

Universidad de Granada

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía y sus especialidades



**Detección del virus del papiloma humano en muestras de cáncer de vejiga mediante una prueba de hibridación de ADN
Relaciones clínicas**

Manuel Pareja Vilches
Granada, 2008

Universidad de Granada

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía y sus especialidades

Los que suscriben, D. José Gutiérrez Fernández, Profesor Titular de Microbiología de la Facultad de Medicina de Granada, D. Antonio Sorlózano Puerto, Profesor Ayudante Doctor del área de Microbiología de la Facultad de Medicina de Granada y D. José Luís Martínez Torres, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad de Granada y Jefe de Sección del Servicio de Urología del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada.

CERTIFICAN:

Que D. Manuel Pareja Vilches, Licenciado en Medicina, ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Detección del virus del papiloma humano en muestras de cáncer de vejiga mediante una prueba de hibridación de ADN. Relaciones clínicas”, que ha sido realizado bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Granada, a 3 de Marzo de 2008.

Antes de iniciar el desarrollo del presente trabajo, deseo expresar mi más sincera gratitud a todos aquellos que con su ayuda lo han hecho posible:

Al Dr. D. Armando Zuluaga Gómez, Jefe del Servicio de Urología del Hospital Clínico “San Cecilio” de Granada y Catedrático de Urología de la Universidad de Granada, ejemplo de constancia y dedicación a la labor científica, profesional y humana, haciéndome ilusionar por la labor investigadora.

Al Dr. D. José Luis Martínez Torres, Jefe de Sección del Servicio de Urología del Hospital Clínico “San Cecilio”, que me ha acompañado durante toda mi etapa formativa profesional y científica, siendo un pilar fundamental en la consecución de este trabajo de investigación.

A los profesores de Microbiología de la Universidad de Granada D. José Gutiérrez Fernández y D. Antonio Sorlózano Puerto, y al grupo de investigación CTS-521 del que son miembros. Porque su labor y apoyo técnico han sido fundamentales para adentrarme en un campo de trabajo desconocido para mí hasta este momento, y porque con su saber hacer, su constancia y completa dedicación, han sido el soporte principal de esta investigación.

A todos los compañeros del Servicio de Urología del Hospital Clínico “San Cecilio” de Granada, y, en especial, al Dr. D. Antonio Jiménez Pacheco, por su apoyo y colaboración, que ha sido inestimable para la ejecución de este trabajo.

Al personal del Quirófano de Urología, por su colaboración en la recogida de muestras, por su alta profesionalidad e interés.

Al laboratorio GENOMICA S.A.U., por el apoyo técnico prestado.

Al laboratorio INIBSA S.A., por su contribución en la realización de los estudios de laboratorio.

Al Ilustre Colegio de Médicos de la Provincia de Granada por favorecer la investigación médica.

A la fundación FIBAO, por su inestimable ayuda en el campo de la estadística.

A la “Fundación Hospital Clínico”, por favorecer, en el ámbito del Hospital “San Cecilio”, la realización de trabajos de investigación.

A mi esposa, Mercedes, y a mis hijos, por la paciencia que demuestran día a día, al permitirme dedicar parte del tiempo que a ellos debo, en mi realización personal y profesional, tiempo que en la elaboración de este trabajo era importante.

A toda mi familia, amigos y compañeros, y a todo aquel que ha sabido perdonar la falta de dedicación que hacia ellos tuve durante el tiempo que este trabajo duro.

A mis padres

A mi esposa

A mis hijos

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	3
Acción patógena	3
Diagnóstico microbiológico	29
CÁNCER DE VEJIGA	31
Incidencia y epidemiología	31
Histología en el cáncer vesical	35
Clasificación TNM	45
Manifestaciones clínicas del cáncer de vejiga	47
FACTORES ETIOLÓGICOS EN EL CÁNCER DE VEJIGA	50
Factores ambientales	50
Factores genéticos	59
OBJETIVOS	73
MATERIAL Y MÉTODOS	77
DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES	79
DESCRIPCIÓN DE LAS LESIONES TUMORALES	84
Grado histológico	86
Estadio tumoral	87
Tamaño tumoral	87
Número y localización de las lesiones	88
DETECCIÓN DEL VPH MEDIANTE ARRAY EN TUBO	89
Fundamento genético	89
Clinical Arrays® Papillomavirus Humano	91

	Pág.
DETECCIÓN DEL VPH EN MUESTRAS DE BIOPSIA	96
Extracción del ADN de la muestra	96
Reacción en cadena de la polimerasa	98
Electroforesis en gel de agarosa	102
Lectura del producto amplificado mediante tecnología AT	103
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	110
RESULTADOS	113
DETECCIÓN DEL VPH TRAS VISUALIZACIÓN EN GEL	115
DETECCIÓN DEL VPH EN EL ARRAY EN TUBO	118
DETECCIÓN DE CADA GENOTIPO	121
Genotipo 16	121
Genotipo 35	122
Genotipo 39	123
Genotipo 51	124
Genotipo 52	125
Genotipo 58	126
Genotipos 61 y 82	127
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS CASOS	128
Relación entre antecedente de tabaquismo e infección por VPH	128
Relación entre antecedente de consumo de alcohol e infección por VPH	129
Relación entre edad e infección por VPH	131
Relación entre estadio tumoral e infección por VPH	131
Relación entre grado histológico e infección por VPH	133
Relación entre tamaño del tumor e infección por VPH	135
Relación entre el número de lesiones tumorales e infección por VPH	137
Relación entre categoría del tumor e infección por VPH	138

	Pág.
Relación entre estadio tumoral y antecedentes de tabaquismo	140
Relación entre estadio tumoral y antecedentes de consumo de alcohol	142
Relación entre grado histológico y antecedentes de tabaquismo	144
Relación entre grado histológico y antecedentes de consumo de alcohol	146
Relación entre tamaño tumoral y antecedentes de tabaquismo	148
Relación entre tamaño tumoral y antecedentes de consumo de alcohol	150
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS CONTROLES	152
Relación entre antecedente de tabaquismo e infección por VPH	152
Relación entre antecedente de consumo de alcohol e infección por VPH	153
Relación entre edad e infección por VPH	155
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS CASOS FRENTE A LOS CONTROLES	155
Relación entre infección por VPH y grupo al que se pertenece	156
Relación entre la distribución de genotipos y grupo al que se pertenece	157
Relación entre antecedentes de tabaquismo y grupo al que se pertenece	159
Relación entre antecedentes de consumo alcohólico y grupo al que se pertenece	160
Relación entre edad y grupo al que se pertenece	162
DISCUSIÓN	163
ANÁLISIS DE ESTUDIOS PREVIOS SOBRE LA RELACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN POR VPH Y EL CÁNCER DE VEJIGA	165
Estudios basados en la detección del ADN del VPH	165
Estudios no basados en la detección del ADN del VPH	178
Estimación de la asociación entre la exposición al VPH y la presencia de cáncer vesical, según los estudios anteriores	181
Justificación de la utilización de una técnica de amplificación y otra de hibridación mediante microarrays	182

	Pág.
DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH: PCR FRENTE A MICROARRAY	187
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PRESENTE ESTUDIO	188
CONCLUSIONES	193
BIBLIOGRAFÍA	197

INTRODUCCIÓN

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Acción patógena

Virología

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus pequeño, con una doble cadena de ADN. Inicialmente, fue considerado como un miembro más de la familia *Papovaviridae*, junto a los poliomavirus murinos, los virus vacuolados de los simios (SV40) y los virus BK y JC humanos; todo ello, por sus similitudes superficiales en microscopía electrónica y por sus propiedades biológicas (Pfister, 1984). Sin embargo, estudios genéticos y moleculares recientes han demostrado que esta asociación taxonómica es incorrecta. Así, por ejemplo, al contrario de lo que ocurre con los otros papovavirus, nunca el VPH se ha podido propagar en cultivos celulares. Por esta razón, entre otras, este grupo de virus debe ser considerado como una familia distinta y única.

Las partículas del VPH aisladas en conejos, ciervos o humanos, son similares en cuanto a su apariencia. Consisten en un “core” central constituido de una doble cadena de ADN circular formado por unos 7.900 pares de bases, dentro de una cápside de proteína viral. Todas las secuencias codificadoras o de transcripción (ORF) se hallan en una sola cadena de ADN, y todos los VPH comparten una misma organización del genoma (Lowy y Howley, 2001). La cápside está compuesta por 72 subunidades (capsómeros) distribuidos en un patrón icosaédrico

simétrico, que da al virus un aspecto esférico en el examen con microscopio electrónico. Las partículas maduras no tienen una membrana externa envolvente, lo que condiciona la baja antigenicidad de la infección por el virus.

El análisis bioquímico de la cápside viral ha demostrado la existencia de dos familias distintas de proteínas estructurales. Las proteínas mayores de la cápside del VPH sirven como antígenos específicos de género (Tomita y cols., 1987). Por el contrario, las proteínas menores de la cápside parecen ser altamente tipospecíficas y podrían ser utilizadas para la tipificación inmunohistoquímica de la infección por VPH (Pfister, 1984).

El genoma del VPH está dividido, desde el punto de vista de su función, en dos grandes dominios: las regiones E y L. La región E (*early*) representa alrededor del 45% del genoma viral. En general, esta región se expresa en períodos precoces de la infección y codifica proteínas relacionadas con la inducción y regulación de la síntesis de ADN. A su vez está integrada por los genes *E1* a *E8*. Desde el punto de vista de la transformación celular, los genes que más importancia tienen son *E1*, *E2*, *E5*, *E6* y *E7*. La región L (*late*) comprende aproximadamente el 40% del genoma vírico, se expresa en los estados tardíos de la infección y está compuesta por los genes *L1* y *L2*. Dicha región codifica la síntesis de proteínas de la cápside viral.

Entre la región E y la región L existe un tercer fragmento de ADN que representa un 15% del genoma viral, la región LRC, que contiene genes implicados en la regulación de la transcripción y la replicación.

Patogenia

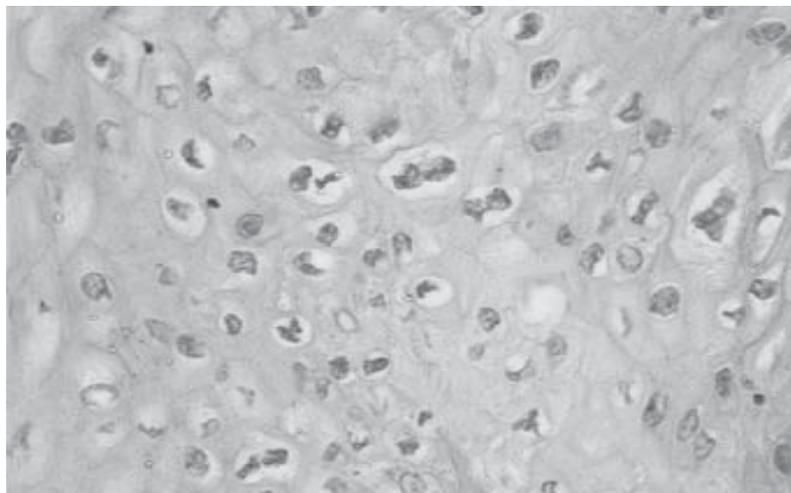
La patogenia de la infección por el VPH ha sido estudiada por varios autores (Fehrmann y Laimins, 2003; Munger y Howley, 2002). El periodo de incubación ha sido establecido experimentalmente por la inoculación de extracto de verrugas cutáneas a voluntarios. Frecuentemente, las verrugas se desarrollan en 3 ó 4 meses, incluso ocasionalmente crecen en 6 semanas y hasta 2 años después de la inoculación.

Aunque poco se conoce sobre el primer estadio de la infección por VPH, es asumido que el ciclo replicativo del virus comienza con la entrada de partículas virales en el estrato basal, porque el ADN viral es detectado en los núcleos de las células basales. Las células basales se diferencian y progresan hacia la superficie del epitelio, el ADN del VPH se replica y se transcribe, y, finalmente, viriones completos son liberados empaquetados entre los restos de los queratinocitos muertos.

En una verruga, o en un condiloma, la replicación viral está asociada con un aumento de la proliferación de todas las capas epidérmicas, excepto la capa basal. Este proceso produce acantosis,

paraqueratosis e hiperqueratosis. Hay también una profundización de los surcos y crestas, lo que produce la típica arquitectura papilomatosa. Algunas células infectadas se transforman en coilocitos (figura 1), que, histológicamente, son células escamosas grandes y poligonales, con un núcleo encogido dentro de una gran vacuola citoplasmática. También se observan, dentro de los coilocitos, cuerpos de inclusión citoplasmáticos. Una excesiva proliferación de células semejantes a células basales (proliferación basaloide) con una alta relación núcleo/citoplasma y con un gran número de mitosis, algunas anormales (disqueratosis), es la característica del inicio de malignidad provocada por el VPH.

Figura 1: Detalle de los coilocitos (tomado de Lewin y cols., 2004)



En las lesiones benignas causadas por el VPH, el ADN viral está situado extracromosómicamente, en el núcleo de la célula infectada. Sin

embargo, cuando el ADN del VPH es detectado en neoplasias intraepiteliales de alto grado y en cánceres, éste, está generalmente integrado en el cromosoma (Fehrmann y Laimins, 2003; Zur Hausen, 2002; McGlennen, 2000; Munger y Howley, 2002).

La integración del ADN del VPH ocurre en sitios especiales del cromosoma de la célula, separando específicamente la región transcritora *E2* (Thorland y cols., 2003). Esta interrupción de *E2*, probablemente, juega un papel en el desarrollo de la malignidad, porque la expresión de esta región transcritora lleva a una baja regulación de *E6* y *E7*, cuyos productos interfieren con las proteínas supresoras p53 y la proteína del retinoblastoma (pRb). Otros mecanismos potencialmente oncogénicos del VPH son la inducción de inestabilidad cromosómica, la cooperación con oncogenes activados, la metilación de sitios cromosómicos virales y celulares, la activación de la telomerasa y factores hormonales e inmunológicos (Hildesheim y Wang, 2002).

La respuesta del hospedador a la infección por VPH es poco conocida. Sin embargo, varias observaciones clínicas sugieren que la integridad del sistema inmune es importante en la resolución de la infección por VPH: la enfermedad ocurre con frecuencia y es más severa en pacientes inmunodeprimidos. También afecta de forma severa a pacientes con enfermedades linfoproliferativas y en aquellos con infección por VIH.

