

4. *RESULTADOS*

4.1. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES VARIABLES CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS TUMORALES CON LA PRESENCIA DE RECIDIVA TUMORAL INDEPENDIENTEMENTE DEL TIEMPO.

Una vez efectuada la selección rigurosa de los pacientes obtuvimos un total de 82 casos que cumplían los requisitos del protocolo establecido con los cuales realizamos el análisis que seguidamente detallamos.

Tal como queda reflejado en los puntos primero y segundo del capítulo de Objetivos procederemos al análisis descriptivo de las variables clínicas y citométricas de interés obtenidas en nuestro estudio.

4.1.1. VARIABLES CLÍNICAS

4.1.1.1. Edad

En el análisis univariante de nuestra serie no hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la recidiva tumoral y la edad de los pacientes.

4.1.1.2. Tabaquismo

Tras el análisis de nuestros datos no hemos encontrado relación entre la recidiva tumoral y el consumo de cigarrillos, siendo analizado este evento tanto de forma categórica, es decir, presencia o ausencia de hábito tabáquico, como de forma cuantitativa, número de cigarrillos consumidos/día.

4.1.1.3. Anilinas

De igual forma este dato fue recogido y analizado pero no existió relación con respecto a la presencia de recidiva tumoral.

En la Tabla 7 se realiza la descripción de la muestra sobre la que se ha practicado el

estudio así como, la relación de dichas variables clínico-histológicas con respecto a la recidiva tumoral.

Tabla 7.- Estudio de la asociación entre las características demográficas, clínicas e histológicas y el desarrollo de recidiva tumoral.

<i>Variables clínicas</i>	<i>Recidiva tumoral</i>				<i>Valor de p</i>
	<i>No</i>	<i>(%)</i>	<i>Si</i>	<i>(%)</i>	
<i>Sexo</i>					
<i>Hombres</i>	40	44.4	32	55.6	0.5
<i>Mujeres</i>	4	60.0	6	40.0	
<i>Tabaquismo</i>					
<i>No</i>	11	45.8	13	53.2	0.46
<i>Si</i>	33	56.9	25	43.1	
<i>Anilinas</i>					
<i>No</i>	44	55.7	35	44.3	0.09
<i>Si</i>	3	100	0	0	
<i>Grado tumoral</i>					
<i>Grado I</i>	3	37.5	5	62.5	0.48
<i>Grado II</i>	32	55.2	26	44.8	
<i>Grado III</i>	9	56.3	7	43.8	
<i>Estadio tumoral</i>					
<i>pTa</i>	19	59.4	13	40.6	0.498
<i>pT1</i>	25	50	25	50	
<i>Tamaño tumoral</i>					
<i>< 3cm</i>	26	65.0	14	35.0	0.046
<i>> 3cm</i>	18	42.9	24	57.1	
<i>Nº de tumores</i>					
<i>1 ó 2</i>	31	58.5	22	41.5	0.256-
<i>3 ó más</i>	13	44.8	16	55.2	

Test exacto de Fisher.

Test de tendencia.

De todas las variables consideradas la única que presentó una asociación estadísticamente significativa en relación con la presencia de recidiva tumoral fue el tamaño.

4.1.2. VARIABLES CITOMÉTRICAS. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.

4.1.2.1. Clasificación de los histogramas de ADN

En la serie constituida por 82 tumores vesicales superficiales hemos obtenido los siguientes patrones de ploidía (Tabla 8)

Tabla 8.- Tipos de ploidía presentes en la muestra.

<i>Tipo de ploidía</i>	<i>Nº</i>	<i>(%)</i>
<i>Diploide</i>	16	19.5
<i>Hiperdiploide</i>	6	7.3
<i>Tetraploide</i>	23	28
<i>Hipertetraploide</i>	37	45.2

Las figuras 29, 30, 31 y 32 muestran los cuatro tipos de histogramas observados en nuestra serie junto con el corte histológico y suspensión nuclear tipo.

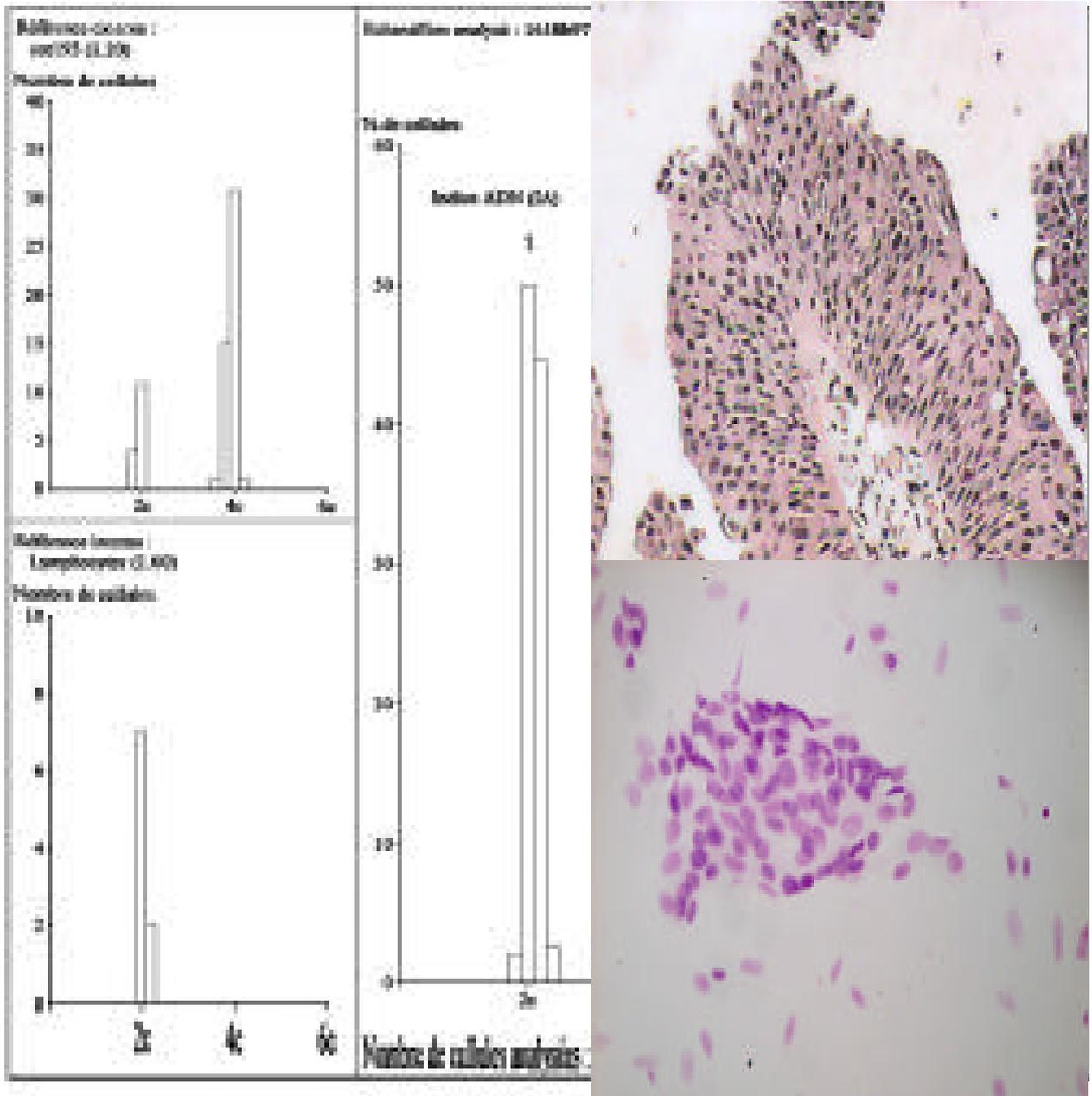


Figura 29.- Tumor diploide: histograma, biopsia y suspensión nuclear.

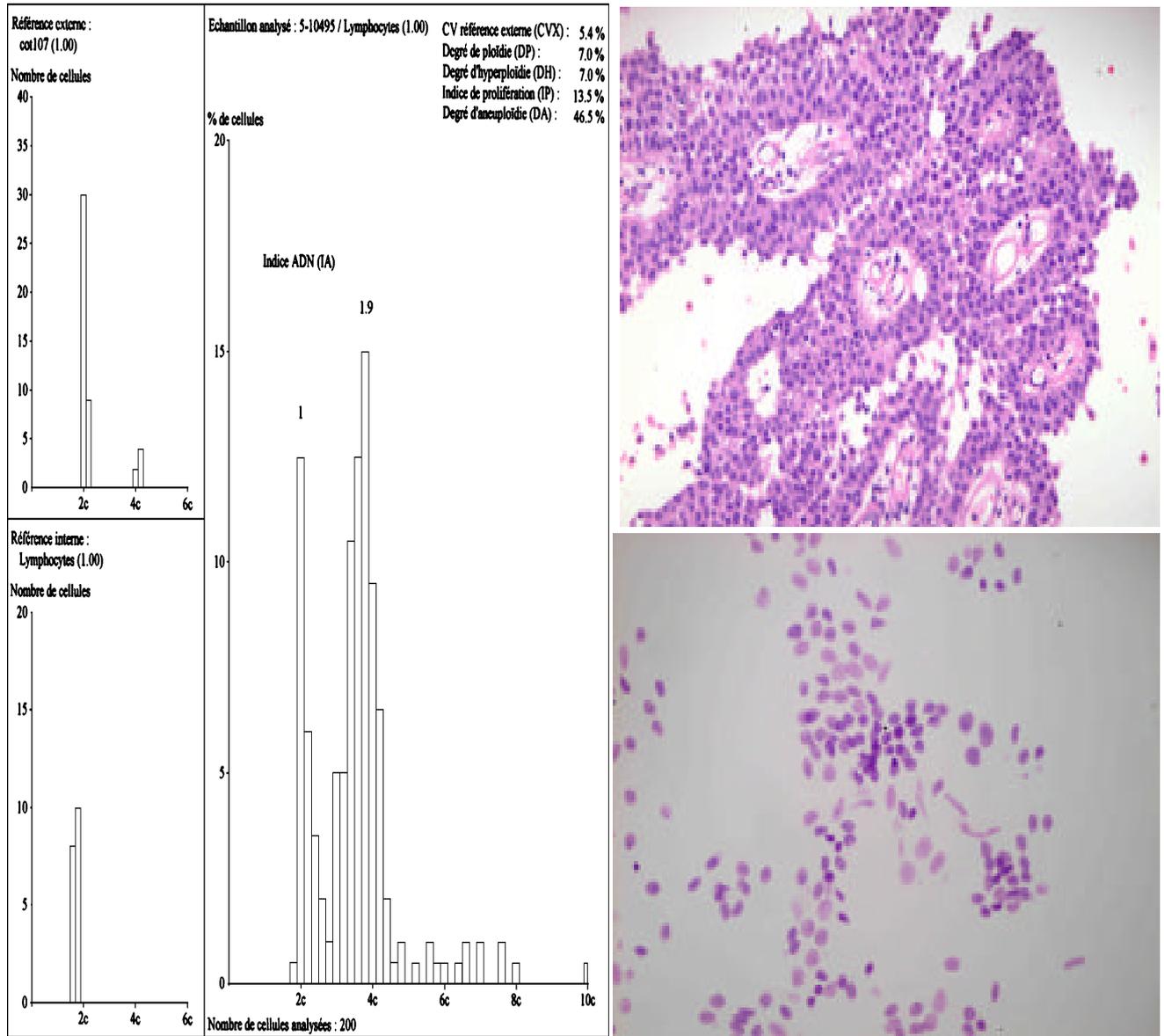


Figura 30.- Tumor tetraploide: histograma, biopsia y suspensión nuclear.

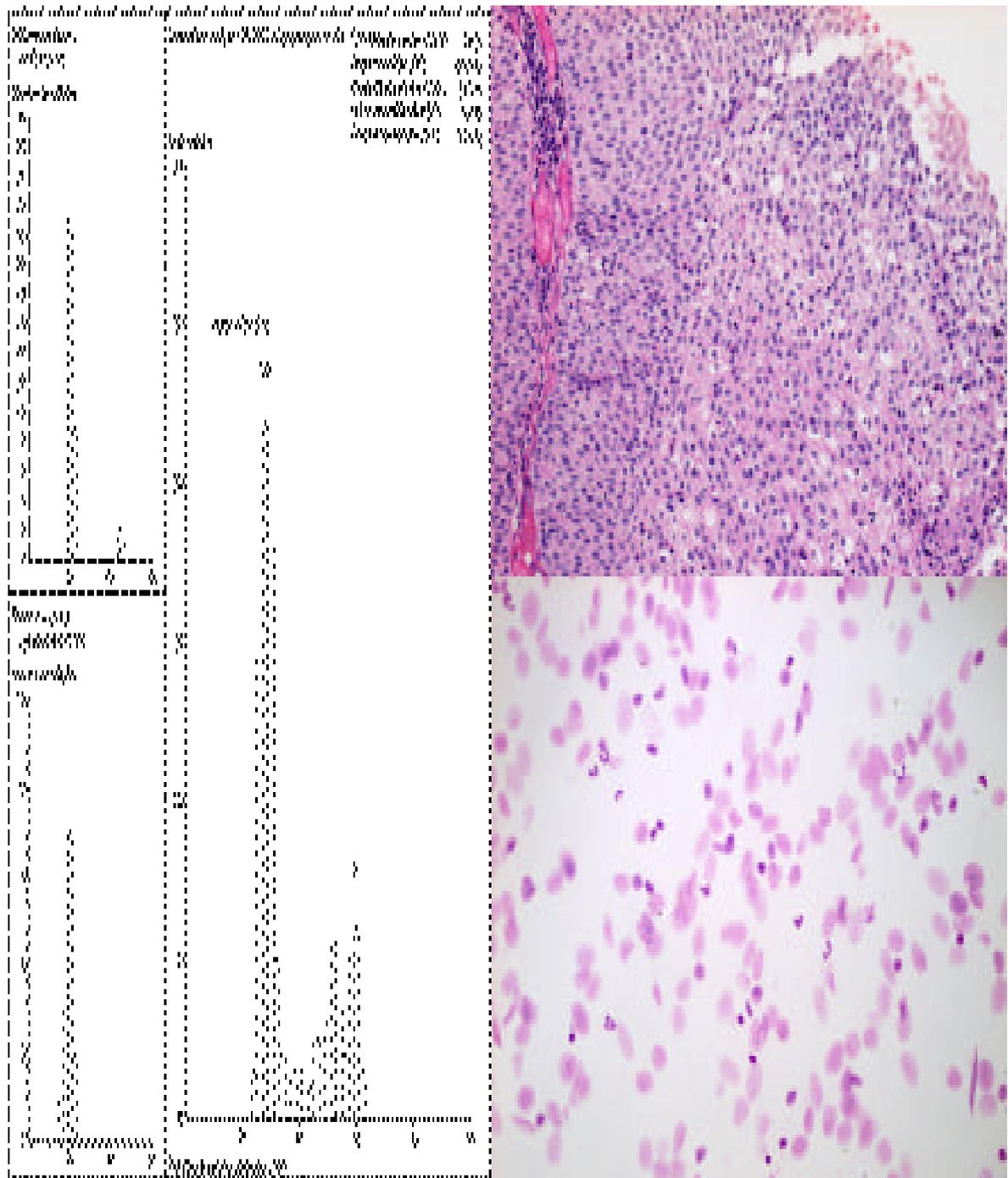


Figura 31.- Tumor hiperdiploide: histograma, biopsia y suspensión nuclear.

