8, 9, 11, 15, 17, 18 y la sonda de locus específico (LSI) para 9p21. En la primera parte se concluyó que las 4 sondas con mayor sensibilidad eran: CEP3, CEP7, CEP17 y LSI 9p21. Las sondas seleccionadas se testaron en una cohorte de 179 pacientes de manera prospectiva (46 pacientes con biopsias positivas para carcinoma urotelial). En la segunda parte del estudio, establecieron los criterios de positividad del kit de sondas y demostraron una alta sensibilidad y especificidad.

Ese mismo año, Halling *et al.* [2000] compararon la citología con la técnica de FISH usando la sonda multicolor descrita por Sokolova *et al.*[2000]. Este estudio se realizó en un total de 280 muestras de orina de 265 pacientes (150 con antecedentes de carcinoma urotelial y 115 sin antecedentes) concluyendo, por primera vez, una mayor sensibilidad y especificidad del FISH respecto a la citología.

Posteriormente, se han realizado numerosos estudios comparando la técnica de FISH con la citología, con otros marcadores tumorales, en biopsias, en muestras de lavado vesical, etc.

El kit UroVysion® para la detección del cáncer vesical, está diseñado para detectar aneuploidías de los cromosomas 3, 7, 17 y pérdidas de 9p21 utilizando la técnica de FISH, sobre muestras de orina de pacientes con hematuria y sospecha de cáncer vesical tal y como describió Sokolowa *et al.* [2000], la FDA aprobó el uso del Kit UroVysion® para la detección de recidivas en muestras de orina de micción espontánea en pacientes con antecedentes de cáncer de vejiga. En el año 2005 la FDA aprobó a UroVysion® para la detección de cáncer de vejiga en pacientes con hematuria macroscópica o microscópica pero sin antecedentes de cáncer vesical. Según la aprobación de la FDA, los resultados del Kit UroVysion® deben ser usados, en conjunto y no como sustituto de los procedimientos diagnósticos actuales, como una ayuda para el diagnóstico inicial del cáncer vesical en pacientes con hematuria y en el posterior seguimiento de la recurrencia del tumor.

El kit UroVysion® consiste en la mezcla en tampón de hibridación de las secuencias repetitivas de ADN del centrómero de los cromosomas 3, 7, 17 marcadas en diferentes fluorocromos y la sonda de secuencia única que hibrida específicamente con 9p21 donde se localiza el localiza en el locus de *CDKN2A* (Figura 9):

- CEP 3 marcada en espectro rojo
- CEP 7 marcada en espectro verde
- CEP 17 marcada en espectro aguamarina
- LSI 9p21 marcada en espectro amarillo

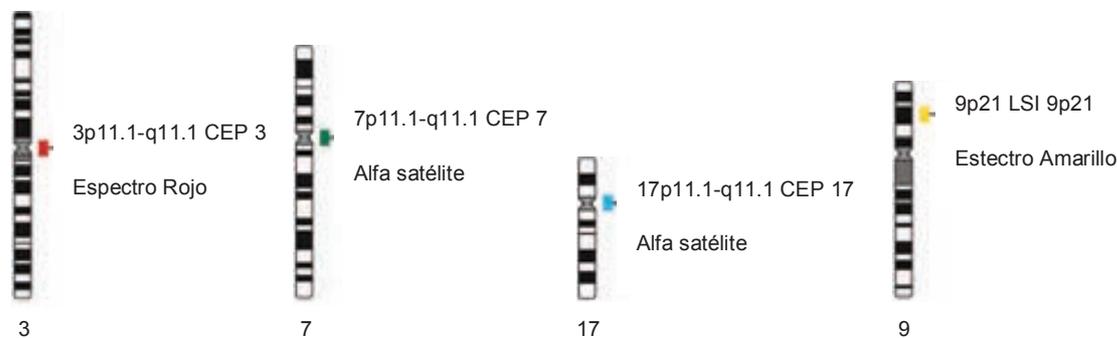


Figura 9: Esquema de la sonda UroVysion

1.4.2. Criterio de valoración y criterios de positividad del kit UroVysion®

Los criterios de valoración y positividad han sido y siguen siendo objeto de multitud de publicaciones, reflejando la falta de consenso entre diferentes grupos.

Respecto a la valoración de los resultados de la hibridación (criterios de valoración), Sokolowa *et al.* [2000] observaron que es más eficiente la valoración de células morfológicamente sospechosas que la valoración de células uroteliales consecutivas. Muchos autores han seguido este criterio de valoración [Bubendorf *et al.*, 2001; Kipp *et al.*, 2005a; Gudjonsson *et al.*, 2008].

En cuanto al criterio de positividad, Hajdinjak *et al.* [2008] en un metanálisis en el que se compara la técnica de FISH y la citología urinaria, describe al menos 5 criterios de positividad que han utilizado diversos autores hasta el momento. Estos criterios han evolucionado a partir de los criterios propuestos por Sokolova *et al.* [2000]:

- Sokolova *et al.* [2000]: recuento de 20 células morfológicamente seleccionadas. Positividad si la muestra presenta al menos cinco células con polisomía

- (ganancia de dos o más cromosoma), o 10 células o más con ganancia de un único cromosoma, o al menos 10 células con delección homocigota de 9p21.
- Bubendorf *et al.* [2001]: recuento de 25 células morfológicamente seleccionadas. Positividad si la muestra presenta al menos dos células presentan patrón de FISH alterado en al menos uno de los cromosomas analizados después de excluir del recuento células tetraploides.
 - Friedrich *et al.* [2003]: análisis de 100 células uroteliales. Positividad si presenta al menos 20% de células con polisomía, o 40% de células con ganancia de un único cromosoma, o delección de 9p21.
 - Varella-García *et al.* [2004]: recuento de 50 células morfológicamente seleccionadas. Positividad si la muestra presenta al menos 16% de células con polisomía o 48% de células con delección de 9p21.
 - Casa comercial [Abbot Molecular]: recuento de 25 células morfológicamente seleccionadas, en caso de no conseguirlas, valorar la totalidad de células uroteliales. Positividad si la muestra presenta al menos 4 células con polisomía o al menos 12 células con delección homocigota de 9p21.

1.4.3. Importancia y utilidad

Desde su diseño, se han publicados multitud de estudios, tanto en diagnóstico como en seguimiento, para intentar vislumbrar el índice de detección que puede tener la sonda de FISH en el cáncer vesical. Numerosos autores han testado su utilidad en gran variedad de situaciones: comparación con citología, utilidad en casos de citología dudosa, comparación con otros marcadores, capacidad pronóstica, en respuesta a

diferentes quimioterápicos intravesicales, como monitorización temprana de respuesta de terapia intravesical, en muestras de lavado vesical, etc. La mayoría de los estudios publicados muestran una gran capacidad de la FISH en la detección de tumores vesicales (**Tabla 11**).

Tabla 11: Revisión bibliográfica realizada por Fritsche *et al.*, [2010] respecto a la utilización del kit UroVysion®

Estudio	Objetivo	Características de los pacientes	Nº pacientes/ Eventos/ Tumores	Seguimiento (meses)	Sensi bilidad	Especi ficidad	VPP	VPN
[Sokolova <i>et al.</i> , 2000]	Desarrollo de la prueba multicolor de FISH UroVysion®	Con y sin historia de CCU. Todos los grados	179/179/21	0	86.8	91.8	ND	ND
[Halling <i>et al.</i> , 2000]	Comparación de FISH y citología. Modificación del criterio de FISH	Con y sin historia de CCU. Todos los grados	265/280/75	0	81	96	ND	ND
Bubendorf <i>et al.</i> 2001]	Criterio de FISH modificado (patrón tetrasómico normal). Bajan punto de corte para células aneusómicas	Historia de CCU. Todos los grados. Población de control con HBP	117/192/126	0	71-94	96	98	68
[Ishiwata <i>et al.</i> , 2001]	Criterio de positividad diferente (solo cromosomas 9 y 17)	Historia de CCU. Todos los grados	81/81/17	27	85	95	ND	ND
[Placer <i>et al.</i> , 2002]	Comparación FISH y citología	Historia de CCU. Todos los grados	86/86/47	0	80.4	85.3	88.1	76.3
[Sarosdy <i>et al.</i> , 2002]	Primera evaluación multicéntrica de la FISH. Proponen concepto de resultado anticipatorio	Historia de CCU. Todos los grados	451/451/176	0	71	65.8	53.0	80.6
[Skacel <i>et al.</i> , 2003]	Primera evaluación de FISH en muestras con citología atípica, sospechosa y negativa	Historia de CCU. Todos los grados	120/120/82	Al menos 12	85	97	ND	ND
[Laudadio <i>et al.</i> , 2005]	Primera evaluación clínica en el seguimiento	Historia de CCU. Todos los grados, o síntomas sin antecedentes	300/521/44	12	73	65	ND	ND

[Kipp <i>et al.</i> , 2005b]	Terapia intravesical; modificación de criterios: mínimo de 20% de delección homocigota de 9p21	Historia de CCU. Todos los grados	37/68/25	Mediana (rango) 18.2 (6-29)	ND	ND	100	53
[Sarosdy <i>et al.</i> , 2006]	Primera evaluación multicéntrica en pacientes con hematuria	Microhematuria	497/473/50	0	68.8	77.7	27.1	95.3
[Zellweger <i>et al.</i> , 2006]	Redefinición criterios: patrón tetrasómico normal; mínimo 4 células con pérdida absoluta o relativa de 9p21	Lavados vesicales de pacientes con historia de CCU	138/138/38	Mediana (rango) 19.2 (4-52)	ND	ND	71	79
[Daniely <i>et al.</i> , 2007]	Evaluación de la FISH en citología benigna	Historia de CCU. Todos los grados, o síntomas sin antecedentes	115/133/22	24-36	100	65	44	100
[Moonen <i>et al.</i> , 2007]	Evaluación en seguimiento. Criterios menos estrictos que los originales: al menos 4 células con ganancias cromosómicas	Historia de CCU. Todos los grados	105/113/64	0	39.1	89.7	ND	ND
[Yoder <i>et al.</i> , 2007]	Evaluación del FISH en citología dudosa o negativa	Historia de CCU	250/250/82	Mediana (rango) 23 (12-30)	ND	ND	74.0	87.0
[Bergman <i>et al.</i> , 2008]	Muestras de orina de irrigación vesical durante el seguimiento cistoscópico	Historia de CCU	41/141/ND	Mediana (rango) 30 (2-57)	77	93	83	90
[Gudjonsson <i>et al.</i> , 2008]	Estudio multicéntrico	Historia de CCU. Todos los grados	159/159/27	0	30	95	ND	ND
[Kipp <i>et al.</i> , 2008]	Evaluación de FISH en casos de citología dudosa. Criterios menos estrictos; al menos 4 células con ganancias cromosómicas	Con y sin historia de CCU. Todos los grados	124/124/85	0	62	88	91	52

[Lotan <i>et al.</i> , 2008]	Evaluación de FISH en casos de citología atípica y sospechosa; criterios menos estrictos; al menos 4 células con ganancias cromosómicas	Con y sin historia de CCU. Todos los grados	120/120/38	0	Resultados estratificados según resultado cistoscopia e historia de CCU			
[Whitson <i>et al.</i> , 2009]	Evaluación retrospectiva durante terapia intravesical; criterios menos estrictos: al menos 4 células con ganancias cromosómicas	Historia de alto riesgo de CCU	42/84/18	Mediana (rango) 21 (5-53)	ND	ND	ND	ND
[Savic <i>et al.</i> , 2009]	Evaluación prospectiva durante terapia con BCG; criterios menos estrictos; al menos 4 células con ganancias cromosómicas	Historia de CCU. Todos los grados	68/ND/28	Mediana (rango) 19.5 (7.2-45.1)	ND	ND	ND	ND
[Ferra <i>et al.</i> , 2009]	Evaluación de FISH en casos de citología dudosa; criterios menos estrictos; al menos 4 células con ganancias cromosómicas	Pacientes con citología dudosa.	140/161/79	6.3	68.3	39.7	56.8	51.9
[Schlomer <i>et al.</i> , 2010]	Evaluación prospectiva en casos de citología atípica	Con y sin historia de CCU. Todos los grados. Citología atípica	216/216/43	8.7	Estratificado según el resultado de citología			
[Fritsche <i>et al.</i> , 2010]	Evaluación prospectiva en CCU de alto riesgo. Criterio: Patrón tetrasómico se considera normal	Historia de alto riesgo de CCU	25/210/25	Mediana (rango) 27 (1-48)	94.6	92.9	76.1	98.6

Abreviaturas: ND: dato no disponible

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. **HIPÓTESIS**

Una de las características principales del CCUNMI, es su capacidad de recidiva y progresión, con un crono aleatorio, hacia infiltrante, por ello, los pacientes deben ser seguidos con regularidad y durante largos periodos de tiempo, no existiendo consenso en la duración del mismo, con el objetivo de detectar de manera temprana, la aparición de nuevas recidivas o progresión de la enfermedad.

Las técnicas utilizadas hasta el momento para el diagnóstico y seguimiento del carcinoma vesical son la cistoscopia y la citología. Ambas técnicas presentan inconvenientes y limitaciones, motivo por el cual, en los últimos años se han intentado desarrollar nuevos marcadores y pruebas diagnósticas. Una de estas nuevas pruebas es la técnica de FISH con el kit UroVysion® que permite la detección de alteraciones genéticas concretas (alteraciones numéricas en los cromosomas 3, 7 y 17 y en el locus específico 9p21).

La hipótesis de este trabajo es; dado que la prueba de FISH con la sonda UroVysion® tiene unos valores similares de sensibilidad y especificidad que la cistoscopia, y mayores que la citología, creemos que su utilización en la clínica diaria podría retrasar y/o sustituir la cistoscopia sin impacto en el seguimiento del paciente.

2.2. OBJETIVOS

En el seguimiento de pacientes con antecedentes de CCUNMI:

- 1.** Valorar la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la citología, la cistoscopia, y la FISH

- 2.** Comparar:
 - 2a.** la sensibilidad y especificidad de la citología con la técnica de FISH

 - 2b.** la sensibilidad y especificidad de la combinación de citología y la FISH con la técnica de FISH aislada

 - 2c.** la sensibilidad y especificidad de la cistoscopia con la técnica de FISH

 - 2d.** la sensibilidad y especificidad de la combinación de cistoscopia y la FISH con la técnica de FISH aislada

- 3.** Valorar la capacidad de la FISH en la detección de tumores y la posibilidad de sustituir a la cistoscopia en el seguimiento

- 4.** Validar los criterios de positividad para la sonda UroVysion®

- 5.** Correlacionar las alteraciones genéticas detectadas por FISH con el estadio y el grado tumoral

3. *MATERIAL Y MÉTODOS*

3.1. **PACIENTES**

Este es un estudio prospectivo y ciego que ha sido realizado en el Departamento de Urología y en el Servicio de Patología del Hospital del Mar, Barcelona. En este estudio se han incluido todos los pacientes que acuden al Servicio de Urología del Hospital del Mar para el seguimiento de CCUNMI entre Noviembre de 2007 y Noviembre de 2008 [Galván *et al.* 2011 (**Anexo 2**)].

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético local y todos los pacientes han firmado el consentimiento informado escrito de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

En total, se incluyen en el estudio 250 exámenes de seguimiento de 225 pacientes. Se excluyen dos casos (nº 3 y nº 24 (**Anexo 1**) por tratarse de casos en seguimiento de CCU de vías altas). En total, se encuentran en seguimiento por CCUNMI de vejiga 248 exámenes correspondientes a 223 pacientes (182 (81,6%) hombres y 41 (18,4%) mujeres). La mediana de edad es de 72,9 años (rango: 31 – 91 años). La mediana de supervivencia libre de enfermedad (SLE) desde el último tumor es de 25,6 meses (rango: 2,5–60 meses). Las características histopatológicas del último tumor antes de la inclusión en el estudio se muestran en la **Tabla 12**.

Todos los pacientes fueron seguidos utilizando el protocolo estándar (citología y cistoscopia) independientemente de los resultados de FISH observados. El tiempo de seguimiento se registra desde el momento de inclusión en el estudio hasta la confirmación histológica de una recidiva tumoral o hasta el último control de seguimiento del paciente (cistoscopia y/o citología). La mediana de seguimiento de los

pacientes fue de 15.3 meses (rango: 0–63.1 meses). El diseño del estudio se encuentra en la Figura 10.

Tabla 12: Características histopatológicas del último tumor previo a la inclusión en el estudio.

Estadio tumoral			Tamaño tumoral		
	N	%		N	%
Tis	4	1,8	<1cm	74	33,2
Ta	185	83,0	1-3cm	99	44,4
T1	25	11,2	>3cm	43	19,3
No valorable	9	4,0	No valorable	7	3,1

Grado tumoral (OMS 1973)			Grado tumoral (OMS 2004)		
	N	%		N	%
G1	75	33,6	NUBPM	1	0,4
G2	93	41,7	Bajo grado	77	34,5
G3	49	22,0	Alto grado	133	59,6
No valorable	6	2,7	No valorable	12	5,4

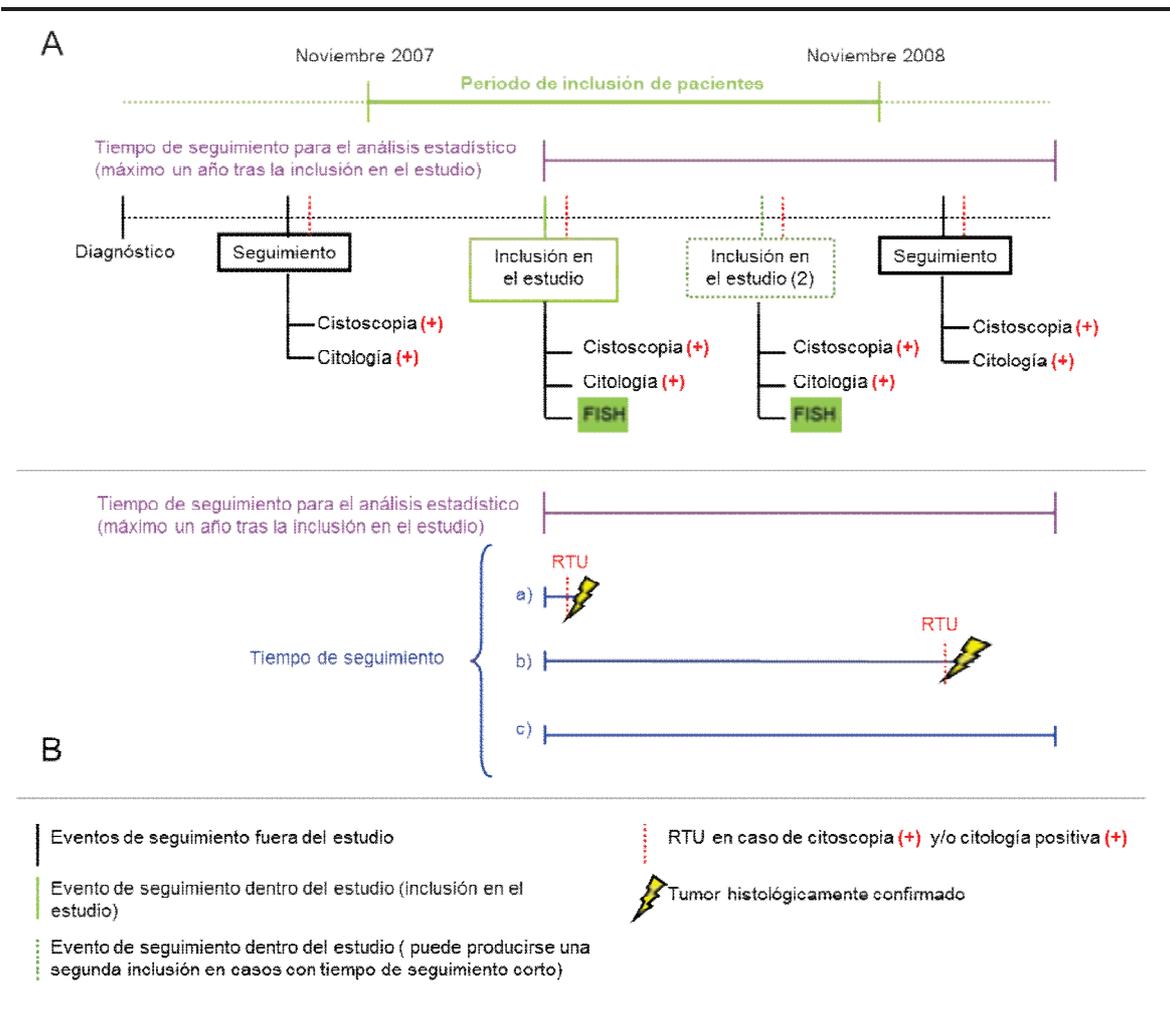


Figura 10: A) Diseño del estudio. Todos los pacientes incluidos en el estudio se encuentran en seguimiento por antecedentes de CCUNMI. En el momento de inclusión en el estudio se incluye la técnica de FISH en su seguimiento. Una vez finalizado el estudio, se siguen de la manera habitual. **B)** Esquema del tiempo de seguimiento de los pacientes tras su inclusión en el estudio: Tiempo tras la detección de recidiva tumoral a) en el momento del estudio y b) en el plazo de un año tras la inclusión en el estudio o, c) hasta el último control de seguimiento conocido.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cistoscopia

Se realiza una cistoscopia convencional de control a todos los pacientes que se incluyen en el estudio. Los resultados de la cistoscopia se clasifican en negativos si no se encuentran signos de recidiva tumoral, y positivos aquellos casos que presentan aparentemente una recidiva tumoral. Existen casos que se informan como dudosos. Estos casos se han considerado positivos desde un punto de vista clínico y estadístico si la sospecha ha conducido a una RTU.

Previo a la realización de la cistoscopia de control, se recoge una muestra de orina (micción espontánea) para su estudio mediante citología con tinción de Papanicolau y mediante FISH.

3.2.2. Citología

Las muestras de orina de micción espontánea se preparan usando la técnica de citología líquida llamada *ThinPrep*® y posteriormente se tiñen con la tinción de Papanicolau.

La citología se considera positiva si se visualizan células malignas o sospechosas de malignidad. Por otro lado, se considera negativa en aquellos casos con atíпия muy leve o moderada. A aquellos pacientes que presentaron una citología positiva se les realizó una RTU como parte del seguimiento estándar.

3.2.2.1. Protocolo de preparación de muestras de orina mediante citología líquida

Reactivos

- ThinPrep® 2000 (Hologic Inc, Nasdaq: Holx)
- Solución Cytolyt® (Hologic)
- Viales de solución Presericyt® (Hologic)
- Filtros ThinPrep Non-GYN (Hologic)
- Portaobjetos de microscopio ThinPrep (Hologic)
- Etanol 96 Cetilperidinio (Cuve Farma; Almodóvar del Río (Córdoba); España)

Procedimiento

Recolección de la muestra

1. Recoger 50mL de orina de micción espontánea en vaso recolector de orina (conservar en nevera hasta su procesamiento)

Lavado de la muestra

2. Centrifugar a 600 G durante 10 minutos
3. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento
4. Añadir 30 mL de Cytolit®
5. Centrifugar la orina a 600 G durante 10 minutos
6. El lavado de la muestra puede repetirse si el pellet es muy hemático

Extensión/conservación de la muestra

7. Añadir el sedimento resuspendido en un vial de Presericyt®
8. Incubar 10-15 minutos
9. Hacer la extensión de la muestra utilizando el ThinPrep® 2000 (Utilizar el programa 2 (FLU/FNA)). **(Figura 11)**
10. Fijar en etanol 96° durante 30 minutos

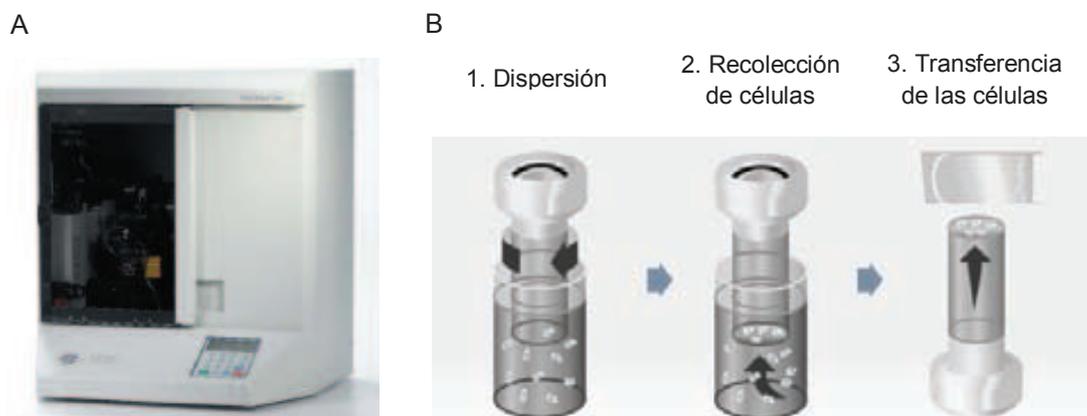


Figura 11: A) Procesador ThinPrep 2000. B) Esquema de la transferencia de las células desde el vial al portaobjetos. 1. El filtro rota en el interior de la muestra para homogeneizar la solución. 2. Una leve aspiración arrastra las células hasta la membrana del filtro. El ThinPrep® supervisa la velocidad del flujo a través del filtro. 3. Después de la recolección de las células, el filtro se invierte y se produce una ligera presión contra el portaobjetos de microscopio ThinPrep®. Gracias a la tensión superficial y a la presión de aire las células se adhieren al portaobjetos, resultando en una suspensión celular de distribución circular.