Estudios histológicos de las lesiones por VPH han demostrado alteraciones en el grado de activación inmunológica de queratinocitos y células Killer y una disminución del número de células de Langerhans y linfocitos T helper. En la mayoría de los pacientes, el infiltrado de células T de la verruga desarrolla una respuesta proliferativa cuando es expuesto a proteínas E7 o L1 de VPH 6. La presencia de un infiltrado linfomonocítico en las verrugas en resolución, indica el importante papel de los linfocitos T en el freno a la infección por VPH. Estas observaciones sugieren que el tejido linfoide de piel o mucosas puede ser más importante en la patogenia y resolución de la infección por VPH que los leucocitos mononucleares circulantes en sangre periférica.

La infección por VPH puede inducir una respuesta sérica. En pacientes con verrugas cutáneas, condilomas acuminados, o papilomatosis recurrente respiratoria se detectan anticuerpos contra la cápside viral. Partículas virus-like basadas en las proteínas L1 ó L1 y L2 ofrecen las mismas características antigénicas que la cápside viral. Éstas han sido usadas extensamente para mostrar, mediante ensayo inmunoenzimático, que el 50-90% de los pacientes con infección VPH desarrollan anticuerpos anticápside (Combata y cols., 2002; Karem y cols., 2002; Studentsov y cols., 2002). Además, en enfermedades asociadas al VPH 16, incluyendo el carcinoma cervical, se desarrollan

anticuerpos contra antígenos derivados de las regiones transcriptoras tempranas (early ORF), sobretodo *E7*.

Los anticuerpos anti-VPH tienden a desaparecer con la resolución de la enfermedad, pero pueden persistir varios años en pacientes asintomáticos. El significado de la respuesta inmunológica sérica al VPH no es conocida, pero se producen anticuerpos neutralizantes, que no solo protegen contra la infección, sino que están también implicados en la resolución de las lesiones (Bousarghin y cols., 2002; Ho y cols., 2002; Kawana y cols., 2002; Kawana y cols., 2003; Koutsky y cols., 2002).

Epidemiología

En Estados Unidos la infección por VPH es la ETS de origen viral más frecuente, en constante ascensión, pasando de 169.000 casos en 1969 a más de 1.150.000 en 1984. Aproximadamente el 1% de los adultos sexualmente activos tienen condilomas acuminados, y, al menos, el 15% de la población, tiene infección subclínica, con las tasas más altas entre los 18 y 28 años de edad (Koutsky, 1997).

En España, algunos autores piensan que es la enfermedad más frecuente en este tipo de consultas, sobretodo, en su forma subclínica (Hellin y cols., 2002).

En la mayoría de las mujeres, la infección se produce antes de los 25 años, suele durar 8-10 meses, y, en condiciones de inmunidad

VPH y cáncer vesical

adecuada, el virus es eliminado, persistiendo un 10% de las infecciones a los 35 años. Estos últimos son los casos que deben ser seguidos más de cerca en la consulta de ginecología, ya que son las mujeres con mayor riesgo de desarrollar procesos neoplásicos del área genital.

Cerca de 40 genotipos causan lesiones del aparato genital inferior. Aunque hay 20 genotipos estrechamente asociados a cáncer, los genotipos 16 y 18 son los más prevalentes en lesiones graves. De los asociados a lesiones leves, los genotipos 6 y 11 son los más frecuentes (tabla 1).

Tabla 1: Genotipos de VPH asociados a cáncer (European Consortium of Cervical Cancer, 2004)

Asociación con oncogénesis	Genotipo
Bajo riesgo oncogénico	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81
Probablemente oncogénicos	62, 71, 83, 84, 85, 89
Alto riesgo oncogénico	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 y 82

Respecto a las vías de transmisión, se ha asumido que el contacto personal estrecho es importante en la mayoría de las verrugas cutáneas, aunque fuertes evidencias epidemiológicas están contradiciendo estas ideas (Bonnez, 2002). La evidencia de que las verrugas anogenitales son transmitidas sexualmente, deriva de que la edad de aparición de esas lesiones es similar a la de aparición de otras ETS, y que la enfermedad

aparece en los dos tercios de los contactos sexuales de pacientes con verrugas anogenitales.

La existencia de un gran número de contactos sexuales se asocia con un gran riesgo de condilomas acuminados o infección de cérvix uterino (Habel y cols., 1998; Van den Eeden y cols., 1998). A pesar de esas observaciones, también se pueden adquirir verrugas genitales a partir del contacto manual con verrugas no genitales (Fairley y cols., 1995).

El papel de los fómites en la transmisión del VPH es incierto. De todas formas, la transmisión nosocomial parece posible porque se han descubierto infecciones virales que pueden estar relacionadas con el humo desprendido durante los tratamientos con láser, dióxido de carbono o electrocoagulación. También se ha descrito la existencia de VPH en espéculos vaginales, en pinzas y en guantes, deduciendo la posibilidad de contagio por vía extrasexual en determinadas ocasiones, aunque la falta de contacto mucosa-mucosa, la escasa cantidad de partículas, o la exposición del virus al medio ambiente hacen difíciles estas modalidades de contagio, que solamente podrían explicar una pequeña cantidad de casos, pero no la mayoría, que se producen por vía sexual. El VPH es resistente a la temperatura, por lo que, el uso del autoclave es necesario para la esterilización de instrumentos contaminados (Roden y cols., 1997).

Clinica

La infección por VPH puede expresarse en forma de lesiones clínicas diversas. Los tipos de VPH y la enfermedad asociada más frecuente aparecen en la tabla 2.

Tabla 2: Enfermedades producidas por VPH

Enfermedad asociada	Genotipo
Verruga común	2 y 4 Otros: 26, 27, 29, 49, 57 y 60
Verruga plantar	1, 2 y 4
Verruga plana y verrugas intermedias	3, 10, 28 y 29 Otros: 7 y 41
Verruga común oral	2, 4 y 57
Xantoma verruciforme	Probable asociación con el VPH
Papilomas orales en niños	6 y 11
Papilomas conjuntivales	6 y 11
Enfermedad de Bowen	16
Epidermodisplasia verruciforme	9, 12, 15, 19, 21 a 25, 36, 46, 47
Verrugas genitales y anales	6 y 11 Otros: 16, 18, 1, 2, 3, 4

La infección por VPH puede ser clasificada según su localización anatómica. Así, se distinguen dos grandes grupos: la infección no genital, que incluye la infección cutánea, y la infección mucosa y genital.

La lesión más común es la producción de verrugas o papilomas, hiperplasias localizadas del epitelio, con límite definido y una membrana

basal intacta. Las verrugas cutáneas suelen ser asintomáticas, aunque, a veces, pueden doler cuando se sitúan en superficies o puntos de roce. La mayor incidencia de verrugas cutáneas se observa entre los 10 y los 14 años, a partir de esta edad disminuye rápidamente su frecuencia hasta los 20 años. Las verrugas cutáneas pueden ser de tres tipos:

- Verrugas comunes, que representan el 71% de todas las verrugas cutáneas y que aparecen preferentemente en niños en edad escolar, con una prevalencia entre el 4-20%. Tienen forma de cúpula, con múltiples proyecciones cónicas (papilomatosis) que le dan un aspecto aterciopelado. Son múltiples y suelen localizarse en el dorso de las manos, entre los dedos o alrededor de las uñas.
- Verrugas plantares, que predominan en adolescentes y adultos jóvenes (24% de las cutáneas). Suelen hallarse en las plantas de los pies o la palma de la mano y acostumbran a presentar una capa córnea muy engrosada.
- Verrugas planas, que aparecen en niños (las menos frecuentes, 4%). Las verrugas planas muestran papilomatosis mínima o inexistente, son múltiples y se localizan en los brazos, el rostro, el cuello y las rodillas, y casi nunca evolucionan hacia la malignidad.

Raramente, las verrugas cutáneas degeneran a carcinoma verrucoso (Schwartz, 1995). La resolución espontánea ocurre del 50 al 90% de los niños entre el primer a quinto año, respectivamente. En un

paciente dado, dos tercios de las verrugas desaparecerán dentro de los dos primeros meses.

La epidermodisplasia verruciforme es una genodermatosis autosómica recesiva asociada a un gen localizado en el cromosoma 17 (Ramos y cols., 2002). Las lesiones están asociadas a un gran número de tipos de VPH, la mayoría de los cuales son específicos para este proceso (Orth y cols., 2001). Suele iniciarse en la infancia y durar toda la vida. Consiste en la aparición de lesiones múltiples, en forma de verrugas planas o de placas maculares rojas o pardo-rojizas, parecidas a una pitiriasis, en la cara, tronco y extremidades superiores, que no remiten. En un tercio de los pacientes progresa a cáncer, en áreas del cuerpo expuestas al sol. Estos pacientes suelen tener una inmunidad celular deprimida, pero tienen una resistencia normal a otros patógenos. La epidermodisplasia verruciforme no parece ser contagiosa.

Respecto a la infección mucosa, se ha constatado la presencia de genoma vírico en la mucosa oral de niños de 4 meses a 12 años. Las verrugas orales son clínicamente indistinguibles de los papilomas de células escamosas y los condilomas orales. La papilomatosis recurrente respiratoria es poco habitual, con tasas de incidencia de 0,45 y 0,6 %, para la forma juvenil y adulta, respectivamente (Derkay, 2001). La localización más común es la laríngea, en las cuerdas vocales. Los pacientes presentan ronquera o, en niños, alteración del llanto. A veces se

acompañan de distrés respiratorio o estridor. Estos papilomas pueden extenderse a tráquea y pulmones, llegando a obstrucción, infección y fallo pulmonar. En jóvenes, el rápido crecimiento de las lesiones puede obstruir el tracto respiratorio y pueden necesitar intervención quirúrgica para evitar la asfixia. En adultos, el curso de la enfermedad no suele ser tan agresivo. Las lesiones pueden sufrir transformación maligna, particularmente en pacientes que han recibido radioterapia (Lindeberg y Elbrond, 1991).

Los papilomas nasales son tumores infrecuentes que se presentan a cualquier edad, aislados o junto a papilomas de otra localización en las vías respiratorias. Pueden parecerse a los laríngeos, denominándose papilomas escamosos. Los papilomas invertidos son tumores de la cavidad nasal y de los senos paranasales. Se han asociado a los genotipos que causan los escamosos y también al VPH 18.

Las infecciones por VPH de la cavidad oral más comunes son los papilomas escamosos y el condiloma acuminado oral. Ambas lesiones están producidas por VPH de afectación mucosa, sobretodo por los genotipos 6, 11 y 16. La verruga vulgar oral es rara, sólo puede diferenciarse por la histología, y es causada por VPH de afectación cutánea, como los genotipos 2, 4 y 57. La hiperplasia focal o enfermedad de Heck es una lesión benigna, que desaparece espontáneamente, y está relacionada con VPH 3 y 13 (Syrjänen, 2003).

Los pacientes con infección VIH pueden presentar, en la cavidad oral, leucoplasia vellosa. Se trata de manchas blanquecinas, planas, ligeramente elevadas y de tacto algo áspero. Están causadas por coinfección del VPH con el virus de Epstein-Barr.

La afectación del área perianal varía según las prácticas sexuales, desde muy frecuente entre hombres homosexuales, a muy raras en varones heterosexuales. Sólo ocasionalmente se aprecian lesiones en escroto, periné o área púbica.

Las verrugas genitales y, en especial, los condilomas acuminados, son más frecuentes que las verrugas cutáneas. El condiloma acuminado es la enfermedad de transmisión sexual más prevalente en Estados Unidos, llegando al 1% en la población general (Koutsky, 1997). Las verrugas genitales son pápulas exofíticas, hiperqueratósicas, de color grisáceo, sesíles o más frecuentemente pediculadas (figura 2). Pueden ser de diferente tamaño, desde menos de un milímetro, hasta varios centímetros. En hombres no circuncidados la cavidad prepucial está afectada en un 85-90% de los pacientes, siendo, la zona del frenillo, la más afectada, mientras que el meato uretral se encuentra afectado en el 1-25% de los pacientes (Kaplinsky y cols., 1995). Las verrugas suelen estar confinadas a la fosa navicular o, con menor frecuencia, extenderse hasta los 3 centímetros distales de la uretra. La afectación vesical o de uretra proximal ha sido considerada excepcional.

Figura 2: Condilomas acuminados en glande y frenillo (tomado de Peyrí y cols., 1999)



En mujeres, la mayoría de las lesiones se localizan en el introito posterior y, en menor grado, en labios mayores, menores y clítoris. Más rara es la afectación de periné, vagina, ano, cérvix y uretra.

Alrededor de las tres cuartas partes de los pacientes con verrugas genitales son asintomáticos, pero el resto puede presentar prurito, quemazón, e, incluso, aumento de sensibilidad en la zona, llegando a provocar afectación psicológica.

La historia natural no es conocida, pero se presenta una remisión espontánea en el 10-20% de los casos en 3-4 meses (Beutner y cols., 1999). Sin embargo, las verrugas exofíticas pueden transformarse en carcinoma de células escamosas (Bonnez y cols., 1993). Pueden alcanzar grandes tamaños, particularmente durante el embarazo y en episodios de inmunosupresión. Cuando grandes condilomas revelan histológicamente

invasión local destructiva sin metástasis, estos se denominan tumores de Buschke-Lowestein, un término que agrupa a carcinomas verrucosos y a condilomas gigantes (Cubilla y cols., 2000).

Pápulas pigmentadas de los genitales externos, histológicamente pueden presentar una citoarquitectura condilomatosa, con evidencia de neoplasia intraepitelial. Esta entidad clínico-patológica es conocida como papulosis bowenoide (Wade y cols., 1978) (figura 3), y puede desarrollar una enfermedad de Bowen, que se manifiesta como una placa plana, rojiza, con los bordes bien definidos y una superficie rugosa e irregular. En el glande, esta lesión es conocida como eritroplasia de Queyrat (figura 4). Histológicamente es un carcinoma *in situ*. La presencia de VPH 16 y 18 ha sido demostrada en la papulosis bowenoide y en la enfermedad de Bowen (Ikenberg y cols., 1983).

Figura 3: Papulosis bowenoide (tomado de Peyrí y cols., 1999)



Figura 4: Eritroplasia de Queyrat (tomado de Peyrí y cols., 1999)



El potencial oncogénico del VPH fue demostrado hace varios años (Campo, 2002). La observación de pacientes con epidermodisplasia verruciforme aportó la evidencia inicial de que los VPH podrían ser carcinogénicos. En esos pacientes, las lesiones dermatológicas inducidas por VPH tipo específicos, frecuentemente sufren transformación maligna, particularmente cuando estas lesiones ocurren en áreas expuestas al sol (Pfister, 2003). Aunque la mayoría de las investigaciones sobre el potencial oncogénico de los VPH están focalizadas sobre los tumores del tracto genital femenino, en concreto del cérvix uterino, se ha impulsado el estudio de su participación en otros tumores urogenitales.