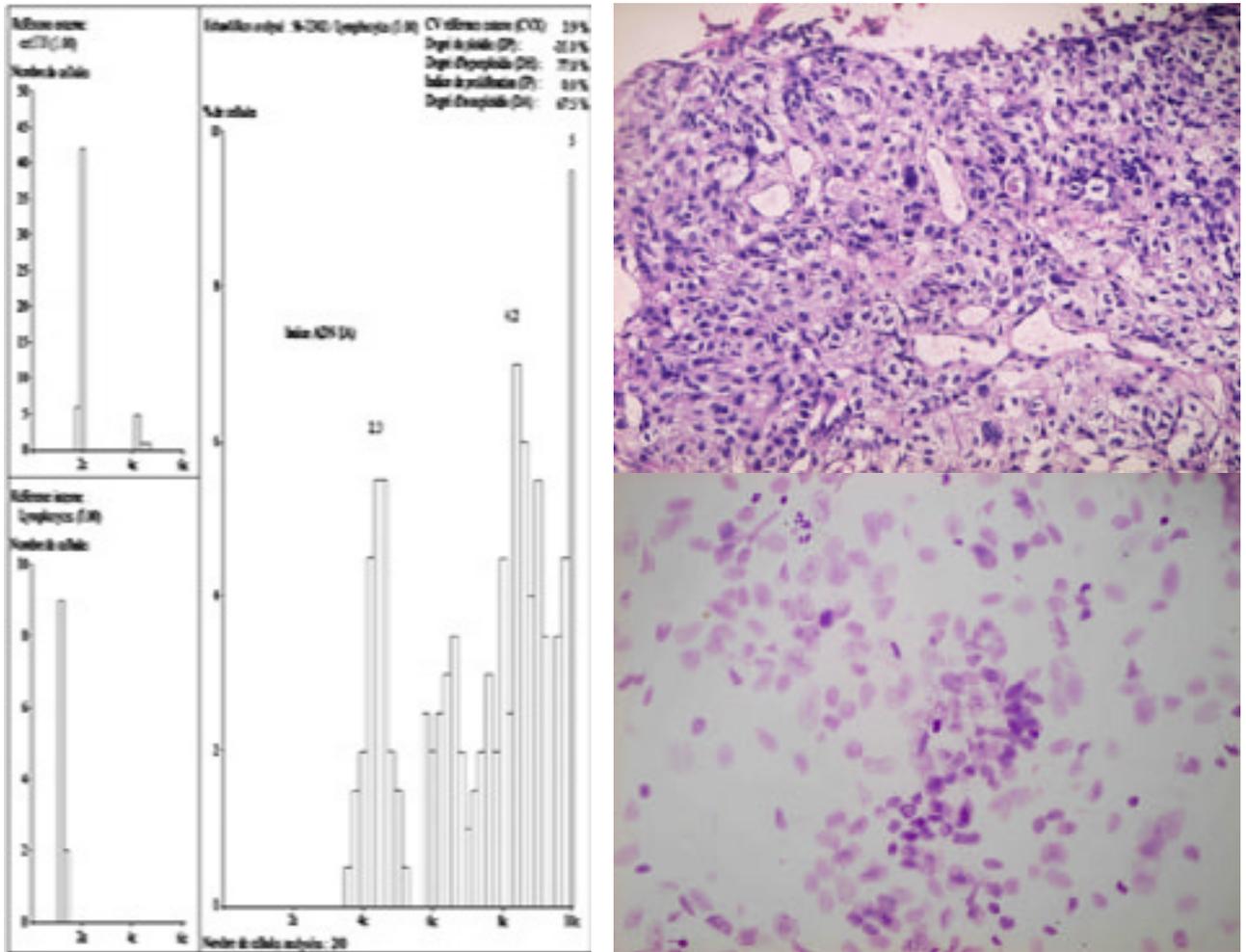


Figura 32.- Tumor hipertetraploide: histograma, biopsia y suspensión nuclear.

Para el análisis estadístico hemos reagrupado los tumores en dos subgrupos mayores, uno que incluye aquellos tumores con histogramas tipo I y II y otro que engloba los histogramas tipo III y IV (Tabla 9):

Tabla 9.- Tipos de histogramas de ADN.

<i>Tipo de histogramas</i>	<i>Nº</i>	<i>(%)</i>
<i>Tipos I y II</i>	38	46.3
<i>Tipos III y IV</i>	44	53.7

Al no existir una metodología estandarizada para evaluar los histogramas de ADN de distintos tipos de tumores^{194,196}, se intentaron diferentes agrupaciones con la intención de obtener la mayor información sobre la posible relación de la ploidía de ADN con respecto a la capacidad de recidiva de cada tumor, siendo nuestra estrategia de estudio la que en adelante se detalla.

Inicialmente, se consideraron los cuatro tipos de ploidía observados (diploide, hiperdiploide, tetraploide e hipertetraploide), y se realizaron estudios univariante con respecto a la recidiva y estudios multivariante con respecto a todas las variables consideradas como independientes en el estudio.

Otra evaluación consistió en clasificar dos grandes grupos de ploidía que incluían por un lado a los tumores con patrón de ploidía diploide e hiperdiploide y otro constituido por los patrones tetraploide e hipertetraploide, cada uno de los dos se relacionó con la capacidad de recidiva tumoral en el estudio univariante y con el resto de variables de estudio en el estudio multivariante. Esta agrupación se justificó teniendo en cuenta que por lo general un mayor contenido de ADN se relaciona con un peor pronóstico. A pesar de que los tumores con patrón de ploidía hiperdiploide deben ser considerados como aneuploides quisimos saber si esta teoría se cumplía en nuestra serie.

Las últimas variaciones que introdujimos consistieron en unificar por un lado a los tumores diploides y por otro lado a los hiperdiploides, tetraploides e hipertetraploides, así

como, también consideramos por un lado a los tumores con patrón diploide, por otro a los de patrón tetraploide y finalmente el resto fueron valorados como aneuploides. En todos estos casos se realizaron estudios univariante con respecto a la capacidad de recidiva. En ninguna de las diferentes agrupaciones realizadas se encontró relación estadísticamente significativa, ni tan sólo una tendencia en el análisis univariante con respecto a la capacidad de recidiva tumoral.

4.1.2.2. Grado de hiperploidía (DH)

Al igual que ocurrió con el tipo de ploidía, el grado de hiperploidía fue estudiado en el análisis univariante. El valor del grado de hiperploidía fue valorado de forma continua y de forma categórica, sin encontrar relación con la capacidad de recidiva tumoral, ya que el grado de hiperploidía de los tumores que recidivaron no fue significativamente superior que el de los que no recidivaron (28.5 ± 27.01 vs 27.6 ± 27.78 ; $p < 0.09$). La Figura 33 muestra los valores del grado de hiperploidía en forma de histogramas.

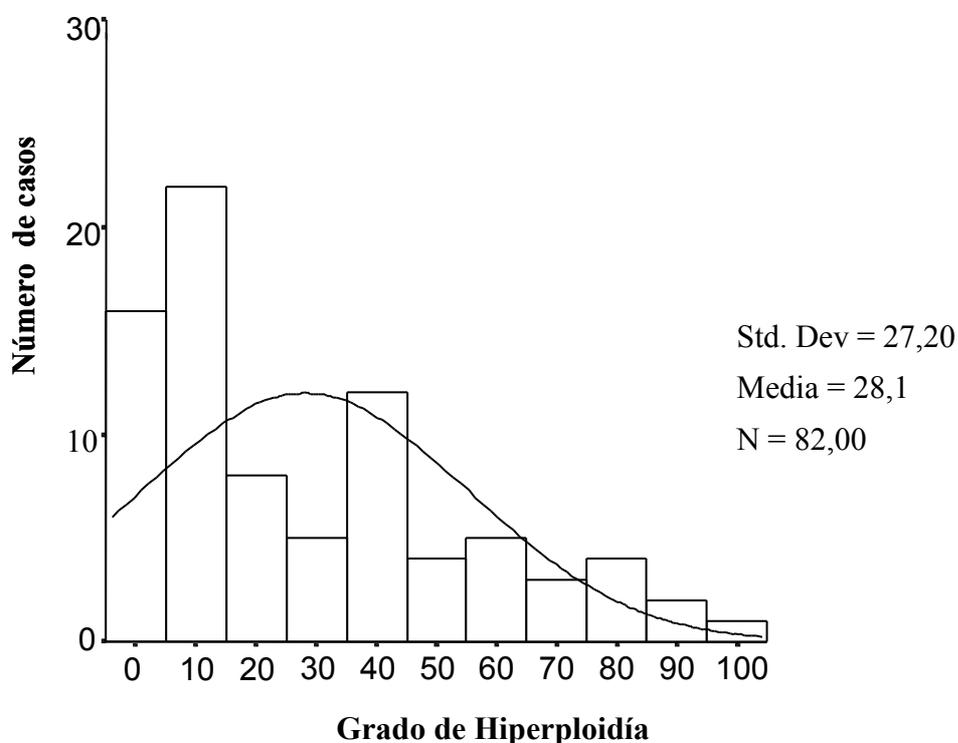


Figura 33.- Distribución de los valores de hiperploidía.

4.1.2.3. Índice de proliferación de ADN (IP)

En el presente estudio, el índice de proliferación medio de los tumores que recidivaron fue significativamente superior al de los que no recidivaron (4.0 ± 3.6 vs 6.8 ± 6.2 ; $p < 0.042$). La Figura 34 muestra la distribución de los valores del índice de proliferación de nuestra serie.

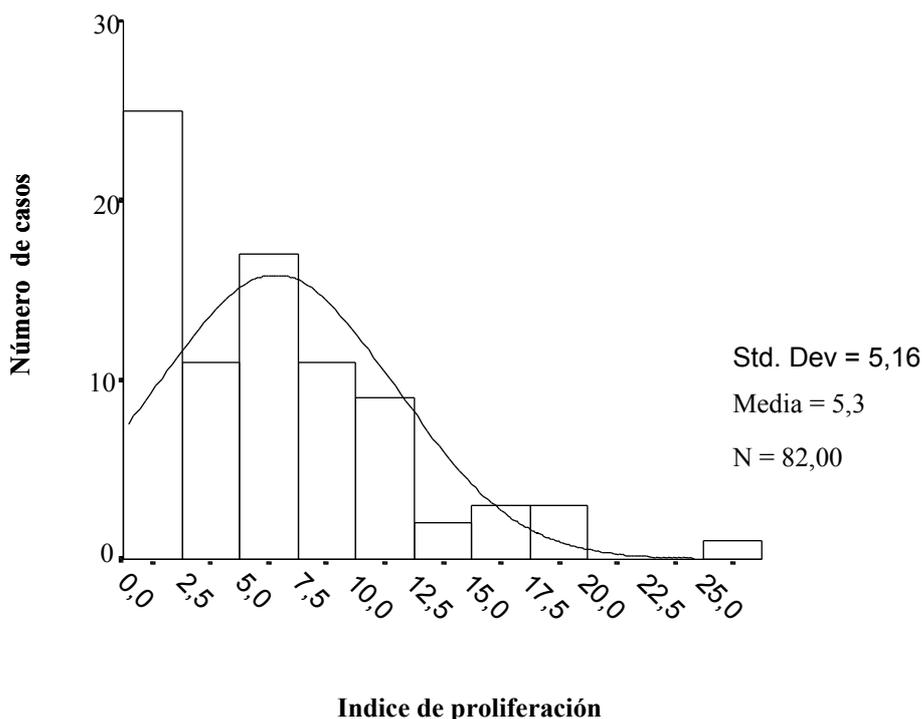


Figura 34.- Distribución de los valores del índice de proliferación de nuestra serie.

4.1.2.4. Grado de malignidad de ADN (GM-ADN)

El análisis de esta variable ha sido idéntico al de los otros parámetros comentados en los epígrafes precedentes. Su valor fue valorado de forma continua y de forma categórica en el análisis univariante, sin obtener tendencia ni relación estadísticamente significativa con respecto a la capacidad de recidiva del tumor (0.5 ± 0.8 vs 1.5 ± 0.7 ; $p < 0.9$).

Los histogramas representados en la Figura 35 muestra la distribución de los valores del grado de malignidad de nuestra serie.

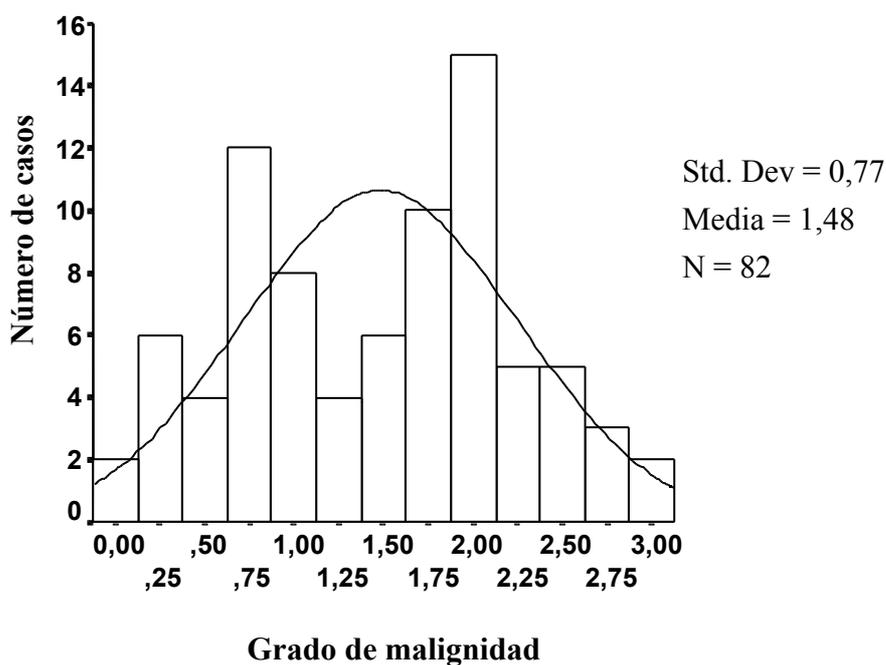


Figura 35.- Distribución de los valores del grado de malignidad de nuestra serie.

4.1.2.5. Área media nuclear (AMN)

Tal y como se realizó con las anteriores variables analizadas, el área media nuclear fue valorada tanto de forma continua como de forma categórica en el análisis univariante, sin obtener tendencia ni relación estadísticamente significativa con respecto a la capacidad de recidiva tumoral tal como queda reflejado en la Tabla 10.

Tabla 10.- Relación entre el área media nuclear y la presencia de recidiva tumoral.

<i>AMN</i>	<i>Recidiva</i>		<i>Valor de p</i>
	<i>No</i>	<i>Si</i>	
<i>Nº casos</i>	44	38	0.8§
<i>X±DS</i>	54.0±17.6	55.2±21.0	

§ Test de Student.

Los histogramas representados en la Figura 36 muestran la distribución de los valores de la media del área media nuclear.

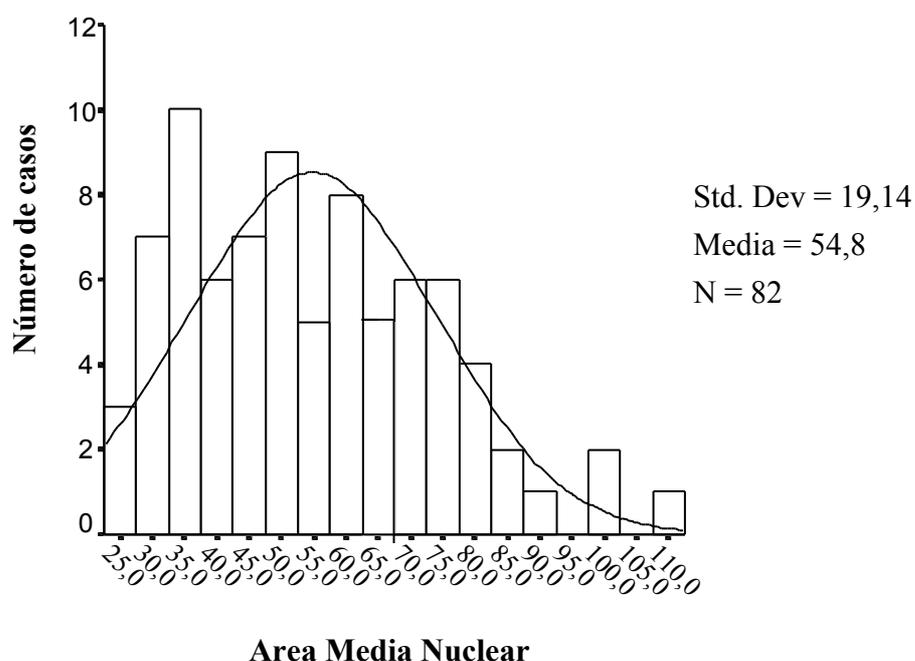


Figura 36.- Distribución de los valores del área media nuclear de nuestra serie.

El área nuclear media de las células transicionales de los tumores pT1 demostraron ser significativamente superiores a la de los tumores pTa (Tabla 11).

Tabla 11.- Relación entre el área media nuclear y la recidiva tumoral.

<i>AMN/Grado nuclear</i>	<i>Nº casos</i>	<i>AMN()</i>	<i>Valor de p</i>
<i>AMN/pTa</i>	32	46.63 ± 15.6	0.002
<i>AMN/pT1</i>	50	60 ± 19.5	

Test T de Student.

En la Tabla 12 se muestran los valores del AMN por grados. Se observó que el AMN de las células de los tumores grado III fue significativamente superior a las de los tumores grado I y II.

Tabla 12.- Valores del área media nuclear en función del grado tumoral.

<i>AMN/Grado tumoral</i>	<i>Nº casos</i>	<i>AMN() X±DS</i>	<i>Valor de p</i>
<i>AMN/Grado I</i>	8	52.9 ± 19.9	<0.01æ
<i>AMN/Grado II</i>	58	50.3 ± 16.6	
<i>AMN/Grado III</i>	16	71.8 ± 19.0	

æ Comparación Grado I-Grado II: 0.04; Comparación Grado I-Grado III: <0.001;

Comparación Grado II-Grado III: 0.04.

Igualmente, el AMN de las células de los tumores con contenido de ADN aneuploide demostró ser significativamente superior a la de los tumores diploides (Tabla 13).

Tabla 13.- Valores del área media nuclear en función de la ploidía del ADN

<i>AMN/Ploidía ADN</i>	<i>Nº casos</i>	<i>AMN()</i>	<i>Valor de p</i>
<i>AMN/Diploide</i>	39	49.5 ± 16.2	0.016-
<i>AMN/Aneuploide</i>	43	59.6 ± 20.4	

_ Test T de Student

4.2. RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS CITOMÉTRICOS CON LA CAPACIDAD DE RECIDIVA DEL TUMOR VESICAL SUPERFICIAL G2pT1 Y POSIBLE PREDICCIÓN DE LA MISMA INDEPENDIENTEMENTE DEL TIEMPO. ESTUDIO MULTIVARIANTE.