3.2.3. RTU

Aquellos pacientes que presentan cistoscopia y/o citología positivas son sometidos a RTU como parte del seguimiento habitual, tal y como describen las guías clínicas del tratamiento y manejo del paciente con cáncer vesical [Gelabert Mas *et al.*, 2007]. En este estudio no se han alterado las pautas, de manera que los resultados de la FISH obtenidos no han alterado el comportamiento clínico sobre los pacientes.

3.2.4. **Hibridación *in situ* fluorescente**

La técnica de FISH se realiza a partir de preparaciones obtenidas mediante citología líquida y la posterior hibridación con la sonda UroVysion®.

3.2.4.1. Protocolo de hibridación

Reactivos

FISH pretreatment reagent kit (Abbot) contiene:

- Proteasa (3 x 25 mg)
- Tampón de proteasa (3 x 50 mL)
- Tampón de lavado PBS 1X (2 x 250 mL)
- MgCl₂ 2M (3 x 0,5mL)
- 20 x SSC (1 x 66g)

UroVysion® bladder cancer kit (Abbot) contiene:

- Mezcla de sondas de ADN UroVysion (60 µL)
- DAPI II (300 µL)
- NP-40 (2 x 2mL)
- 20xSSC (66g)
- Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Países Bajos)
- Formaldehído 37% (Merck)
- PBS 10x (Roche, Barcelona, España)
- MgCl₂ x 6H₂O (Merck)
- Agua destilada (Grifols, Barcelona, España)
- HCl 35% (Prolabo, Ciudad Oregón, Sonora, México)

- Formamida (Merck)
- Agua destilada (Grifols)

Soluciones

- 20xSSC: Mezclar los 66g de 20xSSC con 200 mL de agua destilada. Agitar vigorosamente. Ajustar el pH a 5,3 con HCl concentrado. Enrasar a 250 mL. Filtrar a través de una unidad de filtración con poro de 0,45 μm . Conservar a TA durante un máximo de 6 meses.
- 2xSSC: Mezclar 100mL de la solución de 20xSSC con 850 mL de agua destilada. Agitar vigorosamente. Ajustar el pH a 7,0-7,5. Enrasar a 1000 mL con agua destilada. Filtrar a través de una unidad de filtración con poro de 0,45 μm . Conservar a TA durante un máximo de 6 meses. Descartar tras su uso.
- Solución de proteasa: Mezclar un vial de proteasa (25 mg) en una botella de tampón de proteasa. Mezclar bien. Hacer alícuotas de 1 mL y conservar a -20° un máximo de tres meses.
- Solución MgCl_2 1M: 20,33 g de $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 100 mL de agua destilada. Descartar tras su uso.
- Formaldehído 1%: 57,6 mL de agua destilada, 7 mL de PBS 10x, 3,5 mL de MgCl_2 1M, 1,9mL de formaldehído 35%. Descartar tras su uso.
- Formamida 50%: 125 mL de formamida + 100 mL de agua destilada + 25 mL de 20xSSC + 6 gotas de HCl puro. Conservar a 4°C un máximo de 2 semanas.
- 2xSSC/0,1% NP-40: 499,5 mL de 2xSSC + 0,5 mL de NP-40. Conservar a 4°C un máximo de 6 meses.

- Etanol 85% (50 mL): 42,5 mL de etanol + 7,5 mL de H₂O destilada. Descartar tras su uso.
- Etanol 70% (50 mL): 35 mL de etanol + 15 mL de H₂O destilada. Descartar tras su uso.

Procedimiento

Pretratamiento (Kit de pretratamiento de Vysis)

1. Precalentar una cámara húmeda a 37°C
2. Incubar los portaobjetos en 2xSSC a 73°C durante 2 minutos
3. Descongelar una alícuota de proteasa en el baño a 37°C
4. Colocar 40 µL de la solución de proteasa sobre cada extensión. Cubrir con un cubreobjetos de 24x40mm (evitar la formación de burbujas)
5. Incubar en la solución de proteasa a 37°C durante 10 minutos
6. Lavar en PBS 1x a TA durante 5 minutos
7. Valorar al microscopio la digestión del citoplasma. Si las células no están suficientemente digeridas volver a incubar en la solución de proteasa
8. Fijar en solución de formaldehído al 1% a TA durante 5 minutos
9. Deshidratar los portaobjetos en una serie creciente de etanoles al 70%, 85% y 100% a TA durante un minuto en cada uno
10. Dejar secar a TA para que se evapore el etanol (el etanol inhibe la reacción de hibridación)

Hibridación

Nota: Todo el proceso se realizará en oscuridad ya que la sonda está marcada con fluorocromos sensibles a la luz

11. Retirar la sonda del almacenamiento a -20° y dejar que se atempere
12. Mezclar con ayuda del vórtex y centrifugar brevemente (1-3 segundos)
13. Colocar $3\mu\text{L}$ de sonda UroVysion® sobre el área a hibridar
14. Colocar un cubreobjetos de 24×24 mm y presionar ligeramente para que la sonda se extienda homogéneamente bajo el cubreobjetos
15. Sellar con parafilm

Desnaturalización-Hibridación

16. Encender la placa de hibridación HYbrite (Abbot Molecular)
17. Humedecer con agua papel de filtro y colocarla en las ranuras situadas en los laterales de la superficie de calentamiento (es importante mantener la humedad durante el proceso de hibridación para evitar la evaporación de la sonda)
18. Seleccionar el programa a utilizar:
 - *Meelting*: 73°C , 2 min
 - *Hybridization*: 39°C , 30h
19. Colocar el portaobjetos en el hibridador
20. Esperar que el proceso de desnaturalización y posterior hibridación tenga lugar (desde 4 horas a toda la noche)

Lavados posthibridación (con formamida)

21. Retirar el parafilm de los cubreobjetos uno a uno y colocarlos en el primer baño de formadida 50%
22. Realizar tres lavados en solución de formamida al 50% a 45°C durante 10 minutos. Si el cubreobjetos no ha saltado en el primer coplin de formamida al 50%, hacerlo saltar antes de pasar al segundo (cuidado de no rayar la extensión celular)
23. Realizar un lavado con solución de 2xSSC a 45°C durante 10 minutos
24. Realizar un lavado con solución de 2xSSC/0,1% NP-40 a 45°C durante 5 minutos

Contratinción

25. Colocar 7 μ L de DAPI II en el área marcada
26. Cubrir con un cubreobjetos de 24x24 mm
27. Mantener las preparaciones a -20°C en una caja oscura hasta la observación al microscopio de fluorescencia (mínimo de 20-30 minutos)

3.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE FISH

3.3.1. Análisis de la muestra. Valoración en el microscopio de fluorescencia

Las preparaciones se examinan en un microscopio óptico con dispositivo de epifluorescencia OLYMPUS BX51 (Olympus) utilizando los objetivos de x10 y x100. Para obtener las imágenes de FISH se ha utilizado el sistema de análisis de imágenes digital CytoVision (Applied Imaging). Las señales de la sonda de UroVysion® y la tinción de contraste con DAPI II deben observarse con los siguientes filtros:

- Filtro sencillo DAPI
- Filtro sencillo rojo (cromosoma 3)
- Filtro sencillo verde (cromosoma 7)
- Filtro sencillo aguamarina (cromosoma 17)
- Filtro sencillo amarillo (locus 9p21)

Se analizan 100 células epiteliales consecutivas (análisis integral) apuntando la morfología (sospechoso/no sospechoso) de las células y el criterio de positividad (**Figura 12** y **Figura 13**). Idealmente, deben conseguirse 25 células morfológicamente sospechosas. Si no se consigue alcanzar el número de células morfológicamente sospechosas el análisis se considera igualmente válido.

Se consideran morfológicamente sospechosas aquellas células que presentan un tamaño nuclear aumentado, irregular, pleomórfico y con un patrón de cromatina irregular con zonas más claras y otras más granulares (DAPI parcheado) (**Figura 14**).

3.3.2. Criterio de valoración y criterio de positividad

El criterio de positividad utilizado en este estudio se basa en los criterios establecidos por Sokolova *et al.* [2000] con modificaciones (valoración de 100 células consecutivas en lugar de 25 células morfológicamente seleccionadas). Se considera un caso como positivo si cumple alguno de los siguientes subcriterios:

- **P1:** Cinco o más células con polisomía (ganancia de dos o más cromosomas en un mismo núcleo)
- **P2:** Más de 10 núcleos con ganancia de un único cromosoma (siempre el mismo)
- **P3:** Más de 50% de núcleos con pérdidas de uno o dos alelos de 9p21

Independientemente de cumplir alguno de estos criterios y determinar una muestra como positiva, siempre se valoran 100 células uroteliales para obtener información del número total de células alteradas y de las alteraciones presentes y tratar de correlacionarlo con la clínica.

PROYECTO UROVISION							N° CITOLOGIA:						
	RED	GREEN	AQUA	GOLD	Morfo	Result.		RED	GREEN	AQUA	GOLD	Morfo	Result.
	3	7	17	9p21			3	7	17	9p21			
1	3	4	2	4	S	P1	51	2	2	2	2	S	N
2	2	2	2	1	S	P3	52	2	2	2	2	S	N
3	2	2	2	2	S	N	53	2	2	2	2	S	N
4	2	2	2	2	NS	N	54	3	4	2	4	NS	P1
5	2	2	2	2	NS	N	55	2	2	2	2	NS	N
6	2	2	2	2	NS	N	56	2	2	2	2	NS	N
7	2	2	2	1	NS	P3	57	2	2	2	2	NS	N
8	2	2	2	2	NS	N	58	2	2	2	2	NS	N
9	2	2	2	2	S	N	59	2	2	2	2	S	N
10	3	2	2	2	S	P2	60	2	2	2	2	S	N
11	2	2	2	2	S	N	61	2	2	2	2	S	N
12	2	2	2	2	S	N	62	2	2	2	2	S	N
13	2	2	2	0	S	P3	63	2	2	2	2	S	P3
14	2	2	2	2	NS	N	64	2	2	2	2	NS	N
15	2	2	2	2	NS	N	65	2	2	2	2	NS	N
16	2	2	2	2	NS	N	66	2	2	2	2	NS	N
17	2	2	2	2	NS	N	67	4	2	2	2	NS	P2
18	4	2	2	2	NS	P2	68	2	2	2	2	NS	N
19	2	2	2	2	S	N	69	2	2	2	2	S	N
20	2	2	2	2	S	N	70	2	2	2	2	S	N
21	5	4	3	4	NS	P1	71	2	2	2	2	NS	N
22	2	2	2	2	S	N	72	2	2	2	2	S	N
23	2	2	2	2	S	N	73	2	2	2	2	S	N
24	2	2	2	2	S	N	74	5	4	3	4	S	P1
25	2	2	2	2	NS	N	75	2	2	2	2	NS	N
26	2	2	2	2	NS	N	76	2	2	2	2	NS	N
27	3	4	3	3	NS	P1	77	2	2	2	2	NS	N
28	2	2	2	2	NS	N	78	2	2	2	2	NS	N
29	2	2	2	2	NS	N	79	2	2	2	2	NS	N
30	2	2	2	2	S	N	80	3	4	3	3	S	P1
31	2	2	2	2	S	N	81	2	2	2	2	S	N
32	2	2	2	2	S	N	82	2	2	2	2	S	N
33	2	2	2	2	S	N	83	2	2	2	2	S	N
34	2	2	2	2	S	N	84	2	2	2	2	S	N
35	2	2	2	2	NS	N	85	2	2	2	2	NS	N
36	2	2	2	2	NS	N	86	2	2	2	2	NS	N
37	2	2	2	0	NS	P3	87	4	2	2	2	NS	P2
38	2	2	2	2	NS	N	88	2	2	2	2	NS	N
39	2	2	2	2	NS	N	89	2	2	2	2	NS	N
40	2	2	2	2	S	N	90	2	2	2	2	S	P3
41	2	2	2	2	S	N	91	2	2	2	2	S	N
42	2	2	2	2	S	N	92	2	2	2	2	S	N
43	2	2	2	2	S	N	93	2	2	2	2	S	N
44	2	2	2	2	S	N	94	2	2	2	2	S	N
45	2	2	2	2	NS	N	95	2	2	2	2	NS	N
46	2	2	2	2	NS	N	96	2	2	2	2	NS	N
47	2	2	2	2	NS	N	97	2	2	2	2	NS	N
48	2	2	2	2	NS	N	98	2	2	2	2	NS	N
49	2	2	2	2	NS	N	99	2	2	2	2	NS	N
50	2	2	2	2	S	N	100	2	2	2	2	S	N

RESULTADO: POSITIVO SEGÚN CRITERIO P1 (más de cinco células con polisomía)

Figura 12: Plantilla utilizada en la valoración de las muestras (con un ejemplo hipotético)

Abreviaturas: S: Morfología sospechosa. NS: Morfología no sospechosa. P: Positivo. N: Negativo

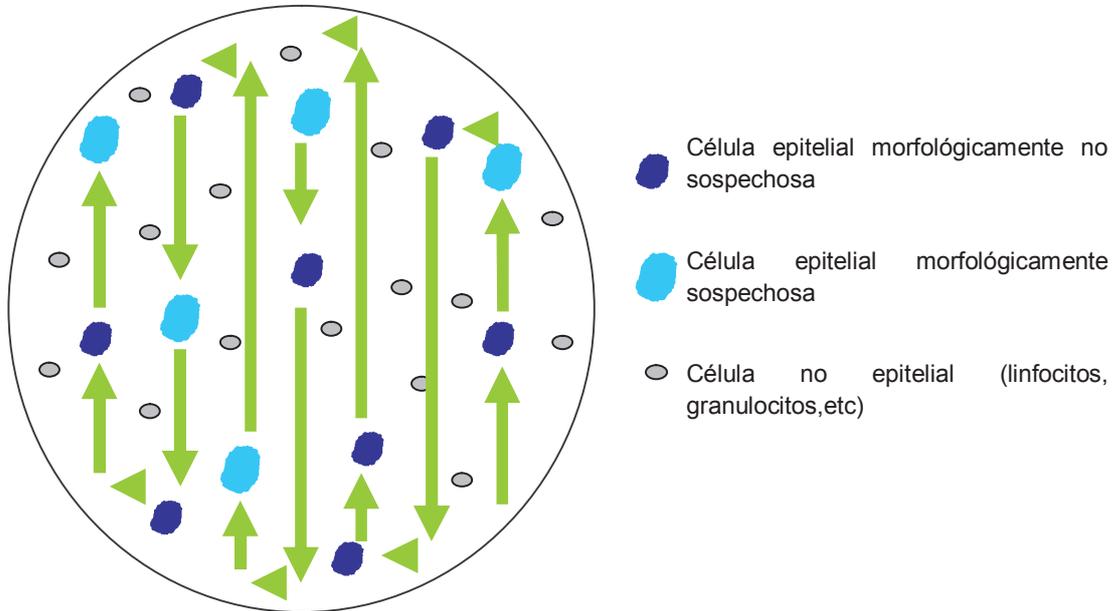


Figura 13: Esquema de rastreo. Valoración de las células epiteliales.

Célula morfológicamente normal



Células solapadas

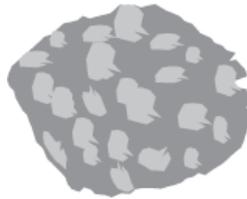


Células morfológicamente sospechosas

Tamaño grande



Tinción irregular



Grupos de células

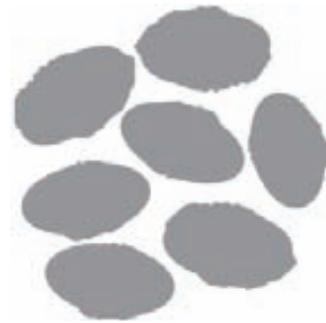


Figura 14: Representación de núcleos con morfología normal o sospechosa (Abbot Molecular).

3.4. ESTADÍSTICA

3.4.1. Definición parámetros estadísticos de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP

Para poder comparar las diferentes técnicas es necesario obtener los parámetros estadísticos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Se definen los parámetros estadísticos usados como:

- Sensibilidad: es la probabilidad de diagnosticar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VerdaderoPositivo}(VP)}{VP + \text{FalsoNegativo}(FN)}$$

- Especificidad: es la probabilidad de diagnosticar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VerdaderoNegativo}(VN)}{VN + \text{FalsoPositivo}(FP)}$$

- Valor predictivo positivo (VPP): es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo con la prueba realizada.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- Valor predictivo negativo (VPN): es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano.

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

Se definen como VP, los resultados positivos proporcionados por el *gold standard* que es la prueba o criterio para definir inequívocamente una enfermedad. En el caso de esta tesis, el *gold standard* es la biopsia, de modo, que se considera VP cuando existe un tumor histológicamente confirmado. Se considera VN cuando no existe tumor histológicamente confirmado (análisis de biopsia no tumoral o por ausencia de biopsia).

3.4.2. Análisis estadístico a distintos momentos del estudio

Se considera cada cistoscopia y sus correspondientes análisis de citología y FISH (realizados en el mismo momento) como casos independientes.

Se realizan dos análisis estadísticos independientes ya que aunque se usa exactamente la misma población de estudio, el *gold standard* en cada uno de ellos (la biopsia) se considera en momentos diferentes.

3.4.2.1. Análisis estadístico en el momento de inclusión en el estudio

En este primer análisis se consideran como VP, aquellas lesiones tumorales detectadas en el momento de inclusión en el estudio, obtenidas mediante RTU. Únicamente, aquellos casos con cistoscopia y/o citología positiva son sometidos a una RTU. Los resultados de FISH no van a modificar las pautas de seguimiento, de modo

que un resultado de FISH positivo no va a conducir a una RTU si su correspondiente cistoscopia y citología son negativas, evitando la obtención de biopsia.

Este primer análisis estadístico permite determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la FISH, de la cistoscopia y de la citología usando como VP la presencia de tumor detectada en el seguimiento estándar de los pacientes (combinación de cistoscopia y citología).

3.4.2.2. Análisis estadístico dentro del primer año después de la inclusión en el estudio

En este segundo análisis se analizan todos los pacientes. Se usa como VP las lesiones neoplásicas histológicamente confirmadas en el período de un año tras la inclusión en el estudio. Se consideran como positivos aquellos que han presentado recidiva en el momento de inclusión en el estudio, o en estudios de seguimiento posteriores o tras la aparición de nueva sintomatología de recaída en el plazo de un año.

Este segundo análisis estadístico permite determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la FISH, de la cistoscopia y de la citología usando como VP la presencia de tumor detectada en el plazo de un año.

Considerando como VP los tumores detectados en el plazo de un año tras la inclusión en el estudio, se realiza cálculo la sensibilidad de las diferentes técnicas dependiendo del grado tumoral. También, se realiza un análisis de la combinación de técnicas de dos en dos.

El motivo de realizar dos análisis independientes es que van a aportar información complementaria. En el análisis post-RTU de forma indirecta se asume que las técnicas de referencia son la cistoscopia y la citología, y los resultados de FISH podrían estar sesgados (infravalorando el número de verdaderos positivos de FISH). En el análisis en el primer año tras la inclusión en el estudio, se elimina el sesgo que pudiera existir al considerar como técnicas de referencia la cistoscopia y la citología pero se introduce un nuevo factor, la capacidad predictiva de la FISH (resultados anticipatorios). La comparación de ambos análisis permitirá un estudio más objetivo.

3.4.3. Métodos estadísticos

El cálculo de los parámetros estadísticos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN se realiza mediante tablas de contingencia de 2x2 (**Figura 15**). Las diferencias en la sensibilidad y en la especificidad se calcularon utilizando el test de McNemar. Se consideran como significativos $P < 0.05$ (intervalo de confianza (IC) del 95%). Se calcula el intervalo de confianza (IC) usando el método exacto.

Se han utilizado en el análisis estadístico los programas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) y 12.0 CIA (*Confidence Interval Analysis*).

A)

Prueba			Goldstandard		Total	
			Negativo	Positivo		
Negativo	Recuento		3	4	7	VPN
	% dentro de Prueba		42,9%	57,1%	100,0%	Especificidad
	% dentro de Goldstandard		60,0%	80,0%	70,0%	
Positivo	Recuento		2	1	3	VPP
	% dentro de Prueba		66,7%	33,3%	100,0%	Sensibilidad
	% dentro de Goldstandard		40,0%	20,0%	30,0%	
Total	Recuento		5	5	10	
	% dentro de Prueba		50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Goldstandard		100,0%	100,0%	100,0%	

B)

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{1}{1 + 4} = \frac{1}{5} = 0.2$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{3}{3 + 2} = \frac{3}{5} = 0.6$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} = \frac{3}{3 + 4} = \frac{3}{7} = 0.42$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} = \frac{1}{1 + 2} = \frac{1}{3} = 0.33$$

Figura 15: A) Ejemplo hipotético de tabla de contingencia de 2x2 obtenida con el programa SPSS para el cálculo de los diferentes parámetros estadísticos. Valores presentados en porcentaje. B) Cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN según la definición según los datos del ejemplo A. Valores representados en tanto por uno

4. *RESULTADOS*

4.1. MUESTRAS ANALIZADAS

Se han realizado 248 análisis de seguimiento de 223 pacientes. Un total de 24 (9.7%) muestras no pudieron ser evaluadas por la técnica de FISH debido a la escasez de células analizables o por motivos técnicos y dos (0.8%) muestras no pudieron ser analizadas por citología, de modo que 26 (10.5%) de los análisis fueron excluidos del análisis estadístico. Se consideraron técnicamente adecuados un total de 222 de los 248 exámenes de seguimiento (89.5%) (**Figura 16**).

Los datos clínicobiológicos y los resultados de las técnicas de los 222 casos analizados se encuentran en el **anexo 1**.

4.2. ANÁLISIS CON DIFERENTES TÉCNICAS

Se analizan los resultados obtenidos mediante FISH, cistoscopia y citología.

4.2.1. FISH

El criterio para considerar un resultado de FISH como óptimo ha sido valorar, al menos, 100 células epiteliales (llamado análisis integral). Además, para obtener mayor información, se ha registrado la morfología nuclear (no sospechosa o sospechosa). Un total de 92 (41.4%) muestras de las 222 analizadas han presentado menos de 25 núcleos morfológicamente sospechosos. Estos casos han sido incluidos igualmente en el análisis estadístico.

El análisis de FISH fue positivo para 41 de los 222 casos (18.5%) y negativo para 181 (81.5%). De los casos positivos, cuarenta presentaron polisomía de dos o más cromosomas (la mediana de células alteradas fue 6 (rango: 5–70)) y un caso presentó, únicamente, aneuploidía del cromosoma 3 en 12 células. Ningún caso presentó la pérdida de 9p21 como única anomalía.

Cabe destacar que seis de los 92 casos en los que no se han registrado 25 células sospechosas han resultado ser positivos al realizar el análisis integral. En estos casos, un patrón cromosómico alterado no estaba asociado a un patrón morfológico aberrante. En la **Figura 17** se muestran imágenes de células con diferentes alteraciones cromosómicas y diferentes patrones morfológicos.

4.2.2. Cistoscopia y citología

Los resultados de la cistoscopia fueron considerados positivos en 43 de los 222 casos (19.4%) y negativos en 179 (80.6%). La citología fue positiva en 5 casos (2.3%) (**Figura 16**).

Considerando el seguimiento estándar de los pacientes (combinación de los resultados de la cistoscopia y/o la citología), 46 casos fueron positivos (41 por cistoscopia, 3 por citología y 2 por ambos análisis) y todos fueron sometidos a una RTU.