En el cáncer de pene, los datos existentes apoyan el papel etiológico de la infección por VPH (Griffiths y Mellon, 1999), y al igual que ocurre en el cáncer genital femenino, los genotipos más asociados son el 16 y el 18 (Cupp y cols., 1995). Al igual que en el cáncer de cérvix uterino, existen otra serie de factores que colaboran con el virus en la génesis del cáncer de células escamosas de pene, como el tabaco, la inmunosupresión o la deficiente higiene genital.

El papel de la fimosis puede ser relevante si nos atenemos a los datos presentados por algunos autores (Castellsague y cols., 2002), con una diferencia significativa a favor de la infección por VPH en los varones con fimosis, respecto a los circuncisos. Aunque estas conclusiones no son universalmente avaladas, sí que hay un mayor número de ETS en varones con fimosis, lo que, por otro lado, podría indicar que las lesiones residuales que dejan éstas, pudieran favorecer el anidamiento del VPH.

En relación al cáncer anal, parece existir una clara relación entre éste y los VPH 16 y 18, sobretodo en enfermos homosexuales y con infección VIH. En este grupo de enfermos, la infección por VPH es más frecuente que en los no infectados por VIH, y, además, desarrollan lesiones preneoplásicas del canal anal con más frecuencia que los no infectados por el VIH. Los bajos recuentos de CD4, la inmunodepresión y la coinfección por múltiples genotipos, explican la mayor incidencia de

cáncer en estos enfermos. Paradójicamente, los tratamientos de alta eficacia frente al VIH aumentan la supervivencia del enfermo y pueden favorecer, de forma indirecta, la aparición más tardía del cáncer anal (De Sanjose y Palefsky, 2002).

Numerosos autores han tratado de establecer la relación de la infección por VPH con el cáncer de vejiga, fundamentalmente, con los tumores de células transicionales, siendo contradictorios los resultados obtenidos, como demuestra un meta-análisis reciente realizado por nuestro grupo de trabajo (Gutiérrez y cols., 2006). En algunos trabajos se detecta ADN de VPH en más del 40% de los casos, mientras que, en otros, los resultados son absolutamente negativos. Probablemente, excesos diagnósticos provocados por una contaminación de las muestras desde la uretra o una contaminación por ADN presente en el laboratorio, sobretodo cuando la prueba utilizada es la PCR, puedan explicar los falsos positivos. También pueden producirse falsos negativos, ya sea por escasa cantidad de ADN viral presente en la muestra o bien por defecto de la técnica, aunque los procedimientos de PCR llevan controles internos que deberían excluir esta posibilidad.

La infección por el VIH también ha demostrado su influencia en la asociación de la infección por VPH y tumores como el vesical, de forma que existen trabajos donde sólo se detecta VPH en tumores vesicales en pacientes con SIDA (Noel y cols., 1994b).

Al igual que sucede en el cáncer de vejiga, los datos existentes sobre el papel del VPH en el cáncer de próstata son controvertidos, con cifras que oscilan del 0 al 100% de participación en esta patología (Gherdovich y cols., 1997; Strickler y cols., 1998). Además, también se ha detectado ADN viral en la hipertrofia benigna de próstata (Al-Ahdal y cols., 1996), lo cual hace pensar en contaminaciones procedentes de la uretra, sobretodo cuando el tejido prostático se ha obtenido por vía uretral.

En el cáncer de células escamosas de uretra los datos son escasos, aunque apuntan a una participación de los genotipos más oncogénicos, concretamente el 16 (Wiener y cols., 1992).

Pocos, y de muy dudoso significado, son los datos existentes acerca del papel de VPH en el cáncer de riñón y testículo (Griffiths y Mellon, 2000).

También se ha implicado el VPH como factor de alto riesgo de desarrollo de carcinoma escamoso en vulva y vagina.

Sin embargo, en el cáncer de cuello uterino es donde el papel de los VPH está menos cuestionado. Una serie de observaciones clínicas y epidemiológicas sugieren que un agente transmisible sexualmente es importante en la patogénesis del cáncer de cuello uterino. Estas observaciones incluyen el bajo grado de prevalencia del cáncer de cérvix uterino entre las monjas católicas, la relación directa entre el riesgo de

cáncer uterino y el número de parejas sexuales, y el riesgo elevado de cáncer de cérvix entre parejas de varones cuyas anteriores parejas habían desarrollado cáncer de cérvix.

El papel del VPH en el cáncer cervical está sustentado en varios argumentos (Bosch y De Sanjose, 2003):

- Prácticamente todos los tumores de cérvix contienen ADN de VPH, usualmente de los genotipos 16, 18, 31 ó 45 (Muñoz y cols., 2003; Xi y cols., 2003).
- Los mismos tipos de VPH se encuentran en las lesiones precursoras o neoplasias intraepiteliales cervicales.
- Se ha detectado ARN mensajero de VPH en el tejido tumoral cervical, indicando que el genoma del VPH se expresa en esas lesiones (Lamarcq y cols., 2002).

La infección con un VPH de alto riesgo parece ser necesaria para el desarrollo del cáncer cervical, pero no es suficiente. Varios cofactores juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer cervical, como la multiparidad, el tabaco, el uso de anticonceptivos orales durante largo tiempo, la inflamación cervical (sobretudo la asociada a infección con *Chlamydia trachomatis*) o la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Castellsague y Muñoz, 2003; Castle y Giuliano, 2003; De Sanjose y Palefsky, 2002; Palefsky y Holly, 2003).

Existe otra faceta de la participación del VPH en la patología humana, y hace referencia a su presencia en el semen. La existencia de genotipos de bajo y alto riesgo de VPH en el semen ha sido demostrada (Kyo y cols., 1994). Es probable que el semen se pueda contaminar por VPH de localización uretral en el momento de la eyaculación, pero también se ha detectado en el 18,5% de las muestras obtenidas quirúrgicamente durante vasectomías (Rintala y cols., 2002). La consecuencia de estos hallazgos es múltiple, ya que, además de poder estar implicado en la uretro-prostatitis inespecífica, las muestras de semen obtenidas de varones sin aparente VPH pueden ser utilizadas para fertilizaciones *in vitro* y producir, de forma yatrógena, una ETS en la mujer receptora. Por otro lado, el lavado del semen no asegura la eliminación de las partículas virales vehiculadas por los espermios (Olatunbosun y cols., 2001), y éstos pueden transportar ADN viral dentro de los óvulos a fertilizar, no pudiendo descartar que pudiera afectar a su implantación en el útero, así como al desarrollo posterior del embrión.

Genética tumoral del VPH

La interacción entre un virus y las células humanas se incluye en alguno de los tres tipos siguientes:

- La infección permisiva tiene como resultado la síntesis de ADN viral episomal, del ARN y de las proteínas víricas, con liberación de

partículas virales maduras. Es de gran interés señalar que las funciones replicativas virales están muy relacionadas con el proceso de diferenciación de las células escamosas y así, las únicas que permiten la replicación viral son los queratinocitos maduros del estrato espinoso.

- La infección no permisiva sin transformación celular posiblemente constituye el tipo de interacción más frecuente en el organismo, puesto que un virus determinado no puede infectar la mayoría de las células.
- La infección no permisiva con transformación celular es un fenómeno poco frecuente, que ocurre como resultado de la integración del ADN en el genoma de la célula hospedadora. La integración puede inducir la pérdida de las funciones virales y celulares, alterando el fenotipo celular.

El lugar de integración en el genoma celular parece realizarse al azar, puesto que el genoma viral puede encontrarse en localizaciones diferentes en distintos cánceres y líneas celulares. No obstante, con frecuencia, la integración ocurre en la vecindad de conocidos protooncogenes de la célula epitelial humana. Por ejemplo, el ADN de los genotipos de alto riesgo 16 y 18 de VPH se ha encontrado frecuentemente en la proximidad de los protooncogenes *c-src*, *c-raf-1*, *Ki-Ras-2*, *Ha-Ras* y *c-myc*, aunque se desconoce si este fenómeno favorece

la progresión de una lesión precancerosa hacia un cáncer.

Las proteínas específicas están codificadas en las regiones transcriptoras tempranas *E1* a *E8*, y tardías, *L1* y *L2*. Las proteínas codificadas por las secuencias *E1* a *E8* son polipéptidos no estructurales, mientras que las codificadas por *L1* y *L2* son las proteínas estructurales de la cápside.

La proteína *E1* está relacionada con la replicación plasmídica. El polipéptido *E2* es un importante modulador de la transcripción viral y juega un papel importante en la replicación viral. Se desconoce la función de la proteína *E3*. La proteína *E4* forma filamentos citoplasmáticos que ayudan a mantener la arquitectura viral, está implicada en la replicación viral y en la liberación del virus. La proteína *E5* se expresa en la membrana celular, estimula la actividad del receptor de crecimiento epidérmico y contribuye a la transformación neoplásica de la célula. Las proteínas *E6* y *E7* tienen capacidad de transformación neoplásica a través de la unión a varios factores celulares y receptores de proteínas supresoras tumorales. La proteína *E6* se une a la proteína tumoral *p53* e inhibe su actividad provocando su degradación. La proteína *E7* también se une a un producto del gen supresor tumoral, la proteína del retinoblastoma (*pRb*), y a proteínas relacionadas, de este modo inhibe sus funciones. Se desconoce la función de la proteína *E8* (Fehrmann y Laimins, 2003; Munger y Howley, 2002).

Para que se produzca el importante fenómeno oncogénico de la integración, es imprescindible que se rompa la doble cadena circular de ADN viral. Se ha comprobado que esta ruptura se produce específicamente en la región del genoma viral ocupada por el gen *E2*, que pierde así su capacidad funcional. En los tipos virales más oncogénicos (16 y 18), el gen *E2* parece actuar principalmente como represor de la transcripción de los genes *E6* y *E7*. Por tanto, la consecuencia de la ruptura de la doble cadena de ADN viral en el proceso de integración es la pérdida de la función represora que ejerce *E2* sobre los genes transformantes *E6* y *E7*.

Las oncoproteínas *E6* y *E7* son sintetizadas en el citoplasma celular obedeciendo las órdenes de los genes virales *E6* y *E7* de los VPH. Las oncoproteínas *E6* y *E7* interactúan específicamente con proteínas celulares reguladoras de la proliferación. Se ha demostrado que la oncoproteína *E7* interactúa con la proteína celular p105Rb, codificada por el gen del retinoblastoma. Este gen, a través de la proteína que codifica, ejerce un efecto regulador sobre la proliferación celular, habiéndose comprobado alteraciones del gen, y por tanto, de la proteína, en muchos tumores humanos como retinoblastomas, osteosarcomas, cánceres de mama, de pulmón, etc. La unión de la oncoproteína *E7* de los VPH con la proteína reguladora p105Rb, presumiblemente inactiva a ésta, con consecuencias similares a las que acontecen en los tumores con

alteraciones en el gen del retinoblastoma.

Al igual que ocurre con E7, la oncoproteína E6 basa sus propiedades transformantes en su capacidad de formar complejos y alterar la actividad de proteínas celulares reguladoras del crecimiento y la diferenciación. En concreto, se ha demostrado una asociación de la proteína E6 con p53. La proteína p53 es una proteína reguladora del ciclo, que detiene la proliferación celular para la reparación de los daños del ADN, y en caso de daño irreparable induce la muerte celular programada (apoptosis). Por esta vía impide la perpetuación de clones celulares con ADN lesionado en los que nuevas alteraciones podrían concluir en la malignidad. En numerosos tumores humanos se detectan alteraciones del gen *p53* que dan lugar a proteínas p53 mutadas, no funcionantes. La asociación de E6 con p53 puede dar lugar a un efecto similar al que acontece tras la mutación del gen *p53*, y se piensa, por lo tanto, que ésta es una de las vías oncogénicas de los VPH. Los tipos de alto riesgo (VPH 16 y 18) parecen codificar oncoproteínas con mayor afinidad por las proteínas reguladoras p105Rb y p53. Esta afinidad es menor en los tipos de bajo riesgo (6 y 11) y este hecho parece marcar una clara diferencia en cuanto a su potencial oncogénico.

Diagnóstico microbiológico

La histología de las lesiones en la infección por VPH es característica, por lo que la biopsia suele usarse para confirmar el diagnóstico. El examen histológico puede identificar la presencia de neoplasia intraepitelial o cáncer invasivo. Sin embargo, aunque la biopsia es la prueba de referencia para el diagnóstico, sufre, como la citología, de falta de precisión y confianza en cuanto al grado de enfermedad (Sherman, 2003; Stoler y Schiffman, 2001).

Para mejorar la sensibilidad y la especificidad de la citohistología, se dispone de varias pruebas basadas en la demostración de los antígenos del VPH, o sus ácidos nucleicos, en las muestras de biopsia (Burd, 2003; Iftner y Villa, 2003). Los antígenos comunes de los VPH se detectan, generalmente, por inmunohistoquímica, con la prueba de la peroxidasa. Estos antígenos se presentan en la mitad de las lesiones por VPH.

La detección del ADN del VPH ha llegado a ser accesible a la clínica con la técnica de Captura de Híbridos II (Digene Corp, EEUU), que fue aprobada por la FDA en el año 2000. Este ensayo está basado en una reacción de hibridación con sonda de ARN específicas. La muestra de ADN se hibrida con sondas específicas de ARN en dos variedades: el tipo A está dirigido al ADN de genotipos de bajo riesgo (tipos 6, 11, 42, 43 y 44) y el tipo B contra VPH de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35,

39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Este ensayo es rápido y, al contrario que los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), no es susceptible de contaminación cruzada.

La PCR tiene la ventaja de ser más sensible que el procedimiento anterior y poder detectar cada tipo específico de VPH. La identificación de los genotipos se efectúa empleando cebadores del gen *L1* o mezclas de cebadores de *L1* y *E7*. La cuantificación podría distinguir infecciones clínicamente relevantes, estableciéndose un umbral significativo.