Para este análisis, tendremos en cuenta únicamente los tumores G2pT1 dado que se trata de un grupo de tumores con un comportamiento biológico muy heterogéneo. En este grupo de tumores G2pT1 se puede observar como neoplasias que parecen idénticas desde el punto de vista histológico presentan una evolución muy dispar entre sí.

En contraposición a este hecho, los tumores G1pTa/T1, G2pTa y G3pTa/T1 presentan una evolución más clara y predecible, bien con escasas recidivas y casi nula capacidad de progresión en el caso de los tumores G1pTa, o con frecuentes recidivas y elevada capacidad de progresión a formas infiltrantes como ocurre en los tumores G3pT1.

Por estas razones consideramos oportuno realizar el análisis independiente de este subgrupo de 36 casos de tumores vesicales G2pT1, con objeto de identificar a los pacientes con elevado riesgo de presentar recidiva tumoral en cualquier momento de su evolución. Para ello, utilizamos por un lado los parámetros predictivos clínicos clásicos, edad, sexo, estadio patológico incluyendo grado y nivel de infiltración tumoral, números de tumores, tamaño tumoral y multiplicidad, y por otro, los parámetros objetivos obtenidos del estudio de ploidía de ADN a través de la citometría de imagen.

Para dicho análisis se consideraron todas las combinaciones posibles de las variables explicativas, clínicas clásicas y citométricas, con respecto a la variable respuesta "recidiva tumoral", tanto de forma conjunta como de forma individual.

Se llevaron a cabo diferentes análisis para determinar si las características clínicas y los descriptores citométricos, individualmente o de forma combinada, conseguían distinguir a aquellos pacientes con riesgo elevado de desarrollar recidiva a lo largo de su evolución independientemente del tiempo.

La estrategia del análisis realizado es la que se detalla a continuación. La recidiva es un hecho consustancial a la historia natural del tumor superficial de vejiga. La probabilidad de su aparición se relaciona directamente con el estadio patológico y grado de diferenciación celular. Otros factores asociados son el tamaño del tumor primario y la multiplicidad o multifocalidad tumoral. El objetivo principal del presente proyecto de investigación, era examinar si las variables derivadas del estudio morfométrico y del contenido de ADN aportan información predictiva de recidiva tumoral, independiente de la aportada por el resto de factores considerados como clásicos. De esta forma, una vez seleccionados el grupo de tumores G2pT1, procedimos a realizar un análisis de regresión logística utilizando como variables explicativas únicamente los factores pronósticos considerados como clásicos, es decir, el tamaño tumoral y la multiplicidad tumoral. Además, la edad del paciente fue incluida como variable categórica. En segundo lugar, realizamos una regresión logística incluyendo como variables explicativas las procedentes del estudio citomorfométrico, y de contenido de ADN. Por último, para determinar si la información predictiva aportada por estas variables, mejoraba la capacidad predictiva de los factores clásicos, se realizó un tercer análisis de regresión logística. En este último análisis, como variables explicativas, se introdujeron todas las variables conjuntamente. En todos los análisis, la variable dependiente o respuesta fue la presencia de recidiva, categorizada como 0= ausencia de desarrollo y 1= desarrollo. Por otra parte, determinadas variables explicativas fueron categorizadas así:

- la edad se agrupó en menores de 65 años, de 66 a 75 años y mayores de 75 años;
- el índice de proliferación fue agrupado en, menor o igual al 10 % y mayor del 10%.

En la Tabla 14 se exponen los resultados del análisis de la regresión logística en la que se introdujo como variables explicativas a los factores pronósticos clásicos. Después de la selección por pasos hacia adelante y hacia atrás, el análisis seleccionó a las variables: *tamaño tumoral*, *multiplicidad* y *edad*. Ninguna otra variable añadida posteriormente aportó información independiente que mejorase las predicciones con suficiente magnitud para introducirla en el modelo. Como puede apreciarse los coeficientes son realmente bajos. La odds ratio nos indica que la probabilidad de desarrollar recidiva se multiplica casi por tres cuando el tamaño tumoral es superior a 3 cm y por dos cuando existe un número de tumores superiores a 2. La edad afecta levemente, aunque que por cada año mayor la probabilidad se

multiplica por 1.3.

Tabla 14.- Resultados del análisis de la regresión logística utilizando como variables explicativas los factores pronósticos clásicos

<i>Variables clínicas clásicas</i>	<i>Coefficiente B</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Wald X</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>Intervalo de confianza al</i>
<i>Constante</i>	-3.3187	1.6364	4.1132			
<i>Edad</i>	0.2866	0.5451	0.2765	0.59	1.3	0.45-3.8
<i>Tamaño</i>	1.0347	0.8183	1.5991	0.2	2.8	0.56-14
<i>Multiplicidad</i>	0.8813	0.8536	1.0659	0.30	2.4	0.45-12.7

Con estos resultados construimos un modelo matemático para intentar predecir el posible desarrollo de recidiva y, posteriormente, lo resolvimos individualmente para cada paciente. Se calcularon las probabilidades correspondientes, considerándose inicialmente un punto de corte del 50%. En la Tabla 15, se evalúa la capacidad predictiva del modelo comparando sus predicciones con lo observado. Como puede apreciarse, un 67% (12/18) de los pacientes que no desarrollaron recidiva, fueron clasificadas como tales por el modelo. Por otra parte, un 78% (14/18) de los tumores que recidivaron fueron predichos adecuadamente. De forma global, el modelo alcanza un 72% de casos con clasificaciones correctas, lo que supone un porcentaje entre moderada y ligeramente superior al que se conseguiría mediante el azar.

Tabla 15.- Asignación de pacientes al grupo no recidiva tumoral versus recidiva tumoral según el modelo matemático introduciendo los factores clínico-patológicos clásicos.

<i>Asignación de grupos</i>			
<i>Grupo observado</i>	<i>Predicción de recidiva</i>		
	<i>Nº</i>	<i>No recidiva Nº(%)</i>	<i>Recidiva Nº(%)</i>
<i>No recidiva</i>	18	12 (67)	6 (33)
<i>Recidiva</i>	18	4 (22)	14 (78)

En la Tabla 16, se presentan los resultados de la regresión logística introduciendo como variables explicativas las procedentes del estudio citomorfométrico y de contenido de

ADN. Después de la selección por pasos correspondiente, el modelo que se obtuvo fue el constituido por el grado de hiperploidía tumoral y el índice de proliferación. El descriptor citomorfométrico del área nuclear no fue seleccionado por no aportar información predictiva independiente. Según este modelo, por cada unidad de aumento en el índice de proliferación, se multiplica por dos veces y media la probabilidad de desarrollar recidiva. Sin embargo, el hecho de que un tumor tenga contenido aneuploide no modifica el riesgo.

Tabla 16.- Resultados del análisis de la regresión logística utilizando como variables explicativas los parámetros citométricos.

<i>Variables citométricas</i>	<i>Coficiente B</i>	<i>Error standar</i>	<i>Wald X</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%</i>
<i>Constante</i>	-0.7296	0.6930	1.1083	0.29		
<i>Índice proliferación</i>	0.934360	0.4874	3.6748	0.05	2.5	0.9-6.5
<i>Grado hiperploidía</i>	-0.0069	0.0164	1.1083	0.67	0.9	0.7-1.4

En la Tabla 17, se evalúa el modelo comparando las predicciones realizadas por el modelo y lo observado. El modelo no consiguió mejorar los resultados del realizado anteriormente con factores clásicos. Es más, globalmente sólo predijo correctamente un 64% de los casos, lo que supone un 8% menos de aciertos con respecto al modelo anterior. Tanto en su capacidad para predecir el desarrollo de recidiva como para descartarla, los porcentajes de acierto fueron inferiores con un 72% (13/18) y 56% (10/18) respectivamente.

Tabla 17.- Asignación de pacientes al grupo no recidiva tumoral versus recidiva tumoral según el modelo matemático introduciendo los factores citométricos.

<i>Asignación de grupos</i>			
<i>Grupo observado</i>	<i>Predicción de recidiva</i>		
	<i>Nº</i>	<i>No recidiva Nº(%)</i>	<i>Recidiva Nº(%)</i>
<i>No recidiva</i>	18	10 (56)	8 (44)
<i>Recidiva</i>	18	5 (28)	13 (72)

Por último, en la Tabla 18 se exponen los resultados de la regresión logística en la que

se incluyeron como variables explicativas una combinación de los dos modelos anteriores. Tras la realización de todas las posibles combinaciones, el mejor modelo fue el obtenido por las variables: multiplicidad, índice de proliferación y edad del paciente. Desaparecieron del modelo tanto la ploidía como el tamaño al no aportar información pronóstica independiente cuanto se analizaron de forma conjunta. De acuerdo a las variables seleccionadas, la presencia de multiplicidad multiplica por tres la probabilidad de desarrollar recidiva. Por otra parte, por cada aumento en el índice de proliferación se duplica dicha probabilidad. Con relación a la edad, aunque hay que tenerla en cuenta, el coeficiente esta cercano a la unidad.

Tabla 18.- Resultados del análisis de la regresión logística utilizando como variables explicativas una combinación de los dos modelos.

<i>Variables combinadas</i>	<i>Coficiente B</i>	<i>Error standar</i>	<i>Wald X</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%</i>
<i>Constante</i>	-3.3938	1.6731	4.1147	0.0425		
<i>Edad</i>	0.5274	0.5146	1.0501	0.3	1.7	0.6-4.6
<i>Índice proliferación</i>	0.8699	0.50313	2.9896	0.08	2.4	0.8-6.3
<i>Multiplicidad</i>	1.1606	0.8457	1.8831	0.17	3.2	0.6-16.5

En cuanto al rendimiento predictivo del modelo, se observa una discreta mejora global con respecto a los dos anteriores con un 75% de casos correctamente asignados (Tabla 19). La capacidad para predecir aquellos tumores que no van a desarrollar recidiva fue del 78% (14/18) y la de aquellos que la van a desarrollar del 72% (13/18).

Tabla 19.- Asignación de pacientes al grupo no recidiva tumoral versus recidiva tumoral según el modelo matemático introduciendo una combinación de ambos modelos.

<i>Asignación de grupos</i>			
<i>Grupo observado</i>	<i>Predicción de recidiva</i>		
	<i>Nº</i>	<i>No recidiva Nº(%)</i>	<i>Recidiva Nº(%)</i>
<i>No recidiva</i>	18	14 (78)	4 (22)
<i>Recidiva</i>	18	5 (28)	13 (72)

En las tablas 14, 16 y 18 se muestra la constante B_0 que expresa la influencia o peso específico que cada parámetro tiene en el riesgo de recidiva y el valor de p que expresa el resultado del contraste de hipótesis en el que la hipótesis nula establece que las poblaciones de donde proceden las muestras tienen las mismas medias y por lo tanto no difieren.

En base a los resultados obtenidos según el último modelo de regresión logística podemos resumir que, el factor predictivo de riesgo de recidiva más importante es la presencia de multiplicidad tumoral, seguido de aquellos tumores que presentan un índice de proliferación superior al 10%. La edad sólo es un factor determinante si se asocia a la presencia de alguno de los otros dos factores.

4.2.1. PROPUESTA DE CREACIÓN DE GRUPOS DE RIESGO DE RECIDIVA TUMORAL EN BASE A LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

El grupo de pacientes con riesgo bajo de recidiva lo constituyen aquellos que presentan 1-2 tumores, con índice de proliferación inferior al 10%, independientemente de su edad. En este grupo, la probabilidad de recidivar se multiplica por un factor inferior a 1.

El grupo con riesgo medio lo constituyen aquellos pacientes que presentan, o bien tumores múltiples, o tumores con índices de proliferación superiores al 10%. En este grupo, la probabilidad de recidiva se duplica, si bien, en los mayores de 75 años puede llegar incluso a multiplicarse por 4.

Por último, el grupo de riesgo elevado lo constituyen aquellos pacientes que presentan multiplicidad tumoral con índices de proliferación superiores al 10%. En estos casos, la probabilidad de recidiva se triplica. En este grupo la edad es un factor importante pues la probabilidad de recidiva se multiplica por 5 en caso de pacientes mayores de 65 y por 9 en los mayores de 75 años (Tabla 20).

Tabla 20.- Grupos de riesgo.

<i>Grupo de riesgo</i>	<i>Número tumores</i>	<i>Y/O</i>	<i>Índice de proliferación</i>	<i>Riesgo de odds ratio</i>
<i>Bajo</i>	1-2	y/ó	< 10%	< 1
<i>Medio</i>	>2	ó	> 10%	2-4*
<i>Elevado</i>	>2	y	>10%	3-9**

* Puede llegar a multiplicarse por 4 en mayores de 75 años

** Puede llegar a multiplicarse por 9 en mayores de 75 años

5. *DISCUSIÓN*

Las lesiones papilares superficiales y moderadamente diferenciadas que afectan al tejido conectivo subepitelial (G2pT1) suponen un enigma. Desde el punto de vista histológico, estas lesiones parecen similares, pero muestran un comportamiento biológico muy diferente. Queda patente que el aspecto morfológico utilizado clásicamente para la estadificación de los tumores, parece insuficiente para describir el riesgo de recidiva y/o progresión de los tumores vesicales G2pT1¹⁹⁷.

Alrededor del 25% de los pacientes con nivel de infiltración pT1 acaban presentando tumores infiltrantes, elevándose esta cifra a un 40% en los tumores G3pT1¹⁹⁸. Dado que existe la posibilidad de progresión en los tumores pT1, y que ello conlleva un aumento de la morbilidad y mortalidad nada despreciable, algunos autores proponen un manejo terapéutico más agresivo en algunos tumores T1. Estas terapias varían desde la práctica de instilaciones endocavitarias con Bacilo de Calmette-Guerin, en los casos con elevado riesgo de invasión de la capa muscular, sobre todo en los tumores G3 pT1¹⁹⁹, llegando incluso a la cistectomía radical con reconstrucción vesical ileal ortotópica²⁰⁰.

La morbilidad y/o mortalidad derivada de ambos tipos de tratamientos no es nada despreciable, por lo que sería primordial disponer de parámetros objetivos que nos permitieran discernir entre aquellos pacientes con elevado riesgo de recidiva y/o progresión, que requerirán un seguimiento más estricto o la práctica de terapias más agresivas. Estos parámetros objetivos se plantean como imprescindibles a la hora de diseñar árboles de decisión para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

El momento del diagnóstico anatomopatológico constituye otro punto crítico antes de plantearnos el tratamiento y seguimiento más adecuado para estos pacientes. Es imprescindible la correcta caracterización de las neoplasias, así como, que dicho diagnóstico sea reproducible intra e interobservadores³. En general, existe poca discrepancia entre patólogos a la hora de diferenciar entre tumores de bajo grado (G1) y tumores de alto grado (G3). Sin embargo, el problema aparece cuando se trata de caracterizar a los tumores moderadamente diferenciados (G2). Frecuentemente, las características histológicas de los tumores grado 2 y de los tumores grado 3 son similares. Conocidas estas limitaciones, distintos autores han intentado reclasificar este heterogéneo grupo de neoplasias que constituyen los tumores G2. Pauwels et al²⁰¹ describen dos grupos de tumores G2 en función

de la variación citológica y de la polaridad celular, encontrando tasas de recidiva y de progresión a los 5 años diferentes entre ambos subgrupos.

Por su parte, Blomjous et al²⁰² intentan una aproximación más objetiva y reproducible subclasificando a los tumores G2 en función del tamaño nuclear, haciendo distinción entre tumores con núcleos menores de $95 \mu\text{m}^2$ y tumores con núcleos mayores de $95 \mu\text{m}^2$ ²⁰³. De esta forma, encuentran diferencias estadísticamente significativas en términos de recurrencia y de supervivencia a los 5 años entre ambos subgrupos neoplásicos.

La revisión de la literatura muestra como numerosos grupos de trabajo centran su atención en el estudio e incorporación de nuevos marcadores citogenéticos y moleculares, que permitan mejorar el diagnóstico histológico obviando el componente subjetivo inherente al mismo, así como, que permitan establecer grupos de riesgo de recidiva y de progresión tumoral.

En la última década un elevado número de estudios citométricos, tanto de flujo como de imagen, han demostrado que la ploidía del ADN tiene valor pronóstico en el estudio de diferentes tipos de tumoraciones^{189,204}. Otros investigadores, no encuentran relación alguna o ésta resulta poco relevante, con respecto a las variables clínico-morfológicas clásicas^{205,159}.

Los estudios revisados concernientes a la citometría de flujo y de imagen, coinciden en que los hallazgos obtenidos por medio de una u otra son totalmente superponibles^{206,188,158,207}. Cohen et al²⁰⁸, encuentran un 91% de concordancia entre los resultados obtenidos por citometría de flujo y los obtenidos por citometría de imagen.