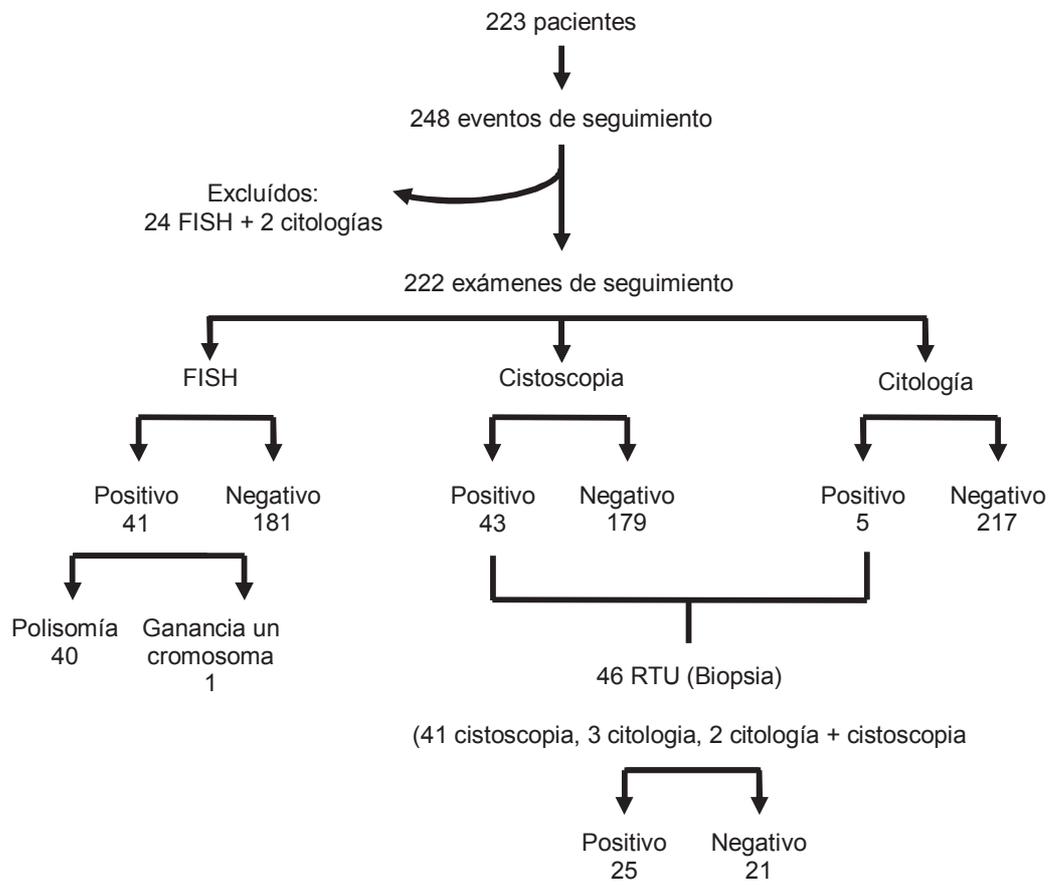


Figura 16: Resumen de los resultados obtenidos en la cistoscopia, en la citología, en la FISH y en la anatomía patológica de la biopsia tras la RTU.

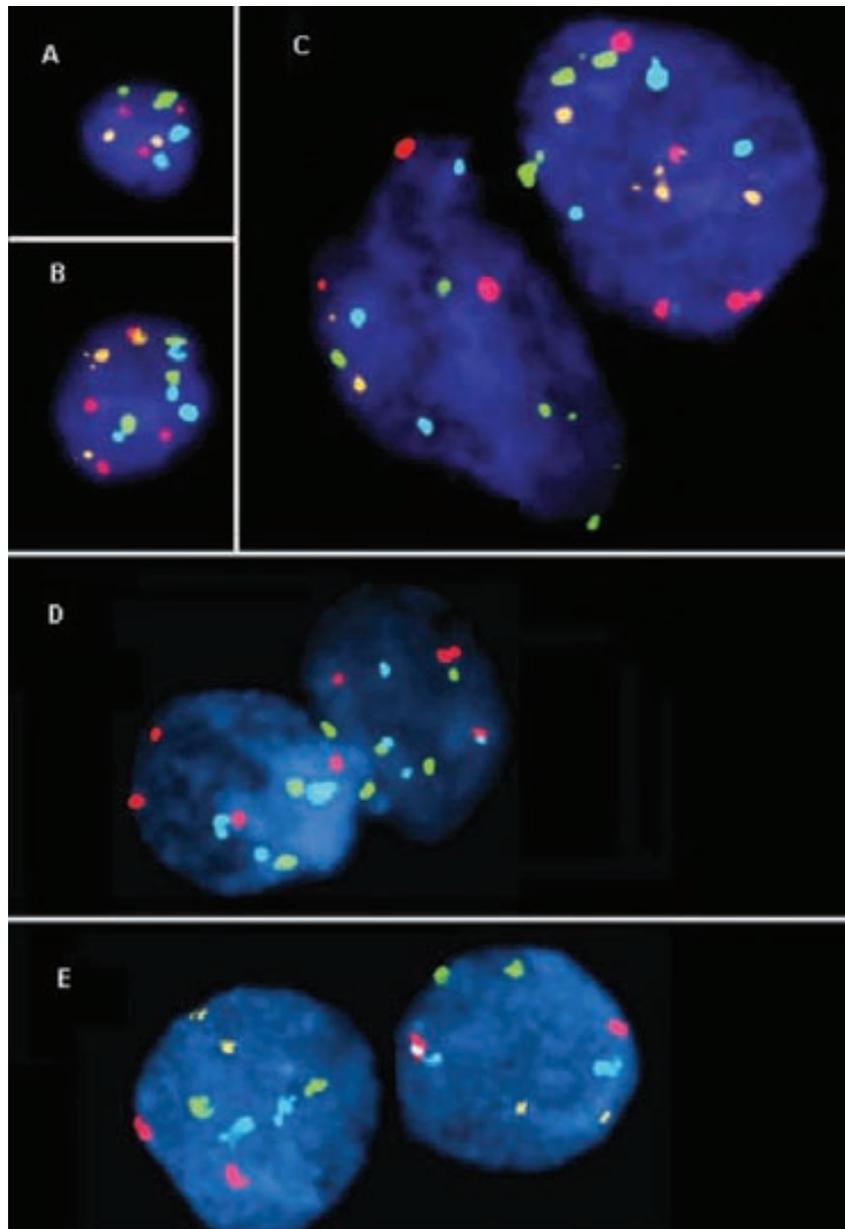


Figura 17: Imágenes de hibridación *in situ* fluorescente de células uroteliales (x1000) A) Célula morfológicamente normal y genéticamente anormal con 3 copias del cromosoma 3 (señales rojas). B) Célula que muestra un patrón cromosómico alterado con aneuploidía de los cromosomas 3, 7, 9 y 17. C) Células morfológica y genéticamente alteradas con aneuploidía de los cromosomas 3, 7, 9 y 17. D) Células morfológica y genéticamente alteradas con aneuploidía de los cromosomas 3, 7 y 17 y delección homocigota del locus 9p21 (no presentan señales amarillas). E) Células morfológicamente y genéticamente normales con 2 cromosomas 3 (señales rojas), 2 cromosomas 7 (señales verdes), 2 cromosomas 17 (señales aguamarina) y 2 loci 9p21 (señales amarillas)

4.3. DETECCIÓN DE RECIDIVAS

El análisis de las diferentes técnicas va a permitir la detección de recidivas. A nivel estadístico se consideran recidivas, por un lado, aquellos tumores histológicamente confirmados en el momento de inclusión en el estudio, y por otro lado, tumores histológicamente confirmados detectados en el plazo de un año tras la inclusión en el estudio.

4.3.1. Detección de recidivas en el momento de inclusión en el estudio

Los 46 pacientes que presentaron cistoscopia y/o citología positiva fueron sometidos a RTU, de estos (**Figura 16**):

- en 21 no pudo demostrarse la presencia histológica del tumor (**Anexo 1**):
 - en cinco las lesiones fueron electrocauterizadas durante la resección debido a su escaso tamaño de manera que no pudo obtenerse biopsia
 - en nueve no se encontró lesión sospechosa durante la RTU
 - en siete la histología no reveló malignidad en las biopsias analizadas
- en 25 (VP) se identificaron lesiones malignas que fueron histológicamente confirmadas (**Tabla 13 y Anexo 1**) en:
 - dos NUBPM
 - siete G1 (bajo grado) Ta
 - un G1 (bajo grado) Tx
 - nueve G2 (alto grado) Ta
 - un G2 (alto grado) T1
 - dos G3 (alto grado) Ta

RESULTADOS

- dos G3 (alto grado) T1
- un CIS

Tabla 13: Características histológicas de las recidivas histológicamente confirmadas tras la RTU y los resultados proporcionados por las diferentes técnicas analizadas

Caso	Cistoscopia	Citología	FISH			Histología	Tamaño
			Resultado	Cr. Afectados	% células alteradas		
175	Positivo	Positivo	P1	3, 7 y 17	70	G2 (alto grado) Ta	>3cm
217	Positivo	Positivo	P1	3, 7 y 17	8	G3 (alto grado) Ta	>3cm
113	Positivo	Negativo	Negativo	-	-	NUBPM	<1cm
210	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	NUBPM	1-3cm
164	Positivo	Negativo	Negativo	-	-	G1 (bajo grado) Ta	1-3cm
86	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	6	G1 (bajo grado) Ta	<1cm
87	Positivo	Negativo	P1	3 y 7	5	G1 (bajo grado) Ta	1-3cm
90	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G1 (bajo grado) Ta	1-3cm
135	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	6	G1 (bajo grado) Ta	<1cm
138	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G1 (bajo grado) Ta	1-3cm
144	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G1 (bajo grado)Ta	Desconocido
181	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G1 (bajo grado) Ta	Desconocido
182	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	16	G1 (bajo grado) Tx	<1cm
133	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G2 (alto grado) T1	1-3cm
38	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	6	G2 (alto grado) Ta	1-3cm
42	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17		G2 (alto grado) Ta	1-3cm
58	Positivo	Negativo	P2	3	12	G2 (alto grado) Ta	>3cm
83	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	9	G2 (alto grado) Ta	<1cm
156	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G2 (alto grado) Ta	<1cm
162	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G2 (alto grado) Ta	1-3cm
219	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G2 (alto grado) Ta	1-3cm
146	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	6	G3 (alto grado) T1	1-3cm
174	Positivo	Negativo	P1	3, 7 y 17	6	G3 (alto grado) Ta	<1cm
241	Negativo	Positivo	P1	3, 7 y 17	5	G2 (alto grado) Ta	1-3cm
134	Negativo	Positivo	P1	3, 7 y 17	8	CIS	Desconocido

Abreviaturas: CIS: Carcinoma *in situ*; Cr: Cromosoma; NUBPM: Neoplasia urotelial de bajo potencial maligno. P1: Positivo por la presencia de polisomía de dos o más cromosomas; P2: Positivo por ganancia de un único cromosoma.

4.3.2. Detección de recidivas dentro del plazo de un año después de la inclusión en el estudio

De los 222 exámenes de seguimiento, si se eliminan los 25 VP tras la RTU quedan 197 exámenes con cistoscopia, citología, RTU y/o histología negativos. De éstos, cuatro pacientes presentaron recidivas de la enfermedad en el periodo máximo de un año después de la inclusión en el estudio (media 5.6 meses) (**Tabla 14**).

De estos cuatro pacientes presentaron recidiva (**Anexo 1**):

- Uno tras la aparición de sintomatología: un CIS (nº 20) a los 2.3 meses
- Tres en el siguiente seguimiento rutinario:
 - dos G1 (bajo grado) Ta (nº 25 y 180) a los 11.2 y 2.80 meses, respectivamente
 - un tumor músculo infiltrante (caso nº 10) a los 6.2 meses

En el caso del tumor músculo infiltrante (nº10), el tumor se electrocauterizó impidiendo la obtención de biopsia. Este caso no se tiene en cuenta para el análisis estadístico ya que no existe biopsia confirmatoria del tumor.

RESULTADOS

Tabla 14: Características de las recurrencias histológicamente confirmadas durante el seguimiento y los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas

Caso	Cistoscopia	Citología	FISH			Histología	Tamaño
			Resultado	Cr. Afectados	% células alteradas		
25	Negativo	Negativo	P1	3, 7 y 17	9	G1 (bajo grado) Ta	<1cm
180	Negativo	Negativo	P1	3, 7 y 17	5	G1 (bajo grado) Ta	<1cm
20	Negativo	Negativo	P1	3, 7 y 17	10	CIS	<1cm

Abreviaturas: CIS: Carcinoma *in situ*; Cr: Cromosoma; P1: Positivo por la presencia de polisomía de dos o más cromosomas.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

4.4.1. Análisis estadístico en el momento de inclusión en el estudio

En este análisis se incluyen los 222 exámenes de seguimiento. La cistoscopia permitió identificar 23 de las 25 lesiones malignas (**Tabla 13**). Los dos casos en los que no se pudo detectar la presencia de tumor se corresponden con un CIS (nº 134) y un G2 (alto grado) Ta (nº241) que sí fueron detectados por citología y FISH. Mediante la técnica de FISH se detectaron 23 de estas 25 lesiones tumorales. No pudo hacerlo en 2 casos: una NUBPM (nº 113) y un tumor G1 (bajo grado) Ta (nº 164) (**Anexo 1**).

A partir de estos resultados se calcula la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de cada una de las técnicas considerando la biopsia obtenida tras la RTU como *gold standard*. La **Tabla 15** muestra los datos obtenidos directamente con el programa SPSS.

Tabla 15: Tablas de 2x2 obtenidas mediante el programa SPSS para el cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPP (en el momento de inclusión en el estudio) para cada una de las técnicas

			Recurrencias		Total
			Negativo	Positivo	
Cistoscopia	Negativo	Recuento	177	2	179
		% dentro de Cistoscopia	98,9%*	1,1%	100,0%
		% dentro de Recurrencias	89,8%+	8,0%	80,6%
	Positivo	Recuento	20	23	43
		% dentro de Cistoscopia	46,5%	53,5%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencias	10,2%	92,0%#	19,4%
Total	Recuento	197	25	222	
	% dentro de Cistoscopia	88,7%	11,3%	100,0%	
	% dentro de Recurrencias	100,0%	100,0%	100,0%	

			Recurrencias		Total
			Negativo	Positivo	
FISH	Negativo	Recuento	179	2	181
		% dentro de FISH	98,9%*	1,1%	100,0%
		% dentro de Recurrencias	90,9%+	8,0%	81,5%
	Positivo	Recuento	18	23	41
		% dentro de FISH	43,9%	56,1%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencias	9,1%	92,0%#	18,5%
Total	Recuento	197	25	222	
	% dentro de FISH	88,7%	11,3%	100,0%	
	% dentro de Recurrencias	100,0%	100,0%	100,0%	

			Recurrencias		Total
			Negativo	Positivo	
Citología	Negativo	Recuento	196	21	217
		% dentro de Citología	90,3%*	9,7%	100,0%
		% dentro de Recurrencias	99,5%+	84,0%	97,7%
	Positivo	Recuento	1	4	5
		% dentro de Citología	20,0%	80,0%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencias	0,5%	16,0%#	2,3%
Total	Recuento	197	25	222	
	% dentro de Citología	88,7%	11,3%	100,0%	
	% dentro de Recurrencias	100,0%	100,0%	100,0%	

En negrita se muestran los parámetros estadísticos estudiados: *VPN; +especificidad; ¥ VPP; # sensibilidad.

RESULTADOS

El resumen de los resultados se muestra en la **Tabla 16**. La cistoscopia muestra una sensibilidad del 92%, la FISH del 92% y la citología del 16%. La cistoscopia muestra una especificidad del 89.8%, la FISH del 90.9% y la citología del 99.5%.

Tabla 16: Resumen de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (en el momento de inclusión en el estudio) de la cistoscopia, FISH y citología

	Cistoscopia			FISH			Citología		
	N	Valor (%)	IC	N	Valor (%)	IC	N	Valor (%)	IC
Sensibilidad	23/25	92.0	74.0-99.0	23/25	92.0	74.0-99.0	4/25	16.0	0.4-36.1
Especificidad	177/197	89.8	84.8-93.7	179/197	90.9	85.9-94.5	196/197	99.5	97.2-100
VPP	23/43	53.5	37.7-68.8	23/41	56.1	39.7-71.5	4/5	80.0	28.4-99.5
VPN	177/179	98.9	96.0-99.9	179/181	98.9	96.1-99.9	196/217	90.3	85.6-93.9

Abreviaturas: IC: Intervalo de confianza; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor predictivo negativo

En la **Tabla 17** se muestran los valores P calculados mediante el test de McNemar con un 95% de IC. La sensibilidad y la especificidad de la cistoscopia y la FISH no presentan diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, la citología presenta una sensibilidad estadísticamente menor que la cistoscopia y la FISH ($P=0.000$ y $P=0.000$, respectivamente); y una especificidad estadísticamente mayor que la cistoscopia y la FISH ($P=0.000$ y $P=0.000$, respectivamente).

Tabla 17: Valores P de la comparación de la sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas obtenidas en el momento de inclusión en el estudio

		Valor P Sensibilidad	Valor P Especificidad
Cistoscopia	FISH	1.000 (NS)	0.845 (NS)
Cistoscopia	Citología	0.000 (S)	0.000 (S)
FISH	Citología	0.000 (S)	0.000 (S)

Abreviaturas: NS: No significativo; S: significativo

4.4.2. Análisis estadístico en el primer año después de la inclusión en el estudio

Se realiza un segundo análisis con los 222 casos considerando como *gold standard* (VP) un total de 28 casos: 25 que provienen del análisis en el momento de inclusión en el estudio (**Tabla 13**) y tres casos que han presentado recidiva (con confirmación histológica) en el seguimiento (**Tabla 14**).

Los cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para cada una de las técnicas obtenidos directamente con el programa SPSS (tablas de 2x2) se muestran en la **Tabla 18**.

RESULTADOS

Tabla 18: Tablas de 2x2 obtenidas mediante el programa SPSS para el cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPP (tras el seguimiento) para cada una de las técnicas

			Recurrencia con histología (seguimiento un año)		Total
			Negativo	Positivo	
Cistoscopia	Negativo	Recuento	174	5	179
		% dentro de Cistoscopia	97,2%*	2,8%	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	89,7%+	17,9%	80,6%
	Positivo	Recuento	20	23	43
		% dentro de Cistoscopia	46,5%	53,5%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	10,3%	82,1%#	19,4%
Total	Recuento	194	28	222	
	% dentro de Cistoscopia	87,4%	12,6%	100,0%	
	% dentro de Recurrencia con histología	100,0%	100,0%	100,0%	

			Recurrencia con histología (seguimiento un año)		Total
			Negativo	Positivo	
FISH	Negativo	Recuento	179	2	181
		% dentro de FISH	98,9%*	1,1%	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	92,3%+	7,1%	81,5%
	Positivo	Recuento	15	26	41
		% dentro de FISH	36,6%	63,4%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	7,7%	92,9%#	18,5%
Total	Recuento	194	28	222	
	% dentro de FISH	87,4%	12,6%	100,0%	
	% dentro de Recurrencia con histología	100,0%	100,0%	100,0%	

			Recurrencia con histología (seguimiento un año)		Total
			Negativo	Positivo	
Citología	Negativo	Recuento	193	24	217
		% dentro de Citología	88,9%*	11,1%	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	99,5%+	85,7%	97,7%
	Positivo	Recuento	1	4	5
		% dentro de Citología	20,0%	80,0%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	0,5%	14,3%#	2,3%
Total	Recuento	194	28	222	
	% dentro de Citología	87,4%	12,6%	100,0%	
	% dentro de Recurrencia con histología	100,0%	100,0%	100,0%	

En negrita se muestran los parámetros estadísticos estudiados: *VPN; +especificidad; ¥ VPP; # sensibilidad.

El resumen de los resultados se muestra en la **Tabla 19**

Tabla 19: Resumen de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (obtenidos tras el seguimiento) de la cistoscopia, FISH y citología.

	Cistoscopia			FISH			Citología		
	N	Valor (%)	IC	N	Valor (%)	IC	N	Valor (%)	IC
Sensibilidad	23/28	82.1	63.1-93.9	26/28	92.9	76.5-99.1	4/28	14.3	0.4-32.7
Especificidad	174/194	89.7	84.5-93.6	179/194	92.3	87.6-95.6	193/194	99.5	97.2-100
VPP	23/43	53.5	37.7-68.8	26/41	63.4	46.9-77.9	4/5	80.0	28.4-99.5
VPN	174/179	97.2	93.6-99.1	179/181	98.9	96.1-99.9	193/217	88.9	84.8-93.1

Abreviaturas: IC: Intervalo de confianza. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor predictivo negativo.

En la **Tabla 19** se observa que la sensibilidad de la cistoscopia y la FISH presentan valores muy elevados, de 82.1% y 92.9%, respectivamente. La sensibilidad de la citología es menor (14.3%). La especificidad en todas las técnicas es elevada: un 89.7% para la cistoscopia, un 92.3% para la FISH y un 99.5% para la citología.

Respecto al VPN, se observa que con las tres técnicas es muy elevado siendo de un 89.7%, 92.3% y 99.5% para la cistoscopia, la FISH y la citología, respectivamente. Esto indica que en todas las técnicas la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano es muy elevada.

El VPP de la cistoscopia y la FISH (53.5% y 63.4%, respectivamente) son menores que el VPP de la citología (80.0%), indicando que la citología presenta una capacidad

mayor de detectar como enfermos a los pacientes que realmente presentan recidiva tumoral.

Tabla 20: Valores P de la comparación de la sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas (seguimiento un año).

		Valor P Sensibilidad	Valor P Especificidad
Cistoscopia	FISH	0.453 (NS)	0.405 (NS)
Cistoscopia	Citología	0.000 (S)	0.000 (S)
FISH	Citología	0.000 (S)	0.001 (S)

Abreviaturas: NS: No significativo; S: significativo

En la **Tabla 20** se observan los valores P calculados mediante el test de McNemar. No se encuentran diferencias significativas entre los valores de sensibilidad y especificidad de la cistoscopia y la FISH. La sensibilidad de la citología es significativamente menor que la observada en la FISH y la cistoscopia ($P=0.000$ y $P=0.000$, respectivamente). La especificidad (99.5%) es significativamente mayor que la observada en la FISH y la cistoscopia ($P=0.001$ y $P=0.000$, respectivamente).

4.4.3. Comparación análisis en el momento de inclusión en el estudio y análisis en el primer año

Cuando se comparan los resultados obtenidos en los dos análisis para cada una de las técnicas, los valores son similares. La sensibilidad de la cistoscopia se reduce del 92% al 82.1% cuando se incluye el seguimiento en los cálculos realizados, pero las

diferencias no son significativas. El incremento de la sensibilidad del FISH del 92.0% al 92.9% tampoco presenta diferencias significativas.

Dado que no existen diferencias significativas entre el resultado de FISH en el análisis en el momento de inclusión en el estudio y en el realizado tras el seguimiento de un año, se asume que el posible papel anticipatorio de la FISH en el plazo de un año no ejerce un papel estadísticamente demasiado importante, sin embargo puede tener un papel clínico irrelevante ya que una detección precoz mejora el pronóstico del paciente.

El resto de estadísticas realizadas se realizan considerando como VP, los casos positivos detectados tras el seguimiento de un año.

4.4.4. Análisis según la histología de la recidiva

De las 28 recidivas se analiza la sensibilidad de las diferentes técnicas según el grado y estadio tumoral (**Tabla 21**). Aunque el número de recidivas es pequeño para poder extraer conclusiones estadísticas, parece que los resultados son similares entre la cistoscopia y el FISH en la detección de tumores según las características histológicas, con la excepción del CIS. Mientras que la FISH pudo detectar correctamente los dos CIS, la cistoscopia no pudo hacerlo en ninguno de los dos casos. En el caso de la citología, la sensibilidad varía en la capacidad de detección según el grado tumoral (no pudo detectar ningún tumor de bajo grado y pudo hacerlo en el 26.7% de los tumores de alto grado).

RESULTADOS

Tabla 21: Sensibilidad de los métodos de seguimiento según el estadio y grado tumoral

	Histología	N	Cistoscopia	Citología	FISH
Bajo grado	G1 (bajo grado) Ta	10	8	0	9
	G1 (bajo grado) Tx	1	1	0	1
	NUBPM	2	2	0	1
	Total	13 (46.4%)	11 (84.6%)	0 (0%)	11(84.6%)
Alto grado	CIS	2	0	1	2
	G2 (alto grado) T1	1	1	0	1
	G2 (alto grado) Ta	9	8	2	9
	G3 (alto grado) T1	1	1	0	1
	G3 (alto grado) Ta	2	2	1	2
	Total	15 (53.6%)	12 (80.0%)	4 (26.7%)	15 (100%)
Total		28	23 (82.1%)	4 (14.3%)	26 (92.9%)

4.4.5. Análisis estadístico de la combinación de técnicas

Con el objetivo de establecer el mejor algoritmo de seguimiento de pacientes con CCUNMI, se combinan diferentes técnicas y se calculan los valores de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP. Los resultados se muestran en la **Tabla 22** y el resumen en la **Tabla 23**.