Uno de los inconvenientes de la PCR es que detecta ADN de VPH de alto riesgo en la infección silente (5-25% de la población femenina con citología y seguimiento negativo). Ello hace que el valor predictivo positivo de la técnica sea bajo. Algunos autores sugieren analizar la integración del ADN en el genoma, con el objeto de establecer el significado clínico de un resultado positivo. En el futuro, quizás se disponga de marcadores biológicos que permitan identificar, qué lesiones CIN grado I remitirán y cuáles progresarán.

Los cultivos celulares y las técnicas serológicas no están disponibles para el diagnóstico clínico de infecciones por VPH.

CÁNCER DE VEJIGA

Incidencia y epidemiología

El cáncer de vejiga es una patología relativamente frecuente en el varón en muchas áreas del mundo, y ocupa, globalmente, el séptimo lugar entre las enfermedades neoplásicas, con una estimación de 202.000 nuevos casos en 1995. En la mujer, por su parte, representa el decimoquinto tumor en orden de frecuencia, con una estimación de 58.000 nuevos casos en ese mismo año (Parkin y cols., 1999). Sin embargo, las tasas de incidencia del cáncer vesical muestran una variación importante entre diferentes áreas. Esta incidencia es, aproximadamente, tres veces más elevada en los países más desarrollados que en los países en vías de desarrollo.

En la mayoría de las poblaciones el cáncer vesical es, en general, de tres a cuatro veces más frecuente en el varón que en la mujer. Este hecho refleja la exposición más frecuente del varón al tabaquismo y a ocupaciones que involucran contacto con determinados productos químicos, tales como las aminas aromáticas, que son los principales factores de riesgo reconocidos para el cáncer vesical (La Vecchia y Airolti, 1999).

La interpretación de las tasas de prevalencia del cáncer vesical es difícil, dado que no es fácil diferenciar entre tumores papilares y malignos; por lo tanto, las tasas de prevalencia recogidas en diferentes

registros podrían reflejar, en parte, criterios diagnósticos distintos. Con todo, la prevalencia más alta (normalizada, a la población standard mundial) se recoge en Europa (con cifras entre 22,0/100.000 en la Europa meridional y 12,6/100.000 en la Europa oriental) y en Norteamérica (23,8/100.000), si bien el norte de África (23,3/100.000) y Asia Occidental (10,9/100.000) parecen constituir áreas de alto riesgo (Parkin y cols., 1999).

En Europa, las tasas de incidencia más elevadas, en varones, se han recogido en las áreas de registro del norte de Italia, España y Ginebra (Suiza), con tasas de incidencia superiores a 30/100.000 varones, mientras que las tasas han sido de nivel intermedio en los registros oncológicos del Reino Unido, Alemania y Francia, y bajas en varios países del este de Europa y en otras áreas de registro en Suiza (Levi, 1999).

En España, el carcinoma de células transicionales de la vejiga es la neoplasia más común del tracto genitourinario en ambos sexos, y el segundo tumor más frecuente de todos los tumores genitourinarios en varones, después del cáncer de próstata.

En el periodo 1997-2000 se diagnosticaron en España alrededor de 162.000 casos de cáncer cada año (sin considerar el cáncer de piel no melanoma), de los que 25.000 correspondieron a carcinomas colorrectales, que es el tumor más frecuente en términos absolutos. El

siguiente tumor en frecuencia fue el cáncer de pulmón, con 19.000 casos nuevos, seguido del cáncer de mama en mujeres, con 16.000 casos, y en cuarto lugar el tumor vesical, con 15.000 casos, aunque, en varones, el cáncer de próstata, con 13.000 casos, supera al de vejiga con 12.000 nuevos casos en varones.

Respecto a la incidencia de cáncer en hombres, España presenta unas tasas ajustadas superiores al promedio de la Unión Europea, ocupando el quinto lugar. Sin embargo, en mujeres, junto con Grecia, España muestra las tasas de incidencia más bajas. Por otra parte, España ocupa el primer lugar en frecuencia del cáncer de vejiga en hombres, con tasas bastante superiores a las del resto de países. Esta alta incidencia, que podría ser cuestionada por los criterios diagnósticos para algunos tipos histológicos del cáncer de vejiga, es confirmada por las altas tasas de mortalidad presentes en España. Así, la mortalidad por cáncer de vejiga en España durante el periodo 1978-1992 fue de un total de 31.912 hombres y 7.205 mujeres con una edad promedio de 71 y 73 años respectivamente (López-Abente y cols., 2004).

En lo referente a tendencias temporales, las tasas de incidencia aumentaron en ambos sexos en los EEUU en el periodo comprendido entre 1969 y 1990, mientras que la mortalidad tendió a declinar, especialmente en varones (Silverman y cols., 1996).

Es más frecuente en la raza blanca. Sin embargo, la diferencia de

incidencia entre blancos y negros se limita a la enfermedad localizada, presentando el mismo riesgo para los tumores agresivos y siendo similares en ambos la tasa de mortalidad (Schairer y cols., 1988). No se han encontrado diferencias en cuanto al estatus social. Las diferencias objetivadas, tanto en la raza, como en el sexo, sugieren la posibilidad de una posible susceptibilidad genética. De hecho, las alteraciones en el cromosoma 9 se asocian con el inicio de los tumores papilares, y este tipo presenta una incidencia más elevada en la raza blanca. Por otra parte, el cáncer de células transicionales puede acumularse en ciertos síndromes neoplásicos familiares.

La incidencia del cáncer de vejiga se incrementa con la edad, ya que son prácticamente inexistentes en la primera década, objetivándose ocasionalmente antes de los 40 años, siendo en estos casos de bajo grado y con escaso riesgo de recurrencia. Por encima de los 50 años, preferentemente entre los 60 y 70 años, se presentan más del 80%. Esto es debido al largo periodo de latencia que precisan los factores ambientales para inducir la carcinogénesis.

En cuanto a la topografía, hay que señalar que las localizaciones más frecuentes son las paredes posterior y laterales, seguidas de los orificios ureterales, trígono, cuello y cúpula; en estos últimos empeora el pronóstico, aunque los resultados son difíciles de interpretar (Witjes y cols., 1992).

La mayoría son procesos primarios vesicales y de éstos más del 90% se originan en el epitelio de revestimiento o de transición. El resto de los tumores primitivos pueden asentar en cualquiera de los tejidos o estructuras que conforman la vejiga. Los tumores vesicales de carácter secundario pueden ser debidos a la invasión por neoplasias de órganos vecinos (intestino, próstata, aparato genital femenino, etc.) o bien por asiento de metástasis de otros tumores, siendo éstas de carácter excepcional.

Histología en el cáncer vesical

Una vez establecida la teoría celular en la interpretación de las neoplasias malignas, fue un hecho inmediato el clasificar éstas según el tipo celular al que se asemejaban. La utilidad médica de estas clasificaciones vino ratificada por la comprobación de que la agresividad de la neoformación variaba según la supuesta estirpe celular. Las observaciones de Hansemann (1890) y Broders (1925) de que la progresiva alteración de la forma e incremento del tamaño del núcleo se correspondían con un peor pronóstico, forjó la aparición del concepto de grado de indiferenciación, ya que se interpretó como una progresiva transformación de las células neoplásicas, inicialmente “maduras”, en “inmaduras” o “embrionarias”.

A pesar de que Broders (1922), en un principio, describió cuatro

grados histológicos en función del porcentaje de células epiteliales indiferenciadas dentro del propio tumor, posteriormente se adoptó la clasificación en tres grados. El grado I corresponde a células con ligera anaplasia, el grado II a células con moderada anaplasia y el grado III a tumores con marcada anaplasia.

Todo sistema de gradación de un tumor es subjetivo, y en el cáncer vesical el índice de reproductibilidad intrapersonal está alrededor del 79%, y el interpersonal en el 50% (Vaskó, 1994), siendo casi del 90% en los tumores peor diferenciados. Estas cifras son perfectamente aceptables para el uso diario, sin embargo, en este momento, se está produciendo un amplio debate sobre el tema.

Después de arduas discusiones para poder distinguir los llamados papilomas de los carcinomas bien diferenciados, y que, a su vez, se subdividieran los carcinomas sólo en tres grados, siguiendo las directrices de la OMS, se ha vuelto a poner en duda la naturaleza maligna de los carcinomas transicionales grado I, con el intento de asimilarlos con los papilomas. A su vez, la tendencia acomodaticia del patólogo en encasillar como grado II a muchas neoplasias, ha ido desdibujando los grupos pronóstico y, en este momento, se están preconizando subdivisiones de grado I, subdivisiones de grado II, eliminación de los tres grados y, utilización de los términos de papiloma, tumores bien diferenciados y tumores mal diferenciados (Murphy y cols., 1994).

Tumores vesicales uroteliales

El urotelio es un epitelio poliestratificado, con una porción basal generatriz, una intermedia poliestratificada, y una capa superficial, especializada, con una membrana pentalaminar que, junto a las uniones intercelulares, contribuye a la impermeabilidad vesical. Otra de sus características es la adaptabilidad a los distintos volúmenes de orina, oscilando su estratificación de 7 capas (vejiga vacía) a 2 capas (vejiga llena). Un hecho que no debemos olvidar es que el urotelio reviste a toda la vía urinaria, no sólo a la vejiga, por lo que los agentes cancerígenos probablemente actúan contra él como un todo, si bien es cierto que la mayor incidencia de tumores acontece en la vejiga (posiblemente por un contacto más prolongado de los cancerígenos). Una última consideración, para una mejor comprensión de la expresión anatómo-patológica de estas neoplasias, es la gran capacidad de cambio metaplásico que tiene el urotelio normal y conserva el neoforado, por lo que los carcinomas uroteliales pueden tener un fenotipo transicional (95%), escamoso (5%) o glandular (1%), pudiendo encontrarse entremezclados todos ellos.

- Carcinoma de células transicionales

Los carcinomas de células transicionales corresponden a más del 90% de las neoplasias vesicales. Casi el 10% de estos tumores contienen focos de diferenciación glandular o escamosa. La diferenciación

glandular suele aparecer en los grados altos y en los tumores invasivos, pero, a veces, se observa también en los tumores bien diferenciados.

En los carcinomas transicionales suelen distinguirse dos patrones (Spruck y cols., 1994).

✓ *Papilar*

El más frecuente, que alcanza el 75% de los tumores uroteliales, es el patrón papilar. Se define como un tumor superficial, limitado a la mucosa de la vejiga (Ta) o a la lámina propia (T1). Los carcinomas papilares Ta representan el 70% y los T1 el 30%. Pueden ser muy variables tanto en su aspecto, como en su tamaño. Las papilas están habitualmente cubiertas por más de siete capas de urotelio. Las células de estas capas varían desde normales (papiloma) o casi normales, hasta las que presentan una importante atipia (Hasui y cols., 1994). Son muy poco invasivos, pero precisan de un seguimiento prolongado, por su tendencia a la recidiva, con una tasa global entre el 60-90%, siendo entre un 30-46% en los tumores papilares solitarios, y entre un 66-90% en los tumores múltiples (Omer y cols., 2001). Las recidivas son más frecuentes en los tumores mayores de 3-5 cm, y en los que presentan grados II y III. El urotelio carece de capilares y de linfáticos, por lo que, en general, los Ta tienden a quedar localizados, pero ocasionalmente, pueden evolucionar hacia un tumor invasivo. En estos tumores la progresión se

estima entre un 10-30%, dependiendo, sobretodo, del grado tumoral. Estos tumores superficiales, en cuanto a su evolución, pueden ser considerados en diferentes grupos de riesgo, clasificándolos en grupo I o de bajo riesgo, grupo II o de riesgo intermedio y grupo III, o de alto riesgo. Hay que tener en cuenta que, en un 30% de los tumores vesicales de alto riesgo, puede existir extensión extravesical (Huguet-Pérez y cols., 2001). La presencia de metástasis en este tipo de carcinoma es muy baja. El diagnóstico diferencial debe de plantearse con la hiperplasia urotelial y con la cistitis papilar o polipoide.

✓ *No papilar*

➤ *Carcinoma in situ*

El segundo patrón, no papilar, es más agresivo, incluyendo desde lesiones con pocas alteraciones citológicas, a células con características claramente malignas, que definen al carcinoma *in situ* (CIS). Éste constituye aproximadamente el 10% de todas las neoplasias vesicales. Es una lesión plana, aterciopelada, confinada a la mucosa, que en ocasiones adquiere un aspecto granular por la inflamación y congestión del estroma subyacente, por lo que el diagnóstico endoscópico no es fiable, al contrario que el diagnóstico por citología urinaria gracias a la importante alteración celular, detectando la presencia de figuras mitóticas y la pérdida de conexión intercelular y de adherencia a la membrana basal,

con la denudación del urotelio resultante. El CIS se puede encontrar de forma difusa o como lesiones focales. Puede presentarse solo o asociado con lesiones papilares o invasivas. El 10-20% de los tumores superficiales pueden presentar un CIS asociado, siendo éstos, en su mayoría, tumores de alto grado (Fradet, 1992) En general, el CIS presenta progresión en alrededor de un 54% de los casos, siendo los procesos difusos asintomáticos y los que se asocian a tumores papilares los que presentan una mayor incidencia de progresión hacia la enfermedad invasiva. La supervivencia, en general, a los 5 años, es del 20 al 40%.

➤ *Carcinoma de células transicionales invasivo*

En el carcinoma de células transicionales invasivo, la morfología que podemos encontrar puede ser muy diversa: papilar, nodular, polipoide, sesiles o ulcerado. Pocas veces crece con un patrón difuso, pero incluso en estos casos, los pequeños grupos o nidos están presentes, siendo excepcional que sea difuso de forma uniforme. En otras ocasiones, se asocian con una inflamación crónica, que puede enmascarar el tumor subyacente.

Su característica fundamental es la invasión de la capa muscular vesical, habitualmente de forma irregular, debido a su configuración histológica sólido-papilar. Esta invasión es un marcador importante de

progresión (Herr, 1995). La asociación con CIS y/o atipia urotelial, estadio y grado elevados serán factores de riesgo para la posible invasión muscular.

La presencia de adenopatías ocurre en un 40-50% de los tumores músculo-invasivos, fundamentalmente a nivel pélvico. A lo largo de su evolución, el desarrollo de metástasis a distancia ocurre en el 50-70% de los casos, preferentemente a nivel de hígado, pulmón, hueso y glándula suprarrenal. En torno al 65% de los tumores con infiltración muscular presentan metástasis en el momento del diagnóstico.