Kline et al.²⁰⁹, en un estudio de revisión, opina que pese a que los resultados obtenidos por medio de citometría de flujo y de imagen son superponibles, la citometría de imagen supera a la de flujo a la hora de detectar poblaciones aneuploides ignoradas por la citometría de flujo, sobre todo, las poblaciones tetraploides. De esta forma, aporta mayor sensibilidad que la citometría de flujo en el seguimiento de pacientes con historia de tumor vesical, precisamente por su capacidad para detectar poblaciones aneuploides. Un 16% de muestras reanalizadas por medio de citometría de imagen sobre lavados vesicales, fueron reclasificadas como tetraploides. Las razones de porque la citometría de flujo no detecta estas poblaciones son diversas, dilución de células tetraploides entre las células diploides, pérdida de células

tetraploides durante la preparación celular y/o error en el manejo de la muestra. La citometría de imagen evita estos sesgos al realizar una selección visual de las células, excluyendo células dobles que darían falsas poblaciones tetraploides y confirmando la presencia de poblaciones morfológicamente anómalas.

El estudio de la ploidía del ADN nuclear puede ser utilizado como una herramienta diagnóstica y de pronóstico, a la hora de determinar el manejo de ciertas neoplasias. Se han desarrollado protocolos^{210,211} en los que se combinan las técnicas histológicas clásicas con la determinación de la ploidía de ADN en la orina emitida por el paciente, las cuales permitirían detectar anomalías incipientes. Sin embargo, debemos ser cautos a la hora de su interpretación. Los tumores benignos tienden a ser euploides y los malignos con gran frecuencia muestran histogramas aneuploides, pero esto no es siempre así. La aneuploidía del ADN no indica siempre malignidad y la diploidía tampoco indica siempre benignidad. Así, por ejemplo, los adenomas endocrinos benignos y las hiperplasias endocrinas muestran ADN aneuploide hasta en un 30% de los casos, sin implicar por ello transformación neoplásica²¹². Se ha observado que en ocasiones tumores grado 3 eran diploides, mientras que tumores grado 1 eran aneuploides. Para algunos autores^{190,207}, el nivel de ploidía de los tumores puede estar reflejando un fenómeno de degeneración, unido a la edad del tumor más que a su potencial agresivo. Este fenómeno puede aparecer tanto en tumores benignos como en tumores malignos. Para este grupo de estudio, la explicación de la aneuploidía vendría dada porque los tumores perderían cromosomas o bien, sumarían aberraciones cromosómicas durante los ciclos celulares. El resultado de estas pérdidas progresivas conforme las células van pasando a través del ciclo, acabarían dando como resultado un índice de ADN entre 1.5 y 2.0. Devonec et al²¹³, proponen que todos los tumores en su inicio son diploides, y que sólo la edad y los múltiples pasos por el ciclo celular provoca que algunos de ellos se transformen en aneuploides. Un gran número de ciclos celulares inherentes a la edad del tumor, provocaría la acumulación de aberraciones cromosómicas, y por ende la aneuploidía. Entendido de esta forma, la aneuploidía sería un factor indirecto de agresividad.

La razón o razones por la que estas células que han adquirido alteraciones en su material genético, escapan del control celular eludiendo los mecanismos de apoptosis y persisten a través del ciclo celular, queda por clarificar. Abdel-Moneim et al²¹⁴ estudian, sobre

una serie de 38 tumores de distintas estirpes, la posible relación entre aneuploidía, proliferación y apoptosis sin encontrar ninguna o muy débil relación entre ellos. Según estos autores los tumores aneuploides presentan pocas células apoptóticas.

La complejidad de la interpretación del significado de la ploidía se pone de nuevo de manifiesto en el momento de interpretar el significado de ciertos tipos de aneuploidía como es el caso de los tumores tetraploides. Este problema es debido, en parte a que, existe poco consenso en los criterios utilizados para designar a una población celular como tetraploide. Para Shabaik²¹⁵ et al, una población se considera tetraploide por medio de citometría de imagen, cuando el histograma contiene un pico predominante en la posición correspondiente a las fases G2+M, con un mínimo número de células en la zona diploide. Los hallazgos en la literatura a este respecto son contradictorios.

En el estudio realizado por Klein et al²⁰⁹ encuentran que, sólo el 55% de casos clasificados como ADN tetraploide exhibieron evidencia clínica o patológica de neoplasia, y opinan que la presencia de poblaciones tetraploides puede estar relacionada con procesos inflamatorios o reactivos, constituyendo en ocasiones un hallazgo irrelevante. En contraste, el 97% de los tumores con ADN aneuploide-no tetraploide mostraron evidencia tumoral.

Shabaik et al²¹⁵ encuentran que los tumores de bajo grado que recidivan son todos tetraploides.

Para Lipponen et al²⁵⁴, los tumores tetraploides presentan un comportamiento en términos de supervivencia que no difiere del resto de tumores aneuploides, por lo que los incluyen dentro de la aneuploidía. También observan que los tumores diploides, con más de un 10% de células en proliferación, deben ser considerados de forma diferente al resto de tumores diploides, pues la supervivencia no difiere de forma significativa del resto de tumores que proliferan rápidamente.

Tanto la citometría de flujo como la de imagen coinciden en que el análisis del ADN no debe ser utilizado por sí sólo como base para la toma de decisiones clínicas, pero sí debe ser utilizado en conjunción con los otros parámetros clínicos y de laboratorio^{216,217}.

Para Mora et al²¹⁸, la citometría de imagen tiene un importante papel en el seguimiento

de pacientes con neoplasia urotelial, pero debe ser utilizado con juicio y junto con el diagnóstico citológico, pues puede aportar importante información en aquellos tumores con propensión a la recidiva o metástasis. El método pierde sensibilidad en las lesiones de bajo grado siendo necesario el desarrollo de marcadores moleculares más específicos que puedan ser utilizados como herramientas diagnósticas.

Un consenso internacional celebrado en octubre de 1992, valoró la relevancia del análisis de ploidía del ADN en distintos tumores, encontrando gran controversia en las opiniones de los autores revisados. Se llegó a la conclusión de que la aneuploidía del ADN se mostraba como un factor pronóstico negativo e independiente en los melanomas malignos, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de esófago, ovario, endometrio, próstata, vejiga urinaria y carcinoma papilar de tiroides²¹⁹.

Una nueva revisión de consenso¹⁹⁰ sobre la utilidad de la citometría en el cáncer vesical llegó a la conclusión, de que ésta no puede ser utilizada en el cribaje o *screening* del cáncer vesical ni en el estudio de la hematuria, pues aunque la sensibilidad de la citometría en muestras de irrigación vesical, es mayor a la hora de detectar malignidad que la citología, la especificidad es demasiado baja en el cribaje de pacientes con bajo riesgo de sufrir una neoplasia vesical. Según esto, la citometría estaría recomendada únicamente en pacientes con tumor, historia de tumor vesical o alta sospecha de la existencia del mismo. Su principal utilidad sería la estratificación de tumores superficiales grado 2 pT1 y Cis, dado que forman un grupo muy heterogéneo donde la diploidía y la aneuploidía se distribuye casi por igual.

El estudio del ADN por medio de citometría tiene también utilidad en el momento del diagnóstico y seguimiento de los tumores vesicales superficiales. La ploidía del ADN puede ser analizada tanto en muestras obtenidas por biopsia como por resección o por lavado vesical. Para el seguimiento de los pacientes el lavado vesical es la mejor técnica de recogida de muestra. Se considera que la práctica del análisis de la ploidía, por medio de citometría de flujo en el lavado vesical durante el seguimiento de estos pacientes, es incluso más sensible a la hora de detectar la recidiva que la citología de orina^{220,221}, pudiendo anteceder en el tiempo al desarrollo de tumor clínico²²⁰.

En el seguimiento de tratamiento quirúrgico conservador, se ha podido ver que si

después de la RTU se detecta en el lavado vesical un pico aneuploide-no tetraploide puede estar indicando recidiva, teniendo en cuenta que la presencia de un histograma diploide no la excluye¹⁹⁰.

A la hora de monitorizar el tratamiento endocavitario se ha visto que a los 6 meses del tratamiento intravesical con BCG, la detección en el lavado vesical de poblaciones con ADN aneuploide puede ser un buen predictor de progresión y fracaso del tratamiento. Por otra parte, la aparición de histogramas diploides tras el tratamiento, cuando previamente la población tumoral mostraba histogramas aneuploides, puede indicar buen pronóstico con buena respuesta a la terapia administrada²¹⁷.

Casi toda la literatura revisada coincide en la asunción de que los parámetros histológicos clásicos como, el grado histológico y el estadio tumoral constituyen hoy por hoy, y a pesar de la problemática de la subjetividad y baja reproductibilidad del estudio anatomopatológico, los pilares en el diagnóstico y predicción evolutiva tumoral.

En este estudio se han valorado los distintos factores pronósticos clásicos descritos en los capítulos previos y no hemos hallado relación entre el grado histológico y el estadio tumoral con la presencia de recidiva. Por el contrario, fue relevante la información aportada por el tamaño y por la multiplicidad tumoral con respecto a la recidiva.

Para Blomjous et al.¹⁸⁸, los tumores recidivantes estudiados en su serie de 80 casos por citometría de imagen, eran aneuploides y de mayor tamaño, observando un índice de recidiva significativamente superior entre los tumores aneuploides y mayores de 4 cm frente a los tumores diploides y menores de 4 cm.

Para van Velthoven et al.²⁰⁷, el tamaño tumoral también se asocia con distribución anómala del ADN.

Otro importante factor pronóstico clásico a destacar es la presencia de multiplicidad de los tumores, característica ésta muy frecuente de los tumores vesicales superficiales. La multifocalidad o multiplicidad del carcinoma de células transicionales vesicales y del tracto urinario superior, ha sido atribuido por distintos autores por un lado, a la siembra de células tumorales exfoliadas y por otro, a la sensibilidad de todo el urotelio al estímulo provocado por

los carcinógenos^{222,223}.

Con la intención de evaluar si las alteraciones genéticas conocidas pueden ser la causa de la multiplicidad de los tumores transicionales vesicales, Pycha et al.²²⁴, diseñan un estudio con 47 pacientes con tumores transicionales multifocales sincrónicos y/o metacrónicos, en los que determinan por medio de FISH, técnicas de inmunohistoquímica y citometría de imagen las alteraciones cromosómicas, alteraciones de expresión de distintos marcadores como p53 y Ki-67 así como, las alteraciones a nivel de la ploidía de ADN en muestras de tejido vesical normal y tumoral. En su estudio encuentran alteraciones cromosómicas de los cromosomas 7, 9 y 17 muy similares tanto en las muestras malignas como en las no malignas, variando únicamente la frecuencia de dichas aberraciones, 1.4 veces mas frecuentes en muestras malignas que en las no malignas. A nivel de la ploidía del ADN, obtuvieron un 10% de aneuploidía entre las muestras tumorales y un 57.5% de aneuploidía en las muestras no tumorales. Para p53 y Ki-67 ocurrió lo mismo que a nivel cromosómico, es decir, se encontraron patrones de alteración similares para muestras tumorales y para muestras no tumorales variando nuevamente la frecuencia, 3.5 veces mas frecuente entre muestras tumorales que entre no tumorales, para ambos marcadores. Las alteraciones genéticas aparecen de forma concomitante en los tejidos tumorales y no tumorales uroteliales, difiriendo únicamente en la frecuencia, por lo tanto, es lícito sospechar que la inestabilidad genética está presente en todo el urotelio.

Hoy por hoy, se sigue creyendo en el origen monoclonal de la multiplicidad tumoral provocada por la dispersión intraluminal o migración intraepitelial de las células tumorales dentro de la vejiga. Esta migración o dispersión celular estaría favorecida por cambios inflamatorios, de forma que determinados factores de crecimiento y citoquinas permitirían la dispersión del clon original y por lo tanto la multiplicidad tumoral.

Los datos aportados por la citometría de imagen son muy numerosos. En nuestro estudio, siguiendo el ejemplo de otros grupos de trabajo, nos hemos centrado en la interpretación del tipo de ploidía o tipo de histograma, grado de hiperploidía, índice de proliferación, grado de malignidad y área media nuclear, los cuales se discuten a continuación.

En la citometría de imagen, el ADN se mide a través de la densidad óptica integrada (DOI) y sus valores se representan gráficamente en los histogramas de ADN. Los criterios seguidos para determinar la ploidía de los tumores son variados, utilizándose en unos casos el índice de ADN (IADN) y en otros los tipos de histogramas. Distintos autores realizan clasificaciones diferentes de los tipos de histogramas con la intención de acercarse más al comportamiento tumoral, o para poder mejorar las comparaciones de los resultados obtenidos por medio de citometría de imagen a los obtenidos por medio de la citometría de flujo. Steinbeck et al.²²⁵, clasifica los histogramas de ADN en cuatro tipos. Considera que los tumores euploides tienen histogramas tipo I (diploides), tipo II (diploides-tetraploides) y tipo III (diploides+proliferación). El resto de histogramas que no cumplen los criterios anteriores son considerados tumores aneuploides.

En cambio, Sampedro et al.¹⁹⁴ incluyen los tumores con histograma tetraploide dentro de los tumores aneuploides.

Longin et al.²²⁶, estudiaron la influencia de distintos parámetros sobre el patrón de ploidía del ADN en el cáncer de mama, y demostraron que la aneuploidía depende de los parámetros seleccionados. En su estudio, utilizaron cuatro parámetros para determinar el patrón de ploidía del ADN: los tipos de histogramas de ADN según la clasificación de Auer, el IADN, el 5cER, y el GM-ADN definido por A. Böcking et al.¹⁶⁷. Estos autores consideraron los tumores como aneuploides, cuando se daban las siguientes condiciones:

- los tipos de histograma de ADN eran del tipo III y IV descritos por Auer,
- el IADN era > 1.25 ,
- el GM-ADN era > 1.1 y
- el 5cER $> 1\%$.

Tan sólo 26 tumores de los 58 tumores aneuploides estudiados cumplían con los cuatro criterios de aneuploidía. Los autores concluyeron que, en función de los parámetros estudiados y de los criterios aplicados para definir los tumores como euploides o aneuploides, un mismo tumor puede ser clasificado de forma distinta.

Login et al²²⁶, establecen unos criterios para clasificar los tumores como euploides o aneuploides en los que existen incongruencias, ya que definen los tumores con histogramas del tipo II (tetraploides, pico en 4c) como euploides. Estos autores definen estos mismos tumores como aneuploides basándose en el IADN (IADN=2, pico en 4c). En nuestra opinión es mejor la utilización de un sólo parámetro para definir el patrón de ploidía del ADN. En los estudios realizados con citometría de imagen, el parámetro más apropiado para definir el patrón de ploidía sería la clasificación por tipos de histogramas de ADN.

Igual que en nuestro estudio, Login et al²²⁶ también tuvieron problemas con la clasificación de Auer al clasificar algunos tipos de histogramas de ADN. La falta de criterios claramente definidos para identificar situaciones difíciles de diferenciar, como son la presencia de proliferación celular, o la de pequeñas poblaciones de células aneuploides, dan lugar a la libre lectura del observador. En estas condiciones, el resultado está sujeto a la variabilidad de la interpretación subjetiva del histograma.

En nuestro estudio, dos observadores clasificaron los histogramas de ADN mediante la clasificación de Auer. Dada la discordancia en algunos resultados, en una segunda fase se aplicó la clasificación descrita por A. Sampedro et al¹⁹⁴, con el fin de reducir la discordancia. Esta estrategia nos permitió reducir pero no eliminar este problema.

En el presente estudio hemos utilizado como parámetros densitométricos el DH, la clasificación según tipos de histograma y, además el GM-ADN, con la finalidad de obtener un parámetro más objetivo para diferenciar los tumores en función de su mayor o menor malignidad, y poder establecer un criterio que se relacione mejor con el pronóstico de la enfermedad.

Siguiendo lo descrito por A. Böcking et al en 1984¹⁶⁷, hemos considerado el GM-ADN distribuido en tres grados tal como se comentó en el capítulo de Material y Métodos.

La utilización de esta metodología se justifica teniendo en cuenta los resultados publicados por A. Böcking et al. en 1984²²⁷, que relacionan la agresividad de distintos tipos de tumores con el GM-ADN obtenido en cada uno de ellos.

Generalmente los tumores asociados a baja malignidad, tales como el plasmocitoma, el

inmunocitoma, la leucemia linfática crónica y el linfoma centrocítico-centroblástico, muestran en la mayoría de los casos un GM-ADN bajo, entre 0 y 1. En cambio, los tumores conocidos por su elevada malignidad histológica, como por ejemplo el sarcoma de Ewing, se asocian a GM-ADN comprendidos entre 2.0 y 3.0. En los adenocarcinomas de mama y de próstata existe un amplio espectro de valores, comprendidos entre 0.2 y 2.8, al igual que ocurre en los linfomas considerados como una entidad global, donde el GM-ADN se sitúa entre 0 y 2.8.