Tabla 22: Tablas de 2x2 obtenidas mediante el programa SPSS para el cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPP (tras el seguimiento) para la combinación de las técnicas

			Recurrencia con histología (seguimiento)		Total
			Negativo	Positivo	
Cistoscopia + Citología	Negativo	Recuento	173	3	176
		% dentro de cistoscopia + citología	98,3%*	1,7%	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	89,2%+	10,7%	79,3%
	Positivo	Recuento	21	25	46
		% dentro de cistoscopia + citología	45,7%	54,3%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	10,8%	89,3%#	20,7%
Total	Recuento	194	28	222	
	% dentro de cistoscopia + citología	87,4%	12,6%	100,0%	
	% dentro de Recurrencia con histología	100,0%	100,0%	100,0%	

			Recurrencia con histología (seguimiento)		Total
			Negativo	Positivo	
Cistoscopia + FISH	Negativo	Recuento	165	0	165
		% dentro de Cistoscopia + FISH	100,0%*	0,0%	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	85,1%+	0,0%	74,3%
	Positivo	Recuento	29	28	57
		% dentro de Cistoscopia + FISH	50,9%	49,1%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	14,9%	100,0%#	25,7%
Total	Recuento	194	28	222	
	% dentro de Cistoscopia + FISH	87,4%	12,6%	100,0%	
	% dentro de Recurrencia con histología	100,0%	100,0%	100,0%	

			Recurrencia con histología (seguimiento)		Total
			Negativo	Positivo	
FISH + Citología	Negativo	Recuento	178	2	180
		% dentro de FISH + Citología	98,9%*	1,1%	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	91,8%+	7,1%	81,1%
	Positivo	Recuento	16	26	42
		% dentro de FISH + Citología	38,1%	61,9%¥	100,0%
		% dentro de Recurrencia con histología	8,2%	92,9%#	18,9%
Total	Recuento	194	28	222	
	% dentro de FISH + Citología	87,4%	12,6%	100,0%	
	% dentro de Recurrencia con histología	100,0%	100,0%	100,0%	

En negrita se muestran los parámetros estadísticos estudiados: *VPN; +especificidad; ¥ VPP; # sensibilidad

RESULTADOS

Tabla 23: Resumen de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (obtenidos tras el seguimiento) de la combinación de técnicas

	Cistoscopia + Citología			Cistoscopia + FISH			Citología + FISH		
	N	Valor (%)	IC	N	Valor (%)	IC	N	Valor (%)	IC
Sensibilidad	25/28	89.3	71.8-97.7	28/28	100	87.7-100	26/28	92.9	76.5-99.1
Especificidad	173/194	89.2	83.9-93.2	165/194	85.1	79.2-89.8	178/194	91.8	87.0-95.2
VPP	25/46	54.3	39.0-69.1	28/57	49.1	35.6-62.7	26/42	61.9	45.6-76.4
VPN	173/176	98.3	95.1-99.6	165/165	100	97.8-100	178/180	98.9	96.0-99.9

Abreviaturas: IC: Intervalo de confianza. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor predictivo negativo

En la **Tabla 23** se muestra el resumen de los datos. La combinación de la cistoscopia y la citología presentan una sensibilidad del 89.3%, la combinación de la técnica de FISH y la cistoscopia presenta una sensibilidad del 100%, y sensibilidad de la combinación de la citología y la FISH es del 92.9%. La combinación de la cistoscopia y la citología presentan una especificidad del 89.2%, la combinación de la técnica de FISH y la cistoscopia presenta una especificidad del 85.1%, y la de la combinación de la citología y la FISH es del 91.8%. La combinación de la cistoscopia y la citología presentan un VPP del 54.3%, la combinación de la técnica de FISH y la cistoscopia presenta un 49.1% de VPP, y la combinación de la citología y la FISH es del 61.9%. En el caso del VPN, es de un 98.3% para la combinación de la cistoscopia y la citología, de un 100% para la combinación de la cistoscopia y la FISH y de un 98.9% para la combinación de la citología y la FISH.

Se comparan los resultados de sensibilidad y especificidad de cada una de las combinaciones de técnicas realizadas, con la combinación de otras técnicas y con las técnicas aisladas (**Tabla 19**). En la **Tabla 24** se muestran los valores P de todas estas comparaciones.

La combinación de la cistoscopia y de la FISH presenta una mayor sensibilidad que cada una de las técnicas por separado (**Tabla 19**) y que la combinación de la cistoscopia y la citología, y que la FISH y la citología. Los valores P de estas comparaciones no pueden ser calculados por limitaciones estadísticas del test de McNemar. Sin embargo, la combinación de cistoscopia y FISH demostró una significativamente menor especificidad ($P=0.004$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.0001$ y $P=0.000$ para la cistoscopia, la FISH, la citología, la combinación de FISH y citología y la combinación de cistoscopia y citología, respectivamente).

La combinación de la FISH y citología no presenta diferencias significativas, ni en sensibilidad ni en especificidad, al compararla con la FISH, la cistoscopia, la combinación de FISH y cistoscopia o la combinación de cistoscopia y citología. Únicamente presenta diferencias significativas al compararla con la citología aislada, tanto en sensibilidad como en especificidad ($P=0.000$ y $P=0.000$, respectivamente). De la misma manera, la combinación de cistoscopia y citología no proporciona estadísticamente mayor sensibilidad que la cistoscopia y la FISH. En cambio, se observan diferencias significativas al compararla con la combinación de cistoscopia y FISH. También se observan diferencias estadísticamente significativas al compararla con la citología sola que presenta una menor sensibilidad a expensas de una mayor especificidad estadísticamente significativa ($P=0.000$).

Tabla 24: Valores P de las comparaciones realizadas (técnicas aisladas y combinación de técnicas).

		Valor P Sens.	Valor P Esp.
Cistoscopia	FISH	0.453 (NS)	0.405 (NS)
Cistoscopia	Citología	0.000 (S)	0.000 (S)
FISH	Citología	0.000 (S)	0.001 (S)
Cistoscopia + citología	FISH	1 (NS)	0.307 (NS)
Cistoscopia + citología	Cistoscopia	0.5 (NS)	1 (NS)
Cistoscopia + citología	Citología	0.000 (S)	0.000 (S)
Cistoscopia + citología	FISH + Cistoscopia	NC	0.021 (S)
FISH + Citología	Cistoscopia + citología	1 (NS)	0.405
FISH + Cistoscopia	FISH + Citología	NC	0.001 (S)
FISH + Cistoscopia	FISH	NC	0.000 (S)
FISH + Cistoscopia	Cistoscopia	NC	0.004 (S)
FISH + Cistoscopia	Citología	NC	0.000 (S)
FISH + Citología	FISH	1 (NS)	1 (NS)
FISH + Citología	Cistoscopia	0.453 (NS)	0.541 (NS)
FISH + Citología	Citología	0.000 (S)	0.000 (S)

Abreviaturas: NS: no significativo; S: significativo NC: no se puede calcular por limitaciones estadísticas

4.4.6. Correspondencia entre la cistoscopia, la FISH y la recidiva

La **Tabla 25** muestra la correspondencia entre la técnica de FISH, la cistoscopia, y las recurrencias confirmadas histológicamente mostrando que 186 de los 222 (83.8%) casos (positiva en 21 casos y negativa en 165) presentan correspondencia entre las tres técnicas.

Tabla 25: Concordancia entre la cistoscopia, la FISH y la recidiva de la enfermedad

N=222	Recidiva		No recidiva	
	FISH positivo	FISH negativo	FISH positivo	FISH negativo
Cistoscopia positiva (n=43)	21 (9.5%)§	2 (0.9%)¥	6 (2.7%)*+	14 (6.3%)+
Cistoscopia negativa (n=179)	5 (2.3%)#	0 (0%)¥#	9 (4.1%)*	165 (74.3%)§

Nomenclatura: § Resultados en los que correlacionan las tres técnicas; *FP de la FISH; +FP de cistoscopia; ¥FN de la FISH; #FN de la cistoscopia;

Nueve casos fueron considerados FP para la FISH (**Tabla 25**) por presentar discordancia con los resultados de la cistoscopia y con los de recidiva: casos nº 10, 11, 13, 28, 67, 105, 225, 240, 246) (**Anexo 1**). El caso nº 10 corresponde a una recidiva de tumor músculo infiltrante que aparece tras nueva sintomatología a los 6.1 meses tras la inclusión en el estudio que fué electrocauterizado impidiendo la obtención de biopsia, dado el alto riesgo del proceso de resección (página 106). En estos nueve casos considerados FP se realizó un seguimiento de 38.4 meses (rango: 12 meses -63.1 meses). Durante el seguimiento, uno de los pacientes (caso nº 28) presentó una recidiva del tumor (G1 (bajo grado) Ta) a los 38.5 meses desde la inclusión en el estudio.

En seis pacientes (FP para la cistoscopia y la FISH), los resultados de ambas técnicas se correlacionan pero sin evidencia histológica de tumor (casos nº 16, 22, 34, 64, 112 y 216) (**Anexo 1**). Dos de ellos (casos nº 16 y 64), se corresponden con dos casos en los que la RTU fué considerada tumoral pero las lesiones fueron electrocauterizadas sin la obtención de biopsia. Los cuatro restantes (casos nº 22, 34, 112 y 216),

presentaron una biopsia dudosa que finalmente fue considerada como reactiva, y se recomendó a los pacientes un seguimiento más intensivo. En estos seis el seguimiento es de 44.1 meses (rango: 7 meses -61.1 meses). Dos de ellos, han presentado recidiva de la enfermedad. En ambos casos el tumor detectado correspondía a un G1 (bajo grado) Ta (caso n° 34 y caso n° 112).

Los dos casos con FISH negativo que presentaron recidiva histológicamente confirmada (FN de la FISH) (**Tabla 25**) corresponden a una NUBPM (n° 113) y un tumor G1 (bajo grado) Ta (n°164) (**Tabla 13** y **Anexo 1**). En el caso de la NUBPM se encontraron 2 núcleos con aneuploidía de los cromosomas 3, 7 y 17 y 13 núcleos con delección de 9p21 (2 con delección heterocigota y 11 con delección homocigota). En el caso del tumor G1 (bajo grado) Ta se encontraron 4 núcleos con aneuploidía de los cromosomas 3, 7 y 17 y 24 núcleos con delección de 9p21 (4 con delección heterocigota y 20 con delección homocigota).

5. DISCUSIÓN

5.1. UTILIDAD DE LA FISH EN CÁNCER

El aumento de conocimiento de la patogénia y de los cambios genéticos asociados al desarrollo tumoral ha permitido el desarrollo de herramientas útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer. Una de estas herramientas, es la técnica de FISH.

Existen muchos ejemplos en los que la FISH se ha convertido en una herramienta indispensable en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento. Si bien en el campo de la hematología su uso está extendido desde hace tiempo, poco a poco se va extendiendo al campo de la oncología. Algunos ejemplos son el gen *ERBB2* en el caso del cáncer de mama y más recientemente en el cáncer gástrico y el gen *ALK* en cáncer de pulmón, entre otros.

El caso del cáncer vesical no ha sido una excepción. Sokolova *et al.* [2000] publican un artículo en el que desarrollan una nueva sonda de FISH muticolor con la que detectar el cáncer vesical.

5.2. UTILIDAD DE LA FISH EN EL CÁNCER VESICAL

En el año 2001, la FDA aprobó el Kit UroVysion® en la detección de recidivas en muestras de orina de micción espontánea en pacientes con antecedentes de cáncer de vejiga a partir del diseño publicado por Sokolowa *et al.* [2000]. Posteriormente, en el año 2005, la FDA aprobó el uso del kit para la detección del cáncer de vejiga en pacientes con hematuria macroscópica o microscópica pero sin antecedentes de cáncer vesical. Según la aprobación de la FDA, los resultados del Kit UroVysion®

deben ser tenidos en cuenta, en conjunto y no como sustituto de los procedimientos diagnósticos actuales, como una ayuda para el diagnóstico inicial del cáncer vesical en pacientes con hematuria y en el posterior seguimiento de la recurrencia del tumor en pacientes previamente diagnosticados de cáncer de vejiga.

Desde su diseño, se han publicado multitud de estudios, tanto en diagnóstico como en seguimiento, para intentar vislumbrar el índice de detección que puede tener la sonda de FISH en el cáncer vesical. Numerosos autores han testado su utilidad en gran variedad de situaciones: comparación con la citología, en casos de citología dudosa, comparación con otros marcadores, capacidad pronóstica, en respuesta a diferentes quimioterápicos intravesicales, como monitorización temprana de respuesta de terapia intravesical, en muestras de lavado vesical, etc. La FISH muestra una gran capacidad en la detección de tumores vesicales, si bien, su aplicabilidad en la práctica clínica habitual no queda bien establecida por su complejidad y, según algunos autores, por no aportar un valor añadido a las técnicas actualmente usadas. Sin embargo, la gran diferencia estriba en que con las otras técnicas existe un alto grado de susceptibilidad en función de la *expertise* del observador y en cambio la técnica FISH ofrece unos resultados de lectura cuantitativa y por ello objetiva.

5.3. DESARROLLO DEL ESTUDIO

El objetivo principal de este estudio es determinar el valor clínico de la técnica de FISH en una cohorte no seleccionada de pacientes que se encuentran en seguimiento de CCUNMI. Este estudio ha sido diseñado de una manera prospectiva y en él se han incluido todos los pacientes consecutivos procedentes del Servicio de Urología del

Hospital del Mar en el periodo comprendido entre Noviembre de 2007 y Noviembre de 2008. En total, se han realizado 222 seguimientos. Este diseño permite encontrar en la población de estudio unos resultados extrapolables a la práctica clínica habitual.

Hasta el momento, la serie reportada en este proyecto de tesis es la más extensa presentando las siguientes características: es prospectiva, realizada en muestras de orina de micción espontánea, en pacientes en seguimiento y comparación directa con la cistoscopia.

5.4. CRITERIOS DE VALORACIÓN Y CRITERIOS DE POSITIVIDAD DE LA FISH

La sonda UroVysion® permite la detección de cuatro tipos de alteraciones genéticas en pacientes con cáncer urotelial: polisomía, tetrasomía, trisomía y delección heterocigota y homocigota de 9p21 [Halling and Kipp 2008].

En el presente estudio se han detectado 41 casos positivos (**página 94 y Anexo 1**) por FISH de los cuales 40 presentaron polisomía de dos o más cromosomas y únicamente un caso, presentó ganancia de un cromosoma (en este caso era ganancia del cromosoma 3). Ningún caso presentó pérdida de 9p21 como única alteración. La proporción de casos positivos según la alteración cromosómica presente, es similar a la que se encuentra en la literatura. Más del 90% de los casos positivos presentan un patrón polisómico que generalmente se correlaciona con tumores de alto grado. Un pequeño porcentaje de pacientes se consideran positivos por presentar trisomía, tetrasomía o delección homocigota de 9p21 [Halling and Kipp 2008].

Se conoce poco de la correlación clínica de la presencia de trisomía y tetrasomía, sin embargo, la delección homocigota de 9p21 parece estar correlacionada con la presencia de tumores de bajo grado [Kawauchi *et al.*, 2009].

Los criterios de valoración y los criterios de positividad han sido y siguen siendo objeto de multitud de publicaciones, reflejando la falta de consenso entre diferentes grupos **(apartado 1.4.2, página 57)**

5.4.1. Criterios de valoración

El criterio de valoración de la FISH usado en este estudio, difiere del usado por otros autores con anterioridad. Sokolova *et al.* [2000] reportaron que es más eficiente y sensible valorar 25 células seleccionadas (con un patrón histológico aberrante) que la valoración de células uroteliales consecutivas. Muchos autores han seguido este criterio ya que defienden que las células polisómicas tienden a presentar núcleos más grandes e irregulares y la cromatina parcheada [Bubendorf *et al.*, 2001; Varella-Garcia *et al.*, 2004; Kipp *et al.*, 2005a; Gudjonsson *et al.*, 2008]. En cambio, en el presente estudio se han valorado 100 células epiteliales consecutivas, llamado análisis integral. El motivo de realizar el análisis integral en vez de seleccionar las células morfológicamente sospechosas es, por un lado, reducir la variabilidad interobservador ya que la selección de la célula a valorar tiene un componente subjetivo, y por otro, las células con baja polisomía pueden no presentar una morfología destacadamente sospechosa (**Tabla 3, página 17**). Además de realizar el análisis integral, se ha registrado la morfología de las células. Idealmente, se deberían haber contado 25 células con un patrón morfológico aberrante, sin embargo, no conseguir este último valor no era motivo de exclusión del resultado. De los 222 análisis, 92 (41.4%) no

presentaron 25 células morfológicamente sospechosas y aun así seis presentaron un resultado de FISH positivo. Constatamos que, células genéticamente alteradas pueden ser morfológicamente normales y viceversa, por lo que cambios genéticos tempranos no tienen por qué correlacionarse necesariamente con cambios morfológicos observables tal como proponen Gofrit *et al.*, [2007].

Como ya se ha mencionado, resulta inevitable que la selección morfológica de los núcleos incluye un punto de vista subjetivo y por consiguiente, variabilidad interobservador. Este inconveniente se debe a que la contratinción con DAPI no es la mejor técnica para realizar la selección morfológica [Daniely *et al.*, 2005]. En este contexto aparecen autores que tratan de complementar la capacidad de detección tumoral de la FISH al combinarla con técnicas de selección morfológica automatizada usando el sistema *Duet system* (BioView Ltd, Rehovot, Israel) [Daniely *et al.*, 2005; 2007] o el *Autocyte™ cell analytical system* (Carl Zeiss AG, Feldmeilen, Switzerland) [Dalquen *et al.*, 2002]. Otros, han añadido la selección inmunofenotípica con CK7 (que se observa en la mayoría de los tumores vesicales primarios) [Pajor *et al.*, 2008]. Si bien estas técnicas combinadas presentan buenos valores de sensibilidad y especificidad, incrementan su coste y su dificultad en la valoración, de manera que se alejan de los requerimientos necesarios para una técnica de seguimiento rutinario.

5.4.2. Criterio de positividad

El límite de corte usado para determinar un caso como positivo con la técnica de FISH ha sido el mismo que el publicado por Sokolowa *et al.*, [2000] con ligeras modificaciones. Un caso se considera positivo si cumple alguno de los siguientes criterios:

- **P1:** Cinco o más células con polisomía (ganancia de dos o más cromosomas en un mismo núcleo)
- **P2:** Más de 10 núcleos con ganancia de un único cromosoma (siempre el mismo)
- **P3:** Más de 50% de núcleos con pérdidas de uno o dos alelos de 9p21.

Las modificaciones respecto a los criterios de Sokolowa *et al.* [2000] reside en que no únicamente se consideran como positivas aquellas células con pérdida homocigota de 9p21, sino que también se consideran alteradas las células con pérdida heterocigota de 9p21 y se valoran 100 células uroteliales consecutivas.

Actualmente, el criterio de positividad aprobado por la FDA es el de la casa comercial (Abbot Molecular) (**apartado 1.4.2, página 59**):

- Cuatro o más células con polisomía (ganancia de dos o más cromosomas (3, 7 y 17) en un mismo núcleo)
- Más de 12 de núcleos con pérdida homocigota de 9p21.

Sin embargo, la multitud de publicaciones en las que se usan criterios diferentes hace pensar que estos no están totalmente aceptados. Probablemente, esta disparidad en los criterios puede plantear la posibilidad de que puedan existir diferentes criterios dependiendo de la población de estudio (diagnóstico, pacientes en seguimiento, con citología dudosa, con hematuria, etc.) [Hajdinjak, 2008]. Posteriormente, Huysentruyt *et al.* [2011], compararon la capacidad de detección tumoral con la técnica de FISH en pacientes con citología dudosa usando dos criterios de positividad diferentes. Para realizar el estudio, usaron el criterio establecido por la casa comercial (Abbot Molecular) y un criterio alternativo con la presencia de cuatro o más células con

ganancia de un único cromosoma (3, 7 y/o 17) o 12 o más células con delección heterocigota y/o homocigota tras el recuento de 25 células morfológicamente seleccionadas corresponderían a un resultado de FISH positivo. La valoración con este nuevo criterio alternativo, incrementaría la sensibilidad de la técnica de FISH pasando de un 68 hasta el 81% y reduciría levemente la especificidad (de un 84 a un 82%). Otros autores como Moatamed *et al.* [2013] sugieren que eliminar del recuento células tetraploides del análisis incrementa la especificidad de la técnica, mientras otros autores lo incluyen como criterio de positividad si esta tetraploidía o octaploidía se encuentra en más del 10% de las células analizadas [Zellweger *et al.*, 2006; Tapia *et al.*, 2011].

5.5. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA CITOLOGÍA Y LA FISH

La citología presenta una sensibilidad de 14.3% y una especificidad de un 99.5% (**Tabla 19, página 105**). En el caso de la FISH, la sensibilidad es del 92.9% y la especificidad del 92.3%. Se observa que la FISH tiene una sensibilidad estadísticamente mayor que la citología ($P=0.000$), mientras que la especificidad es estadísticamente menor que la citología ($P=0.001$) (**Tabla 20, página 106**). Si bien las diferencias entre la especificidad de ambas técnicas son estadísticamente significativas, la especificidad de la FISH es igualmente muy elevada.

La FISH se ha comparado con la citología en numerosos estudios y en gran diversidad de situaciones. Es importante destacar la variabilidad de resultados entre las diferentes series debido a la falta de homogeneidad: se incluyen pacientes de nuevo diagnóstico, en seguimiento, tras tratamiento con BCG, etc; frecuentemente el

número de casos analizados es bajo y/o el tipo de muestra puede variar (lavado vesical y micción espontánea) (**Tabla 11, página 60**). Las comparaciones entre estudios pueden ser difíciles debido a esta variabilidad.

Hajdinjak *et al.* [2008] realizaron un metanálisis comparando los resultados de FISH y citología urinaria de 14 estudios independientes (**Figura 18**) en los que se incluían pacientes en diagnóstico y seguimiento de CCUNMI. En total, en este metanálisis se analizaron 2477 muestras correspondientes a 578 pacientes, de las cuales, 677 correspondían a pacientes en seguimiento. La sensibilidad global obtenida en este metanálisis fue del 72% (69-75%) y del 42% (38-46%) para la FISH y la citología, respectivamente. La especificidad global del metanálisis fue del 83% (82-85%) y del 96% (95-97%) para la FISH y la citología, respectivamente.

Los resultados del presente estudio presentan una sensibilidad de la FISH ligeramente superior a la reportada, tal y como se muestra en la **Figura 18**. Uno de los motivos podría ser el criterio de positividad utilizado. También es importante, que en el presente estudio, el proceso desde la recolección de la muestra hasta la hibridación se ha realizado de manera estrictamente protocolizada y manteniendo en todo momento las condiciones de recolección y manipulación óptimas. Esto que parece ser algo arbitrario puede tener un papel fundamental y probablemente sea una de las limitaciones de la aplicabilidad de la FISH en la rutina del laboratorio. El hecho de ser una técnica de laboratorio especializado, provoca que las muestras se recolecten en un centro y deban desplazarse a otro para ser analizadas con lo que es difícil de controlar el proceso preanalítico de la muestra, que por otro lado es fundamental.

En el caso de la citología, la sensibilidad es inferior a la de otros estudios. Budman *et al.*, [2008] evalúan siete biomarcadores realizando un metanálisis, incluyendo la FISH y la citología, en pacientes en diagnóstico y en seguimiento de CCUNMI. En el estudio de la citología se incluyen 24 estudios y la sensibilidad global y la especificidad global son 45% (12.2-84.6%) y 92.0% (78-100%), respectivamente. Se concluye que la sensibilidad de la citología es muy variable dependiendo de la población de estudio debido a las diferencias en la capacidad de detección de los tumores dependiendo del grado tumoral. En el presente estudio, la citología presenta una sensibilidad del 14.3%, sin embargo, al separar la sensibilidad según el grado, se observan diferencias entre la capacidad de detección de los tumores de bajo (no se pudo detectar ninguno de los 13 tumores de bajo grado) y alto grado (con una sensibilidad del 26.7%) (**Tabla 21, página 108**). Este hallazgo es similar al observado por otros autores. Yafi *et al.* [2013] observaron una sensibilidad de un 10% en los tumores de bajo grado y una sensibilidad del 51% en los tumores de alto grado.