La recurrencia es importante, no sólo por sus implicaciones pronósticas, sino también por condicionar un seguimiento más o menos estrecho. Las características clínicas que predicen la recurrencia son un grado histológico alto, la multifocalidad, invasión de la lámina propia, presencia de CIS asociado, tamaño mayor de 3-5 cm o historia previa de recurrencia, siendo la multifocalidad y la recurrencia precoz los factores pronósticos más importantes. En el 5-10% de los tumores músculo-invasivos, aún en pacientes cistectomizados, podemos encontrar un tumor urotelial en el tracto urinario superior.

- Carcinoma de células escamosas

Corresponde al 5% de los carcinomas de vejiga, alcanzando el 75% en las áreas donde la esquistosomiasis es endémica. Esta variedad

histológica está presente en el 20% de los tumores que aparecen en divertículos, en el 50% de los que asientan en vejigas no funcionantes y en el 15% de los que aparecen en pacientes trasplantados. El aspecto macroscópico de este tumor varía desde sesíl y ulcerado a papilar, polipoide o nodular. Habitualmente son grandes e infiltrantes, incluso cuando son bien diferenciados. En su mayoría, son moderados o bien diferenciados, presentando abundante queratina. Suelen presentar, con frecuencia, zonas de leucoplasia en la mucosa adyacente (Young, 2000).

- Adenocarcinoma

El 0,5-2% de todos los tumores de vejiga son adenocarcinomas. La distribución por sexos y edades de esta variedad histológica es similar a la del carcinoma de células transicionales. Se pueden originar a partir del uraco o asociarse a extrofia vesical. Su apariencia macroscópica diferirá según su origen, bien de novo, o a partir de la patología subyacente comentada. Los tumores que se originan a partir del uraco se localizan en la zona de la cúpula vesical, y los que se originan de novo pueden comprometer cualquier zona de la vejiga. Los focos de hemorragia y necrosis son comunes. Al igual que el carcinoma de células escamosas, se relaciona con vejigas no funcionantes en un 15%, y en el 85% se encuentran en casos de extrofia.

Tienen un mal pronóstico, sobretodo, los que presentan células en

anillo de sello y los que no proceden del uraco. Los carcinomas con células en anillo de sello corresponden al 3-5% de los adenocarcinomas vesicales.

El metastásico es uno de los adenocarcinomas vesicales más frecuentes. Los tumores primarios suelen afectar al recto, estómago, endometrio, mama, próstata y ovarios. Ante la presencia de un adenocarcinoma vesical hay que realizar un estudio exhaustivo en busca de un posible adenocarcinoma primario (Catalona, 1992).

- Carcinoma de células pequeñas

Es un tumor extremadamente raro. Su característica principal es estar constituido por células con escaso citoplasma y núcleos hipercromáticos, y con frecuentes necrosis, similares a las descritas en el carcinoma microcítico del pulmón. Su histogénesis no es bien conocida, habiéndose postulado que deriva de las infrecuentes células neuroendocrinas de la vejiga o de células pluripotenciales.

A pesar del tratamiento combinado con quimioterapia, el pronóstico es infausto, con una supervivencia media de un año. En el momento del diagnóstico, el 50% tienen metástasis regionales, óseas o hepáticas.

Tumores vesicales no uroteliales

Sólo del 0,5 al 2% de las neoplasias de la vejiga no son epiteliales. La mayoría de ellas son malignas, y sólo un pequeño porcentaje son benignas, entre las que el leiomioma (46% de los tumores benignos no epiteliales), el hemangioma (26% de estos tumores), el neurofibroma y el paraganglioma (feocromocitoma vesical), son las más características (Murphy y cols., 1994).

Entre las variedades malignas están el leiomiosarcoma, que es un tumor propio de los adultos, con predominio de varones, definiendo su agresividad la presencia de 5 o más mitosis por diez campos de gran aumento, una expresión de MIS-1 (Ki-67) en más del 20% de los núcleos y la necrosis.

El rhabdomiosarcoma, característico de la infancia, suele afectar a niños menores de 10 años, en los que representa el tercer tumor sólido más común, después de los del sistema nervioso central y el neuroblastoma.

El linfoma, que para poder considerarse como primario, no debe haber ninguna tumoración perivesical, ni afectación linfoproliferativa del hígado, bazo, ganglios, médula ósea o sangre en el momento del diagnóstico y durante los siguientes 6 meses. De acuerdo con estas directrices, los linfomas primarios son algo más frecuentes en mujeres, suelen aparecer durante la sexta década, y son de linfocitos B de bajo

grado, considerados como del sistema MALT, lo que puede explicar las sobrevividas de hasta un 30% a los 5 años. Los linfomas secundarios son más característicos del varón, con una incidencia de tipos celulares similar a la de los linfomas ganglionares, llegándose a encontrar afectación macro o microscópica de la vejiga en un 17% de los linfomas sistémicos y la sobrevivida no suele ser mayor de 6 meses (Kempton y cols., 1997).

Y, por último, el melanoma, que suele ser metastásico en la vejiga, y del que tan sólo se han publicado algunos casos que pueden considerarse como primarios. Los principales criterios para el diagnóstico de melanoma primario son la ausencia de un melanoma cutáneo-mucoso y la presencia de melanocitos atípicos en la mucosa de alrededor del tumor (De Torres y cols., 1995).

Clasificación TNM

El método más aceptado, internacionalmente, para la evaluación de la extensión de los tumores, es la clasificación TNM.

Dicha clasificación sólo se aplica a los carcinomas, excluyéndose el papiloma, y debe existir confirmación histológica o citológica de la enfermedad.

- T: Tumor primario
 - ✓ Tx: No se puede evaluar el tumor primario
 - ✓ T0: No existen signos de tumor primario
 - ✓ Ta: Carcinoma papilar no invasivo
 - ✓ Tis: Carcinoma *in situ*
 - ✓ T1: Tumor que invade el tejido conectivo subepitelial
 - ✓ T2: Tumor que invade el músculo
 - T2a: Tumor que invade la capa muscular superficial
 - T2b: Tumor que invade la capa muscular profunda
 - ✓ T3: Tumor que invade la grasa perivesical
 - T3a: Invasión microscópica
 - T3b. Invasión macroscópica
 - ✓ T4: Tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras:
próstata, útero, vagina, pared pélvica o pared abdominal
 - T4a: Tumor que invade la próstata, útero o vagina
 - T4b: Tumor que invade las paredes pélvica o abdominal
- N: Afectación de ganglios linfáticos regionales
 - ✓ Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
 - ✓ N0: No se demuestran metástasis ganglionares regionales
 - ✓ N1: Metástasis en un único ganglio linfático de diámetro máximo inferior a 2 cm
 - ✓ N2: Metástasis en un único ganglio linfático de diámetro máximo

superior a 2 cm, pero menor o igual a 5 cm, o afectación de varios ganglios linfáticos, ninguno de ellos mayor de 5 cm de diámetro máximo

- ✓ N3: Metástasis en un ganglio linfático de diámetro máximo superior a 5 cm
- M: Metástasis a distancia
 - ✓ Mx: No se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia
 - ✓ M0: No hay metástasis a distancia
 - ✓ M1: Presencia de metástasis a distancia

Manifestaciones clínicas del cáncer de vejiga

La hematuria es el signo más frecuente en el momento de presentación, objetivándose en el 70-80% de los pacientes. Puede ser macro o microscópica. Cuando es macroscópica suele ser total (sangrado durante toda la micción), indolora e intermitente, con o sin coágulos. Si el tumor se encuentra en el cuello o en el triángulo, la hematuria puede ser únicamente terminal. Cuando hay dolor asociado hay que pensar en que coexiste un proceso inflamatorio, bien por la presencia de una infección o de cálculos.

La hematuria microscópica puede ser sintomática o asintomática. El 13% de la población general presenta microhematuria asintomática, pero únicamente un 0,4% presentan un carcinoma urotelial. El 20%

manifiestan síntomas irritativos como aumento de la frecuencia miccional, urgencia y dolor con la micción. Esta clínica es frecuente cuando el tumor asienta en trígono y/o se asocia con un carcinoma *in situ* difuso. Tanto la infección urinaria como la cistitis intersticial comparten esta clínica, por lo que en muchas ocasiones el diagnóstico del carcinoma se retrasa varios meses.

Pueden presentar dolor óseo por metástasis y/o dolor en flanco por metástasis retroperitoneales. Las metástasis retroperitoneales pueden afectar los uréteres provocando la obstrucción de los mismos. Esto también puede suceder a nivel local cuando el carcinoma invade de forma uni o bilateral los meatos ureterales provocando uropatía obstructiva, que se manifestará con dolor y, ocasionalmente, con insuficiencia renal. En fases avanzadas podemos objetivar azoemia por uropatía obstructiva (El-Gabry y cols., 2001).

En ocasiones pueden objetivarse edemas en miembros inferiores, adenopatías inguinales, masa palpable (aunque la mayoría no son palpables) y, en fases avanzadas, pérdida de peso, anorexia y/o astenia. Si la neoplasia infiltra la próstata, ocasionalmente puede detectarse mediante el tacto rectal la induración de la glándula. En las mujeres, mediante la palpación bimanual, a veces se puede detectar la afectación de la vagina y el recto.

Aunque se puede asociar a síndromes paraneoplásicos, su

frecuencia es escasa si se compara con otras neoplasias del aparato urinario (riñón y próstata). El síndrome paraneoplásico más frecuente es la hipercalcemia, objetivándose casi siempre en la enfermedad avanzada, y habitualmente responde favorablemente tras la extirpación del tumor. Se cree que es ocasionada por la secreción de péptidos o prostaglandinas semejantes a las paratiroides. Son infrecuentes los síndromes paraneoplásicos neuromusculares, hematológicos y la dermatomiositis.

Pueden presentar anemia debido a una pérdida crónica de sangre o, más infrecuente, por metástasis a nivel de la médula ósea.

FACTORES ETIOLÓGICOS EN EL CÁNCER DE VEJIGA

La etiología de los tumores del urotelio vesical, como la del cáncer, en general, es multicausal y casi siempre indefinida. No obstante, y como ocurre con otras muchas neoplasias, existen una serie de factores que, en la experimentación animal, han demostrado un efecto carcinogénico bien establecido, ya sea como agentes promotores, desencadenantes o carcinogénicos completos (Cummings, 1986).

Factores ambientales

El cáncer de vejiga fue uno de los primeros tumores malignos relacionados con la exposición única a determinadas sustancias químicas, y así, Rhen (1895) describió, entre los trabajadores de la industria química de los colorantes, a finales del siglo XIX, el cáncer de vejiga como “epidémico” e identificó a las anilinas como las formas químicas responsables de la aparición de este cáncer, una auténtica enfermedad profesional.

En carcinogénesis vesical son clásicos los experimentos de Chapman y cols. (1973), quienes mediante ligadura, dividieron en dos partes las vejigas de los ratones sometidos a estudio, previa introducción de sendas píldoras de parafina en cada una de las bolsas vesicales. Los animales fueron controlados durante 40 días, observándose que la neoplasia sólo aparecía en la parte de la vejiga que estuvo en contacto

con la orina. Se concluyó, entonces, que deberían existir, como mínimo, dos factores para producir tumores vesicales: una sustancia no identificada, incluida en la orina, y la presencia de un cuerpo extraño irritante.

Poco tiempo después aparecieron las primeras evidencias que pusieron de manifiesto la existencia de carcinógenos en la orina. Entre tales carcinógenos, presentes algunos de ellos en alta concentración ambiental en algunas industrias, y otros en baja concentración en una amplia gama de bienes de consumo alimentario, destacan las nitrosaminas (Schulte y cols., 1986).

Hashimoto y Kitagawa (1974) indujeron con éxito la transformación neoplásica “in vitro” de células epiteliales de vejiga de rata utilizando nitrosaminas. Así, utilizando butil-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN), un metabolito activo de la dibutilnitrosamina (DBN), y butil-(3-carboxipropil)-nitrosamina (BCPN), en cultivos “in vitro” de células epiteliales de ratón, se indujo un cierto grado de mortalidad celular para determinados valores de concentración de ambas sustancias, pero, a concentración subliminal, una y otra produjeron una “transformación” neoplásica característica en dichas células. Estas experiencias fueron confirmadas por otros autores (Bertran y Craig, 1972; Metcalf y Stanley, 1969).

Aunque aún no todos los mecanismos de la carcinogénesis están

claros, sí que es conocido que la patogenia del cáncer vesical es el resultado de múltiples procesos que parecen desencadenarse por los factores que comentaremos a continuación.

Aunque se han descrito algunos casos familiares, su etiología es multifactorial, resultado de alteraciones genéticas, moleculares y de interacciones ambientales. El descenso relativo de la incidencia de este tumor va a favor de la escasa importancia de la herencia en su etiología (Silverman y cols., 1992).

El tabaco es el factor de riesgo más importante. El riesgo relativo oscila entre dos y diez, en relación a dosis-respuesta, duración del hábito y grado de inhalación del humo. La mitad de las neoplasias vesicales en los hombres y la tercera parte en las mujeres, son debidas al tabaco. Abandonar el hábito permite una reducción del riesgo del 30 al 60% durante los primeros 2-4 años (Hartge y cols., 1987). Los consumidores de tabaco sin filtro incrementan el riesgo en un 50%. El tabaco negro incrementa el riesgo de cáncer vesical al doble o al triple respecto al tabaco rubio. Sin embargo, al igual que el carcinoma broncopulmonar, fumar puros o fumar en pipas elevan mínimamente el riesgo. Masticar tabaco no parece que se asocie con la neoplasia vesical. El mecanismo por el cual provoca el cáncer de vejiga aún no se conoce con precisión, pero probablemente es inducido por diversos compuestos químicos que contiene, por ejemplo el 4-amino-bifenilo (que parece ser la sustancia

más carcinógena), la acroleína y radicales libres del oxígeno. La respuesta proliferativa del epitelio vesical de los fumadores es mayor; lo cual puede potenciar los efectos de otras sustancias cancerígenas o la susceptibilidad genética. También se ha asociado el consumo de cigarrillos con las mutaciones del gen *p53* (El-Gabry y cols., 2001).

La cistitis crónica provocada por la presencia de cálculos, catéteres intravesicales prolongados u otros mecanismos, también se ha asociado con el carcinoma de células escamosas.

Hasta el 80% de los parapléjicos presentan metaplasia escamosa y un 5% desarrollan carcinoma de células escamosas (Navon y cols., 1997). En un estudio retrospectivo en pacientes con daño medular y cáncer vesical, mostraron menor riesgo de cáncer los que utilizaban colectores externos o cateterismos vesicales intermitentes, comparado con el sondaje uretral permanente o catéteres suprapúbicos.