Además, dentro de un mismo tipo de tumor con idéntico patrón de ploidía del ADN, se han observado diferencias con respecto al comportamiento maligno en los tumores aneuploides. Lanza et al²²⁸, en un estudio sobre tumores colorectales, observaron diferencias en el carácter maligno de distintas poblaciones aneuploides y detectaron, en un estudio por citometría de flujo, que los tumores tetraploides y moderadamente aneuploides, según su IADN, presentaban una reincidencia tumoral inferior a la hallada en tumores con una marcada aneuploidía.

En nuestra serie, a pesar de que nos hemos centrado en la presencia de recidiva tumoral y no en la progresión tumoral, hemos querido valorar el GM-ADN, por un lado con la intención de añadir un parámetro más objetivo, y por otro dado que en su significado intrínseco, el GM-ADN alberga la actividad proliferativa tumoral. A pesar de que estas características apuntaban hacia el GM-ADN como un marcador óptimo, en este estudio no ha añadido información válida con respecto a la recidiva tumoral.

Aunque las dos técnicas citométricas de ADN, citometría de flujo y de imagen, ponen de manifiesto el patrón de ploidía del ADN, ambas proporcionan una información con significado biológico distinto en algunos aspectos. Las principales diferencias, entre otras, estriban en el método de selección celular y en el tamaño de la muestra analizada.

Generalmente, si comparamos los histogramas de ADN procedentes de ambas técnicas citométricas, se observa que los histogramas asociados a técnicas de citometría de imagen muestran una mayor dispersión de los datos. Con frecuencia se obtienen picos celulares menos definidos debido al reducido número de núcleos analizados. Por ello, el patrón de ploidía del ADN se determina habitualmente en relación a la clasificación de tipos de histogramas de ADN. En cambio, en el análisis por citometría de flujo, se determina el patrón

de ploidía del ADN en relación al IADN asociado al pico que representa la población celular con mayor contenido en ADN.

Para el cálculo del IADN descrito en el apartado 1.7, se analiza una muestra celular que varía de tamaño en función de la técnica utilizada. En citometría de imagen, el tamaño de la muestra varía habitualmente entre 100-300 núcleos, y en la citometría de flujo, varía entre 10.000-20.000 núcleos. Generalmente, se considera que un pico que contiene como mínimo entre un 20% a un 30% del total de las células analizadas representa una población celular. Esto nos indica que en la citometría de imagen estamos valorando el patrón de ploidía en función de un IADN calculado en relación a una población entre 20 y 60 células, y en la citometría de flujo en relación a una población entre 2000 y 3000 células. En nuestra opinión, el IADN obtenido mediante citometría de flujo es más preciso en cuanto a la identificación de poblaciones celulares, sin embargo, en la citometría de imagen el IADN es poco fiable y reproducible. Además, en citometría de imagen, se puede perder información al expresar un resultado global considerando únicamente una pequeña fracción de la muestra total cuantificada. Por ello, en nuestro estudio no hemos considerado este parámetro.

El método de selección de células que hemos empleado es el selectivo, que tiene ventajas sobre el sistemático y aleatorio, ya que permite detectar con mayor certeza las pequeñas poblaciones aneuploides en la muestra estudiada. Es por ello, que en la mayoría de nuestros casos hemos hallado en mayor o menor proporción, pequeñas poblaciones celulares de características aneuploides con un alto IADN.

En relación a la sensibilidad del muestreo selectivo en la detección de pequeñas poblaciones celulares, coincidimos con Reeder et al.²²⁹ que, al estudiar la variabilidad entre los datos obtenidos al aplicar diferentes criterios de selección de la muestra, demostraron que mediante el muestreo selectivo se obtiene una mayor sensibilidad con respecto a la identificación de poblaciones aneuploides, pero con resultados menos reproducibles que en el muestreo sistemático y aleatorio.

De todas formas, optar por un procedimiento o por otro depende del significado biológico y pronóstico que se le quiere atribuir a la presencia de pequeños clones aneuploides en la muestra tumoral. En nuestro caso, es importante detectar estas poblaciones ya que

pretendemos encontrar una asociación de las mismas con el comportamiento biológico y el pronóstico del tumor.

Raitanen et al.²³⁰, analizan 51 tumores transicionales superficiales de vejiga encontrando que la mayoría de los tumores que presentaron recidiva pero no progresión eran diploides y p53 negativos. En este estudio, la ploidía de ADN resultó ser un buen predictor de agresividad tumoral por encima de la expresión de p53.

Ioakim-Liossi et al.²³¹, realizan un estudio sobre 80 pacientes diagnosticados de carcinoma transicional vesical superficial. En cada caso se realiza estudio de ploidía por medio de citometría de imagen (SAMBA 2005), y estudio de expresión de la proteína p53 por medio de inmunohistoquímica (avidina-extravidina), encontrando una importante relación entre recurrencia y la ploidía de ADN al igual que otros investigadores^{232,233}. Para estos autores existe un elevado porcentaje de recidivas en pacientes con ADN aneuploide y sobreexpresión de p53 (p53+).

Nuestros hallazgos coinciden con los de los grupos de investigación que no relacionan la ploidía del ADN ni con la recidiva ni con la progresión tumoral. Tanto la valoración global de nuestra serie, como la del subgrupo de tumores G2pT1, no ha mostrado relación alguna entre los tipos de ploidía, valorados éstos de las distintas formas expuestas en el capítulo de Material y Métodos, y la presencia de recidiva tumoral en cualquier momento de la evolución del enfermo. Estos resultados están en acuerdo con los obtenidos por deVere²³⁶.

Para otros autores como Decaestecker y Sowter²³⁴, el nivel de ploidía y la clasificación de los histogramas si presentaron valor pronóstico cuando se tienen en cuenta de forma conjunta. En su estudio los parámetros más importantes son el porcentaje de núcleos hiperdiploides e hipertetraploides, los cuales describen la presencia de subpoblaciones aneuploides específicas, siendo estos hallazgos especialmente útiles en los tumores grado 2.

Por otra parte, Sánchez-Fernandez de Sevilla et al.²³⁵ demuestran que una notable proporción de tumores vesicales con progresión eran diploides, mientras que algunos tumores superficiales que no progresaron eran aneuploides.

Para deVere White et al.²³⁶, la aneuploidía no contribuye en la información sobre la

recidiva ni sobre la progresión de los tumores vesicales superficiales, encontrando tanto tumores diploides entre las tumoraciones grado 3, como tumores aneuploides entre los grado 1. Estos autores coinciden en la interpretación de la aneuploidía como un dato sobre la madurez del tumor, y asumen que el grado tumoral y la ploidía no contienen exactamente la misma información. En concordancia a estos hallazgos, todos los tumores G1 de nuestra serie son aneuploides, quizás debido a la madurez del tumor o quizás al procedimiento de tipo selectivo utilizado por nosotros durante el estudio citométrico.

Se debe tener en consideración que la ploidía provee una visión media global de la composición genética de las células cancerosas, mientras que otras alteraciones moleculares como por ejemplo, las alteraciones de p53 definen una mutación específica que podría fomentar la inestabilidad genética. Todo y así, la aneuploidía puede ser suficiente para generar inestabilidad genética dado que se ha visto, que tanto en cultivos de células transformadas de embriones de hamster chino como en células cancerosas humanas, la inestabilidad del cariotipo de estas células es directamente proporcional al grado de aneuploidía. Algunos autores proponen que la heterogeneidad fenotípica de las células cancerosas es el resultado de la inestabilidad de su cariotipo.

La segregación simétrica de los cromosomas depende de la existencia de dos copias idénticas de los genes durante la mitosis. Cuando un gen se altera por medio de diferentes mecanismos, aparece la aneuploidía y la célula se dividirá sujeta a una segregación cromosómica asimétrica, de forma que no se producirán dos copias idénticas de cada cromosoma. Cada vez que se produzca la mitosis, la célula entrará en un proceso denominado "*error de propagación cromosómica*"²³⁷, de forma que será prácticamente imposible mantener el cariotipo normal en aquellas células cancerosas con propagación clonal, lo cual ocurre en la mayoría de los tumores^{238,239}.

De esta forma, el fenotipo celular puede ser modificado por dos mecanismos diferentes²³⁹:

- 1) por medio de una mutación que implique la síntesis de una proteína,
- 2) aumentando o disminuyendo el número de líneas celulares diploides ligadas a enzimas cuyo producto final está relacionado con la determinación del cariotipo.

Por otra parte, es conocido el hecho de que los tumores transicionales presentan defectos genéticos tales como, deleciones parciales del cromosoma 9²⁴⁰, aberraciones numéricas de los cromosomas 7, 9^{135,136} y 17^{136,241}, así como, signos indirectos de inestabilidad genética como, sobreexpresión del gen supresor p53^{135,242} o del marcador de proliferación Ki-67^{243,244} o alteraciones de la ploidía del ADN²⁴⁵.

Waldman et al.²⁴⁶, encuentra una correlación directa entre el aumento numérico del cromosoma 7 y una mayor agresividad tumoral. Ello puede ser debido a que en el cromosoma 7 se hayan ubicados genes que promueven la proliferación tumoral. Los cambios en el cromosoma 9 se han asociado con la presencia de tumores vesicales superficiales y la monosomía de este cromosoma 9 se ve implicada en la presencia de recurrencias pero no de progresión tumoral¹³⁵. La progresión tumoral se ha visto asociada con mutación en el locus del gen supresor p53 ubicado en el cromosoma 17, junto a aberraciones en el cromosoma 9^{135,136,247}. Las mutaciones de p53 y aberraciones del cromosoma 17, parecen ser la primera alteración genética que ocurre con mayor frecuencia en los tumores transicionales invasivos^{248,249,250}.

La presencia de bajas positividadades para estos dos marcadores, p53 y Ki-67, en células tumorales y en células normales puede estar en relación con lo postulado acerca de la teoría sobre la oncogénesis de los carcinomas transicionales, según la cual estos tumores se deberían a alteraciones genéticas que acontecen a diferentes niveles ("*multistep genetic alteration*"), de forma que los cambios citogenéticos se presentan mucho antes que a nivel histológico.

Es importante tener en cuenta que los análisis citogenéticos son más específicos a la hora de valorar alteraciones del ADN, y más sensibles en la determinación de pequeños defectos del ADN que la citometría, tanto de flujo como de imagen. Esto es debido a que la citometría es una técnica cuantitativa únicamente y da una información del ADN total o global, de forma que lesiones tempranas con discretos desbalances genéticos pueden mostrar histogramas diploides ya que su ADN total será normal en ese momento o cercano a la normalidad.

Otro parámetro obtenido a partir del estudio de muestras tumorales por medio de técnicas de citometría de ADN (citometría de flujo y de imagen), es la fracción celular en

proliferación o índice de proliferación (IP). Este parámetro ha sido utilizado como marcador de detección de recidiva precoz en el seguimiento de pacientes con tumores vesicales transicionales superficiales, al considerarlo como un parámetro objetivo que podría indicar la presencia de cambios celulares sugestivos de malignidad.

Un razonamiento similar al aplicado previamente con el IADN, explicaría los inconvenientes que existen para los valores del IP obtenidos en el análisis de imagen. Tanto la citometría de imagen como la de flujo proporcionan este parámetro, pero en la citometría de imagen su fiabilidad es inferior. Ello es debido al escaso número de núcleos cuantificados y a la elevada dispersión que se asocia a los datos obtenidos sobre el contenido en ADN. En los tumores aneuploides podemos detectar varias poblaciones celulares solapadas entre sí con distinto contenido en ADN nuclear anómalo. En estos casos este parámetro pierde su significado. Ello es debido, a que es prácticamente imposible diferenciar si las células tumorales están en proliferación o en una fase Go/G1, a menos que se utilicen técnicas adicionales que analicen la actividad proliferativa como puede ser, la determinación inmunohistoquímica de la proteína del gen Ki67 o del gen PCNA entre otros.

Pantazopoulos et al.²⁵¹, investigan la actividad proliferativa de 60 tumores vesicales superficiales (pTa y pT1) por medio de la determinación de la expresión de la proteína PCNA en cortes de tejido tumoral parafinado, así como, el contenido de ADN de las mismas muestras por medio de citometría de imagen. Los resultados obtenidos por estos investigadores muestran una fuerte influencia del porcentaje de células en proliferación y el tipo de histograma de ADN, no encontrando recurrencia en el grupo de tumores diploides con porcentaje de PCNA inferior al 30%, en contraste con un elevada tendencia a la recidiva en los pacientes con tumores aneuploides y expresión de PCNA superior a 30%.

Para otros autores como Tizzani et al.²⁵², no existe relación estadísticamente significativa alguna entre la aneuploidía del ADN, índice de ADN, fracción de núcleos hiperdiploides y porcentaje de positividad al factor de proliferación Ki 67 con respecto a la recidiva precoz ni a la progresión de los tumores vesicales superficiales. En este estudio tan sólo la fracción de células en fase S es el único parámetro válido para predecir la recidiva tumoral y progresión en los tumores vesicales superficiales.

Rivas del Fresno et al.²⁵³, en su estudio sobre IADN e IP obtenidos por medio de citometría de flujo, en el lavado vesical de pacientes intervenidos y tratados tras ser diagnosticados de un tumor vesical transicional, aportan que dichas variables pueden ser muy útiles a la hora de valorar la recidiva superando a la citología de orina pero insistiendo en que se trata de variables complementarias que apoyan al diagnóstico anatomopatológico clásico pero que de momento no lo pueden reemplazar. También realizan una valoración sobre el sustrato del análisis, apuntando que lo ideal es realizar el análisis de ploidía sobre las muestras tumorales y sobre el lavado vesical ya que, aunque el estudio realizado sobre el corte histológico es más sensible que el realizado a partir del lavado vesical, si se realizan ambas determinaciones se consigue predecir hasta el 50% de las recidivas.

Al analizar nuestra serie, hemos obtenido que el índice de proliferación obtenido a través del estudio de la ploidía del ADN por medio de citometría de imagen, podría ser contemplado como un marcador útil para predecir la recidiva tumoral en los tumores vesicales papilares superficiales. Este hallazgo concuerda con el obtenido por otros grupos. Lipponen et al.²⁵⁴, realizan un estudio en 448 tumores vesicales superficiales teniendo en cuenta la clasificación TNM, el grado tumoral, el índice mitótico, la ploidía del ADN y la fracción de células en fase S o en fase de proliferación de cada tumor y llegaron a la conclusión de que en los tumores papilares, el índice de proliferación es un factor pronóstico independiente por encima incluso de la ploidía del ADN. Así, los tumores con un índice de proliferación superior al 10% o tumores con mas de 10 figuras mitóticas/mm², presentan un pronóstico desfavorable.

No todos los estudios realizados hasta al momento coinciden en el significado de la fracción de células en proliferación o fracción de células en fase S, así como, no todos encuentran diferencias a nivel de supervivencia entre los tumores con bajo y con alto porcentaje de células en fase S. Estas discordancias pueden ser debidas a diferencias en el manejo de las muestras y en la interpretación de los histogramas, siendo imprescindible la aplicación de técnicas computarizadas que permitan realizar el análisis nuclear de forma fidedigna y reproducible.

Para estos mismos autores²⁵⁴, el índice de proliferación tampoco aporta información adicional sobre la recidiva, pero si sobre la progresión tumoral.

El grado de hiperploidía (DH) es otro de los parámetros que ofrece el estudio del ADN por medio de citometría de imagen. Numerosos autores coinciden en considerarlo como un importante parámetro de agresividad de los tumores vesicales junto a otros como son, el porcentaje de células en fase S (IP) o el tamaño nuclear valorado a través del área nuclear. Sin embargo, como ya se ha mencionado, el valor de estos parámetros parece ser importante a la hora de valorar la agresividad y capacidad de progresión tumoral, pero no muestran un papel relevante para predecir la recidiva tumoral. Hemstreet et al.¹⁹⁷ realiza un estudio de ploidía por medio de citometría de imagen en bloques parafinados de 88 tumores transicionales de bajo grado concluyendo que, la aneuploidía y la presencia de células con contenido de ADN mayor de 5C, deberían ser seguidos más estrechamente que los que no cumplen estos criterios. Estos autores encontraron asociación entre aneuploidía, muerte cáncer-específica y recidiva tumoral. Para este grupo de trabajo queda claro que el análisis de la ploidía del ADN de los tejidos por medio de citometría de imagen, puede identificar a pacientes con elevado riesgo de recidiva y muerte. Resultados similares a los de Hemstreet son los obtenidos por de la Roza et al.²⁵⁵, que en su estudio sobre 78 tumores vesicales superficiales, obtiene que el 68% de los casos que mostraron elevados porcentajes de células con contenido superior a 5C presentaron recidiva.

Con respecto a la información aportada por el área media nuclear debemos concluir en nuestro estudio, al igual que otros autores²⁵⁶, que dicho parámetro no presenta una relación estadísticamente significativa en términos de recidiva. García et al.^{257,258}, establecen un punto de corte para el área media nuclear de 50 μm^2 en un intento de diferenciar los tumores G2 en dos subgrupos con comportamiento estadísticamente significativos, sin encontrar que este descriptor morfométrico discrimine entre ambos subgrupos.