En referencia a la especificidad, los resultados de la FISH y de la citología obtenidos en el presente estudio, son bastante similares a la especificidad global obtenida por Hajdinjak *et al.* [2008]. La especificidad de la FISH es bastante elevada y presenta poca variabilidad en los diferentes estudios (**Figura 18**). En el caso de la citología, los valores son también muy elevados (97.2-100%)

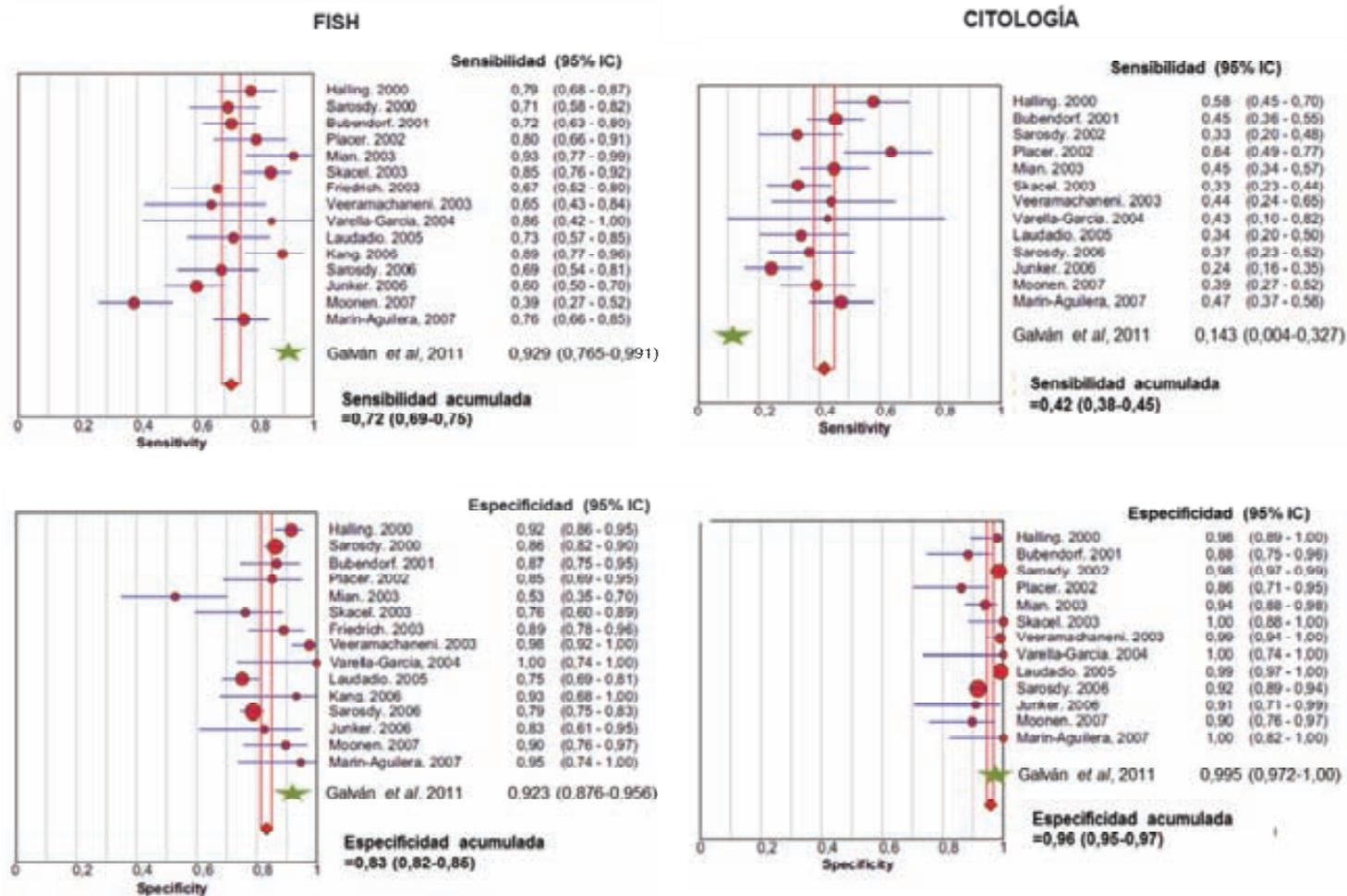


Figura 18: Resumen de los resultados incluidos en la publicación de Hajdinjak *et al.* [2008] y los del presente estudio ★
Resultados expresados en tanto por uno

En general, la mayoría de los estudios publicados hasta el momento en los que se comparan la citología con la FISH concluyen que la FISH es una técnica más sensible que la citología y en cuanto a la especificidad es ligeramente menos específica que la citología [Bubendorf *et al.*, 2001; Halling, 2003; Caraway *et al.*, 2010]. Rodgers *et al.* [2006] incluso plantearon el pequeño papel que juega la citología para descartar el cáncer vesical.

5.6. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA CISTOSCOPIA Y LA FISH

Muchos estudios han demostrado una importante evidencia de que la FISH presenta una sensibilidad mayor que la citología, sin embargo, se necesitan muchos más estudios para tratar de responder importantes cuestiones sobre la aplicabilidad de la técnica de FISH. Una de las más importantes sería su repercusión en mejorar la calidad de vida de los pacientes, al reemplazar o disminuir la frecuencia de las cistoscopias realizadas, al introducir la técnica de FISH durante el seguimiento de los pacientes con CCUNMI.

En este estudio, la técnica de FISH realizada con la sonda UroVysion® ha presentado una alta sensibilidad y una alta especificidad en la detección de tumores uroteliales (92.9% y 92.3%, respectivamente (**Tabla 19, página 105**)). Estos valores permiten pensar en la técnica de FISH como una herramienta útil en la detección de recidivas en pacientes con antecedentes de CCUNMI. En cuanto a las diferencias entre la sensibilidad y especificidad, la FISH y la cistoscopia no han mostrado diferencias estadísticamente significativas ($P=0.453$ para la sensibilidad y $P=0.405$ para la

especificidad) (**Tabla 20, página 106**), lo que demuestra que la FISH presenta una capacidad de detección de tumores similar a la de la cistoscopia.

Hasta el momento de plantearse este estudio no existía ningún trabajo comparando la FISH y la cistoscopia, posteriormente, han aparecido publicaciones con el mismo objetivo (evaluación y comparación directa de la cistoscopia, la citología y la FISH) aunque con ciertas diferencias relevantes que van a limitar las conclusiones y comparaciones entre ellas. Las principales diferencias son las características de los pacientes (población de estudio), las características del estudio (prospectivo o retrospectivo), tipo de muestra analizada (orina de micción espontánea o lavado vesical), criterios de valoración y de positividad, el número de pacientes analizados, etc. (**Tabla 26**).

Tabla 26: Estudios comparativos de cistoscopia, citología y FISH.

Estudio	[Gudjonsson <i>et al.</i> , 2008]	[Karnwal <i>et al.</i> , 2010]	[Fritsche <i>et al.</i> , 2010]	[Galvan <i>et al.</i> , 2011]	
Objetivo	Evaluación de cistoscopia, citología y FISH	Evaluación de cistoscopia, citología y FISH	Evaluación de cistoscopia, citología y FISH	Evaluación de cistoscopia, citología y FISH	
Características de los pacientes	No selección	No selección	Selección alto grado	No selección	
Características del estudio	Prospectivo	Retrospectivo	Prospectivo	Prospectivo	
Características de la muestra	Micción espontánea	Lavado vesical	Micción espontánea	Micción espontánea	
Nº pacientes	159	59	25	248	
Eventos	175	94	210	224	
Tumores	27	48	25	28	
Seguimiento (meses)	Mínimo 12, mediana 18	Mediana (rango) 52 (4-150)	Mediana (rango) 27 (1-48)	Mediana (rango) 15.3 (0-63.1)	
Criterios de valoración/positividad de la FISH	25 células morfológicamente seleccionadas Abbot Molecular	ND	25 células morfológicamente seleccionadas Abbot Molecular*	100 células epiteliales consecutivas Sokolowa <i>et al.</i> *	
Cistoscopia	Sens.	93	98	68	82.1
	Esp.	93	41	89	89.7
	VPP	ND	ND	60	53.5
	VPN	ND	ND	92	97.2
Citología	Sens.	22	42	68	14.3
	Esp.	98	89	89	99.5
	VPP	ND	ND	61	80.0
	VPN	ND	ND	92	88.9
FISH	Sens.	30	63	95	92.9
	Esp.	95	65	93	92.3
	VPP	ND	ND	76	63.4
	VPN	ND	ND	99	98.9

Abreviaturas: CCU: Carcinoma de células uroteliales; CCUNMI: Carcinoma de células uroteliales no músculo infiltrante; ND: No determinado; Sens.: Sensibilidad; Esp.: Especificidad; VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo; *: Criterios ligeramente modificados

5.6.1. Comparación con el estudio de Gudjónsson *et al.* [2008]

El estudio de Gudjónsson *et al.* [2008] es el que presenta más características comunes en el planteamiento al compararlo con el presente. En ambos se analiza prospectivamente una población similar que comprende un número relativamente elevado de pacientes en seguimiento por antecedentes de CCUNMI, no seleccionados (y por lo tanto, las conclusiones pueden ser extrapolables a la práctica clínica habitual). La principal discrepancia a nivel de planteamiento de ambos estudios se basa en el criterio de valoración y positividad.

Respecto a la FISH, la sensibilidad del presente estudio es bastante más elevada que la presentada por Gudjónsson *et al.* [2008], mientras que las especificidades de ambos estudios son comparables. En el caso de la cistoscopia, la sensibilidad es ligeramente menor y la especificidad similar. Las conclusiones respecto a la FISH en ambos estudios son contrarias. Mientras que en el presente estudio, la sensibilidad de la FISH y la cistoscopia son muy similares, Gudjónsson *et al.* [2008], tras analizar 175 eventos de seguimiento de 156 pacientes ha reportado que la sensibilidad de la FISH es menor que la obtenida por la cistoscopia.

Gudjónsson *et al.* [2008] atribuyen la baja sensibilidad de la FISH al elevado porcentaje de recidivas de bajo riesgo (62%), ya que cuando analizaban únicamente casos con CIS, la sensibilidad alcanzaba el 100%. En el estudio presentado el porcentaje de recidivas tumorales de bajo grado es de 46.4% (**Tabla 21, página 108**). Si bien, este porcentaje es menor que el de Gudjónsson *et al.* [2008], creemos que no explicaría esta importante diferencia en las sensibilidades obtenidas.

Otra diferencia principal sería el criterio de valoración y de positividad. Gudjónsson *et al.* [2008] analizaron únicamente 25 células morfológicamente sospechosas excluyendo del análisis los que no cumplían este criterio. De nuestra experiencia, el bajo valor de sensibilidad obtenido por Gudjónsson *et al.* [2008] se debe a que la valoración de 25 células morfológicamente seleccionadas puede no ser totalmente adecuada en el seguimiento de tumores donde no existe una excesiva descamación de células tumorales hacia la orina o donde las alteraciones morfológicas de las células son escasas (tumores de bajo grado). En los casos positivos del presente estudio, la media de células con anomalías cromosómicas detectadas, fue bajo: 6 células alteradas de las 100 analizadas.

5.6.2. Comparación con el estudio de Fritsche *et al.* [2010]

Los resultados de sensibilidad y especificidad de FISH son similares a los obtenidos por Fritsche *et al.* [2010]. En el caso de la cistoscopia, la especificidad es similar, mientras que sensibilidad es ligeramente menor.

Las principales diferencias entre el presente estudio y el presentado por Fritsche *et al.* [2010] son que en este último se han seleccionado pacientes de alto grado y se han valorado 25 células morfológicamente seleccionadas. Por el contrario, el diseño del estudio planteado por Fritsche *et al.* [2010] es similar al planteado en esta tesis. No solo se incluyen como positivos los casos con confirmación histológica en el momento de la RTU, sino que aquellos casos con citología y/o FISH positivos y cistoscopia negativa que presentaban recidiva en el siguiente seguimiento se consideran VP.

El criterio de positividad difiere ligeramente, en lugar de realizar un análisis integral como en el presente estudio, realizaron la valoración de 25 en células morfológicamente seleccionadas. Con este criterio de valoración se descartan el 11.9% de los casos por no cumplir los criterios mínimos, mientras que en este trabajo es de 9.7% (**página 93**). El hecho de que Fritsche *et al.* [2010] analicen exclusivamente tumores de alto riesgo, donde las células presentan más alteraciones histológicas (**Tabla 3, página 17**) puede contrarrestar el efecto de la selección morfológica.

También concluyen, que la FISH es una buena herramienta para el seguimiento de aquellos pacientes con antecedentes de CCUNMI, aunque para Fritsche *et al.* [2010] esta afirmación queda restringida a los tumores de alto grado. Mientras que la totalidad de los pacientes analizados por Fritsche *et al.* [2010] presentaban tumores de alto grado previos, en el presente estudio, únicamente correspondían al 59% de la población de estudio (**Tabla 12, página 70**).

5.6.3. Comparación con el estudio de Karnwal *et al.* [2010]

Las principales diferencias se basan en que el estudio de Karnwal *et al.* [2010] es retrospectivo y las muestras utilizadas para el análisis de FISH y de citología provienen del lavado vesical.

Mientras que en el presente estudio no existen diferencias entre cistoscopia y la FISH, en el suyo, las diferencias entre la sensibilidad y la especificidad de la cistoscopia y la FISH, y la FISH y la citología son estadísticamente significativas, mostrando

diferencias entre la capacidad de detección tumoral de la cistoscopia y la FISH y concluyendo que la cistoscopia no puede ser reemplazada por la FISH.

El estudio de Karnwal *et al.* [2010] observa una especificidad de la cistoscopia (41%), relativamente baja al compararla con los estudios de Gudjónsson *et al.* (2008) (93%), Fritsche *et al.* [2010] (89%) y el presente trabajo (89.7%) (**Tabla 26**).

Estos autores no han especificado los criterios de valoración y de positividad de la FISH con lo que poder establecer una comparación con los resultados del presente trabajo es difícil.

En referencia a la citología, la sensibilidad reportada por Karnwal *et al.* [2010] (42%) es superior a la detectada en el presente trabajo (14.3%) (**Tabla 26**). La diferencia puede deberse al uso de muestras obtenidas mediante lavado vesical, que según la literatura proporcionan un mejor material para la citología (mayor número de células, mejor conservación, menos contaminantes, etc). Esto se traduce en un incremento de la sensibilidad de la citología obtenida mediante lavado vesical al compararla con la obtenida por micción espontánea [El-Bolkainy, 1980; Matzkin *et al.*, 1992], sin embargo, este procedimiento de obtención de muestra de orina añade una actitud invasiva.

Además, la citología es más sensible y específica en la detección de tumores de G1 y G2, hecho que también discrepa con otros trabajos similares [Rodgers *et al.*, 2006].

5.7. VALOR PREDICTIVO NEGATIVO Y POSITIVO DE LA CISTOSCOPIA, CITOLOGÍA Y FISH

El VPN de una técnica nos indica la probabilidad de que un paciente con un resultado negativo esté realmente sano. Con todas las técnicas se observan unos VPN muy elevados (**Tabla 19, página 105**). Para la FISH del 98.9%, para la cistoscopia del 97.2% y para la citología del 88.9%. Estos resultados están en concordancia con los presentados por Fritsche *et al.* [2010], donde el VPN de la FISH fue del 99%, de la cistoscopia fue el 92% y de la citología alcanzó el 92%. Estos VPN elevados indican que existe una baja probabilidad de presentar recidivas en pacientes que presenten un resultado de FISH, cistoscopia o citología negativo.

En el caso concreto de la FISH, el alto VPN podría permitir pensar, por lo tanto, en incrementar el tiempo entre cistoscopias, sobre todo en aquellos casos de bajo grado en los que un retraso en su diagnóstico no afectaría al pronóstico del paciente, reduciendo por lo tanto la frecuencia de ésta prueba invasiva.

El VPP de una técnica nos indica la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba. El VPP en el caso de la FISH fue del 63.4%, en el caso de la cistoscopia del 53.5% y en el caso de la citología del 80.0% (**Tabla 19, página 105**). La citología por lo tanto presenta el VPP más elevado. En el caso de la FISH y la cistoscopia, este valor es más bajo indicando que un resultado positivo no siempre va relacionado con la existencia de tumor. El valor tan bajo observado con la FISH es debido a que existen 15 positivos es los que no se ha podido demostrar recidiva y en el caso del bajo valor de la cistoscopia es que se han encontrado 20 casos positivos sin mostrar recidiva (**Tabla 25, página 113**). Más

adelante se discuten las causas de estos resultados que pueden considerarse falsos positivos.

5.8. COMBINACIÓN DE TÉCNICAS

Con el objetivo de establecer el mejor algoritmo de seguimiento de pacientes con CCUNMI, se ha calculado la sensibilidad y de la especificidad de cada una de las técnicas individuales (**Tabla 21, página 108**) y de la combinación de las técnicas de dos en dos (**Tabla 23, página 110**). Con los resultados obtenidos no parece que la combinación de técnicas mejore la capacidad de las técnicas por separado en la detección de tumores (**Tabla 24, página 112**).

La combinación de la cistoscopia y la FISH presenta una sensibilidad del 100%, una sensibilidad mayor al compararla con la cistoscopia aislada (82.1%) o con la FISH aislada (92.9%). En cuanto a la especificidad (85.1%), se reduce de forma estadísticamente significativa al compararla con la cistoscopia aislada (89.7%, $P=0.004$) o con la FISH aislada (92.3%, $P=0.000$).

Por otro lado solo se encuentran diferencias significativas cuando se compara la citología aislada con la cistoscopia aislada, la FISH aislada, o la combinación de cistoscopia y FISH, combinación de cistoscopia y citología y combinación de FISH y citología (**Tabla 24, página 112**). Esto parece indicar que la citología no tiene un papel importante en la sensibilidad global como ya apuntaban algunos autores como Rodgers *et al.* [2006]. Sin embargo, su capacidad de detección de CIS complementa la dificultad de la cistoscopia en la detección de este tipo de tumores. Con esta, afirmación se puede concluir que la cistoscopia debe ir siempre acompañada de

citología para evitar infravalorar recidivas de CIS que además pueden progresar a CCUMI.

5.9. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS

Las técnicas usadas en el seguimiento estándar de los pacientes con antecedentes de CCU, tanto la cistoscopia, la citología, como la FISH, presentan algunas ventajas respecto a las otras técnicas pero también presentan errores en la detección de tumores.

5.9.1. Ventajas y limitaciones de la cistoscopia

Actualmente, la cistoscopia se considera la técnica *gold standard* en el diagnóstico y seguimiento del CCUNMI. La cistoscopia es una técnica altamente sensible para la detección de muchos tumores y proporciona una información muy relevante para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer vesical: apariencia del tumor, número, tamaño, forma y localización [Sharma *et al.*, 2009].

Sin embargo, también presenta algunas limitaciones. Presenta un porcentaje de resultados FN. Estos resultados falsos negativos pueden deberse a errores del operador o ser pequeñas áreas de CIS que pueden ser difíciles de detectar [Schmidbauer *et al.*, 2004]. Otros FN de la cistoscopia pueden deberse a que el tumor no es visible en el momento de la cistoscopia por su pequeño tamaño y que posteriormente se hace visible durante el seguimiento. La visualización puede estar disminuida por cambios inflamatorios o hemorrágicos, un lóbulo prostático agrandado o existencia de divertículos. En los casos de carcinoma urotelial recurrente o

persistente, tras tratamiento con quimioterapia, radioterapia o cirugía, las áreas patológicas del epitelio vesical pueden ser extremadamente complicadas de visualizar y de biopsiar [Talwar *et al.*, 2007]. En el caso de imposibilitar la visualización del urotelio, puede ser necesaria la repetición de la cistoscopia, con la consiguiente comorbilidad asociada. Además estas condiciones pueden inducir a proporcionar resultados FP en la cistoscopia.

Se ha observado que de los 46 casos con citología positiva, en solo 25 casos se encontraron lesiones histológicamente confirmadas. Si descartamos aquellas lesiones que fueron electrocauterizadas durante la resección por el pequeño tamaño, aún quedan 16 casos en los que o bien no se encontró lesión o que la lesión encontrada era benigna (**página 97**). Por otro lado, no fue capaz de identificar dos tumores G1 (bajo grado) Ta, un tumor G2 (alto grado) Ta y dos CIS (**Tabla 21, página 108**).

5.9.2. Ventajas y limitaciones de la citología

La citología es una prueba no invasiva (si se realiza a partir de muestra de orina de micción espontánea) para la detección del cáncer vesical y muy específica (90%) [Babjuk *et al.*, 2008] de manera que, delante de una citología positiva se puede estar bastante seguro de que existe un tumor e incluso si los estudios de imagen son negativos puede indicar la presencia de un tumor en cualquier localización del tracto urinario (cálices renales, uréteres, vejiga y en la uretra).

La citología por el contrario también presenta limitaciones, sobretudo su baja sensibilidad en los tumores de bajo grado [Kirkali *et al.*, 2005]. La citología es más útil en la detección de tumores de alto grado donde las características morfológicas

aberrantes se hacen más presentes. Los criterios usados en la valoración de la citología son subjetivos y dependen en gran medida de la experiencia del citólogo/patólogo [van Rhijn *et al.*, 2005].

La terapia intravesical induce una reacción inflamatoria de la mucosa vesical e interfiere en los resultados de la citología. El eritema encontrado en la mucosa puede semejarse al CIS en el examen cistoscópico y la inflamación induce a atipia citológica dificultando su interpretación.

Como se observa en la (**Tabla 21, página 108**) la citología, en el presente estudio no ha podido detectar ninguno de los tumores de bajo grado mientras que ha podido detectar el 26.7% de los tumores de alto grado. Más concretamente pudo detectar un CIS (nº134), dos tumores G2 (alto grado) (nº 175 y 241) Ta y un G3 (alto grado) Ta (nº 217).

En nuestra muestra es importante destacar dos casos en concreto:

- Caso nº 147 (**Anexo 1**): Resultado FP de la FISH. Se realiza RTU en la que no se encuentra tumor. Únicamente se observa cicatriz de RTU previa.
- Caso nº 20 (**Anexo 1 y página 99**): Resultado FN de la citología y la cistoscopia. Recidiva a los 2.3 meses desde la inclusión en el estudio tras la aparición de sintomatología. La citología presenta resultado de citología atípica; es decir se observan ligeras alteraciones que no alcanzan criterio de positividad (citología dudosa).

Los casos con citología dudosa son relativamente frecuentes en la práctica clínica. Estos casos dudosos incluyen citología atípica, sospechosa o la presencia de agrupaciones celulares compatibles con neoplasias de bajo grado. Diferentes datos

sugieren que menos del 50% de los casos con citología dudosa presentan recidivas durante el seguimiento [Voss *et al.*, 2008], sin embargo, este resultado puede conducir a un control más intensivo y por lo tanto, un aumento de la comorbilidad del paciente. Kipp *et al.* realizaron un estudio en 124 pacientes con citología dudosa. De estos casos, 58 (47%) presentaron FISH positivo, y de estos, 53 (91%) presentaron evidencias de tumor vesical en el siguiente seguimiento. Por otro lado, 32 de 56 (48%) pacientes con FISH negativo presentaron tumores. En 20 de estos 32, la detección se llevó a cabo mediante cistoscopia. Lotan *et al.* en un estudio publicado en 2008, encuentran en la técnica de FISH una herramienta útil para clarificar resultados en casos de citología dudosa y cistoscopia negativa. En casos con cistoscopia dudosa, la técnica de FISH sería innecesaria.

5.9.3. Ventajas y limitaciones de la FISH

La FISH es una técnica objetiva que permite detectar alteraciones genéticas concretas, que no se basa en la subjetividad de alteraciones fenotípicas (excepto en el caso en el que se hace selección morfológica de las células analizadas). Pero su habilidad de combinar morfolología, detección de alteraciones genéticas e incluso distintos criterios de positividad en diferentes situaciones, hace de esta técnica una herramienta potente y a tener en cuenta en el diagnóstico y más concretamente en el seguimiento del cáncer vesical.

La técnica de FISH es una técnica que no se encuentre disponible en todos los centros, costosa en tiempo y en la que se requiere cierto nivel de entrenamiento del personal. Además, puede presentar resultados falsamente negativos que podrían ser explicados por la presencia de alteraciones genéticas no identificadas con dicha

técnica de FISH, por un número escaso de células tumorales en la orina debido a una pobre descamación tumoral o a un volumen urinario limitado. En este estudio, la FISH no ha podido detectar una NUBPM (nº 113) y un tumor G1 (bajo grado) Ta (nº 164) (**Tabla 13, página 98**).

En algunos casos, la FISH presenta un resultado positivo sin detección de recidiva considerando estos casos FP que pueden deberse a una errónea valoración de células en paraguas o células infectadas por virus que pueden presentar cariotipos tetraploides [Caraway and Katz 2010]. La tetraploidía en células uroteliales benignas también puede explicarse en la transición de la célula a través de la fase S o G2 del ciclo celular o por mecanismos de endoreplicación como respuesta a estrés celular [Lee *et al.*, 2009]. Además, algunos explican estos casos como una positividad temprana de recidivas que no son cistoscópicamente visibles, lo que se conoce como resultado anticipatorio del FISH.

5.9.3.1. Valoración de los FP

En nueve pacientes, el resultado de la FISH han sido positivo pero no se ha observado recidiva de la enfermedad (**Tabla 25, página 113**) son considerados FP. Los pacientes con estos resultados fueron seguidos durante un periodo de tiempo mayor (mediana de 23.6 meses) sin aparición de recidiva. En cinco de estos nueve casos, se encontraron 5 células epiteliales alteradas (límite de criterio de positividad). El resto de casos presentaron entre 7 y 14 células alteradas. Algunos autores han considerado que casos de FISH positivos y con citología y cistoscopia negativa serían considerados anticipatorios. En este sentido, Sarosdy *et al.* [2002] observaron una tasa de recurrencia del 42% en un rango de entre 3 a 16 meses, en pacientes con

FISH positivo y cistoscopia negativa, frente a una tasa de recurrencia del 19% si la FISH era negativa. Yoder *et al.* [2007] observaron una capacidad anticipadora de la FISH de 29 meses en el 65% de los pacientes con FISH positivo que no han presentado recurrencias. Un seguimiento más largo de los pacientes que han presentado falsos resultados de FISH podría confirmar si estos resultados son realmente falsos positivos o por el contrario, son resultados anticipatorios de la FISH. Sin embargo, otros autores como Ferra *et al.* [2009] observaron que no es necesario un seguimiento más exhaustivo en aquellos pacientes que presentan cistoscopia y citología negativos y FISH positivo. Una posible explicación sería que no todas las células que presentan alteraciones genéticas desarrollarán un tumor. La FISH, únicamente, permite detectar células con alteraciones genéticas concretas que potencialmente, en un 40% de los casos, podrán transformarse en células tumorales ya que el resto pueden resolverse de manera espontánea [Gofrit *et al.*, 2008].

5.9.4. Limitaciones en la detección de carcinomas de alto grado

Es interesante determinar si existe un sesgo en las características patológicas de los tumores que no han podido ser detectados por las diferentes técnicas. El uso de una técnica que no fuera capaz de detectar tumores de alto riesgo podría tener implicaciones en el pronóstico del paciente.