La tuberculosis genitourinaria también ha sido asociada con un mayor riesgo de cáncer vesical.

En determinadas áreas, el cáncer vesical se asocia con otros procesos, como la Nefropatía de los Balcanes o la Enfermedad del pie negro.

Por otra parte, parece que las mujeres con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia, presentan un riesgo de 2 a 4 veces superior de desarrollar carcinoma de células transicionales. No está claro que estos

datos estén influenciados por factores de confusión como son el consumo de tabaco y las enfermedades de transmisión sexual (El-Gabry y cols., 2001). Aunque hay estudios que indican que el riesgo es dependiente del tiempo al que es sometido el paciente y de la dosis, (Fleshner y Fair, 1996) tras revisar la literatura, concluyen que no existen suficientes datos que sustenten esta afirmación, señalando la necesidad de más estudios.

En cuanto a los fármacos citotóxicos (quimioterapia), la ciclofosfamida ha sido vinculada con un mayor riesgo de desarrollar cáncer vesical, tanto en pacientes que fueron sometidos a este tratamiento por una enfermedad maligna como por enfermedades no malignas (enfermedad de Wegener; lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, etc.). El riesgo se puede incrementar hasta nueve veces, con un período de latencia entre 8 y 12 años. Se cree, aunque hay datos contradictorios, que el desarrollo del tumor no está relacionado con la cistitis hemorrágica que en ocasiones provoca este fármaco tras su administración de forma aguda (Schatte y cols., 2000). Parece que el mecanismo de actuación tanto de la ciclofosfamida como la ifosfamida en el desarrollo del cáncer vesical en humanos es a través de sus metabolitos, las acroleínas.

Se consideró que el consumo de café, té y alcohol estaban asociados; pero no ha sido demostrado en todos los trabajos. En algunos estudios mostraban una débil asociación, pero probablemente el tabaco

actúa como factor de confusión (Silverman y cols., 1992).

Los edulcorantes artificiales, como la sacarina y los ciclamatos a grandes dosis, se relacionaron en un principio, basándose en estudios experimentales, pero en ningún estudio en humanos se ha demostrado tal relación (El-Gabry y cols., 2001).

La ingesta elevada de colesterol, carnes grasas y los alimentos fritos se han asociado con un aumento del riesgo de desarrollar cáncer vesical. Las aminas heterocíclicas, presentes en la carne y el pescado a la brasa, no aumentan el riesgo. Sin embargo, se cree que la ingesta elevada de vitamina A o carotenos se asocia con un menor riesgo de cáncer vesical.

El consumo elevado de analgésicos que contienen fenacetina se ha asociado con neoplasias de la pelvis renal, uréter y vejiga. El período de latencia parece ser más prolongado para el cáncer de vejiga que para las neoplasias de la pelvis renal. El riesgo relativo varía de 2 a 6,5 según los diferentes estudios. Parece que el riesgo se correlaciona con la dosis consumida. Se ha prohibido su consumo en países occidentales. No se ha encontrado esta asociación con otro tipo de analgésicos, como el acetaminofeno.

La propia orina se ha relacionado con el desarrollo del cáncer vesical desde hace años. Los hallazgos que apoyan esta afirmación son el riesgo incrementado que presentan los varones con hiperplasia prostática

benigna ya que las orinas presentan mayor concentración, y la menor incidencia de tumores en la cúpula vesical, donde hay menor contacto con la orina que en el resto de la superficie vesical (Schatte y cols., 2000).

En cuanto a la exposición laboral, la primera referencia etiológica referente al carcinoma vesical en la especie humana se debe al trabajo de Rhen (1895), en el que identificó una epidemia de cáncer de vejiga entre los trabajadores de la industria alemana de colorantes sintéticos. En años sucesivos, mediante estudios epidemiológicos y experimentales, se han identificado tanto productos químicos como actividades laborales que se asocian al desarrollo del cáncer vesical. Actualmente se considera que los factores ocupacionales de riesgo son responsables del cáncer vesical en un 20-30% de los casos (Fleshner y Fair, 1996). Habitualmente, estos productos muestran un periodo de latencia prolongado, aunque la exposición masiva, las características individuales y la asociación con otros elementos cancerígenos, pueden acortar dicho periodo. La exposición a la anilina fue el primer cancerígeno que se estableció con precisión. Más tarde fueron identificados, entre otros, la 2-naftilamina, 4-aminobifenilo, 4-nitrobifenilo, bencidina o 2-amino-inaftol (Ismail y cols., 1998).

Entre las ocupaciones laborales que se han asociado con un riesgo incrementado para el desarrollo de una neoplasia vesical señalamos, en

primer lugar, los trabajadores que manejan los tintes, los trabajadores que manipulan la piel animal (fundamentalmente el cuero), el caucho, el aluminio, pintores, mineros, maquinistas y peluqueros (Ward y cols., 1997). Se ha observado un riesgo elevado de cáncer vesical (entre 2,2 y 12 veces más) en conductores de autobuses y taxis, incluso en exposiciones por cortos períodos. Probablemente el elemento cancerígeno en estos casos sea el hidrocarburo policíclico aromático (Soll-Johanning y cols., 1998). También se ha relacionado con el cáncer vesical el agua corriente clorada y el percloroetileno que se emplea para la limpieza en seco (Blair y cols., 1990).

La investigación sobre carcinógenos químicos ha permitido conocer que la capacidad de acetilación no es igual en todos los individuos, variando en ellos la susceptibilidad a desarrollar una neoplasia vesical. Diferentes autores señalan el mayor riesgo de padecer cáncer vesical entre los acetiladores lentos, fundamentalmente entre los individuos con exposición laboral de riesgo, alcanzando hasta el 96% entre los expuestos a aminas aromáticas (Schatte y cols., 2000).

Determinados estudios han mostrado que ciertos metabolitos endógenos del triptófano son carcinógenos cuando se implantan en la vejiga de ratones. Sin embargo, estudios epidemiológicos no apoyan este dato en humanos (Swaminathan y Reznikoff, 2000).

La persistencia del uraco puede originar una displasia en la cúpula

vesical que predispone al adenocarcinoma (Kantor y cols., 1988).

Ciertas publicaciones señalan que la infección crónica del tracto urinario se asocia con el desarrollo del cáncer vesical, especialmente en mujeres. La infección se asocia, con mayor frecuencia, con el carcinoma de células escamosas que con el de células transicionales. La cistitis por *Schistosoma haematobium* se relaciona frecuentemente con el desarrollo de carcinoma de este tipo celular. En Egipto, por ejemplo, el 60-75% de todos los carcinomas vesicales son de células escamosas. Esto se observa en casi todos los países donde la esquistosomiasis es endémica. Este tipo de tumor se presenta en una población más joven que el cáncer de células transicionales, siendo con frecuencia bien diferenciados, con una baja incidencia de diseminación local y/o a distancia (El-Gabry y cols., 2001). Por otra parte, el gen de la proteína p16 se ha hallado alterado en el 60% de los carcinomas de células escamosas que aparecen tras una esquistosomiasis, comparado únicamente con el 18% de los objetivados en carcinomas de células transicionales. El huevo de *Schistosoma haematobium* se deposita en la pared vesical, provocando una inflamación crónica, dando lugar a una metaplasia escamosa. Aunque se sospecha que el cáncer inducido por el *Schistosoma haematobium* es el resultado de errores genéticos inducidos por los procesos inflamatorios y regenerativos, hay alguna evidencia de que las nitrosaminas generadas en la orina pueden desempeñar un papel (El-Merzabani y cols., 1979).

En este apartado de la infección crónica debe de situarse como factor etiológico el VPH (Walther y cols., 1986) tanto en presencia como en ausencia de *Schistosoma haematobium*. Numerosos trabajos han tratado de estudiar el riesgo carcinogénico de virus como el VPH, con resultados contradictorios (Spano y cols., 2005), habiéndose relacionado éste con tumores de diferentes localizaciones.

En relación con el cáncer vesical, no han sido muchos los trabajos recientes (Gutiérrez y cols., 2006) que han encontrado una asociación entre la infección por el VPH y el riesgo incrementado para el desarrollo de dicha neoplasia. Esta posible relación se basa en el tropismo epitelial del VPH y la proximidad anatómica de la zona urogenital. Asimismo, se ha detectado peor pronóstico en los tumores vesicales en los que se demuestra infección por VPH, ya que estos tumores son de mayor grado y estadio (Lopez-Beltran y Escudero, 1997).

Factores genéticos

El impulso investigador en el conocimiento de los principios que gobiernan el ciclo celular y el reconocimiento de las mutaciones de genes que se saben implicados en el ciclo celular y en las vías de apoptosis, y que se relacionan con la tumorigénesis y progresión neoplásica, han provocado que la mayoría de los estudios en el carcinoma vesical se orienten hacia la detección de marcadores biológicos, con el fin de

predecir qué tumores superficiales o carcinomas *in situ* se convertirán en invasivos, y cuáles desarrollarán enfermedades neoplásicas diseminadas. El análisis de estos marcadores biológicos y su relación con las características clínicas y anatomopatológicas del tumor, deben aportar información relevante acerca del diagnóstico, evolución y tratamiento de esta neoplasia.

La monoclonalidad de los tumores indica que la alteración de una primera célula desencadena un crecimiento anormal e incontrolado de todas las células hijas, cuyo fenotipo se perpetúa y acaba configurando un tumor visible. La caracterización de protooncogenes, oncogenes, genes supresores tumorales y factores de crecimiento o de necrosis tumoral, es la principal línea de investigación básica actual, en la que ya se han obtenido algunos resultados.

En el cáncer urotelial está demostrada la correlación de anomalías genéticas con el grado y el estadio tumoral. Las deleciones de 9q corresponden a tumores superficiales papilares, las deleciones en 3p, 5q y 17p a tumores T1 y las pérdidas alélicas en 11p, 6q, 13q y 18q a estadios infiltrantes. El estudio de la proteína p53 ha puesto de manifiesto su responsabilidad en la progresión tumoral.

En este contexto, las alteraciones moleculares del cáncer vesical descritas en la literatura son muy numerosas, por lo que nos centraremos con mayor detalle en el estudio de las alteraciones oncogénicas.

Los estudios de cariotipo llevados a cabo en los tumores de vejiga revelaron varios tipos de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. Las primeras alteraciones descritas fueron la monosomía del cromosoma 9 y las deleciones intersticiales del cromosoma 13 (Gibas y cols., 1984). Posteriormente, en una revisión bibliográfica (Leonard y cols., 2002), se estableció que los cambios citogenéticos, en orden de frecuencia, eran: 9q-, 1p-, 1q- 5q-, i5p, 11p-, 6p-, 6q-, entre otros.

Oncogenes

Los protooncogenes son genes con un papel fundamental en la división y proliferación celular, que, si se alteran, pueden convertirse en oncogenes y provocar que la célula se transforme en una célula cancerosa. Estos protooncogenes codifican proteínas que participan de modo directo en el crecimiento y diferenciación celular.

Cuando un protooncogén se altera puede dar lugar a un oncogén, que actúe de forma dominante, es decir, que con la sola alteración de uno de los dos alelos, dé lugar al desarrollo tumoral. En el cáncer de vejiga se han estudiado varios oncogenes relacionados con factores de crecimiento (oncogenes *c-erbB-2/HER/neu* y *c-erbB-1*), con proteínas transductoras de señales (oncogén *Ras*) y con proteínas reguladoras nucleares (oncogenes *c-myc* y *mdm2*).

- Oncogén *c-erbB-2/HER/neu*

Su protooncogén se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica una proteína transmembrana que presenta estructura clásica de factor de crecimiento. Esta proteína posee un dominio interior con actividad tirosina-quinasa (HER-2/neu) y un dominio exterior (HER-1) que actúa como receptor de superficie celular para un factor de crecimiento (Hudson y Herr, 1995).

Fue el grupo de Zhau el primero en demostrar, mediante diversas técnicas, la sobreexpresión de *c-erbB-2* en el cáncer vesical (Zhau y cols., 1990). A partir de ahí, diversos grupos han informado acerca de la importancia pronóstica adversa de este gen en el carcinoma de células transicionales vesical (CCT), así como en otros tumores (mama, estómago, ovario, vejiga, etc.).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, Wright y cols. (1991) realizaron un estudio acerca de la expresión de *c-erbB-2* en 81 pacientes con CCT. Encontraron que el 15% de los tumores presentaron una tinción muy positiva, y el 23% se tiñeron de una manera más débil. Sin embargo, apareció una escasa asociación entre la positividad para *c-erbB-2* y estadio tumoral, y una asociación nula entre positividad para *c-erbB-2* y grado histológico.

Acerca de la recidiva tumoral, Tetu y cols. (1996) realizaron un estudio en 256 pacientes con tumores superficiales Ta y T1, Sólo

encontraron positividad para el dominio HER-2/neu en el 8,2% de los casos, encontrando relación con el estadio T1, la multifocalidad, el alto grado tumoral, la expresión de p53 y la aneuploidía, y no encontrando relación con el tiempo ni el pronóstico de recidiva, y señalando que la expresión anormal de HER/neu en el CCT raramente se observa en las presentaciones iniciales.

En cuanto a la progresión tumoral, Underwood y cols. (1995) realizaron una revisión sobre 236 CCT pertenecientes a 89 pacientes con tumores recidivantes, 20 enfermos sin recidiva y 10 controles de vejiga sin alteraciones, determinando la presencia de expresión de la proteína del gen *c-erbB-2* y la amplificación de dicho gen. Se objetivó sobreexpresión proteica en el 50% de los pacientes con enfermedad recidivante, en el 45% de aquellos que no tuvieron recidivas y en ninguno de los controles. De los 89 CCT recidivantes, el 48% sufrieron progresión tumoral, y de ellos, el 32% correspondían a pacientes que presentaron amplificación de *c-erbB-2*, lo que puso de manifiesto una estrecha relación entre la amplificación genética y la progresión tumoral. Sin embargo, dicha amplificación sólo se puso de manifiesto cuando la progresión ya había ocurrido, y no en las muestras iniciales.

En cuanto a la influencia de este oncogén en la supervivencia, se ha observado una relación inversa entre la positividad del mismo y la supervivencia, independiente del grado y del estadio (Sato y cols., 1992).

En conclusión, el significado pronóstico de los valores aislados de *c-erbB-2* en vejiga, hasta ahora, es limitado, en comparación con otros marcadores moleculares. No obstante, nuevos estudios parecen indicar que su asociación con otros marcadores, como el *c-erbB-1*, sí puede tener valor como predicción de la recurrencia tumoral.