Si bien en nuestro estudio el AMN no mostró relación estadística en términos de recidiva si hemos objetivado como los tumores pTa muestran AMN inferiores a la AMN de los tumores pT1 con una diferencia estadísticamente significativa entre los tumores que recidivaron frente a los que no lo hicieron. De forma similar, el área nuclear media (AMN) es significativamente superior en los pacientes con tumores de contenido aneuploide ($p < 0.005$). Lo mismo ocurrió por grados, siendo los valores de AMN de los tumores grado III superiores a las de los grado I y II.

De todo lo expuesto previamente, creemos que se debe ser crítico con los resultados obtenidos a través del estudio de ADN por medio de citometría de imagen, pues aunque disminuye el componente subjetivo del estudio anatomopatológico, los resultados publicados hasta el momento son muy dispares. Esto puede ser debido tanto al manejo de las muestras como a la interpretación de los resultados. Debemos ser conscientes de que en ocasiones los distintos modelos de análisis estadísticos pueden crear modelos de dudoso interés biológico y/o difícil explicación.

6. *CONCLUSIONES*

1.- Los parámetros clásicos analizados en el conjunto de nuestra serie tales como, sexo, hábito tabáquico, presencia de anilinas, grado nuclear, estadio tumoral y número de tumores, no se asocian a riesgo de recidiva.

2.- En el estudio del conjunto global de tumores de nuestra serie, únicamente el tamaño tumoral, considerado como factor aislado, parece relacionarse con la presencia de recidiva tumoral.

3.- El contenido de ADN de las células tumorales transicionales aporta información predictiva independiente de los factores clásicos, siendo el índice de proliferación el parámetro citométrico más relevante.

4.- La mejor forma de predecir el desarrollo de recidiva tumoral es mediante un modelo que combina la información aportada tanto por los parámetros clásicos como por los parámetros citométricos. En concreto:

4.a- La multiplicidad tumoral multiplica por tres la probabilidad de recidiva.

4.b- El índice de proliferación superior al 10% duplica dicha probabilidad

4.c- La variable edad debe ser considerada dentro del contexto global del estudio, siendo un factor determinante si se asocia a la presencia de alguno de los otros dos factores, ya que su coeficiente está cercano a la unidad.

5.- El modelo matemático que demostró tener mayor capacidad predictiva permitió establecer tres grupos de riesgo de recidiva bien definidos entre los tumores G2pT1:

5.a- El grupo de pacientes con *riesgo bajo* de recidiva lo constituyen, aquellos que presentan 1-2 tumores, con índice de proliferación inferior al 10%, independientemente de su edad. La probabilidad de recidivar se multiplica por un factor inferior a 1.

5.b- El grupo con *riesgo medio* lo constituyen, aquellos pacientes que presentan o bien tumores múltiples o tumores con índices de proliferación superiores al 10%. La probabilidad de recidiva se duplica. Si bien en los mayores de 75 años puede llegar incluso a multiplicarse por 4.

5.c- El grupo de *riesgo elevado* lo constituyen, aquellos pacientes que presentan multiplicidad tumoral con índices de proliferación superiores al 10%. La probabilidad de recidiva se triplica y la edad es un factor importante pues la probabilidad de recidiva se multiplica por 5 en caso de pacientes mayores de 65 y por 9 en los mayores de 75 años.

6.- Consideramos que la citometría de imagen constituye una herramienta de ayuda adicional al estudio anatomopatológico sin que por el momento pueda sustituirla.

7. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Martínez-Piñeiro JA, Martínez-Piñeiro L. Tumores vesicales. En: Tratado de Urología. Jimenez Cruz, JF., Rioja Sanz, LA (ed.). J.R. Prous Editores, Barcelona, 1993: 1152-1201.
- ² Herr HW, Laudone VP. An overview of intravesical therapy for superficial bladder tumors. *J Urol*, 1987; 138: 1363-1365.
- ³ Sherman AB, Koss LG, Adams SE. Interobserver and intraobserver differences in the diagnosis of urothelial cells. *Analyt Quant Cytol*, 1984; 6: 112-120.
- ⁴ Mostofi FK. Pathology and spread of carcinoma of the urinary bladder. En: *Cancer of the Genitourinary Tract*. Eds. D.E: Johnson ML Samuels, Raven Press, Nueva York, 1979.
- ⁵ Boring CC, Squires TS, Tong T, et al. Cancer statistics. *Cancer J Clin*, 1994; 44:7-10.
- ⁶ Cohen SM, Johansson SL. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 1992; 19: 421-428.
- ⁷ Ruiz Cerdá JL, Gil A, Ferrando D, et al. Evolución temporal (1960-1990) de la mortalidad y la razón de masculinidad en España del cáncer vesical. *Actas Urol Esp*, 1995; 19: 196-202.
- ⁸ Benson RC.Jr, Tomera KM, Kelalis PP. Transitional cell carcinoma of the bladder in children and adolescents. *J Urol*, 1983; 130: 54-58.
- ⁹ Cohen SM, Johansson SL. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 1992; 19:421-428.
- ¹⁰ Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, et al. The role of N-acetyl transferase in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*, 1982; 2: 482-489.

- ¹¹ Clavel J, Cordier S, Boccon-Gibod L, et al. Tobacco and bladder cancer in males: increased risk for inhalers and smokers of black tobacco. *Int J Cancer*, 1989; 44:605-611.
- ¹² Zhang Z-F, Steineck G. Epidemiology and etiology of bladder cancer. In: *Principles and Practice of Genitourinary Oncology*. Raghavan D, Scher HI, Leibel SA and Lange P (eds). JB Lippincott Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1997: 215-222.
- ¹³ Catalona WJ.: Urothelial tumors of the urinary tract. In. *Campbell's Urology*. PC Walsh, AB Retik, TA Stamey, E.D. Vaughan Jr (eds.). Saunders, Philadelphia, 1994.
- ¹⁴ Augustine A, Herbert JR, Rabat GC, et al. Bladder cancer in relation to cigarette smoking. *Cancer Res*, 1988; 48: 4405-4412.
- ¹⁵ Price JM. Etiology of bladder cancer. In: *Benign and malignant tumors of the urinary bladder*. Flushing NY, Maltry, E (ed). Medical examination publishing, New York, 1971: 189-251.
- ¹⁶ Zhang Z, Sarkis AS, Cerdón-Cardó C, et al. Tobacco smoking, occupation and p53 overexpression in early stage bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 1994; 3(1): 19-24.
- ¹⁷ Cerdón Cardó C. Molecular alterations in bladder cancer. *Cancer Surveys*, 1998; 32: 115-131.
- ¹⁸ González CA, et al. Occupation, tobacco use, coffee and bladder cancer in the country Mataró (Spain). *Cancer*, 1985; 55: 2031-2034.
- ¹⁹ Piper JM, Tonascia J, Metanosk GM. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med*, 1985; 313: 292-295.

- ²⁰ Fokkens W. Phenacetin abuse related to bladder cancer. *Environ Res*, 1979; 20: 192-194.
- ²¹ Morrison AS, Verhoek WG, Leck I, et al. Artificial sweeteners and bladder cancer in Manchester, UK and Nagoya, Japan. *Br J Urol*, 1982; 45: 332-338.
- ²² Muncione GP, Messerini L, Salutti C, et al. HPV and p53 in urinary bladder carcinoma. *Pathologica*, 1994; 86:244-250.
- ²³ Sella A, Dexeus FH, Chong C, et al. Radiation therapy associated with invasive bladder tumors. *Urology*, 1989; 33:185-192.
- ²⁴ Tuttle TM, Williams GM, Marshall FF, et al. Evidence for cyclophosphamide induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient. *J Urol*, 1988; 140: 1009-1017.
- ²⁵ Knowles MA, Williamson M. Mutation of H-ras is frequent in bladder cancer: Confirmation of single strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms and direct sequencing. *Cancer Res*, 1993; 53:133-139.
- ²⁶ Ooi A, Herz F, Setsuko I, et al. HRAS codon 12 mutation in papillary tumors of the urinary bladder: a retrospective study. *Int J Oncol*, 1994; 4: 85-89.
- ²⁷ Czerniak B, Cohen GL, Etkind P, et al. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the H-RAS gene in urinary bladder carcinomas. *Hum Pathol*, 1992; 23:1199-1203.
- ²⁸ Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K, et al. Identification of HRAS mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J Nat Cancer Inst*, 1995; 87: 129-133.

- ²⁹ Cerutti P, Hussain P, Pourzand C, et al. Mutagenesis of the H-Ras protooncogene and p53 tumor suppressor gene. *Cancer Res*, 1994; 54: 1934s-1938s.
- ³⁰ Bittard H, Descotes F, Billerey C, et al. A genotype study of the C-H-Ras-1 locus in human bladder tumors. *J Urol*, 1996; 155: 1083-1088.
- ³¹ Gorgoulis VG, Barbatis C, Poulias I, et al. Molecular and immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor and c-erb-B-2 gene product in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: a study in greek patients. *Mod Pathol*, 1995; 8: 758-764.
- ³² Sauter G, Haley J, Chew K, et al. Epidermal growth-factor-receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer. *Int J Cancer*, 1994; 57: 508-514.
- ³³ Turkeri LN, Erton ML, Cevik I, Akdas A. Impact of the expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor on the prognosis of superficial bladder cancer. *Urology*, 1998; 51: 645-649.
- ³⁴ Neal DE, Sharples L, Smith K, et al. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 1990; 65: 1619-1625.
- ³⁵ Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a multivariate survival analysis. *Am J Clin Path*, 1994; 101: 166-176.
- ³⁶ Ravery V, Grignon D, Angulo J, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-er-B-2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res*, 1997; 25: 9-17.

- ³⁷ Rao JY, Hemstreet GP, Hurst RE, et al. Alterations in phenotypic biochemical markers in bladder epithelium during tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 1993; 90: 8287-8291.
- ³⁸ Underwood M, Barlett J, Reeves J, et al. C-ERBB2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors?. *Cancer Res*, 1995; 55: 2422-2430.
- ³⁹ Sardi I, Dal Canto M, Guazzelli R, et al. Molecular genetic alterations of c-myc oncogene in superficial and locally advanced bladder cancer. *Eur Urol*, 1998; 33(4): 424-430.
- ⁴⁰ Christoph F, Schmidt B, Schmidt-Drager BJ, et al. Overexpression and amplification of the c-myc gene in human urothelial carcinoma. *Int J Cancer*, 1999; 84(2): 169-173.
- ⁴¹ Mellon JK, Lunec J, Wright C, et al. C-erb-B-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol*, 1996; 155: 321-326.
- ⁴² Tetu B, Fradet Y, Allard P, et al. Prevalence and clinical significance of Her-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol*, 1996; 155(5): 1784-1788.
- ⁴³ Lipponen PK, Aaltomaa S, Eskelinen M. Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumours. *Histopathology*, 1996; 28: 135-140.
- ⁴⁴ Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, et al. The prevalence of bcl-2, p53, and Ki67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Human Pathol*, 1998; 29:146-154.
- ⁴⁵ King ED, Matteson J, Jacobs SC, et al. Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression. *J Urol*, 1993; 155: 316-320.

-
- ⁴⁶ Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971; 68: 820-823.
- ⁴⁷ Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour supressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-456.
- ⁴⁸ Volgestein B, Kinzler K. p53 function and dysfunction. *Cell*, 1992; 70, 523-526.
- ⁴⁹ Lane DP: Cancer p53, guardian of the genome (news:coment). *Nature*, 1992; 358: 15-16.
- ⁵⁰ Kastan MB, Onkyekwere O, Sidransky D, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 1991; 51: 6304-6311.
- ⁵¹ Cordón-Cardó C, Dalbagni G, Saez GT, et al. P53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer*, 1994; 56: 347-353.
- ⁵² Burkhard FC, Markwalder R, Thalmann GN, Studer UE. Immunohistochemical determination of p53 expression. *Urol Res*, 1997; 25 (suppl 1): s31-s35.
- ⁵³ Sinik Z, Alkibay T, Ataoglu O, et al. Correlation of nuclear p53 overexpression with clinical and histopathological features of transitional cell bladder cancer. *Int Urol Nephrol*, 1997; 29: 25-31.
- ⁵⁴ Greenblatt MS, Benett WP, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994; 54: 4855-4878.
- ⁵⁵ Dalbagni G, Pretsi JC, Reuter VE, et al. Molecular genetic alterations of chromosome p17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. *Diag Mol Pathol*, 1993; 2: 4-13.
- ⁵⁶ Sarkis A, Dalbagni VE, Saez GT, et al. Detection of p53 mutations in superficial (T1) bladder carcinomas as a marker of disease progression. *J Natl Cancer Int*, 1993; 85: 53-59.

-
- ⁵⁷ Sarkis AS, Dalbagni VE, Cordon-Cardó C, et al. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol*, 1994; 152: 388-392.
- ⁵⁸ Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, et al. Allelic loss of chromosomes 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 1990; 50: 7081-7083.
- ⁵⁹ Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, et al. Allelic losses of chromosomes 9, 11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*, 1994; 54: 784-788.
- ⁶⁰ Decaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, et al. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell*, 1989; 58: 1085-1095.
- ⁶¹ Cordon-Cardó C, Wartinger D, Petrylak D et al. Altered expressions of the retinoblastome gene product: prognostic indicator of bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1992; 84: 1251-1256.
- ⁶² Goodrich DW, Chen Y, Scully P et al. Expression of retinoblastome gene product in bladder carcinoma cells associates with a low frequency of tumor formation. *Cancer Res*, 1992; 52: 1968-1973.
- ⁶³ Cordon Cardó C, Wartinger D, Petrylak D, et al. Altered expression of the retinoblastome gene product as a predictor of outcome in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1992; 84:1251-1256.
- ⁶⁴ Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, et al. Altered expression of retinoblastome protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1992; 84: 1256-1261.
- ⁶⁵ Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993; 366: 704-707.

-
- ⁶⁶ Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, et al. Deletion of the p16 and p15 in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst*, 1995; 87(20): 1524-1529.
- ⁶⁷ Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, et al. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res*, 1995; 55(22): 5213-5216.
- ⁶⁸ Habuchi T, Devlin J, Elder PA et al. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene*, 1995; 11(8): 1671-1674.
- ⁶⁹ Lipponen PK, Eskelinen MJ. Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1995; 121: 303-308.
- ⁷⁰ Wakatsuki S, Watanabe R, Saito K, et al. Loss of human E-cadherin (ECD) correlated with invasiveness of transitional cell cancer in the renal pelvis, ureter and urinary bladder. *Cancer Lett*, 1996; 103: 11-17.
- ⁷¹ Ross JS, Del Rosario AD, Figge HL, et al. E-Cadherin expresión in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Human Pathol*, 1995; 26: 940-944.
- ⁷² Griffiths TRL, Brothrick I, Bishop RI, et al. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer*, 1996; 74: 579-584.
- ⁷³ Blackburn EH. Telomerase: no end in sight. *Cell*, 1994; 77: 621-623.
- ⁷⁴ Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994; 266: 2011-2015.

- ⁷⁵ Kyo S, Kunimi K, Uchibayashi T, et al. Telomerase activity in human bladder cancer. *Am J Clin Pathol*, 1997; 107: 555-560.
- ⁷⁶ Miyake H, Hara I, Yamanaka K, et al. Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence. *Cancer*, 1999; 86: 316-324.
- ⁷⁷ Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, et al. Trombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, 1997; 89: 219-227.
- ⁷⁸ Murphy WH, Soloway MS, Jukkola AF, et al. Urinary cytology and bladder cancer: the cellular features of transitional cell neoplasias. *Cancer*, 1984; 53: 1555-1560.
- ⁷⁹ Murphy WM, Crabtree WN, Jukkola AF. The diagnostic value of urine versus bladder washing in patients with bladder cancer. *J Urol*, 1981; 126: 320-327.
- ⁸⁰ Martinez Sarmiento M, Vera Donoso CD, Jimenez Cruz JF. Diagnóstico y protocolos de seguimiento en la recidiva del tumor superficial vesical. En: Diagnóstico y tratamiento de la recidiva en los tumores urológicos. Ed. Grupo Aula Médica. Madrid, 1996.
- ⁸¹ Dershaw DD, Shero HI. Sonography in the evaluation of carcinoma of the bladder. *Urology*, 1987; 29: 454-459.
- ⁸² Boronat F, Fernandez J, Llopis B, et al. Ecografía transuretral de vejiga: Diagnóstico y estadiaje tumoral. *Act Esp Urol*, 1986; 10: 341-346.