En este estudio, debido al escaso número de recidivas no es posible obtener resultados con poder estadístico, sin embargo, al realizar el análisis por separado en tumores de alto y bajo grado, no existen diferencias significativas. La FISH ha sido capaz de detectar el 100% de los tumores de alto grado, mientras que la cistoscopia, únicamente ha podido detectar el 80% de los tumores de alto grado (**Tabla 25, página**

113). La cistoscopia no ha podido detectar correctamente 3 de los 15 tumores de alto grado encontrados: un G2 (alto grado) Ta y dos CIS (**Tabla 21, página 108**).

En el caso de los tumores CIS, al no tener representación morfológica macroscópica, ni aún utilizando pequeños aumentos, ya que son nidos celulares situados bajo la capa epitelial en paraguas, y por lo tanto no visibles ópticamente, se acepta que la cistoscopia no es capaz de detectarlo, si bien no existe evidencia estadísticamente significativa de ello, como han descrito otros autores [Shaw and Bunce 2008; Whitson *et al.*, 2009]. Este problema se ha intentado corregir con el uso de la cistoscopia fluorescente. Sin embargo, es ampliamente aceptado que la FISH parece tener un papel importante en la detección de tumores de alto riesgo (incluyendo el CIS) y tumores de bajo riesgo.

6. CONCLUSIONES

1. La sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la citología son 14.3%, 99.5%, 80.0% y 88.9%, respectivamente. Para la cistoscopia estos valores son 82.1%, 89.7%, 53.5% y 97.2%, respectivamente, y para la FISH 92.9%, 92.3%, 63.4% y 98.9%.
2. De las diferentes comparaciones realizadas se concluye que:
 - 2a. La sensibilidad de la FISH es estadísticamente superior a la de la citología, sin embargo, la especificidad es estadísticamente inferior.
 - 2b. La sensibilidad de la combinación de la citología y la FISH (92.9%) no presenta diferencias estadísticamente significativas cuando se compara con la de la FISH aislada. La especificidad de la combinación de la citología y la FISH (91.8%) al compararla con la FISH aislada (92.3%) tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas. Se concluye que la combinación de la citología y la FISH no presenta ningún beneficio respecto al uso exclusivo de la FISH.
 - 2c. La sensibilidad y especificidad de la cistoscopia al compararla con la técnica de FISH no presentan diferencias significativas. La capacidad de estas técnicas de detectar recidivas es equiparable concluyendo que la técnica de FISH podría retrasar/sustituir a la cistoscopia en aquellos casos con resultado de FISH negativo.
 - 2d. La sensibilidad de la combinación de la cistoscopia y la FISH (100%) y la de la FISH aislada (92.9%) presentan valores muy elevados (no comparables por limitaciones estadísticas). La especificidad de la

combinación de la cistoscopia y la FISH (85.1%) es estadísticamente menor que la de la FISH aislada (92.3%).

3. Los parámetros de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la cistoscopia y la FISH, indican que ambas técnicas no presentan diferencias en la capacidad de detección de tumores. Es razonable, por lo tanto, pensar en la técnica de FISH como una buena herramienta inicial en el seguimiento de pacientes con antecedentes de CCUNMI. La cistoscopia podría ser innecesaria en casos de FISH negativo. Por el contrario, delante de un resultado de FISH positivo la probabilidad de que exista una recidiva es muy elevada, de manera que el paciente debería ser sometido a una cistoscopia invasiva. La cistoscopia es insustituible en los casos en los que existe sospecha de recidiva tumoral.
4. Los criterios de positividad aplicados en este estudio proporcionan unos valores de sensibilidad y especificidad más elevados que los observados en la literatura. Es necesario estudiar diferentes series con estos criterios para poder validar el uso del análisis integral en el seguimiento de pacientes con antecedentes de CCUNMI.
5. El bajo número de recidivas observado, no ha permitido extraer conclusiones robustas sobre la posible asociación de las alteraciones genéticas detectadas y el estadio y el grado tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Apodaca G 2004. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 5:117-128
- Avritscher EB, Cooksley CD, Grossman HB, *et al.* 2006. Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications. *Urology* 68:549-553
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, *et al.* 2008. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 54:303-314
- Babu VR, Lutz MD, Miles BJ, Farah RN, Weiss L and Van Dyke DL. 1987. Tumor behavior in transitional cell carcinoma of the bladder in relation to chromosomal markers and histopathology. *Cancer Res* 47:6800-6805
- Balint EE and Vousden KH. 2001. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* 85:1813-1823
- Bellmunt J, Orsola A, Maldonado X, Kataja V and ESMO Guidelines Working Group. 2010. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5:v134-6
- Bergman J, Reznicek RC and Rajfer J. 2008. Surveillance of patients with bladder carcinoma using fluorescent in-situ hybridization on bladder washings. *BJU Int* 101:26-29
- Bernues M, Casadevall C, Caballin MR, *et al.* 1999. Study of allelic losses on 3p, 6q, and 17p in human urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 112:42-45
- Berrozpe G, Miro R, Caballin MR, Salvador J and Egozcue J. 1990. Trisomy 7 may be a primary change in noninvasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Genet Cytogenet* 50:9-14

- Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, *et al.* 2001. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 158:1955-1959
- Blaveri E, Simko JP, Korkola JE, *et al.* 2005. Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin Cancer Res* 11:4044-4055
- Bowles L, Bialkowska-Hobrzanska H, Bukala B, Nott L and Razvi H. 2004. A prospective evaluation of the diagnostic and potential prognostic utility of urinary human telomerase reverse transcriptase mRNA in patients with bladder cancer. *Can J Urol* 11:2438-2444
- Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC and Dalquen P. 2001. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 116:79-86
- Budman LI, Kassouf W and Steinberg JR. 2008. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J* 2:212-221
- Cairns P, Shaw ME and Knowles MA. 1993. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 8:1083-1085
- Calabro F and Sternberg CN. 2009. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 55:348-358
- Caraway NP and Katz RL. 2010. A review on the current state of urine cytology emphasizing the role of fluorescence in situ hybridization as an adjunct to diagnosis. *Cancer Cytopathol* 118:175-183
- Caraway NP, Khanna A, Fernandez RL, *et al.* 2010. Fluorescence in situ hybridization for detecting urothelial carcinoma: a clinicopathologic study. *Cancer Cytopathol* 118:259-268

-
- Chade DC, Shariat SF and Dalbagni G. 2009. Intravesical therapy for urothelial carcinoma of the urinary bladder: a critical review. *Int Braz J Urol* 35:640-50
- Chang F, Syrjanen S and Syrjanen K. 1995. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 13:1009-1022
- Chen Z, Morgan R, Berger CS and Sandberg AA. 1992. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 63:62-69
- Choi HS, Lee SI, Kim DJ and Jeong TY. 2010. Usefulness of the NMP22BladderChek test for screening and follow-up of bladder cancer. *Korean J Urol* 51:88-93
- Clapp RW, Jacobs MM and Loechler EL. 2008. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health* 23:1-37
- Cole P, Hoover R and Friedell GH. 1972. Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer* 29:1250-1260
- Coogan CL, Estrada CR, Kapur S and Bloom KJ. 2004. HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 63:786-790
- Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, *et al.* 1991. Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 63:601-608
- da Silva FC, Ferrito F, Brandao T and Santos A. 1992. 4'-epidoxorubicin versus mitomycin C intravesical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 21:42-44

- Dai H, Holm R, Kristensen GB, Abeler VM, Borresen-Dale AL and Helland A. 2001. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) - analyses of the S249C mutation and protein expression in primary cervical carcinomas. *Anal Cell Pathol* 23:45-49
- Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR and Cordon-Cardo C. 1993. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 342:469-471
- Dalquen P, Kleiber B, Grilli B, Herzog M, Bubendorf L and Oberholzer M. 2002. DNA image cytometry and fluorescence in situ hybridization for noninvasive detection of urothelial tumors in voided urine. *Cancer* 96:374-379
- Daniely M, Rona R, Kaplan T, *et al.* 2005. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. *Urology* 66:1354-1359
- Daniely M, Rona R, Kaplan T, *et al.* 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* 111:517-524
- de Braud F, Maffezzini M, Vitale V, *et al.* 2002. Bladder cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 41:89-106
- Denzinger S, Burger M, Walter B, *et al.* 2007. Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis: 8-year results of prospective randomized study. *Urology* 69:675-679
- Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M, *et al.* 2003. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet* 33:90-96

-
- Eble J, Sauter G, Epstein J and Sesterhenn I. 2004. Pathology and Genetics. Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs: Lyon.
- Eissa S, Swellam M, Shehata H, El-Khouly IM, El-Zayat T and El-Ahmady O. 2010. Expression of HYAL1 and survivin RNA as diagnostic molecular markers for bladder cancer. J Urol 183:493-498
- El-Bolkainy MN 1980. Cytology of bladder carcinoma. J Urol 124:20-22
- El-Bolkainy MN, Mokhtar NM, Ghoneim MA and Hussein MH. 1981. The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. Cancer 48:2643-2648
- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR and Mostofi FK. 1998. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol 22:1435-1448
- Erdem E, Dikmen G, Atsu N, Dogan P and Ozen H. 2003. Telomerase activity in diagnosis of bladder cancer. Scand J Urol Nephrol 37:205-209
- Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, *et al.* 2000. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. Genes Chromosomes Cancer 29:256-265
- Fadl-Elmula I 2005. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. Cell Chromosome 4:1
- Ferra S, Denley R, Herr H, Dalbagni G, Jhanwar S and Lin O. 2009. Reflex UroVysion testing in suspicious urine cytology cases. Cancer Cytopathol 117:7-14

- Friedrich MG, Toma MI, Hellstern A, *et al.* 2003. Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer. *BJU Int* 92:911-914
- Fritsche HM, Burger M, Dietmaier W, *et al.* 2010. Multicolor FISH (UroVysion) facilitates follow-up of patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *Am J Clin Pathol* 134:597-603
- Gallucci M, Merola R, Leonardo C, Ruggeri EM and Cianciulli AM. 2005. Analysis of HER2 expression in primary urinary bladder carcinoma and corresponding metastases. *BJU Int* 96:440;
- Galvan AB, Salido M, Espinet B, *et al.* 2011. A multicolor fluorescence in situ hybridization assay: A monitoring tool in the surveillance of patients with a history of non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma: A prospective study. *Cancer Cytopathol* 119:395-403
- Gelabert, A. 2007. Cáncer vesical que no infiltra músculo. Recomendaciones diagnósticas, terapéuticas y de seguimiento. Monografías de Urología Oncológica. MARGE. Médica Books. Barcelona
- Gibas Z and Gibas L. 1997. Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 95:108-115
- GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr/>
- Gofrit ON, Zorn KC, Silvestre J, *et al.* 2008. The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol* 26:246-249

-
- Golijanin D, Sherman Y, Shapiro A and Pode D. 1995. Detection of bladder tumors by immunostaining of the Lewis X antigen in cells from voided urine. *Urology* 46:173-177
- Greene FL 2002. *AJCC cancer staging manual* New York: Springer-Verlag.
- Grossman HB, Messing E, Soloway M, *et al.* 2005. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 293:810-816
- Grossman HB, Soloway M, Messing E, *et al.* 2006. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 295:299-305
- Gudjonsson S, Isfoss BL, Hansson K, *et al.* 2008. The value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 54:402-408
- Habuchi T, Ogawa O, Kakehi Y, *et al.* 1993. Accumulated allelic losses in the development of invasive urothelial cancer. *Int J Cancer* 53:579-584
- Hajdinjak T 2008. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol* 26:646-651
- Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, *et al.* 2007. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol* 178:2314-2330
- Halling KC, King W, Sokolova IA, *et al.* 2000. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 164:1768-1775

- Halling KC 2003. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 3:507-519
- Halling KC and Kipp BR. 2008. Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). *Adv Anat Pathol* 15:279-286
- Han RF and Pan JG. 2006. Can intravesical bacillus Calmette-Guerin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology* 67:1216-1223
- Heidenblad M, Lindgren D, Jonson T, *et al.* 2008. Tiling resolution array CGH and high density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors. *BMC Med Genomics* 1:3-8794-1-3
- Heney NM, Koontz WW, Barton B, *et al.* 1988. Intravesical thiotepa versus mitomycin C in patients with Ta, T1 and TIS transitional cell carcinoma of the bladder: a phase III prospective randomized study. *J Urol* 140:1390-1393
- Holmang S, Hedelin H, Anderstrom C and Johansson SL. 1995. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol* 153:1823-6;
- Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C and Johansson SL. 2001. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol* 165:1124-8

- Huysentruyt CJ, Baldewijns MM, Ruland AM, *et al.* 2011. Modified UroVysion scoring criteria increase the urothelial carcinoma detection rate in cases of equivocal urinary cytology. *Histopathology* 58:1048-1053
- Ilic M, Stojadinovic M and Milosavljevic Z. 2011. Familial aggregation of bladder cancer. *Vojnosanit Pregl* 68:447-451
- Ishiwata S, Takahashi S, Homma Y, *et al.* 2001. Noninvasive detection and prediction of bladder cancer by fluorescence in situ hybridization analysis of exfoliated urothelial cells in voided urine. *Urology* 57:811-815
- Jacobs BL, Lee CT and Montie JE. 2010. Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA Cancer J Clin* 60:244-272
- Jalon Monzon A, Fernandez Gomez JM, Escaf Bramada S, Alvarez Mugica M, Garcia Rodriguez J and Regadera Sejas FJ. 2008. Therapeutic effect of mitomycin C in the immediate postoperative in patients with low-risk non-muscle-invasive bladder tumours. *Actas Urol Esp* 32:811-820
- Jamshidian H, Kor K and Djalali M. 2008. Urine concentration of nuclear matrix protein 22 for diagnosis of transitional cell carcinoma of bladder. *Urol J* 5:243-247
- Jauhainen K and Alfthan O. 1987. Instillation of mitomycin C and doxorubicin in the prevention of recurrent superficial (Ta-T1) bladder cancer. *Br J Urol* 60:54-59
- Jemal A, Siegel R, Xu J and Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60:277-300

- Jordan AM, Weingarten J and Murphy WM. 1987. Transitional cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading? *Cancer* 60:2766-2774
- Junker K, van Oers JM, Zwarthoff EC, Kania I, Schubert J and Hartmann A. 2008. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder tumors correlate with low frequency of chromosome alterations. *Neoplasia* 10:1-7
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, *et al.* 1995. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 12:213-219
- Kang JU, Koo SH, Jeong TE, Kwon KC, Park JW and Jeon CH. 2006. Multitarget fluorescence in situ hybridization and melanoma antigen genes analysis in primary bladder carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 164:32-38
- Karnwal A, Venegas R, Shuch B, Bassett J, Rajfer J and Reznichuk R. 2010. The role of fluorescence in situ hybridization assay for surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *Can J Urol* 17:5077-5081
- Kawauchi S, Sakai H, Ikemoto K, *et al.* 2009. 9p21 Index as estimated by Dual-Color Fluorescence in Situ Hybridization is useful to predict urothelial carcinoma recurrence in bladder washing cytology. *Hum Pathol* 40:1783-1789
- Khalbuss W and Goodison S. 2006. Immunohistochemical detection of hTERT in urothelial lesions: a potential adjunct to urine cytology. *Cytojournal* 3:18
- Khandelwal P, Abraham SN and Apodaca G. 2009. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F1477-501

- Kipp BR, Fritcher EG, del Rosario KM, Stevens CL, Sebo TJ and Halling KC. 2005a. A systematic approach to identifying urothelial cells likely to be polysomic by fluorescence in situ hybridization. *Anal Quant Cytol Histol* 27:317-322
- Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, *et al.* 2005b. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 173:401-404
- Kipp BR, Halling KC, Campion MB, *et al.* 2008. Assessing the value of reflex fluorescence in situ hybridization testing in the diagnosis of bladder cancer when routine urine cytological examination is equivocal. *J Urol* 179:1296-301
- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, *et al.* 2005. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66:4-34
- Knowles MA, Shaw ME and Proctor AJ. 1993. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 8:1357-1364
- Konety BR, Nguyen TS, Brenes G, *et al.* 2000. Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 164:634-639
- Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, *et al.* 2010. HYAL-1 hyaluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *Eur Urol* 57:86-93
- Kubota Y, Miyamoto H, Noguchi S, *et al.* 1995. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor-beta 1 gene expression in human bladder cancer. *J Urol* 154:371-374

- Lai Y, Ye J, Chen J, *et al.* 2010. UPK3A: a promising novel urinary marker for the detection of bladder cancer. *Urology* 76:514-517
- Laudadio J, Keane TE, Reeves HM, *et al.* 2005. Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. *BJU Int* 96:1280-1285
- Lee HO, Davidson JM and Duronio RJ. 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev* 23:2461-2477
- Lewis SA 2000. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:867-874
- Li M, Zhang ZF, Reuter VE and Cordon-Cardo C. 1996. Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 149:229-235
- Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, *et al.* 2000. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol* 163:348-356
- Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, *et al.* 2002. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer* 95:61-72
- Lopez-Beltran A and Cheng L. 2003. Stage pT1 bladder carcinoma: diagnostic criteria, pitfalls and prognostic significance. *Pathology* 35:484-491
- Lotan Y and Roehrborn CG. 2002. Cost-effectiveness of a modified care protocol substituting bladder tumor markers for cystoscopy for the followup of patients with

-
- transitional cell carcinoma of the bladder: a decision analytical approach. *J Urol* 167:75-79
- Lotan Y and Roehrborn CG. 2003. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 61:109-118
- Lotan Y, Svatek RS and Sagalowsky AI. 2006. Should we screen for bladder cancer in a high-risk population?: A cost per life-year saved analysis. *Cancer* 107:982-990
- Lotan Y, Bensalah K, Ruddell T, Shariat SF, Sagalowsky AI and Ashfaq R. 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* 179:2164-2169
- Matzkin H, Moinuddin SM and Soloway MS. 1992. Value of urine cytology versus bladder washing in bladder cancer. *Urology* 39:201-203
- Melissourgos N, Kastrinakis NG, Davilas I, Foukas P, Farmakis A and Lykourinas M. 2003. Detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in urine of patients with bladder cancer: evaluation of an emerging tumor marker. *Urology* 62:362-367
- Mengual L, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, *et al.* 2007. Clinical utility of fluorescent in situ hybridization for the surveillance of bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guerin therapy. *Eur Urol* 52:752-759

- Messing EM 1992. Growth factors and bladder cancer: clinical implications of the interactions between growth factors and their urothelial receptors. *Semin Surg Oncol* 8:285-292
- Mhaweck-Fauceglia P, Cheney RT and Schwaller J. 2006. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review. *Cancer* 106:1205-1216
- Mian C, Lodde M, Comploj E, *et al.* 2003. Liquid-based cytology as a tool for the performance of uCyt+ and Urovysion Multicolour-FISH in the detection of urothelial carcinoma. *Cytopathology* 14:338-342
- Mian C, Maier K, Comploj E, *et al.* 2006. uCyt+/ImmunoCyt in the detection of recurrent urothelial carcinoma: an update on 1991 analyses. *Cancer* 108:60-65
- Miladi M, Peyromaure M, Zerbib M, Saighi D and Debre B. 2003. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumours. *Eur Urol* 43:241-245
- Mitra AP, Datar RH and Cote RJ. 2006. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol* 24:5552-5564
- Mitra AP and Cote RJ. 2009. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol.* 4:251-285
- Mitra AP and Cote RJ. 2010. Molecular screening for bladder cancer: progress and potential. *Nat Rev Urol* 7:11-20
- Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S, Iwasaki Y and Kubota Y. 1995. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer* 71:831-835

- Miyamoto H, Miller JS, Fajardo DA, Lee TK, Netto GJ and Epstein JI. 2010. Non-invasive papillary urothelial neoplasms: the 2004 WHO/ISUP classification system. *Pathol Int* 60:1-8
- Mo L, Zheng X, Huang HY, *et al.* 2007. Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *J Clin Invest* 117:314-325
- Moatamed NA, Apple SK, Bennett CJ, *et al.* 2013. Exclusion of the uniform tetraploid cells significantly improves specificity of the urine fish assay. *Diagn Cytopathol* 41:218-225
- Montie JE, Clark PE, Eisenberger MA, *et al.* 2009. Bladder cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 7:8-39
- Moonen PM, Merckx GF, Peelen P, Karthaus HF, Smeets DF and Witjes JA. 2007. UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 51:1275-80
- Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, *et al.* 1991. Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol* 145:423-427
- Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. 1973. *Histological Typing of Urinary Bladder Tumours. International Classification of Tumours 10.* Geneva: World Health Organization
- Murphy WM, Soloway MS, Jukkola AF, Crabtree WN and Ford KS. 1984. Urinary cytology and bladder cancer. The cellular features of transitional cell neoplasms. *Cancer* 53:1555-1565
- Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA and Zeidel ML. 1996. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol* 271:F886-94

- Netto GJ and Cheng L. 2012. Emerging critical role of molecular testing in diagnostic genitourinary pathology. *Arch Pathol Lab Med* 136:372-390
- Oxford G and Theodorescu D. 2003. The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol* 170:1987-1993
- Pajor G, Sule N, Alpar D, *et al.* 2008. Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical preselection of uroepithelial cells. *Cytometry A* 73:259-265
- Parker J and Spiess PE. 2011. Current and emerging bladder cancer urinary biomarkers. *Scientific World Journal* 11:1103-1112
- Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, *et al.* 1996. A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer. *J Urol* 156:1934-40
- Pfister C, Chautard D, Devonec M, *et al.* 2003. Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urinary cytology: results of a French multicenter study. *J Urol* 169:921-924
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83(9): 2934–2938.
- Placer J, Espinet B, Salido M, Sole F and Gelabert-Mas A. 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* 42:547-552

- Planz B, Striepecke E, Jakse G and Bocking A. 1998. Use of Lewis X antigen and deoxyribonucleic acid image cytometry to increase sensitivity of urinary cytology in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 159:384-7
- Pode D, Golijanin D, Sherman Y, Lebensart P and Shapiro A. 1998. Immunostaining of Lewis X in cells from voided urine, cytopathology and ultrasound for noninvasive detection of bladder tumors. *J Urol* 159:389-92
- Pollard C, Smith SC and Theodorescu D. 2010. Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). *Expert Rev Mol Med* 12:e10
- Poulakis V, Witzsch U, De Vries R, Altmannsberger HM, Manyak MJ and Becht E. 2001. A comparison of urinary nuclear matrix protein-22 and bladder tumour antigen tests with voided urinary cytology in detecting and following bladder cancer: the prognostic value of false-positive results. *BJU Int* 88:692-701
- Prout GR, Jr, Wesley MN, McCarron PG, *et al.* 2004. Survival experience of black patients and white patients with bladder carcinoma. *Cancer* 100:621-630
- Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, *et al.* 1999. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* 161:388-394
- Reznikoff CA, Kao C, Messing EM, Newton M and Swaminathan S. 1993. A molecular genetic model of human bladder carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 4:143-152
- Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR, *et al.* 1996. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Semin Oncol* 23:571-584

- Richter J, Beffa L, Wagner U, *et al.* 1998. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 153:1615-1621
- Richter J, Wagner U, Schraml P, *et al.* 1999. Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Res* 59:5687-5691
- Rieger-Christ KM, Mourtzinos A, Lee PJ, *et al.* 2003. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. *Cancer* 98:737-744
- Rodgers MA, Hempel S, Aho T, Kelly JD, Kleijnen J and Westwood M. 2006. Diagnostic tests used in the investigation of adult haematuria: A systematic review. *BJU Int* 98:1154-1160
- Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg MP and Sidransky D. 1995. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res* 55:5213-5216
- Saad A, Hanbury DC, McNicholas TA, Boustead GB, Morgan S and Woodman AC. 2002. A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine. *BJU Int* 89:369-373
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, *et al.* 2003. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 163:505-516
- Sanchini MA, Gunelli R, Nanni O, *et al.* 2005. Relevance of urine telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *JAMA* 294:2052-2056

- Sandberg AA and Berger CS. 1994. Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol* 151:545-560
- Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, *et al.* 2002. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 168:1950-1954
- Sarosdy MF, Kahn PR, Ziffer MD, *et al.* 2006. Use of a multitarget fluorescence in situ hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol* 176:44-47
- Sasaki K, Hamano K, Kinjo M and Hara S. 1992. Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of bladder carcinomas. *Oncology* 49:219-222
- Sauter G, Carroll P, Moch H, *et al.* 1995. C-Myc Copy Number Gains in Bladder Cancer Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. *Am J Pathol* 146:1131-1139
- Savic S, Zlobec I, Thalmann GN, *et al.* 2009. The prognostic value of cytology and fluorescence in situ hybridization in the follow-up of nonmuscle-invasive bladder cancer after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy. *Int J Cancer* 124:2899-2904
- Schlomer BJ, Ho R, Sagalowsky A, Ashfaq R and Lotan Y. 2010. Prospective validation 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* 183:62-67

- Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL, *et al.* 1997. A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer. *J Urol* 158:801-805
- Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, *et al.* 2004. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J Urol* 171:135-138
- Schroeder GL, Lorenzo-Gomez MF, Hautmann SH, *et al.* 2004. A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *J Urol* 172:1123-1126
- Seripa D, Parrella P, Gallucci M, *et al.* 2001. Sensitive detection of transitional cell carcinoma of the bladder by microsatellite analysis of cells exfoliated in urine. *Int J Cancer* 95:364-369
- Sexton WJ, Wiegand LR, Correa JJ, Politis C, Dickinson SI and Kang LC. 2010. Bladder cancer: a review of non-muscle invasive disease. *Cancer Control* 17:256-268
- Shariat SF, Karam JA, Lotan Y and Karakiewicz PI. 2008. Critical evaluation of urinary markers for bladder cancer detection and monitoring. *Rev Urol* 10:120-135
- Sharma S, Ksheersagar P and Sharma P. 2009. Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician* 80:717-723
- Shaw GL and Bunce CJ. 2008. Fluorescence cystoscopy--how to do it. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 5:267-270
- Sherr CJ 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:731-737

-
- Siefker-Radtke AO, Dinney CP, Abrahams NA, *et al.* 2004. Evidence supporting preoperative chemotherapy for small cell carcinoma of the bladder: a retrospective review of the M. D. Anderson cancer experience. *J Urol* 172:481-484
- Silverman DT, Levin LI, Hoover RN and Hartge P. 1989. Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White men. *J Natl Cancer Inst* 81:1472-1480
- Simon R, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Terpe HJ and Bocker W. 2000. Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 17:1025-1029
- Siracusano S, Niccolini B, Knez R, *et al.* 2005. The simultaneous use of telomerase, cytokeratin 20 and CD4 for bladder cancer detection in urine. *Eur Urol* 47:327-333
- Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, *et al.* 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* 169:2101-2105
- Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, *et al.* 2000. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2:116-123
- Soloway MS, Sofer M and Vaidya A. 2002. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 167:1573-1583
- Stein JP and Skinner DG. 2006. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure. *World J Urol* 24:296-304
- Sun TT 2006. Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F9-21

- Svatek RS, Sagalowsky AI and Lotan Y. 2006. Economic impact of screening for bladder cancer using bladder tumor markers: a decision analysis. *Urol Oncol* 24:338-343
- Sylvester RJ, van der MEIJDEN AP and Lamm DL. 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* 168:1964-1970
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA and Kurth K. 2005. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 174:86-91
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, *et al.* 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* 49:466-5
- Talwar R, Sinha T, Karan SC, *et al.* 2007. Voided urinary cytology in bladder cancer: is it time to review the indications? *Urology* 70:267-271
- Tapia C, Glatz K, Obermann EC, *et al.* 2011. Evaluation of chromosomal aberrations in patients with benign conditions and reactive changes in urinary cytology. *Cancer Cytopathol* 119:404-410
- Tetu B, Tiguert R, Harel F and Fradet Y. 2005. ImmunoCyt/uCyt+ improves the sensitivity of urine cytology in patients followed for urothelial carcinoma. *Mod Pathol* 18:83-89

- Tritschler S, Sommer ML, Straub J, *et al.* 2010. Urinary cytology in era of fluorescence endoscopy: redefining the role of an established method with a new reference standard. *Urology* 76:677-680
- Van Le TS, Miller R, Barder T, Babjuk M, Potter DM and Getzenberg RH. 2005. Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology* 66:1256-1260
- van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH and Zwarthoff EC. 2001. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res* 61:1265-1268
- van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, *et al.* 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* 21:1912-1921
- van Rhijn BW, van der Poel HG and van der Kwast TH. 2005. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 47:736-748
- Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria MV and Crawford ED. 2004. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol* 22:16-19
- Vineis P and Simonato L. 1991. Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation a systematic approach. *Arch Environ Health* 46: 6–15, 1991. 46:6-15
- Voss JS, Kipp BR, Krueger AK, *et al.* 2008. Changes in specimen preparation method may impact urine cytologic evaluation. *Am J Clin Pathol* 130:428-433

- Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC, *et al.* 1997. Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 151:753-759
- Wakui M and Shiigai T. 2000. Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cell volume distribution. *Int J Urol* 7:248-253
- Whitson J, Berry A, Carroll P and Konety B. 2009. A multicolour fluorescence in situ hybridization test predicts recurrence in patients with high-risk superficial bladder tumours undergoing intravesical therapy. *BJU Int* 104:336-339
- Wu XR 2005. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 5:713-725
- Wu XR 2009. Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. *Cancer Metastasis Rev* 28:281-290
- Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G and Sun TT. 2009. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int* 75:1153-1165
- Wynder EL and Goldsmith R. 1977. The epidemiology of bladder cancer: a second look. *Cancer* 40:1246-1268
- Yafi FA, Brimo F, Auger M, Aprikian A, Tanguay S and Kassouf W. 2013. Is the performance of urinary cytology as high as reported historically? A contemporary analysis in the detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Oncol* [Epub ahead of print]
- Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, *et al.* 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 127:295-301

Yoo JH, Suh B, Park TS, *et al.* 2010. Analysis of fluorescence in situ hybridization, mtDNA quantification, and mtDNA sequence for the detection of early bladder cancer. Cancer Genet Cytogenet 198:107-117

Zellweger T, Benz G, Cathomas G, *et al.* 2006. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. Int J Cancer 119:1660-1665

Zhao X, Li C, Paez JG, *et al.* 2004. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. Cancer Res 64:3060-3071

ANEXOS

Anexo 1: Características clínicopatológicas de los pacientes 222 analizados en el estudio. Resultado de las técnicas analizadas.

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
1	Hombre	25	4	21	2					N	N	N	N	N	N	
2	Hombre	23	3	20						N	N	N	N	N	N	
4	Hombre				1		1	4	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
5	Hombre	1	1		6		1			N	N	N	N	N	N	
6	Hombre				7		2	2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
7	Hombre	1			3			4	3 i 7	N+	N	N	N	N	N	
8	Hombre	38	3	36	1			4	3 i 7	N+	N	N	N	N	N	
9	Hombre	14	3	11	4			2	3,7,17	N	N	N	N	AC	P	Negativo (reactivo)
10	Hombre	6	5	1	18			5	3,7,17	P	P	N	P	N	N	Lesiones electrofulguradas (invasivo)
11	Hombre	12	4	8	2			14	3,7,17	P	N	N	P	N	N	
12	Hombre	12		12			1			N	N	N	N	N	N	
13	Hombre	13	6	7	8		4	9	3,7,17	P	N+	N	P	N	N	
14	Mujer	43	5	38	2			1	3 i 7	N	N	N+	N	N	N	
15	Hombre	32		32	3			1	3 i 7	N	N	N	N	N	N	
16	Mujer	1			1			5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	Lesiones electrofulguradas
17	Mujer	17	5	12	1			1	3 i 7	N	N	N	N	N	N	
18	Hombre	8		8				4	3 i 17	N+	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
19	Hombre	30		30						N	N	N	N	N	N	
20	Hombre							10	3,7,17	P	N	N	P	AC	N	CIS
22	Hombre	7	1	6	7			5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	Negativa (reactiva)
23	Hombre	33	7	26			3			N	N	N	N	N	N	
25	Hombre	5			2			9	3,7 + 3, 7,17	P	N	N	P	N	N	G1 (bajo grado) Ta
26	Hombre	17	5	12				2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
27	Hombre									N	N	N	N	N	N	
28	Hombre	2	2		2			5	3,7,17	P	N	N	P	N	N	G1 (bajo grado) Ta (38.5 meses)
29	Hombre	23	2	21	5					N	N	N	N	N	N	
30	Hombre									N	N	N	N	N	N	
31	Hombre									N	N	N	N	N	N	
32	Mujer	3	2	1	3			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
33	Hombre									N	N	N	N	N	N	
34	Hombre	4						6	3,7,17	P	N	N	P	N	P	Negativa (reactiva)/G1 (bajo grado) Ta (37.1 meses)
35	Hombre	35			5					N	N	N	N	N	N	
36	Hombre	4		4	8					N	N+	N	N	N	N	
37	Mujer	33	1	32						N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
38	Hombre	31		31				5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G2 (alto grado) Ta
39	Hombre	21		21				2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
41	Hombre				8		3			N	N+	N	N	N	N	
42	Hombre	4	1	3	2		1	6	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G2 (alto grado) Ta
43	Hombre									N	N	N	N	N	N	
44	Hombre	9	2	7	1			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
45	Hombre	5		5	1			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
46	Mujer									N	N	N	N	N	N	
47	Hombre									N	N	N	N	N	N	
48	Hombre	12		12				3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
49	Hombre	4	2	2						N	N	N	N	N	N	
50	Hombre	2	1	1	8	8				N	N+	N	N	N	P	Negativa (reactiva)
51	Hombre									N	N	N	N	N	N	
52	Mujer	6	6		1			3	3.17	N+	N	N	N	N	P	Negativa (reactiva)
53	Hombre	17	3	14	1					N	N	N	N	N	N	
54	Hombre	2	1	1	5			4	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
55	Hombre	1		1	3	2		3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
56	Hombre									N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
57	Hombre	5		5	4			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
58	Hombre	10		10	12			3	3,7,17	N+	P	N	P	N	P	G2 (alto grado) Ta
60	Hombre	8		8	4			1	3 i 7	N	N	N	N	N	N	
61	Hombre	9	1	8	4			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
62	Hombre	15			2			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
63	Hombre	12	2	10				3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
64	Mujer	6	2	4				5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	Lesión electrofulgurada
65	Mujer	18	2	16	4			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
66	Hombre	10	4	6	6			2	3,7,17	N	N	N	N	N	P	No se observa tumor
67	Hombre	9	1	8	2	1		7	3,7,17	P	N	N	P	N	N	
68	Hombre	4		4	1	1		1	3 i 7	N	N	N	N	N	N	
69	Mujer	25	1	24			1		0	N	N	N	N	N	N	
70	Hombre	1	1		2			4	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
72	Hombre	18						1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
73	Hombre	9			1			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
74	Hombre	1		1				4	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
75	Hombre	8			1					N	N	N	N	N	P	Lesión electrofulgurada
76	Hombre	1		1	4			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
77	Hombre	20	5	15	1					N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
78	Mujer	7								N	N	N	N	N	P	Negativa (Reactiva)
79	Mujer	13								N	N	N	N	N	N	
80	Hombre									N	N	N	N	N	N	
81	Mujer	4	2	2				2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
82	Mujer	6							0	N	N	N	N	N	N	
83	Hombre	4			1			9	3,7,17	P	N	N	P	AC	P	G2 (alto grado) Ta
84	Hombre	1						1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
85	Hombre	1								N	N	N	N	N	N	
86	Hombre	2	2		5			6	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado) Ta
87	Hombre	18	1	17	1			5	3 i 7	P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado) Ta
88	Hombre	8	1	7				2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
89	Hombre	48	2	46				3	3,7,17	N+	N	N+	N	N	P	Negativa (reactiva)
90	Hombre	23	1	22		1		5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado) Ta
91	Hombre	20	4	16				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
92	Hombre	19	3	16				4	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
93	Hombre									N	N	N	N	N	N	
94	Hombre	2		2	1			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
95	Hombre	13	1	12			1			N	N	N	N	N	N	
96	Hombre	24	1	23						N	N	N	N	N	N	
97	Hombre	15		15						N	N	N	N	N	N	
100	Hombre	1		1			2			N	N	N	N	N	N	
101	Hombre	12		12						N	N	N	N	N	N	
102	Hombre	16	2	14				3	3,7,17	N+	N	N	N	AC	N	
104	Hombre	20	10	10	1	1	1	1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
105	Hombre	2	1	1	1			5	3,7,17	P	N	N	P	N	N	
106	Hombre	28	1	27	2					N	N	N	N	N	N	
107	Hombre	30	6	24				3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
108	Hombre	44	5	39				4	3,7,17	N+	N	N+	N	N	N	
109	Mujer		9	1	2		1	1	3.17	N	N	N	N	N	P	Negativa (reactiva)
111	Hombre									N	N	N	N	N	N	
112	Mujer	24	1	23			1	5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	Negativa (reactiva) / G1 (bajo grado) Ta (36.1 meses)
113	Hombre	13	2	11	1			2	3,7,17	N	N	N	N	N	P	NUBPM
114	Mujer	24	9	15						N	N	N	N	N	P	Lesión electrofulgurada
115	Hombre									N	N	N	N	N	N	
116	Mujer									N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
118	Mujer	12	7	5		1		3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
119	Hombre	18	1	17	2					N	N	N	N	N	N	
120	Hombre	29	3	26						N	N	N	N	N	N	
122	Hombre	14	4	10						N	N	N	N	N	N	
128	Mujer	13	5	8	1			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
130	Hombre	31		31	1		1	2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
133	Mujer	19	4	15				7	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G2 (alto grado) T1
134	Hombre	9	2	7				8	3,7,17	P	N	N	P	AS	N	CIS
135	Hombre	3		3	1			6	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado) Ta
136	Hombre									N	N	N	N	N	N	
137	Hombre	15	6	9	1	1	2			N	N	N	N	N	N	
138	Hombre	25	5	20	2			5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado) Ta
139	Hombre	15	1	14				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
140	Hombre	7	2	5		1		3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
141	Mujer	4		4						N	N	N	N	N	N	
142	Hombre	20	2	18		1		1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
143	Hombre	16	7	9	3			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
144	Mujer	12	1	11	3			5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado)Ta
145	Mujer	16	1	15						N	N	N	N	N	N	
146	Hombre	24	10	14	4			6	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G3 (alto grado) T1
147	Hombre									N	N	N	N	P	N	No se observa tumor
148	Mujer	21		21		1				N	N	N	N	N	N	
149	Hombre	27	4	23	4			1	3 i 17	N	N	N	N	N	N	
150	Hombre	7	6	1	1			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
151	Hombre	14		14	2			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
154	Hombre									N	N	N	N	N	N	
155	Hombre	45		45	1			1	3,7,17	N	N	N+	N	N	N	
156	Hombre	3		3				5		P	N	N	P	N	P	G2 (alto grado) Ta
157	Hombre									N	N	N	N	N	N	
158	Hombre	13	8	5						N	N	N	N	N	N	
159	Hombre		3							N	N	N	N	N	N	
160	Hombre		20	8				2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
161	Hombre	15	2	13				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
162	Hombre	4		4	1			5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G2 (alto grado) Ta

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
164	Hombre	24	4	20	3			4	3,7,17	N+	N	N	N	N	P	G1 (bajo grado) Ta
165	Hombre	18	3	15				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
166	Hombre	6		6	1			1	3.7	N	N	N	N	N	N	
167	Mujer	19	2	17						N	N	N	N	N	N	
168	Hombre	8		8	6	1	1	1	3.17	N	N	N	N	N	P	Lesión electrofulgurada
169	Mujer	6	4	2	3					N	N	N	N	N	N	
170	Hombre	4	2	2						N	N	N	N	N	N	
171	Hombre									N	N	N	N	N	N	
172	Hombre	20	1	19	3			4	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
173	Hombre	19	1	18	3			4	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
174	Mujer	19	1	18		3		6	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G3 (alto grado) Ta
175	Hombre	19	2	17				70	3,7,17	P	N	N	P	P	P	G2 (alto grado) Ta
176	Hombre									N	N	N	N	N	N	
177	Hombre	3	1	2	2					N	N	N	N	N	N	
178	Hombre									N	N	N	N	N	N	
179	Hombre									N	N	N	N	N	N	
180	Hombre	18		18	4			5	3,7,17	P	N	N	P	N	N	G1 (bajo grado) Ta

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
181	Hombre							5		P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado) Ta
182	Hombre	1	1					16	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G1 (bajo grado) Tx
183	Hombre	22	5	17	1	1		1	3,7,17	N	N	N	N	N	P	No se observa tumor
184	Hombre	8	2	6				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
186	Hombre	3		3						N	N	N	N	N	N	
187	Hombre	1		1						N	N	N	N	N	N	
188	Hombre	9	1	8						N	N	N	N	N	N	
189	Hombre	1		1						N	N	N	N	N	N	
190	Hombre	7		7						N	N	N	N	N	N	
191	Hombre									N	N	N	N	N	N	
192	Hombre									N	N	N	N	N	N	
193	Hombre	13	2	11						N	N	N	N	N	N	
194	Hombre		2	2						N	N	N	N	N	N	
195	Hombre	5	2	3	1			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
196	Mujer	9	4	5				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
197	Hombre	1	1					3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
198	Hombre							1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
199	Hombre	26		26		3				N	N	N	N	N	P	No se observa tumor

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
200	Hombre	9		9	1	1				N	N	N	N	N	N	
201	Mujer	5	4	1	3					N	N	N	N	N	N	
202	Hombre	12	1	11	1					N	N	N	N	N	N	
203	Hombre				1			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
204	Mujer	14	5	9					0	N	N	N	N	N	N	
205	Hombre	10	3	7	1				0	N	N	N	N	N	N	
206	Hombre	26	2	24					0	N	N	N	N	N	N	
207	Hombre	8	2	6				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
208	Hombre	10	5	5						N	N	N	N	N	N	
209	Hombre	1		1	1					N	N	N	N	N	N	
210	Hombre	5	1	4	1			5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	NUBPM
211	Mujer	2		2				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
212	Hombre									N	N	N	N	N	N	
213	Hombre	5	2	3	1			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
214	Mujer	1		1	2			2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
215	Hombre				1			2		N	N	N	N	N	N	
216	Hombre	3	1	2				5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	Negativa (reactiva)
217	Hombre	1	1		2	1	1	8	3,7,17	P	N	N	P	P	P	G3 (alto grado) Ta
218	Hombre	6	3	3	5					N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
219	Mujer	2	1	1	5			5	3,7,17	P	N	N	P	N	P	G2 (alto grado) Ta
220	Mujer	2	2	2		1		1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
221	Hombre	9	2	7						N	N	N	N	N	N	
222	Hombre	5		5	1			1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
223	Hombre	26	11	15						N	N	N	N	N	N	
224	Hombre	2		2				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
225	Hombre				2	1		13	3,7,17	P	N	N	P	N	N	
226	Hombre									N	N	N	N	N	N	
227	Hombre	4	1	3				2	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
228	Mujer	2		2				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
229	Hombre	2	1	1						N	N	N	N	N	N	
230	Mujer									N	N	N	N	N	P	No se observa tumor
231	Hombre	1		1				3	3,7,17	N+	N	N	N	N	N	
232	Hombre	10		10				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
233	Hombre	6	3	3				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
234	Hombre	11	2	9				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
235	Hombre	12	2	10				1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
236	Hombre	9		9						N	N	N	N	N	N	
237	Hombre	6	2	3	3	1		1	3,7,17	N	N	N	N	N	N	
238	Hombre									N	N	N	N	N	N	

ID	Sexo	del(9p21)			Alteración 1 cr.			Alteración > 2 cr.		Criterio polisomía >1 cr. (P1)	Criterio ganancia 1 cr. (P2)	Criterio 9p21 (P3)	FISH	Citología	Cistoscopia	Recurrencia (Biopsia)
		del(9p) Total N° Cél. Alt.	Het 9p21 N° Cél. Alt.	Homo 9p21 N° Cél. Alt.	Cr.3 N° Cél. Alt.	Cr.7 N° Cél. Alt.	Cr.17 N° Cél. Alt.	N° Cél. Alt	Cr. Afectados							
240	Hombre							5	3,7,17	P	N	N	P	N	N	
241	Hombre	10	2	8	4			5	3,7,17	P	N	N	P	P	N	G2 (alto grado) Ta
242	Mujer									N	N	N	N	N	N	
243	Hombre	11	4	7						N	N	N	N	N	N	
244	Hombre									N	N	N	N	N	N	
246	Hombre	9	1	8	1			5	3,7,17	P	N	N	P	N	N	
249	Hombre						2			N	N	N	N	N	N	
250	Hombre									N	N	N	N	N	P	Negativa (Reactiva)

Abreviaturas: ID: Identificador paciente; Het 9p21: Delección heterocigota de 9p21; Homo 9p21: Delección homocigota de 9p21. N° Cél Alt.: Número de células que presentan una determinada alteración; Cr: Cromosoma; N: Negativo; P: Positivo; P1: Positivo según criterio de 5 células o más con polisomía (ganancia de dos o más cromosomas), P2: Positivo según criterio de 10 células o más con ganancia de un único cromosoma (siempre el mismo); P3: Positivo según criterio de 50% de núcleos con pérdida homocigota o heterocigota de 9p21; AC: Citología sospechosa; AS: Atipia sospechosa.

 N° de células alteradas elevado aún sin cumplir criterios de positividad: Para criterio polisomía 3 o más, para criterio ganancia 8 o más, para criterio de pérdida de 9p21, 25 o más

 Casos positivos

Anexo 2: Publicación

A Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization Assay: A Monitoring Tool in the Surveillance of Patients With a History of Non-Muscle-Invasive Urothelial Cell Carcinoma

A Prospective Study

Ana B. Galván, MSc^{1,2}; Marta Salido, MSc¹; Blanca Espinet, PhD¹; José Placer, MD, PhD³; Lara Pijuan, MD, PhD⁴; Núria Juanpere, MD⁴; Josep Lloreta, MD, PhD^{4,5}; Francesc Solé, PhD¹; and Antoni Gelabert-Mas, MD, PhD⁶

BACKGROUND: Non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma (NMIUCC) has a high tendency to recur and affected patients must be monitored regularly using invasive cystoscopies. The aim of the current study was to compare a multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) assay (UroVysion) with routine follow-up (cystoscopy and cytology) in the monitoring of patients with a previous history of NMIUCC. **METHODS:** An unselected cohort of patients under surveillance for a previous history of NMIUCC was prospectively studied. A total of 248 examinations in 223 patients were analyzed. Each exploration was comprised of cytological and FISH microscopic examination of voided urine samples and cystoscopy. The sensitivity, specificity, and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values for tumor recurrence of all 3 techniques were determined. **RESULTS:** The sensitivities of FISH and cystoscopy were not found to be significantly different (92.9% and 82.1%, respectively). The specificities of FISH and cystoscopy were 92.7% and 89.7%, respectively. The PPV and NPV of FISH were 53.5% and 97.2%, respectively, whereas those of cystoscopy were 63.4% and 98.9%, respectively. No significant differences were found between these 2 tests. In contrast, the sensitivity and specificity of cytology were 14.3% and 99.5%, respectively. **CONCLUSIONS:** Given the lack of statistically significant differences with regard to FISH and cystoscopy results, the authors propose that FISH could be a useful monitoring tool in the surveillance of patients with a previous history of NMIUCC. *Cancer (Cancer Cytopathol) 2011;000:000-000. © 2011 American Cancer Society.*

Corresponding author: Antoni Gelabert-Mas, MD, PhD, Department of Urology Hospital del Mar, Parc de Salut MAR, Barcelona, Spain; Fax: (011) 034 93 248 34 33; agelabert@parcdesalutmar.cat

¹Molecular Cytogenetics Laboratory, Department of Pathology, Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain; ²Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Urology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; ⁴Department of Pathology, Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain; ⁵Department of Health and Experimental Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain; ⁶Department of Urology, Hospital del Mar, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

We thank the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC). We also thank Sergi Mojal for his help with the statistical analysis and Rocío Salgado for her help with fluorescence in situ hybridization analysis.

Received: January 7, 2011; **Revised:** April 14, 2011; **Accepted:** April 19, 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cncy.20168, wileyonlinelibrary.com

KEY WORDS: UroVysion, bladder, urothelial cell carcinoma, fluorescence in situ hybridization (FISH), cystoscopy, cytology, urine.

Non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma (NMIUCC) is associated with a high rate of disease recurrence (60%-85%) and progression to high-grade lesions (10%-30%), and therefore these patients must be monitored regularly.¹ The gold standard for NMIUCC surveillance is cystoscopy in conjunction with urine cytology.² White-light cystoscopy remains the primary mode of diagnosing and monitoring bladder cancer, but the procedure is expensive, invasive, and causes patient discomfort and anxiety.³ Although this technique has a specificity of > 90%, carcinoma in situ (CIS) and flat lesions, as well as upper urinary tract lesions, may be missed.^{4,5} Cytology is noninvasive and offers high specificity, although it has low sensitivity in the diagnosis of low-grade papillary tumors. Meticulous surveillance is required for the early detection of disease recurrence and progression, and consequently, NMIUCC is one of the most expensive malignancies to manage.⁶ For all these reasons, multiple noninvasive assays for the detection of NMIUCC recurrence have been developed.⁷

The UroVysion assay is a multitargeted fluorescence in situ hybridization (FISH) technique designed to detect chromosomal aberrations associated with bladder cancer: aneuploidies of chromosomes 3, 7, and 17 and loss of 9p21. Previous studies have demonstrated that UroVysion has higher sensitivity than cytology and a similar specificity.⁸⁻¹⁴ In addition, these parameters are not affected in reactive benign conditions, urinary infection, hematuria, and bacillus Calmette-Guerin therapy.¹⁵⁻¹⁷

The objective of the current study was to determine the FISH value in an unselected cohort of patients under surveillance for NMIUCC in a routine clinical setting. The main question to be addressed was whether FISH of voided urine specimens had the same ability as cystoscopy and cytology to detect disease recurrence in patients with NMIUCC.