- Oncogén *c-erbB-1*

El protooncogén *c-erbB-1* regula la producción del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Éste factor es un polipéptido de 53 aminoácidos que promueve el crecimiento de las células epiteliales y que necesita de un receptor específico de membrana para ejercer su acción.

Está presente ampliamente en el organismo y se encuentra en grandes cantidades en la orina, probablemente por secreción tubular. Pertenece al grupo de receptores de superficie con actividad tirosina-kinasa, con la porción catalítica en el lado citoplasmático de la membrana. El EGFR se ha identificado de modo fisiológico en las capas basales del urotelio sano (Messing, 1990). Varios estudios han demostrado una sobreexpresión de EGFR en diferentes tumores malignos, encontrándose relación con una mayor agresividad tumoral y con un peor pronóstico (Coombs y cols., 1991).

En el CCT, se ha detectado una sobreexpresión del EGFR en

tumores de vejiga de diferente grado y estadio. En un estudio sobre 48 tumores vesicales se observó una asociación significativa con el grado de diferenciación y estadio tumoral (Neal y cols., 1985).

Los resultados publicados han sido variables, pero parecen indicar un cierto papel del EGFR en la predicción de mortalidad, recurrencia y progresión del cáncer vesical.

- Oncogén *Ras*

La activación de los oncogenes *Ras* (*Ha-Ras*, *Ki-Ras* y *N-Ras*) codifica la proteína p21, una proteína de unión de membrana de 21 kD que recibe señales externas de diferenciación y proliferación y emite señales intracelulares como factor de crecimiento, uniéndose a GDP y GTP, y tiene también actividad GTPasa intrínseca, lo que permite su propia inactivación.

La mutación del gen *Ha-Ras* en la línea celular EJ, derivada de un cáncer de vejiga, fue la primera alteración del gen *Ras* documentada en relación al cáncer. Esta familia, en estudios experimentales, ha sido relacionada con la progresión tumoral, pero los resultados no se han confirmado en la clínica.

- Oncogén *c-myc*

El oncogén *c-myc*, situado en el cromosoma 8, codifica una

fosfoproteína celular de 62 kD, que es activada durante la proliferación celular (Kelly y Siebnlist, 1985). Las proteínas myc tienen gran afinidad por los ácidos nucleicos del ADN, lo que sugiere el papel de estas proteínas en el control de la expresión génica y replicación del ADN. La proteína myc parece ser una de las claves en la proliferación celular.

En condiciones normales, este gen se activa por factores de crecimiento. Las líneas celulares que expresan *c-myc* presentan una independencia relativa a los factores de crecimiento para la proliferación y evitan la entrada de la célula en fase de reposo, manteniéndola permanentemente en proliferación activa.

- Oncogén *mdm2*

El gen *mdm2* es un protooncogén localizado en el cromosoma 12 que codifica una proteína nuclear de 90 kD. Esta proteína, al unirse a la proteína p53, inhibe la transcripción provocada por ésta, lo que facilita su degradación a través del proteosoma.

El gen supresor de tumores *Tp53* codifica la proteína p53, que actúa a nivel de la transcripción y de la traslación, revisando la correcta secuencia de ADN antes de replicarse. Este gen está controlado por el gen inactivador *mdm2*.

La proteína p53 actúa sobre la proteína p21, que inhibe la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) y, con este

mecanismo, el gen *p53* permite la reparación del ADN anómalo (a través de los genes reparadores *MLH1* y *MLH2*) y, en caso contrario, se provoca la detención del ciclo celular, provocando la entrada de la célula en G0, o bien su muerte por apoptosis. La proteína mdm2 inactiva tanto a la proteína p53 como a la proteína del retinoblastoma y, por tanto, favorece la progresión del ciclo celular.

Genes supresores

Los genes supresores o antioncogenes son genes que codifican proteínas que son necesarias para el correcto funcionamiento celular, y cuya pérdida o alteración da lugar al desarrollo de tumores. Pertenecen a un grupo de genes cuyos productos actúan en la regulación negativa del ciclo celular. La pérdida, en la célula, de uno de estos genes, supone la proliferación incontrolada de la misma.

Los principales genes supresores implicados en el CCT son el *Tp53*, el *Tp21* y el gen supresor del retinoblastoma (*Rb*).

- Gen supresor *Tp53*

El gen supresor *Tp53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica la expresión de una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos y 53 kD que regula el paso de G1 a S en el ciclo celular.

Algunos autores (Hollstein y cols., 1991) sugieren que la proteína

p53 debe unirse a un receptor nuclear para, a través de diferentes mecanismos, ejercer sus acciones: control del crecimiento tisular, reparación de alteraciones del ADN y destrucción programada de las células con alteraciones de ADN irreparables (apoptosis).

La proteína p53 es, básicamente, un regulador de expresión génica actuando como un factor de transcripción, capaz de activar y también de reprimir genes específicos. Cuando existe un daño en el ADN celular, los niveles de p53 aumentan, y esto provoca un aumento de la expresión de la proteína p21 (Fonatsch y cols., 1991), encargada de evitar la división de la célula hasta que se repare el daño del ADN y así impedir la perpetuación de mutaciones. Si el daño del ADN es excesivo, imposible de reparar, el aumento de p53 determina la inducción del gen *bax* (que favorece la apoptosis) y la inhibición del gen *bcl-2* (oncogén que inhibe la apoptosis) con el resultado final de apoptosis. Con ello, se evita la aparición de células hijas severamente mutadas.

La p53 mutada es más estable que la nativa, por lo que permanece más tiempo en el núcleo, y puede ser detectada por métodos inmunohistoquímicos, lo que ha permitido estudiar la agresividad de los tumores según la expresión de p53.

El análisis de las alteraciones en el gen que codifica la proteína p53 se puede realizar mediante análisis molecular, técnicas de inmunoluminiscencia, análisis serológicos e inmunohistoquímica. En el

análisis molecular, la amplificación mediante PCR, seguida de secuenciación génica, permiten estudiar directamente la mutación específica que afecta al gen.

Las mutaciones en el gen *Tp53* son las alteraciones más frecuentes encontradas en algunos tipos de tumores malignos (vejiga, próstata, riñón, pulmón, mama, colon y recto) (Wee y cols., 1994). La proteína p53 anómala no puede bloquear el ciclo celular, lo que provoca un crecimiento incontrolado.

No se ha llegado a un consenso sobre el porcentaje de positividad a p53 en el cáncer de vejiga. Ésto es debido, principalmente, a varios factores, entre ellos, al empleo de distintos anticuerpos, las diferencias debidas al empleo de muestras de parafina o muestras congeladas y la subjetividad del patólogo en los análisis de inmunohistoquímica (Gardiner y cols., 1994). En general, podemos considerar que es rara la expresión mutada de p53 en tumores superficiales, pudiendo alcanzar un 60% en carcinomas invasivos.

Se puede afirmar que la correlación con el grado y el estadio tumoral sugieren que las mutaciones en *Tp53* pueden estar asociadas con una evolución más agresiva de los tumores (Moreno y cols., 1999), aunque algunos autores no encuentran relación entre la sobreexpresión de p53 y el grado o el estadio tumoral, y sugieren que no tiene ningún valor predictivo pronóstico aislado. Pese a ello, la expresión de p53 constituye

uno de los pilares sobre los que se apoya el pronóstico biológico del CCT.

En cuanto a la supervivencia, algunos autores han demostrado un efecto significativo de la mutación de *Tp53* sobre los porcentajes globales de supervivencia, y así, la supervivencia a 5 años de los pacientes con invasión muscular sin sobreexpresión de la proteína es del 64 al 79% (Nakanishi y cols., 1996), mientras que, en los que la sobreexpresan, es del 22 al 30% (Esrig y cols., 1994).

Asimismo, algunos autores consideran que la positividad de p53 también puede ser útil en la determinación de los tumores superficiales más agresivos, e incluso resistentes al tratamiento con BCG (Lacombe y cols., 1996). La mayoría de los autores no están de acuerdo en que la positividad de p53 prediga la resistencia a la BCG, sino solo que en los casos resistentes a BCG la lesión residual positiva a p53 indicará un mal pronóstico.

- Gen supresor *Tp21/WAF1/CIPI*

La proteína p21 fue el primer miembro descrito de la familia de las CDK1 (de 21 kD), codificada por el gen *Tp21/WAF1/CIPI*. Esta proteína inactiva los complejos ciclina A/E-CDK2 y ciclina D1/D2/D3-CDK4, deteniendo el ciclo celular en G1 y evitando que la célula entre en la fase S. Este proceso se desarrolla a través de su interacción con el

antígeno nuclear de proliferación (PCNA). La proteína p53 nativa regula la expresión de la proteína p21 y le proporciona el mecanismo para ejercer los efectos supresores de la proliferación.

En un estudio acerca de la mutación del gen *WAF1* en diversos tumores primarios, identificaron mutaciones de este gen en dos tumores de vejiga, ambos con p53 nativa, y uno de ellos con alteración de la producción de p21 por la aparición de un codón de terminación; pero por regla general la inactivación de p21 mediante mutaciones a nivel de ADN es poco frecuente (Lacombe y cols., 1996).

Existe controversia acerca de la importancia pronóstica de la expresión de p21 en el cáncer de vejiga.

- Gen supresor *Rb*

El gen del retinoblastoma (*Rb*) fue el primer gen en ser reconocido como gen supresor tumoral, siendo considerado como el prototipo de los genes supresores. Como cualquier gen supresor tumoral, es un gen recesivo, y precisa de mutación en sus dos alelos para la transformación neoplásica, si bien una de ellas puede ser heredada. Esto explicaría la predisposición familiar para desarrollar retinoblastoma.

El gen *Rb* se sitúa en el cromosoma 13, y codifica una proteína denominada pRb, una fosfoproteína nuclear de 928 aminoácidos, y peso molecular de 110 kD que actúa a nivel del primer punto de restricción del

ciclo celular (paso G1/S). Esta proteína, durante la fase G1, se halla en su forma fosforilada y unida al factor de transcripción E2F y a otros factores capaces de inactivarla, como el producto del oncogén *c-myc*. Cuando las células son estimuladas para su proliferación, la proteína pRb se desfosforila por acción de las ciclinas CDK2 y CDK4, lo que provoca la liberación del factor E2F y la proteína *myc*, quienes al encontrarse liberados, pueden llevar a cabo su acción favorecedora de la transcripción, iniciándose la siguiente fase del ciclo celular, la fase S. Tras producirse la mitosis, la proteína pRb es fosforilada de nuevo por acción de la fosfatasa alcalina, con lo que vuelve a unirse a los factores proliferativos.

La ausencia, inactivación o mutación del gen *Rb* se ha relacionado con diferentes tumores humanos (Gallie, 1994). En el carcinoma vesical, las alteraciones del gen *Rb* se han relacionado, en general, con estadios avanzados y con una pobre supervivencia.

Como ya se ha comentado en otro apartado, varios estudios han demostrado el efecto colaborador de las proteínas pRb y p53 en la progresión tumoral de los pacientes con cáncer de vejiga, tanto en tumores superficiales, como en invasores (Cote y cols., 1998).

OBJETIVOS

A pesar de todo lo investigado, la mayor parte de los estudios no permiten la obtención de conclusiones definitivas que indiquen la participación del VPH en el cáncer de vejiga. Esto se debe a que la metodología empleada en estos estudios fue diferente, mal estandarizada y/o poco explícita, lo que dificulta la obtención de unas conclusiones totalmente válidas. Globalmente los estudios muestran, en la mayor parte de los casos, la presencia de la infección, con una importante dispersión. Aunque muchos de los ensayos carecen de un grupo control definido, si se analizan con detenimiento es posible obtener el valor de la *Odds Ratio* global debido al comportamiento homogéneo de algunos de estos estudios previos, con casos y controles bien definidos.

No obstante, pensamos que, para obtener una conclusión definitiva, faltan estudios con suficiente número de casos y muestras, comparativo frente a controles y que utilicen técnicas microbiológicas validadas en un mismo sujeto y muestra. Por lo tanto, permanece abierto el debate sobre si la asociación entre la infección crónica por el VPH y el cáncer vesical es una coincidencia o existe una relación de causalidad. Todo ello invita a seguir investigando la relación entre el virus y este tumor a través de estudios, primero epidemiológicos y posteriormente patogénicos de la enfermedad.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

VPH y cáncer vesical

1. Estudiar, en sujetos con cáncer de vejiga, la presencia de ADN del virus del papiloma humano, determinando, también, el genotipo presente.
2. Investigar los factores de riesgo asociados al cáncer vesical en nuestra población.
3. Establecer relaciones epidemiológicas entre los parámetros anteriores para conocer sus implicaciones clínicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES

Para la realización del presente estudio se utilizó un diseño observacional y analítico, de casos y controles, siendo considerados los primeros (pacientes con cáncer de vejiga) potencialmente susceptibles de estar infectados por el VPH.

Para ello se seleccionaron 85 pacientes intervenidos en el Servicio de Urología del Hospital Clínico “San Cecilio” de Granada, entre septiembre de 2003 y abril de 2007. En todos ellos se obtuvo tejido vesical mediante biopsia (de la lesión tumoral en los casos y de mucosa vesical sana en los controles) constituido por dos fragmentos de, aproximadamente, 25 mm². Todos los sujetos carecían de procesos clínicos infecciosos e inflamatorios en el momento de ser intervenidos.

Las biopsias fueron lavadas con suero fisiológico para eliminar los restos de sangre y colocadas en medio de transporte para virus. Se mantuvieron a 4°C hasta su recogida (un máximo de 4 horas) o fueron inmediatamente congeladas a -20°C, un máximo de 12 a 16 horas, y luego a -80°C hasta su posterior procesamiento.

El grupo de casos lo constituyeron 34 pacientes intervenidos de lesión tumoral vesical mediante resección transuretral (RTU). Todos ellos fueron varones. La edad media del grupo fue de 66 años, con un rango de 36 a 86 años.

Por su parte, el grupo control estuvo formado por 51 pacientes, intervenidos, en su mayoría, de adenomectomía prostática mediante la técnica de Freyer (46 pacientes), dos pacientes intervenidos de carcinoma de próstata por RTU, uno intervenido de una lesión vesical inflamatoria, y dos más (ambas mujeres) intervenidas de carcinoma infiltrante de endometrio por RTU. La edad media del grupo fue de 70 años, con un rango de 53 a 82 años.