-
- ⁸³ Soloway M. Current concepts in the management of superficial bladder cancer. *Arch Esp Urol*, 1990; 43 (suppl): 115-121.
- ⁸⁴ Ruiz Cerdá JL, Morera J, Pontones JL, et al. Factores pronósticos de los tumores del tracto urinario superior. *Actas Urol Esp*, 1993; 17: 547-554.
- ⁸⁵ Witjes JA; Kiemeny LA, Oosterhof GO et al. Prognostic factors in superficial bladder cancer. A review. *Eur Urol*, 1992; 21(2): 89-97.
- ⁸⁶ Hanus M, Matouskova M. Location of primary and recurrent superficial bladder tumors and benefits of selective biopsies. *Neoplasma*, 1994; 41(2): 119-122.
- ⁸⁷ Ayala AG, Ro JY. Premalignant lesions of the urothelium and transitional cell tumors. In: *Pathology of the Urinary Bladder*. Young, R.H. (Ed.), Churchill-Livingstone, New York, 1989, 65-101.
- ⁸⁸ Algaba F, Moreno A, Trias I. Tumores de las vías urinarias. En: *Uropatología tumoral. Correlación morfológica, molecular y clínica*. Ed. Pulso, Primera Edición, Barcelona, 1996, 103-202.
- ⁸⁹ Althausen AF, Prout GR, Daly JJ. Non invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol*, 1976; 116: 475-484.
- ⁹⁰ Broders AC. Epithelioma of the genitourinary organs. *Ann Sur.*, 1922; 75: 574-579.
- ⁹¹ Franksson C. Tumors of the urinary bladder. Pathology and clinical study of 434 cases. *Acta Chir Scand*, 1950; 100: 664-670.
- ⁹² Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumors. *International histological classification of tumors*. Ginebra. O.M.S., 1973; nº 10.

-
- ⁹³ Reuter VR, Epstein JI, Amin MB, et al. A newly illustred synopsis of the World Health Organization/International Society of Urologic Pathology (WHO/ISUP) . Consensus classification of urothelial (Transitional-Cell) neoplasms of the urinary bladder. *J Urol Pathol*, 1999; 11: 1-27.
- ⁹⁴ Sobin LH, Wittekind Ch. *TNM Classification of Malignant Tumours*.Fifth Edition, New York, 1997.
- ⁹⁵ Cifuentes L, Garcia de la Peña E, Vela Navarrete R. Survival rates of patients with bladder tumors. An experience of 1744 cases (1959-1978). *Br J Urol*, 1982; 54: 267-272.
- ⁹⁶ Klan R, Loy V, Huland H. Residual tumor discovered in routine second transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 1991; 146(2): 316-318.
- ⁹⁷ Vicente J, Salvador J, Laguna P. Laserterapia de los tumores superficiales de vejiga. *Arch Esp Urol*, 1990; 43 (supl.2):125-130.
- ⁹⁸ Huland H, Kloppel G, Fedderson I, et al. Comparison of different schedules of cytostatic intravesical instillations in patients with superficial bladder carcinoma: Final evaluation of a prospective multicenter study with 419 patients. *J Urol*, 1990; 144: 68-71.
- ⁹⁹ Sarosdy MF, Lamm DL. Long-term results of intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol*, 1989; 142: 719-728.
- ¹⁰⁰ Herr HW. Progression of T1 bladder tumors after intravesical Bacillus Calmette-Guerin. *J Urol*, 1991; 145(1): 40-43.

-
- ¹⁰¹ González R, Mellones A, Guzman A, Gelabert-Mas A. Efecto mielosupresor durante el tratamiento con citostáticos endocavitarios en los tumores vesicales. *Arch Esp Urol*, 1979; 22: 49-52.
- ¹⁰² Heney NM, Koontz WW, Barton B, et al. Intravesical thiotepa vs. mitomycin C in patients with Ta, T1 and Tis transitional cell carcinoma of the bladder: A phase III prospective randomized study. *J Urol*, 1988; 140: 1390-1399.
- ¹⁰³ Prout GR Jr., Griffin PP, Nocks BN, et al. Intravesical therapy of low stage bladder carcinoma with mitomycin C: Comparison of results in untreated and previously treated patients. *J Urol*, 1982; 127: 1096-1102.
- ¹⁰⁴ Lundbeck F, Mogensen P, Jeppeson M. Intravesical therapy of noninvasive bladder tumors (stage Ta) with doxorubicin and urokinase. *J Urol*, 1983; 130: 1087-1094.
- ¹⁰⁵ Shapiro A, Lijovetzky G, Pode D. Changes of the mucosal architecture and of urine cytology during BCG treatment. *World J Urol*, 1988; 6: 61-64.
- ¹⁰⁶ Ratliff TL, Palmer JO, McGarr JA, et al. Intravesical BCG for murine bladder tumors: Initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of BCG. *Cancer Res*, 1987; 47: 1762-1766.
- ¹⁰⁷ Pagano F, Bassi P, Milani C et al. A low dose bacillus Calmette-Guerin (BCG) therapy in superficial high-risk bladder cancer: a phase II study with the BCG strain connaught Canada. *Br J Urol*, 1995; 75: 185-187.
- ¹⁰⁸ Bassi P, Spinadin R, Carando R, et al. Modified induction course: a solution to side effects? *Eur Urol*, 2000; 37 (suppl): 321-332.

-
- ¹⁰⁹ Martinez Piñeiro JA, Solsona E, Flores N, Isorna S. Cooperative Group CUETO. Improving the safety of BCG immunotherapy by dose reduction. *Eur Urol*, 1995; 27(suppl): 13-18.
- ¹¹⁰ Morales A. Intravesical therapy of bladder cancer: an immunotherapy success story. *Int J Urol*, 1996; 3(5). 329-333.
- ¹¹¹ Lamm DL. Complications of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Urol Clin North Am*, 1992; 19: 565-572
- ¹¹² Borden EC, Sidky YA, Ertürk E, et al. Protection from carcinogen-induced murine bladder carcinoma by interferons and an oral interferon-inducing pyrimidinone, bropirimine. *Cancer Res*, 1990; 50: 1071-1074.
- ¹¹³ Sherman AB, Koss LG, Adams SE. Interobserver and intraobserver differences in the diagnosis of urothelial cells. Comparison with classification by computer. *Anal Quant Cytol*, 1984; 6(2):112-120.
- ¹¹⁴ Parmar MK, Freedman LS, Hargreave TB, Tolley DA. Prognostic factors for recurrence and followup policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council subgroup on superficial bladder cancer (urological cancer working party). *J Urol*, 1989; 142: 284-288.
- ¹¹⁵ Witjes JA, Kiemeny LA, Schaafsma HE, Debruyn MF. The influence of review pathology on study outcome of a randomized multicentre superficial bladder cancer trial. Members of the Dutch South East cooperative urological group. *Br J Urol*, 1994; 73(2): 172-176.

-
- ¹¹⁶ Gelabert-Mas A, Corominas JM, Arango O. Determinación de los isoantígenos ABO (H) de superficie en el carcinoma de células transicionales de vejiga. Estudio clínico-patológico (1ª parte). *Actas Urol Esp*, 1988; 22: 248-253.
- ¹¹⁷ Singhal AK. Histo-blood group antigens in cancer. *Sem Cancer Biol*, 1991; 2: 379-388.
- ¹¹⁸ Mandel U, Langkilde NC, Omtoft TF, et al. Expression of histo-blood-group-A/B-gene-defined glycosyltransferases in normal and malignant epithelia: correlation with A/B carbohydrate expression. *Int J Cancer*, 1992; 52: 7-12.
- ¹¹⁹ Orlow I, Lacombe L, Pellicer I, et al. Genotype and phenotype characterization of the histoblood group ABO (H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer*, 1998; 75: 819-824.
- ¹²⁰ Dalbagni G, Presti J, Reuter V, et al. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet*, 1993; 324: 469-471.
- ¹²¹ Villadiego K, Carles J, Gelabert-Mas A, et al. Valor pronóstico del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en los carcinomas superficiales de vejiga. *Oncología*, 1998; 21(7): 225-231.
- ¹²² Messing EM. Clinical implications of the expression of the epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer Res*, 1990; 50: 2530-2537.
- ¹²³ Neal DE, Sharples L, Smith K, et al. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 1990; 65: 1619-1625.
- ¹²⁴ Coombs LM, Pigott DA, Eydmann ME, et al. Reduced expression of TGF beta is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma. *Br J Cancer*, 1993; 67(3): 578-584.

- ¹²⁵ Pasche B, Luo Y, Rao PH, et al. Type I transforming growth factor beta receptor maps to 9q22 and exhibits a polymorphism and a rare variant within a polyalanine tract. *Cancer Res*, 1998; 58(13): 2727-2732.
- ¹²⁶ Lianes P, Orlow I, Cordón-Cardó C et al. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1994; 86: 1325-1330.
- ¹²⁷ Bernues M, Casadevall C, Miró R, et al. A case of transitional cell carcinoma of the bladder with a del (9)(q11-21.2). *Cancer Genet Cytogenet*, 1993; 69: 76-77.
- ¹²⁸ Orlow I, LaRue H, Osman I, et al. Deletions of the INK4A gene in superficial bladder tumors. Association with recurrence. *Am J Pathol*, 1999; 155(1): 105-113.
- ¹²⁹ Cordón-Cardó C, Zhang Z-F, Dalbagni G, et al. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res*, 1997; 57: 1217-1221.
- ¹³⁰ Bernues M, Casadevall C, Caballiu MR, et al. Study of allelic losses on 3p, 6q and 17p in human urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999; 112: 42-45.
- ¹³¹ Serio G. PCNA/cyclin expression in transitional cell carcinomas of the human bladder: Its correlation with Ki-67 and epidermal growth factor receptor immunostainings. *Pathologica*, 1994; 86: 161-166.
- ¹³² Sidransky D, Frost P, von Eschenbach A, et al. Clonal origin of bladder cancer. *N Engl J Med*, 1992; 326: 737-740.
- ¹³³ Xu X, Stower MJ, Reid I.N, et al. Molecular screening of multifocal transitional cell carcinoma of the bladder using p53 mutations as biomarkers. *Clin Cancer Res*, 1996; 2: 1795-1800.

-
- ¹³⁴ Harris AL, Neal DE. Bladder cancer. Field versus clonal origin. Editorial comment on Sidransky D, Frost, von Eschenbach a, et al. Clonal origin of bladder cancer. *N Engl J Med*, 1992; 326: 737-759.
- ¹³⁵ Spruck CH, Ohneseit PE, Gonzalez-Zulueta M, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 1994; 54: 784-788.
- ¹³⁶ Sandberg AA, Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol*, 1994; 151: 545-560.
- ¹³⁷ Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*, 1996; 274: 1672-1677.
- ¹³⁸ Strauss M, Lukas J, Bartek J. Unrestricted cell cycling and cancer. *Nature*, 1995; 1(12): 1245-1246.
- ¹³⁹ Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet*, 1995; 11(4): 136-149.
- ¹⁴⁰ De Robertis E, Hib J. Citogenética. En: De Robertis (h), Hib, Ponzio, eds. *Biología celular y molecular*. Ed. 12^a, El Ateneo, Madrid, 1996, 414-425.
- ¹⁴¹ Orfao A, Gonzalez M, Ciudad J, et al. Cell cycle and DNA aneuploidy. Biological bases and terminology. In: Sampedro A, Orfao A, Eds: *DNA cytometric analysis*. Oviedo. Universidad de Oviedo, 1993, 15-24.
- ¹⁴² Esteban JM, Sheibani K, Owens M, et al. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis. A need for strict internal DNA standards. *Am J Clin Pathol*, 1991; 95: 460-466.
- ¹⁴³ Montironi R, Diamanti L, Galluzzi CM, et al. Optimization of DNA static cytometry. *Arq Pathol*, 1992; 24: 15-35.

-
- ¹⁴⁴ Kiss R, Salmon I, Camby I, et al. Characterization of factors in routine laboratory protocols that significantly influence the Feulgen reaction. *J Histochem Cytochem*, 1993; 41: 935-945.
- ¹⁴⁵ Ferrer O. Software de análisis textural con aplicaciones histológicas. I. Cuantificación de ADN. *Citología*, 1989; 11: 121-128.
- ¹⁴⁶ Pietra N, Sarli L, Sansebastiano G, et al. Prognostic value of ploidy cell proliferation kinetics and conventional clinico-pathologic criteria in patients with colorectal carcinoma prospective study. *Dis Colon Rectum*, 1996; 39: 494-503.
- ¹⁴⁷ Brugal G. Quantitative microscopy and tumour cell proliferation. *Bull Cancer*, 1995; 82(5): 511s-517s.
- ¹⁴⁸ Galand P, Degraef C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labeling for marking S phase cells in paraffin sections from animals and human tissues. *Cell Tissue Kinet*, 1989; 22: 383-392.
- ¹⁴⁹ Trzepacz C, Lowy AM, Kordich JJ, et al. Phosphorylation of the tumor suppressor adenomatous polyposis coli by the cyclin-dependent kinase p34. *J Biol Chem*, 1997; 272: 21681-21684.
- ¹⁵⁰ Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry*, 1993; 14: 472-477.
- ¹⁵¹ Carey FA. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: Principles and applications. *J Pathol*, 1994; 172: 307-312.
- ¹⁵² Cornelisse CJ, Tanke HJ. Flow cytometry. In: *Comprehensive cytopathology*. Bibbo M (ed). WB Saunders Company, Philadelphia, 1991: 984-1010.

-
- ¹⁵³ Bibbo M, Bartels PH, Dytch HE, et al. Cell image analysis. In: Comprehensive cytopathology. Bibbo M (ed). WB Saunders Comp, Philadelphia, 1991, 965-983.
- ¹⁵⁴ Martinez-Nistal A, Hardisson D, Gonzalez A, et al. Physical and instrumental bases of DNA image cytometry. In: Sampedro A, Orfao A, (ed): DNA cytometric analysis. Oviedo; 1993, 25-52.
- ¹⁵⁵ Auer GU, Askensten U, Ahrens O. Cytophotometry. Hum Pathol, 1989; 20: 518-527.
- ¹⁵⁶ Danque P, Chen HB, Patil J, et al. Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantification of solid tumours: A comparison of six methods of sample preparation. Modern Pathol, 1993; 6: 270-275.
- ¹⁵⁷ Bertino B, Knape WA, Pytlinska M, et al. A comparative study of DNA content as measured by flow cytometry and image analysis in 1864 specimens. Anal Cell Pathol, 1994; 6: 377-394.
- ¹⁵⁸ Goulandrís N, Karakitsos P, Georgoulakis J, et al. Deoxyribonucleic acid measurements in transitional cell carcinomas: comparison of flow and image cytometry techniques. J Urol, 1996; 156: 958-960.
- ¹⁵⁹ Faranda A, Costa A, Canova S, et al. Image and flow cytometric analyses of DNA content in human solid tumors. A comparative study. Anal Quant Cytol Histol, 1997; 19: 338-344.
- ¹⁶⁰ Koss LG, Wersto RP, Simmons DA, et al. Predictive value of DNA measurements in bladder washings. Comparison of flow cytometry, image cytophotometry, and cytology in patients with a past history of urothelial tumors. Cancer, 1989; 64: 916-924.
- ¹⁶¹ Valls O, Moreno JL, Rodríguez LJ. Métodos ópticos: ondas electromagnéticas. En: Técnicas instrumentales en farmacia y bioquímica clínica. Valls O; Moreno JL, Rodríguez LJ (Eds). Ediciones científicas Docinfarma S.A. Barcelona, 1981, 286-293.

-
- ¹⁶² Bacus JW, Bacus JV. Quality control in image cytometry: DNA ploidy. *J Cell Biochem*, 1994; 19: 153-164.
- ¹⁶³ Jaggi B, Palcic B. Image acquisition in cytometry: optics, sensor, and signal processing. In: *Automated cervical cancer screening*. Grohs HK, Nasseem husain OA.(ed). Igaku-Shoin, New York,1994, 128-146.
- ¹⁶⁴ Bartels PH, Layton J, Shoemaker RL. Digital microscopy. *Monogr. Clin Cytol*, 1984; 9: 28-61.
- ¹⁶⁵ Bengtsson E, Nordin B. Densitometry, morphometry, and textural analysis as tools in quantitative cytometry and automated cancer screening. In: *Automated cervical cancer screening*. Grohs HK, Nasseem Husain OA. (ed). Igaku-Shoin, New York, 1994, 21-51.
- ¹⁶⁶ Salto M, Morales J, Corral N, et al. DNA histogram interpretation in image cytometry. In: *DNA cytometric analysis*. Sampedro A, Orfao A (ed). Universidad de Oviedo, Oviedo, 1993, 121-134.
- ¹⁶⁷ Böcking A, Adler CP, Common HH, et al. Algorithm for a DNA cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Analyt Quant Cytol*, 1984; 6: 1-8.
- ¹⁶⁸ Auer G, Fallenius AG, Erhardt KY, et al. Progression of mammary adenocarcinomas as reflected by nuclear DNA content. *Cytometry*, 1984; 5: 420-425.
- ¹⁶⁹ Hardisson D, Salto M, Salas A, et al. Preparation of samples for DNA image cytometry. In: *DNA Cytometric Analysis*. Sampedro A, Orfao A (ed), Universidad de Oviedo, Oviedo, 1993, 71-88.
- ¹⁷⁰ Grohs HK, Zahniser DJ, Geyer WJ. Standarization of specimen preparation through mono/thin-layer technology. In: *Grohs HK, Nasseem Husain OA (ed), New York, Igaku-Shoin, 1994, 176-185.*

- ¹⁷¹ Van Diest PJ, Smeulders AWM, Thunnisson FBJM; et al. Cytophotometry. A methodologic study of preparation techniques, selection methods and sample sizes. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1989; 4: 225-231.
- ¹⁷² Mesker WE, Eysackers MJ, Ouwerkerk-van Velzen MCM, et al. Discrepancies in ploidy determination due to specimen sampling errors. *Anal Cell Pathol*, 1989; 1: 87-95.
- ¹⁷³ Chieco P, Jonker A, Melchiorr C, et al. A users guide for avoiding errors in absorbance image cytometry: a review with original experimental observations. *Histochem J*, 1994; 26: 1-19.
- ¹⁷⁴ Hedley DW, Friedländer ML, Taylor IW, et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem*, 1983; 31: 1333-1335.
- ¹⁷⁵ Van Driel-Kulker AMJ, Mesker WE, et al. Preparation of cells from paraffin-embedded tissue for cytometry and cytomorphologic evaluation. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1987; 9: 225-231.
- ¹⁷⁶ Faulkmer UG. Methodologic sources of errors in image and flow cytometric DNA assessments of the malignancy potential of prostatic carcinoma. *Human Pathol*, 1992; 23: 360-367.
- ¹⁷⁷ Bins M, Takens F. A method to estimate the DNA content of whole nuclei from measurements made on thin tissue sections. *Cytometry*, 1985; 6: 234-236.
- ¹⁷⁸ Fu Y, Hall TL. DNA ploidy measurements in tissue sections. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1985; 7: 90-95.