MATERIALS AND METHODS

Patient Population

This prospective and blind study was conducted in the Departments of Urology and Pathology at the Hospital del Mar in Barcelona, Spain. Consecutive patients who underwent a follow-up flexible cystoscopy between November 2007 and November 2008 because of a history of NMIUCC were included. The local ethics committee approved the study and written informed consent was obtained from all patients according to the Declaration of Helsinki.

Before white-light cystoscopy was performed, a spontaneous voided urine sample was collected from all patients for FISH and cytological analyses. A total of 248 follow-up examinations in 223 patients were performed. The study population was comprised of 182 (81.6%) men and 41 (18.4%) women (median age, 72.9 years [range, 31-91 years]). The median disease-free survival until inclusion in the study was 25.6 months (range, 2.5 months-60 months). The histopathological features of the last tumor studied before inclusion of the patients in the study are shown in Table 1.

Patients were followed after the study using standard routine follow-up methods (cystoscopy in combination with cytology) as recommended by current guidelines, regardless of their inclusion in the study and the FISH results. Follow-up time was recorded as the time between inclusion in the study and histological confirmation of a tumor or last monitoring of the patient. The median follow-up of the patients was 8 months (range, 0 months - 18.1 months).

Cystoscopy

White-light cystoscopy results were scored as negative if findings were normal and as positive in those cases in which there was apparent disease recurrence. However, suspected/unconfirmed results were judged as being positive if the suspicion led to a transurethral resection of the bladder (TURB).

Table 1. Histopathological Features of the Last Tumor Examined Before the Inclusion of Cases in the Study

Feature	No.	%
Tumor stage		
Tx	9	4.0
Ta	185	83.0
T1	25	11.2
Tis	4	1.8
Tumor grade (WHO 2004)		
PUNLMP	1	0.4
Low grade	77	34.5
High grade	133	59.6
Unclassified	12	5.4
Tumor grade (WHO 1973)		
1	75	33.6
2	93	41.7
3	49	22.0
Gx	6	2.7
Tumor size, cm		
<1	74	33.2
1-3	99	44.4
>3	43	19.3
Unknown	7	3.1

Abbreviations: PUNLMP, papillary urothelial neoplasm of low malignant potential; WHO, World Health Organization.

TURB and Biopsy

Patients with positive cystoscopy and/or cytology results underwent TURB. Biopsies were obtained in patients with suspicious lesions. All pathology findings were evaluated by a single pathologist in accordance with the 1973 and 2004 World Health Organization classifications.

Cytology

Specimens were obtained from spontaneously voided urine before cystoscopic procedures. Urine samples were prepared using a liquid-based cytology technique (Thin-Prep; Hologic Inc, Bedford Mass). Cytology was considered as positive if malignant cells or cells with atypical changes suggesting malignancy were found, and was regarded as negative in cases with mild to moderate atypical changes. Patients with positive cytology findings underwent TURB.

FISH With UroVysion

Specimens were obtained from spontaneously voided urine before cystoscopic procedures. Urine samples were prepared using ThinPrep. FISH pretreatment was performed according to the instructions of the Vysis FISH

Pretreatment Reagent Kit (Abbott Molecular, Abbott Park, Ill). Hybridization, posthybridization washings, and counterstaining were performed as described by Placer et al.⁹

An independent operator blinded to the results of cystoscopy, cytology, and biopsy scored the slides. Samples were evaluated by scanning at least 100 urothelial cell nuclei and registering the morphology pattern of the nucleus (normal vs abnormal). Simultaneously, we tried to analyze at least 25 morphologically abnormal cells as previously reported.^{8,10-12}

We adopted the positivity criteria described by Halling et al,¹⁸ with minor modifications: 1) identification of ≥ 5 cells with polysomy (gains of ≥ 2 chromosomes in 1 nucleus); 2) > 10 nuclei gaining a single chromosome; or 3) the presence of $> 50\%$ of nuclei, with losses of 1 or both 9p21 signals.

Statistical Analysis

We considered each cystoscopy result and its corresponding FISH and cytology analyses (all performed at the same time) to be an independent case. FISH results did not alter the clinical behavior and therefore, only cases with positive cystoscopy and/or cytology led to a TURB and biopsy. Patients were followed after the study using the standard routine follow-up methods (cystoscopy in combination with cytology) as recommended by current guidelines, regardless of their inclusion in the study.

We compared all the techniques (FISH, cystoscopy, cytology, and routine follow-up [cystoscopy in conjunction with cytology]) with the histological features of the biopsy obtained by TURB performed because of positive cystoscopy and/or cytology. Moreover, we included malignant lesions detected ≤ 1 year after inclusion in the study as histologically confirmed tumors. These tumors could be detected during the subsequent monitoring study (cystoscopy and/or cytology) or after new symptoms of disease recurrence (including tumors that could not be detected by cystoscopy and/or cytology [false-negative result] and/or the anticipatory result of FISH).

This analysis allowed us to determine the sensitivity and specificity of FISH, cystoscopy, cytology, and routine follow-up using as the gold standard the presence of a tumor detected during the first year after inclusion in the study.

Contingency table analysis was used to calculate the sensitivity, specificity and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of routine follow-up, cystoscopy, cytology, and FISH. A 95% confidence interval was calculated using the exact method. Differences in sensitivity and specificity were calculated using the McNemar test.

RESULTS

A total of 248 follow-up events occurring among 223 patients were included in the study. Because of an insufficient number of urothelial cells or other technical reasons, 24 of 248 (9.7%) samples could not be evaluated by FISH and 2 (0.8%) could not be evaluated by cytology. These patients were excluded in the statistical analysis. Therefore, 222 of 248 follow-up events (89.5%) were considered technically adequate and were included in the statistical analysis.

With regard to FISH results, in all evaluable samples (224 of 248) we could count 100 urothelial cells (comprehensive analysis). However, when we attempted to select morphologically abnormal cells, 92 of 224 (41%) samples presented < 25 morphologically suspicious nuclei (morphologically normal or presented with minimally atypical cells). It is interesting to note that 6 of 92 nonmorphologically suspicious samples were positive when comprehensive analysis was performed. In these cases, cells presenting with an aberrant chromosomal pattern did not demonstrate a morphologically abnormal pattern (Fig. 1). Therefore, we included in the statistical analysis the results of the comprehensive analysis regardless of the cell morphology.

The FISH test was positive in 41 of 222 (18.5%) cases and negative in 181 (81.5%) cases. Polysomy was found in 40 samples whereas aneuploidy of chromosome 3 was found in only 1 case. Loss of 9p21 was not found as a single event in any case. Cystoscopy results were defined as positive in 43 of 222 cases (19.4%) and negative in 179 (80.6%) cases. Cytology was considered positive in 5 (2.3%) cases.

Considering the routine follow-up (combination of cytology and cystoscopy results), 46 of 222 (20.7%) cases were considered positive (41 by cystoscopy, 3 by cytology, and 2 by both tests). All patients with positive routine follow-up results underwent TURB. Five lesions were treated by electrocauterization during the resection

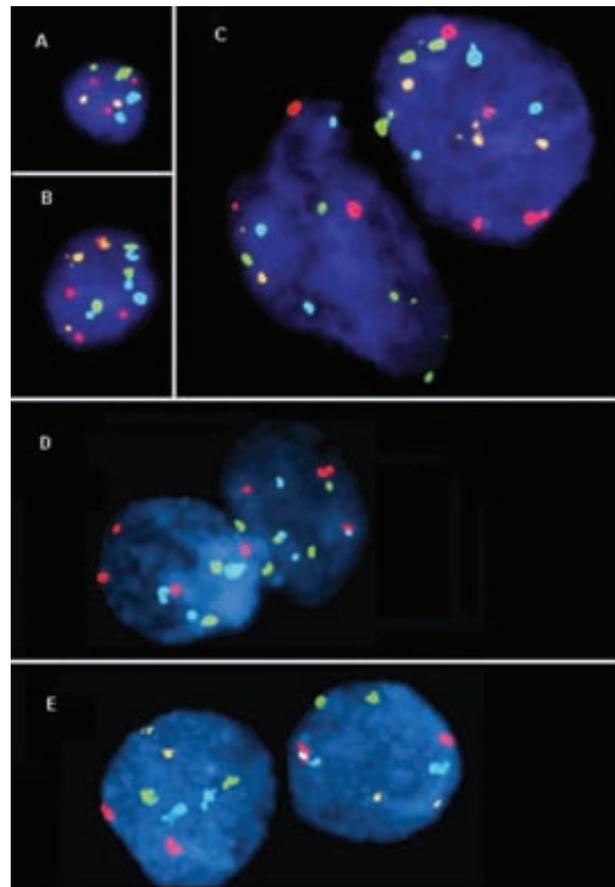


FIGURE 1. Fluorescence in situ hybridization (FISH) images of non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma cells are shown ($\times 1000$). (A) An abnormal cell demonstrating 3 copies of chromosomes 3 (red signals) is shown. (B) A cell demonstrating an abnormal chromosomal pattern (aneuploidy of chromosomes 3, 7, 9, and 17) is shown. (C) Morphologically and genetically abnormal cells demonstrating aneuploidies of chromosomes 3, 7, 9, and 17 are shown. (D) Morphologically and genetically abnormal cells demonstrating both aneuploidies of chromosomes 3, 7, and 17 and homozygous deletion of the 9p21 locus are shown (no spectrum gold signals were noted). (E) Normal cells demonstrating 2 chromosomes 3 (spectrum red), 2 chromosomes 7 (spectrum green), 2 chromosomes 17 (spectrum aqua), and 2 9p21 loci (spectrum gold) are shown.

process without retrieving biopsy material because of their small size. In 9 cases, there were no suspicious lesions noted in the TURB and in 7 cases the lesion was determined to be benign. Histologically confirmed tumors were verified in 25 cases (Table 2). FISH correctly detected 23 of the 25 cases and could not detect 2 cases.

Cystoscopy identified all tumors except 1 CIS and 1 grade 2 pTa tumor (high grade) that were able to be identified using cytology. Moreover, cytology and cystoscopy were able to identify 1 grade 3 pTa tumor (high grade).

Table 2. Histological Features of Biopsy-Proven Recurrences and Results Provided by the Different Methods

Biopsy-Proven Recurrences Detected by Routine Follow-Up					
Patient No.	Cystoscopy	Cytology	FISH	Pathology	Size, cm
175	Positive	Positive	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	>3
217	Positive	Positive	Positive	Grade 3 (high-grade), Ta	>3
113	Positive	Negative	Negative	PUNLMP	<1
210	Positive	Negative	Positive	PUNLMP	1-3
164	Positive	Negative	Negative	Grade 1 (low-grade), Ta	1-3
86	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	<1
87	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade) Ta	1-3
90	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	1-3
135	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	<1
138	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	1-3
144	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	Unknown
181	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	Unknown
182	Positive	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Tx	<1
133	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), T1	1-3
38	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	1-3
42	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	1-3
58	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	>3
83	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	<1
156	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	<1
162	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	1-3
219	Positive	Negative	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	1-3
146	Positive	Negative	Positive	Grade 3 (high-grade), T1	1-3
174	Positive	Negative	Positive	Grade 3 (high-grade), Ta	<1
241	Negative	Positive	Positive	Grade 2 (high-grade), Ta	1-3
134	Negative	Positive	Positive	CIS	Unknown
Biopsy-Proven Recurrences Detected During the Monitoring					
25	Negative	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	<1
180	Negative	Negative	Positive	Grade 1 (low-grade), Ta	<1
20	Negative	Negative	Positive	CIS	<1

Abbreviations: CIS, carcinoma in situ; FISH, fluorescence in situ hybridization; PUNLMP, papillary urothelial neoplasm of low malignant potential.

FISH identified all tumors except 1 papillary urothelial neoplasm of low malignant potential and 1 grade 1 pTa tumor (low grade).

During the follow-up of the 198 patients with negative cystoscopy and cytology findings, 4 patients presented with disease recurrence an average of 6.1 months after the study analysis (Table 2). A monitoring study after the onset of symptoms in 1 patient was able to detect CIS. In the remaining 3 cases, a tumor was detected in the subsequent monitoring analysis. Two of these tumors were histologically classified as grade 1 pTa tumors (low grade) and in the last case the subsequent follow-up cystoscopy revealed an invasive recurrence. Because of the high risk of the biopsy-resection process for the patient, the tumor was electrocauterized. FISH analysis was found to be positive in these 4 patients.

A statistical analysis including all those patients who developed disease recurrence during the follow-up period was performed. In this statistical analysis, we used as the gold standard the presence of a tumor detected within the first year after inclusion in the study. The sensitivity, specificity, and PPV and NPV results for each technique are shown in Table 3. Nonsignificant differences for sensitivity and specificity were found between cystoscopy and FISH. Sensitivity ($P = .000$) of cytology was found to be significantly lower and specificity was significantly higher ($P = .001$) when they were compared with FISH. The combination of FISH and cystoscopy techniques resulted in a higher sensibility than FISH and cystoscopy alone. However, this combination demonstrated a statistically lower specificity ($P = .004$ and $P = .000$, respectively, for cystoscopy and FISH).

Table 3. Overall Sensitivity, Specificity, and Predictive Values Obtained With FISH and Cystoscopy

	Cystoscopy			FISH			Cytology			Cystoscopy + FISH		
	No. of Cases	Value, %	95% CI	No.	Value, %	95% CI	No.	Value, %	95% CI	No.	Value, %	95% CI
Sensitivity	23/28	82.1	63.1-93.9	26/28	92.9	72.7-97.8	4/28	14.3 ^a	0.4-32.7	28/28	100	87.7-100
Specificity	174/194	89.7	84.5-93.6	179/194	92.7	87.6-95.6	193/194	99.5 ^a	97.2-100	165/194	85.1 ^a	79.2-89.8
PPV	23/43	53.5	37.7-68.8	26/41	63.4	46.9-77.9	4/5	80.0	28.4-99.5	28/57	49.1	35.6-62.7
NPV	174/179	97.2	93.6-99.1	179/181	98.9	96.1-99.9	193/217	88.9	84.8-93.1	165/165	100	97.8-100

Abbreviations: 95% CI, 95% confidence interval; FISH, fluorescence in situ hybridization; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.
^aParameters with significant differences.

Table 4. Concordance Between Cystoscopy, FISH, and Disease Recurrence (N = 222)

Cystoscopy Result	Recurrence		No Recurrence	
	Positive FISH	Negative FISH	Positive FISH	Negative FISH
Positive	21 (9.5%)	2 (0.9%)	6 (2.7%)	14 (6.3%)
Negative	5 (2.3%)	0 (0%)	9 (4.1%)	165 (74.3%)

Abbreviation: FISH, fluorescence in situ hybridization.

Table 4 shows the concordance between FISH, cystoscopy, and biopsy-proven recurrence. All test results were concordant in 186 of 222 (83.8%) cases (positive in 21 cases and negative in 165 cases). Among patients with discordant results between the 2 tests, 9 positive FISH results without disease recurrence were considered to be false-positive results. A longer follow-up in these patients was collected (in 1 case the follow-up data were not available). The median follow-up was 23.6 months (range, 12 months-31.2 months). During surveillance, none of these patients presented with disease recurrence.

The same statistical analysis was performed considering the previous tumor (low grade vs high grade) and nonsignificant differences were found for all parameters. In the same way, sensitivity was calculated considering the histological features of the newly detected tumor. Nonsignificant differences for any parameter also were found (data not shown). It is interesting to note that 3 cases of CIS could be detected by FISH but not by cystoscopy.

DISCUSSION

The objective of the current study was to determine the clinical value of the FISH technique in an unselected cohort of patients under surveillance for NMIUCC. An advantage of this study was that its prospective design and

patient variability corresponded to conditions found in real clinical practice. Overall, FISH analysis with the Uro-Vysion assay demonstrated a high sensitivity and specificity for detecting bladder tumors, indicating that FISH is a useful tool with which to detect disease recurrence in patients with a previous history of NMIUCC. The differences in the parameters studied between cystoscopy and FISH were not found to be statistically significant, indicating that FISH had an ability to detect tumors that was similar to that of cystoscopy. The results of previous studies^{13,19} and the NPV obtained in the current study suggest that there is a very low likelihood of disease recurrence in patients with a negative FISH result.

FISH assessment, as performed in the current study, differed from that in previous publications. As described by Hajdinjak²⁰ in a meta-analysis comparing FISH and urinary cytology, at least 5 slightly different positivity criteria have evolved from the study by Sokolova et al.²¹ This group reported that counting 25 abnormal selected cells was more efficient and sensitive than the traditional method. Unlike previously published methods, we assessed 100 epithelial cells, trying to count at least 25 morphologically malignant selected cells. However, in 92 of 248 (37.1%) cases, no morphologically suspicious cells were found, although 6 were positive. Therefore, genetically abnormal cells could be morphologically normal and

vice versa, indicating that early genetic changes do not necessarily correlate with observable changes in morphology. In addition, the morphological cell selection included a subjective point of view and hence interobserver variability. Moreover, the morphologic information provided by the DAPI counterstain is not the best approach to morphological selection.²² The criteria for positivity and assessment may possibly be changed in the near future.

The sensitivity and specificity of FISH reported in the current study are slightly higher than in other publications.^{9,11,23} Hajdinjak²⁰ published a meta-analysis comparing FISH and urinary cytology and the pooled sensitivity and specificity of UroVysion (14 studies) were reported to be 72% (69%-75%) and 83% (82%-85%), respectively. However, some publications report that FISH has a significantly lower sensitivity than cystoscopy. Gudjonsson et al²⁴ investigated 175 follow-up events in 156 patients under surveillance for NMIUCC and found an overall sensitivity of 93% for cystoscopy compared with 30% for FISH. The sensitivity was high in the detection of CIS (100%), but was low in the detection of low-grade tumors. These authors explained these results by the high percentage of low-risk tumors. We believe that assessment of 25 selected nuclei is not adequate to detect tumors with low cell shedding and low aberrant morphological features (low-grade tumors). In the current study, the median number of abnormal cells was low: 6 abnormal of 100 assessed nuclei.

It would be interesting to determine whether there was a bias in the pathological characteristics of the undetected tumors. The use of a test with a tendency to not detect high-grade tumors could affect patient prognosis. The statistical analysis was performed separately in low-grade and high-grade newly detected tumors. Nonsignificant differences for any parameter were found; however, the low number of tumors limited the possibility of performing an analysis with appropriate statistical power, although we were able to identify a nonsignificant tendency of cystoscopy to not detect high-grade flat lesions (CIS), as described in the literature.^{5,25}

Although FISH and cystoscopy demonstrated a high correlation with biopsy-proven recurrence, both techniques failed to detect some tumors correctly. False-negative results for FISH could be explained by the existence of genetic aberrations that FISH cannot identify, a low number of tumor cells in urine because of low shed-

ding, and/or a low urine volume. The positive FISH results without recurrence ($n = 9$) were considered to be false-positive results. These 9 patients were followed for a longer period of time (median, 23.6 months) without disease recurrence. It is remarkable that 5 of them presented only 5 positive cells. The remaining cases demonstrated between 7 and 14 altered cells. Yoder et al²⁶ determined a FISH anticipatory prediction time of 29 months in 65% of patients without recurrence and a positive FISH result. Longer follow-up of the current series will confirm whether these results are truly false or represent anticipatory results. However, Ferra et al²⁷ did not believe that a more aggressive workup was warranted in patients who had suspicious cytology, negative cystoscopy, and a positive UroVysion result. An explanation for false-positive FISH results is that not all cells with a genomic mutation will develop a tumor. FISH allows for the identification of abnormal genetic cells that potentially (40%) transform into a tumor.¹⁹ In a small percentage of patients, the lesion could remain undetected and, ultimately, the abnormal cells in the urine could disappear because of spontaneous resolution of the tumor. In addition, the erroneous interpretation based on umbrella cells or virally infected cells could lead to a false-positive result.²⁸

Although considered the gold standard for diagnosis, cystoscopy has a false-negative rate either because of operator error or small areas of CIS, which may be difficult to detect. In other false-negative results, the tumor was most likely present but not visible at the time of cystoscopy and became visible at follow-up. Inflammation, hematuria, and reactive changes associated with treatment could make visualization of the urothelium difficult and, consequently, the patient could undergo a new cystoscopy. In addition, these features could induce false-positive cystoscopy results.

Currently, a consensus in the use of FISH for the surveillance of patients with NMIUCC does not exist, as reported by Caraway and Katz.²⁸ Many studies have focused on evaluating FISH and the majority have demonstrated a better sensitivity for detecting bladder cancer than urinary cytology, but a lower specificity. However, to our knowledge, no prospective study to date has directly compared FISH and cystoscopy. A similar retrospective study was published by Karnwal et al²⁹ with different results. In this study, the authors included only 94 follow-up events from 53 patients.

In conclusion, FISH analysis has high sensitivity, specificity, and PPVs and NPVs for detecting disease recurrence in patients with NMIUCC, similar to those of cystoscopy and higher than those of cytology. However, cytology has a higher specificity than FISH and cystoscopy. We believe that FISH is a useful initial monitoring tool in patients with a previous history of NMIUCC. A negative FISH result strongly indicates that no tumor is present without the need for an invasive cystoscopy, whereas a positive FISH result strongly indicates that a tumor is present, requiring invasive cystoscopy to detect the tumor features. Given the lack of statistically significant differences in the FISH and cystoscopy results, we propose that FISH could be a useful initial diagnostic tool in the surveillance of patients with a previous history of NMIUCC.

The current study has some limitations, such as the low number of recurrences, which could limit the conclusions, although a similar recurrence rate has been described in the literature. Therefore, the data from the current study suggest that FISH could play an important role in the surveillance of patients with NMIUCC. Prospective, randomized studies are required to recommend FISH over cystoscopy/cytology.

FUNDING SOURCES

Supported in part by a FIU grant from the Spanish Urological Association and in part by grant RD07/0020/2004 from the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Federación Española de Enfermedades Raras, and the Spanish Ministry of Science and Innovation.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

The authors made no disclosures.

REFERENCES

- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66(6 suppl 1):4-34.
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2008;54:303-314.
- Messing E, Catalona W. Urothelial tumors of the urinary tract. In: Walsh P, Retic A, Vaughan E, Wein A, eds. *Campbell's Urology*. 7th ed. Vol 3. Philadelphia: WB Saunders; 2000:2327.
- Witjes JA, Douglass J. The role of hexaminolevulinatate fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2007;4:542-549.
- Shaw GL, Bunce CJ. Fluorescence cystoscopy—how to do it. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008;5:267-270.
- Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21:1315-1330.
- Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol*. 2009;16:23-30.
- Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol*. 2002;167:2001-2006.
- Placer J, Espinet B, Salido M, Sole F, Gelabert-Mas A. 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*. 2002;42:547-552.
- Varela-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria MV, Crawford ED. The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol*. 2004;22:16-19.
- Laudadio J, Keane TE, Reeves HM, et al. Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. *BJU Int*. 2005;96:1280-1285.
- Zellweger T, Benz G, Cathomas G, et al. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer*. 2006;119:1660-1665.
- Daniely M, Rona R, Kaplan T, et al. 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*. 2007;111:517-524.
- Bollmann D, Bollmann M, Bankfalvi A, et al. Quantitative molecular grading of bladder tumours: a tool for objective assessment of the biological potential of urothelial neoplasias. *Oncol Rep*. 2009;21:39-47.
- Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, et al. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J Urol*. 2005;173:401-404.
- Mengual L, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, et al. Clinical utility of fluorescent in situ hybridization for the surveillance of bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guerin therapy. *Eur Urol*. 2007;52:752-759.
- Savic S, Zlobec I, Thalmann GN, et al. The prognostic value of cytology and fluorescence in situ hybridization in the follow-up of nonmuscle-invasive bladder cancer after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy. *Int J Cancer*. 2009;124:2899-2904.

18. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol.* 2000;164:1768-1775.
19. Gofrit ON, Zorn KC, Silvestre J, et al. The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol.* 2008;26:246-249.
20. Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol.* 2008;26:646-651.
21. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn.* 2000;2:116-123.
22. Daniely M, Rona R, Kaplan T, et al. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. *Urology.* 2005;66:1354-1359.
23. Caraway NP, Khanna A, Fernandez RL, et al. Fluorescence in situ hybridization for detecting urothelial carcinoma: a clinicopathologic study. *Cancer (Cancer Cytopathol).* 2010;118:259-268.
24. Gudjonsson S, Isfoss BL, Hansson K, et al. The value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2008;54:402-408.
25. Whitson J, Berry A, Carroll P, Konety B. A multicolour fluorescence in situ hybridization test predicts recurrence in patients with high-risk superficial bladder tumors undergoing intravesical therapy. *BJU Int.* 2009;104:336-339.
26. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, et al. 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.* 2007;127:295-301.
27. Ferra S, Denley R, Herr H, Dalbagni G, Jhanwar S, Lin O. Reflex UroVysion testing in suspicious urine cytology cases. *Cancer (Cancer Cytopathol).* 2009;117:7-14.
28. Caraway NP, Katz RL. A review on the current state of urine cytology emphasizing the role of fluorescence in situ hybridization as an adjunct to diagnosis. *Cancer (Cancer Cytopathol).* 2010;118:175-183.
29. Karnwal A, Venegas R, Shuch B, Bassett J, Rajfer J, Reznichuk R. The role of fluorescence in situ hybridization assay for surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *Can J Urol.* 2010;17:5077-5081.