- ¹⁷⁹ Esteban JM, Sheibani K, Owens M, et al. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis. *Am J Clin Pathol*, 1995; 95: 460-466.
- ¹⁸⁰ Baak JPA, Noteboom E, Koevoets JJM. The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features. *Anal Quant Cytol Histol*, 1989; 11: 219-224.
- ¹⁸¹ Schulte EKW, Wittekind DH. Standardization of the Feulgen reaction: The influence of chromatin condensation on the kinetics of acid hydrolysis. *Anal Cell Pathol*, 1990; 2: 149-157.
- ¹⁸² Becker RL, Mikel UV. Interrelation of formalin fixation, chromatin compactness and DNA values as measured by flow and image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol*, 1990; 12: 333-341.
- ¹⁸³ Kiss R, Salmon I, Camby I, et al. Characterization of factors in routine laboratory protocols that significantly influence the Feulgen reaction. *J Histochem Cytochem*, 1993; 41(6): 933-945.
- ¹⁸⁴ Giroud F. Standardization of specimen fixation in preparation for cytometric evaluation. In: Grohs HK, Nasseem Hussain OA(ed). *New York, Igaku-Shoin*, 1994, 186-199.
- ¹⁸⁵ Schulte EKW. Standardization of the Feulgen reaction for absorption DNA image cytometry: A review. *Anal Cell Pathol*, 1991; 3: 167-182.
- ¹⁸⁶ Hussain OA, Watts KC. Preparatory methods for the DNA hydrolysis cytochemistry, immunocytochemistry and ploidy analysis: Their application to automated and routine diagnosis cytopathology. *Anal Quant Citol Histol*, 1987; 9: 218-224.
- ¹⁸⁷ Lizard G, Roignot P, Bordes M. Comparative quantification of DNA in rat liver cells by flow cytometry and image analysis. *Biol Cell*, 1991; 73: 28a-31a.

-
- ¹⁸⁸ Blomjous CEM, Schipper NW, Baak SPA, et al. The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 1989; 91: 243-248.
- ¹⁸⁹ Russack V. Image cytometry: Current applications and future trends. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1994; 31(1): 1-34.
- ¹⁹⁰ Wheelless LL, Badalament RA, deVere-White RW, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. *Cytometry*, 1993; 14: 478-481.
- ¹⁹¹ Lizard G, Dusserre-Guion L, Roignot P, et al. Intérêt de l'étude cytologique par cytométrie en flux ou analyse d'image en comparaison de l'examen macroscopique par cystoscopie. A propos du suivi thérapeutique d'un cas de tumeur de vessie. *Arch Anat Cytol Path*, 1993; 41 (1): 38-44.
- ¹⁹² Ruiz Cerdá JL, Hernández M, Martínez J, et al. Value of morphometry as an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 1995; 27: 54-57.
- ¹⁹³ Ruiz Cerdá JL, Hernández M, Sempere A, et al. Intratumoral heterogeneity of DNA content in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Cancer*, 1999; 86(4): 664-671.
- ¹⁹⁴ Sampedro A, Urdiales G, Martínez-Nistal A, Riera J, Hardisson D. Prognostic value of DNA image cytometry in colorectal carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1996; 18: 214-220.
- ¹⁹⁵ Auer GU, Fallenius AG, Erhardt KY, et al. Progression of mammary adenocarcinomas as reflected by nuclear DNA content. *Cytometry*, 1984; 5: 420-425.
- ¹⁹⁶ Steinbeck RG, Heselmeyer KM, Neugebauer WF et al. DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1993; 15: 187-194.

-
- ¹⁹⁷ Hemstreet GP, Rollins S, Jones P, et al. Identification of a high risk subgroup of grade 1 transitional cell carcinoma using image analysis based deoxyribonucleic acid ploidy analysis of tumor tissue. *J Urol*, 1991; 146: 1525-1529.
- ¹⁹⁸ Sanchez de la Muela P, Rosell D, Agüera L, et al. Multivariate analysis of progression in superficial bladder cancer. *Br J Urol*, 1993; 71: 284-287.
- ¹⁹⁹ Pansadoro V, Emiliozzi P, Defidio L, et al. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of stage T1 grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder: Long term results. *J Urol*, 1995; 154: 2054-2058.
- ²⁰⁰ Freeman JA, Esrig D, Stein JP, et al. Radical cystectomy for high risk patients in the era of orthotopic urinary reconstruction. *Cancer*, 1995; 76: 833-839.
- ²⁰¹ Pauwels RP, Smeets WW, Geraedts JP et al. Cytogenetic analysis in urothelial cell carcinoma. *J Urol*, 1987; 50: 237-242.
- ²⁰² Blomjous CEM, Vos W, Uyterlinde AM, et al. The prognostic significance of selective nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. *J Clin Pathol*, 1990; 41: 21-25.
- ²⁰³ Valor pronóstico de la citomorfometría nuclear computarizada en el carcinoma transicional de vejiga estadio pT1G2. López Alcina E. Servicio de Urología. Hospital Universitario La Fe de Valencia. Dr. JF Jiménez-Cruz. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario La Fe de Valencia. Dr. M Hernández Martí. Servicio de Urología. Hospital Universitario La Fe. Dr. JL Ruiz-Cerdá. Cirugía. Facultad de Medicina de Valencia. Apto *Cum Laude*, octubre 1998.

- ²⁰⁴ Friedländer W, Hedley D, Taylor I. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol*, 1984; 37: 961-974.
- ²⁰⁵ Kouri M. DNA ploidy of colorectal carcinoma by tumour site, gender and history of noncolorectal malignancies. *Oncology*, 1993; 50: 41-45.
- ²⁰⁶ Tribukait B, Gustafson H, Esposti PL. The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumours. A study of 100 untreated cases. *Br J Urol*, 1982; 54: 130-135.
- ²⁰⁷ van Velthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ. Image cytometry determination of ploidy level, proliferative activity, and nuclear size in a series of 314 transitional bladder cell carcinomas. *Hum Pathol*, 1995; 26: 3-11.
- ²⁰⁸ Cohen C, Tickman RJ, DeRose PB, et al. DNA ploidy studies of benign and malignant tumours: comparison of flow cytometry and image analysis technique using two types of cytological specimen. *Cytopathology*, 1991; 9: 247-253.
- ²⁰⁹ Kline MJ, Wilkinson EJ, Askeland R et al. DNA tetraploidy in Feulgen-stained bladder washings assessed by image cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1995; 17: 129-134.
- ²¹⁰ Tanke, H, Brussee JAM, van Driel-Kulker AMJ, et al. Results of the automated analysis of the 328 bladder specimens using the Leyden Television Analysis System (LEY-TAS). *World J Urol*, 1983; 1: 77-82.
- ²¹¹ Hemstreet GP, Hurst RE, Bass RA, et al. Quantitative fluorescence image analysis in bladder cancer screening. *J Occup Med*, 1990; 32: 822-828.
- ²¹² Falkmer UG. Image DNA cytometry: Diagnostic and prognostic applications in clinical tumor pathology. *Cell Vision*, 1994; 1: 79-83.

-
- ²¹³ Devonec M, Hijazi A. A new concept in the natural history of human bladder cancer based on genetic instability of tumors as evidenced by flow cytometric DNA analysis. En: *Clinical Cytometry and Histometry*. Burger G, Ploem JS, Goerttler K. (editores), New York, NY Academic, 1987, 441-443.
- ²¹⁴ Abdel-Moneim I, Melamed MR, Darzynkiewicz Z, et al. Proliferation and apoptosis in solid tumors. Analysis by laser scanning cytometry. *Analyt Quant Cytol Hystol*, 2000; 22: 393-397.
- ²¹⁵ Shabaik AS, Pow-Sang JM, Lockart J, et al. Role of DNA image cytometry in the follow-up of patients with urinary tract transitional cell carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1993; 15: 115-123.
- ²¹⁶ Ross DW. Clinical usefulness of DNA ploidy and cell cycle studies. *Arch Pathol Lab Med*, 1993 Nov; 117(11): 1077.
- ²¹⁷ Cohen C. Image cytometric analysis in pathology. *Human Pathol*, 1996; 27(5): 482-493.
- ²¹⁸ Mora L, Nicosia SV, Pow-Sang JM, et al. Ancillary techniques in the follow-up of transitional cell carcinoma: A comparison of cytology, histology and deoxyribonucleic acid image analysis cytometry in 91 patients. *J Urol*, 1996; 156: 49-55.
- ²¹⁹ Herman CJ, Hedley D, Wheelless LL, et al. DNA cytometry in cancer prognosis. *Principles of practical oncology*, 1993; 7: 1-8.
- ²²⁰ deVere White RW, Olsson CA, Deitch AD. Flow cytometry: role in monitoring transitional cell carcinoma of bladder. *J Urol*, 1986; 28: 15-19.
- ²²¹ Murphy WM, Emerson LD, Chandler RW, et al. Flow cytometry versus urinary cytology in the evaluation of patients with bladder cancer. *J Urol*, 1986; 136: 815-822.

-
- ²²² Hastie KJ, Hamdy FC, Collins MC, et al. Upper tract tumours following cystectomy for bladder cancer. Is routine intravenous urography worthwhile?. *Br J Urol*, 1991; 67: 29-31.
- ²²³ Herr HW, Cookson MS, Soloway NS. Upper tract tumors in patients with primary bladder cancer followed for 15 years. *J Urol*, 1996; 156: 1286-1287.
- ²²⁴ Pycha A, Mian C, Hofbauer J, et al. Multifocality of transitional cell carcinoma results from genetic instability of entire transitional epithelium. *Urology*, 1999; 53(1): 92-97.
- ²²⁵ Steinbeck RG, Heselmeyer KM, Neugebauer WF, et al. DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1993; 15: 187-194.
- ²²⁶ Longin A, Fontanière B, Pinzani V, et al. An image cytometric DNA analysis in breast neoplasms: Parameters of DNA-aneuploidy and their relationship with conventional pronostic factors. *Path Res Pract*, 1992; 188: 466-472.
- ²²⁷ Böcking A, Adler CP, Common HH, et al. Algorithm for a DNA cytophotometric diagnosis and grading of malignacy. *Analyt Quant Cytol*, 1984; 6: 1-8.
- ²²⁸ Lanza G, Gafa R, Santani A, et al. Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma: A prospective flow cytometric study. *Cancer*, 1998; 1: 49-59.
- ²²⁹ Reeder JE, Cox C, Wheeless LL, Flint A, Liebert M, Barton H, and the BladderTumor Marker Network. Variability of DNA analysis by image cytometry. *Cytometry* 1997; 28: 176-180.
- ²³⁰ Raitanen MP, Tammela TLJ, Kallioinen M, Isola J. p53 accumulation, deoxyribonucleic acid ploidy and progression of bladder cancer. *J Urol*, 1997; 157(4): 1250-1253.

-
- ²³¹ Ioakim-Liossi A, Pantazopoulos D, Karakitsos P, et al. DNA ploidy and p53 protein expression in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Citopathology*, 2000; 11: 96-103.
- ²³² Al-Abadi H, Borgmann V, Nagel R. Transitional cell carcinoma of the urinary bladder: DNA-cytometric analysis in relation to the grade, stage and clinical course. A follow-up study of 9 years. In: Giulieni L, Lупpo P, eds. *Urology*, Monduzzi Editore. Bologna, 1992, 429-431.
- ²³³ Pantazopoulos D, Ioakim-Liossi A, Karakitsos P, et al. DNA content and proliferation activity in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res*, 1997; 17: 781-786.
- ²³⁴ Sowter C, Slavin G, Sowter G, et al. Morphometry of bladder carcinoma: morphometry and grading complement each other. *Anal Cell Pathol*, 1991; 3: 1-9.
- ²³⁵ Sánchez-Fernandez de Sevilla MC, Gil-Salom MC, Pérez-Baceta M, et al. DNA ploidy, morphometric-stereological and P-glycoprotein study of superficial bladder carcinomas. *Eur Urol*, 1992; 21(suppl. 1): 16-19.
- ²³⁶ de Vere White RW, Deitch AD, Daneshmand S, et al. The prognostic significance of S-phase analysis in stage Ta/T1 bladder cancer. *Eur Urol*, 2000; 37: 595-600.
- ²³⁷ Holliday R. Chromosome error propagation and cancer. *Trends Genet*, 1989; 5(2): 42-45.
- ²³⁸ Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 1997; 386(6625): 623-627.
- ²³⁹ Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlman R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 13692-12697.

- ²⁴⁰ Sauter G, Gasser TC, Moch H, et al. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res*, 1997; 25 (suppl 1): S37-S43.
- ²⁴¹ Olumi, AF, Tsai YC, Nichols PW, et al. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res*, 1990; 50: 7081-7083.
- ²⁴² Mellon K, Wilkinson S, Vickers J. Abnormalities in p53 and DAN content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol*, 1994; 73: 522-525.
- ²⁴³ Moch H, Sauter G, Gudat F, et al. Ki-67 fraction, p53 alteration and numerical chromosome aberrations (chromosome 7 and 17) in formalin fixed bladder tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1993; 77: 226-230.
- ²⁴⁴ Mellon K, Neal DE, Robinson MC, et al. Cell cycling in bladder carcinoma determined by monoclonal antibody Ki-67. *Br J Urol*, 1990; 66: 281-285.
- ²⁴⁵ Tetû B, Allard P, Fradet Y, et al. Prognostic significance of nuclear DNA content and S-phase fraction by flow cytometry in primary bladder cancer. *Human Pathol*, 1996; 27: 922-926.
- ²⁴⁶ Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R et al. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in bladder human cancer. *Cancer Res*, 1991; 51: 3807-3813.
- ²⁴⁷ Pycha A, Mian C, Haitel A, et al. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily non invasive (pTa) bladder cancer. *J Urol*, 1997; 157: 2116-2119.
- ²⁴⁸ Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 1991; 252: 706-709.

-
- ²⁴⁹ Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardó C, et al. Nuclear overexpression of p53 in transitional cell carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 53-59.
- ²⁵⁰ Serth J, Kuczyk MA, Bokemeyer C, et al. p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer*, 1995; 71: 201-205.
- ²⁵¹ Pantazopoulos D, Ioakim-Liossi A, Karakitsos P et al. DNA content and proliferation activity in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res*, 1997; 17: 781-786.
- ²⁵² Tizzani A, Casetta G, Gontero P et al. DNA flow cytometry and 67Ki proliferating index as prognostic factors of early recurrence and progression in G1-G2/Ta-T1 and G3/Ta-T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Minerva Urol Nefrol*, 1997; 49: 141-143.
- ²⁵³ Rivas del Fresno M, Salas A, Suarez JA, et al. Análisis de ploidía de ADN y fases del ciclo celular por citometría de flujo en el lavado vesical. Experiencia preliminar. *Arch Esp Urol*, 2000; 1: 29-36.
- ²⁵⁴ Lipponen PK, Nordling S, Eskelinen MJ, et al. Flow cytometry in comparison with mitotic index in predicting disease outcome in transitional cell bladder cancer. *Int J Cancer*, 1993; 53: 42-47.
- ²⁵⁵ De la Roza G, Hopkovitz A, Caraway NP, et al. DNA image analysis of urinary cytology: Prediction of recurrent transitional cell carcinoma. *Modern Pathol*, 1996; 9: 571-578.
- ²⁵⁶ Lipponen P, Kosma UM, Collan Y et al. Potential of nuclear morphometry and volume-corrected mitotic index in grading transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol*, 1990; 17: 333-337.

²⁵⁷ García I, Alvarez M, Hierro I et al. Utilidad de la morfometría nuclear como factor predictivo de progresión en los carcinomas papilares de vejiga. *Actas Urol Esp*, 1994; 18: 937-941.

²⁵⁸ Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlman R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(23):13692-12697.