En los 85 pacientes se determinó, mediante encuesta o revisión de la historia clínica, la exposición a tabaco, la ingesta alcohólica habitual y la profesión del paciente.

En las tablas 3 (para los casos) y 4 (para los controles) se describen las características de los pacientes para los parámetros de estudio considerados anteriormente.

Tabla 3: Características de los casos

Paciente	Fecha de incorporación al estudio	Sexo	Edad	Hábito tabáquico	Consumo alcohólico	Profesión
1	24/09/2003	Varón	55	No fumador	No bebedor	Metalurgia
2	25/09/2003	Varón	55	Fumador	No bebedor	Construcción
3	19/02/2007	Varón	59	Fumador	No bebedor	Construcción
4	01/10/2003	Varón	63	Fumador	No bebedor	Transportista
5	16/04/2007	Varón	86	Fumador	No bebedor	Agricultor
6	14/11/2003	Varón	51	Fumador	Bebedor	Comercial
7	02/12/2003	Varón	39	Fumador	No bebedor	Construcción
8	02/12/2003	Varón	65	Fumador	Bebedor	Comercial
9	19/12/2003	Varón	78	Fumador	No bebedor	Sin identificar
10	08/01/2004	Varón	61	Fumador	Bebedor	Metalurgia
11	12/01/2004	Varón	61	Fumador	No bebedor	Construcción
13	14/01/2004	Varón	64	Fumador	Bebedor	Construcción
15	08/01/2004	Varón	77	Fumador	No bebedor	Agricultor
16	21/01/2004	Varón	76	No fumador	No bebedor	Agricultor
17	30/01/2004	Varón	74	Fumador	Bebedor	Agricultor
18	30/01/2004	Varón	61	Fumador	Bebedor	Agricultor
19	09/02/2004	Varón	72	Fumador	No bebedor	Agricultor
20	09/02/2004	Varón	36	No fumador	No bebedor	Limpieza
21	09/02/2004	Varón	78	Fumador	Bebedor	Agricultor
22	16/02/2004	Varón	59	Fumador	Bebedor	Agricultor
23	16/02/2004	Varón	61	Fumador	No bebedor	Comercial
24	03/03/2004	Varón	51	Fumador	Bebedor	Limpieza
25	03/03/2004	Varón	68	Fumador	No bebedor	Agricultor
26	23/02/2004	Varón	53	Fumador	No bebedor	Asfaltos
27	31/03/2004	Varón	67	Fumador	No bebedor	Carnicero
28	03/03/2004	Varón	68	Fumador	No bebedor	Ingeniero
30	22/03/2004	Varón	76	Fumador	Bebedor	Agricultor
31	13/04/2004	Varón	74	Fumador	Bebedor	Agricultor
33	20/04/2004	Varón	82	No fumador	No bebedor	Sin identificar
34	28/04/2004	Varón	82	Fumador	No bebedor	Sin identificar
35	10/09/2004	Varón	69	Fumador	No bebedor	Panadero
36	24/09/2004	Varón	78	Fumador	No bebedor	Agricultor
37	24/09/2004	Varón	72	Fumador	Bebedor	Sin identificar
38	30/03/2005	Varón	78	Fumador	No bebedor	Agricultor

Tabla 4: Características de los controles

Paciente	Fecha de incorporación al estudio	Sexo	Edad	Hábito tabáquico	Consumo alcohólico	Profesión
12	19/01/2004	Varón	82	Fumador	No bebedor	Construcción
14	19/01/2004	Mujer	74	No fumador	No bebedor	Limpieza
29	22/03/2004	Varón	62	Fumador	No bebedor	Limpieza
32	13/04/2004	Mujer	73	No fumador	No bebedor	Limpieza
39	17/04/2007	Varón	78	Fumador	Bebedor	Comercial
40	24/04/2006	Varón	75	No fumador	No bebedor	Sin identificar
41	16/05/2006	Varón	78	No fumador	No bebedor	Agricultor
42	16/05/2006	Varón	77	No fumador	No bebedor	Construcción
43	12/05/2006	Varón	75	No fumador	No bebedor	Metalurgia
44	07/06/2006	Varón	65	Fumador	No bebedor	Policía
45	07/06/2006	Varón	72	No fumador	No bebedor	Agricultor
46	20/06/2006	Varón	64	No fumador	Bebedor	Agricultor
47	18/08/2006	Varón	70	No fumador	No bebedor	Metalurgia
48	24/08/2006	Varón	66	Fumador	Bebedor	Transportista
49	27/09/2006	Varón	74	No fumador	No bebedor	Administrativo
50	27/09/2006	Varón	63	Fumador	No bebedor	Construcción
51	02/10/2006	Varón	81	Fumador	No bebedor	Agricultor
52	03/10/2006	Varón	64	Fumador	Bebedor	Agricultor
53	04/10/2006	Varón	65	Fumador	No bebedor	Comercial
54	17/10/2006	Varón	68	No fumador	No bebedor	Transportista
55	23/10/2006	Varón	70	Fumador	Bebedor	Agricultor
56	27/10/2006	Varón	81	Fumador	No bebedor	Camarero
57	30/10/2006	Varón	80	Fumador	Bebedor	Metalurgia
58	31/10/2006	Varón	53	Fumador	No bebedor	Lavandería
59	06/11/2006	Varón	64	No fumador	No bebedor	Camarero
60	08/11/2006	Varón	63	No fumador	No bebedor	Metalurgia
61	08/11/2006	Varón	69	Fumador	No bebedor	Comercial
62	15/11/2006	Varón	65	Fumador	No bebedor	Construcción
63	22/11/2006	Varón	77	No fumador	No bebedor	Construcción
64	27/11/2006	Varón	68	Fumador	No bebedor	Tapicero
65	22/12/2006	Varón	71	No fumador	No bebedor	Agricultor
66	17/01/2007	Varón	69	Fumador	Bebedor	Barnizador
67	11/10/2006	Varón	75	Fumador	Bebedor	Agricultor
68	18/10/2006	Varón	65	Fumador	Bebedor	Metalurgia
69	31/01/2007	Varón	68	Fumador	No bebedor	Agricultor
70	22/01/2007	Varón	70	No fumador	Bebedor	Dentista

Tabla 4: Continuación

Paciente	Fecha de incorporación al estudio	Sexo	Edad	Hábito tabáquico	Consumo alcohólico	Profesión
71	21/02/2007	Varón	71	No fumador	No bebedor	Agricultor
72	26/02/2007	Varón	73	Fumador	Bebedor	Administrativo
73	04/10/2006	Varón	80	Fumador	Bebedor	Ganadero
74	06/03/2007	Varón	74	No fumador	No bebedor	Transportista
75	07/03/2007	Varón	65	No fumador	No bebedor	Administrativo
76	07/03/2007	Varón	77	Fumador	No bebedor	Agricultor
77	07/03/2007	Varón	76	Fumador	No bebedor	Transportista
78	28/03/2007	Varón	67	Fumador	Bebedor	Camarero
79	20/03/2007	Varón	60	No fumador	No bebedor	Metalurgia
80	29/03/2007	Varón	73	No fumador	No bebedor	Agricultor
81	02/04/2007	Varón	75	No fumador	No bebedor	Comercial
82	02/04/2007	Varón	73	Fumador	No bebedor	Agricultor
83	11/04/2007	Varón	60	Fumador	No bebedor	Metalurgia
84	11/04/2007	Varón	63	No fumador	No bebedor	Carpintero
85	18/04/2007	Varón	67	Fumador	No bebedor	Construcción

Como vemos, por tanto, respecto al hábito tabáquico, los pacientes se agruparon en dos tipos. Un grupo lo constituyeron aquellos pacientes que no eran fumadores y nunca lo habían sido (categoría “no fumador”); el otro grupo lo constituían los fumadores habituales y exfumadores (categoría “fumador”). Así definidos, en el grupo de casos, el 88,2% (30/34) eran o habían sido fumadores, frente a un 11,8% (4/34) que nunca habían fumado. En el grupo control, eran o habían sido fumadores el 54,9% (28/51), frente al 45,1% (23/51) que nunca habían fumado.

El consumo de alcohol se definió en dos categorías: “bebedores” y “no bebedores”. En este sentido, en el grupo de casos, fueron bebedores

habituales el 35,3% (12/34), frente al 64,7% (22/34) que no fueron bebedores. En el grupo control eran bebedores el 25,5% (13/51), frente al 74,5% (38/51) que no lo eran.

La profesión, en cada uno de los grupos, quedó como sigue:

- En los casos encontramos un predominio del gremio dedicado a las tareas agrícolas, con un 38,2% (13/34), seguido del gremio de la construcción con un 14,7% (5/34). El resto se distribuye en otras profesiones, destacando como posibles factores de riesgo asociados a carcinoma vesical, un paciente que trabajaba en asfaltados. En cuatro pacientes no constaba dato en la historia clínica.
- En el grupo de control también fue mayoritario el gremio de la agricultura con un 25,5% (13/51), seguido del metalúrgico con el 13,7% (7/51) y después el de la construcción con el 11,8% (6/51).

DESCRIPCIÓN DE LAS LESIONES TUMORALES

Una vez definidas las características de la población en ambos grupos, clasificamos las lesiones tumorales en el grupo de casos. Estos datos se reflejan en la tabla 5.

Tabla 5: Características de las lesiones tumorales vesicales

Paciente	Categoría	Grado histológico	Estadio	Tamaño	Número de lesiones
1	Recidiva	G1	T1	Pequeño	Múltiple
2	Recidiva	G2	T1	Pequeño	Múltiple
3	Recidiva	G1	T1	Intermedio	Múltiple
4	Primario	G2	Tx	Pequeño	Única
5	Primario	G2	T2	Grande	Múltiple
6	Primario	G2	T1	Grande	Múltiple
7	Primario	G3	Tx	Grande	Única
8	Primario	G3	T1	Intermedio	Múltiple
9	Recidiva	G2	T1	Intermedio	Múltiple
10	Recidiva	Gx	Tx	Pequeño	Única
11	Primario	G3	T1	Grande	Única
13	Primario	G3	T2	Intermedio	Única
15	Primario	G2	T1	Grande	Única
16	Primario	G3	T2	Grande	Múltiple
17	Primario	G3	T2	Pequeño	Múltiple
18	Primario	G2	T1	Grande	Única
19	Primario	G2	T1	Grande	Múltiple
20	Recidiva	G1	Ta	Pequeño	Única
21	Primario	G2	T1	Pequeño	Única
22	Primario	G3	T2	Grande	Única
23	Primario	G2	T1	Pequeño	Múltiple
24	Primario	G2	Ta	Pequeño	Única
25	Recidiva	G2	T1	Grande	Única
26	Primario	G2	T1	Intermedio	Única
27	Primario	G1	Ta	Pequeño	Única
28	Recidiva	G2	Ta	Grande	Única
30	Primario	G3	T2	Intermedio	Única
31	Recidiva	G2	Ta	Pequeño	Única
33	Recidiva	G2	T1	Pequeño	Múltiple
34	Primario	G3	T1	Grande	Múltiple
35	Recidiva	G1	T1	Grande	Única
36	Recidiva	G2	T1	Grande	Única
37	Recidiva	G2	T1	Intermedio	Única
38	Primario	G3	T2	Grande	Única

De las lesiones vesicales resecaadas, el 61,8% (21/34) correspondieron a tumores primarios, y fueron recidivas el 38,2% (13/34).

Grado histológico

Con respecto al grado histológico, la distribución fue la siguiente:

- Tumores de grado I (G1), en el 14,7% (5/34).
- Tumores de grado II (G2), en el 52,9% (18/34), uno de ellos con diferenciación escamosa.
- Tumores grado III (G3) se diagnosticaron en el 29,4% (10/34), destacando dos casos con diferenciación escamosa y uno con diferenciación glandular.
- Hubo un caso en el que no se pudo determinar el grado histológico (Gx).

Valorando el grado histológico en los tumores primarios y en las recidivas encontramos que, en los tumores primarios, el 4,8% (1/21) fueron G1, mientras que el 47,6% (10/21) fueron G2 y también G3. En las recidivas, el 30,8% (4/13) fueron G1 y el 61,6% (8/13) fueron G2.

Estadio tumoral

En cuanto al estadio tumoral, la distribución fue la siguiente:

- Estadio Tx (debido a la cauterización o al pequeño tamaño de la tumoración no se pudo informar el grado de infiltración), en el 8,8% de los casos (3/34).
- Estadio Ta, en el 14,7% (5/34).
- Estadio T1, en el 55,9% (19/34).
- Estadio T2, en el 20,6% (7/34).

Valorando el estadio tumoral en los tumores primarios y en las recidivas encontramos que, en los tumores primarios, el 9,5% (2/21) fueron Ta, el 47,6% (10/21) fueron T1 y el 33,3% (7/21) fueron T2. En las recidivas, el 23,1% (3/13) fueron Ta y el 69,2% (9/13) fueron T1.

Tamaño tumoral

El tamaño del tumor fue definido como lesiones grandes, cuando tenían un diámetro mayor de 5 cm, lesiones pequeñas cuando el diámetro fue inferior a 2 cm, y lesiones intermedias, aquellas en las que el diámetro estuvo comprendido entre 2 y 5 cm. Así definido, hubo un 44,1% (15/34) de lesiones grandes, un 20,6% de lesiones intermedias (7/34) y un 35,3% de lesiones pequeñas (12/34).

Valorando el tamaño tumoral en los tumores primarios y en las recidivas encontramos que, los tumores grandes fueron primarios en el

73,3% (11/15), los tumores pequeños en el 50% (6/12) y los tumores intermedios en el 57,1% (4/7).

Número y localización de las lesiones

Respecto al número de lesiones tumorales, fueron lesiones únicas el 61,8% (21/34) y respecto a la localización de éstos, teniendo en cuenta que los tumores extensos pueden ocupar más de una localización, las predominantes fueron en cuello vesical con un 38,1% (8/21), seguida de la cara lateral derecha, con un 23,8% (5/21) y de la cara lateral izquierda, involucrada en el 19% de los tumores (4/21). En la zona trigonal sólo se apreció lesión en el 9,5% (2/21).

DETECCIÓN DEL VPH MEDIANTE ARRAY EN TUBO

Fundamento genético

Un array es un conjunto de sondas moleculares fijadas de manera ordenada sobre un soporte sólido y, por extensión, también hace referencia a la técnica de hibridación que utiliza estos soportes.

Actualmente se han diseñado robots que pueden depositar estas sondas moleculares en forma de microgotas en una superficie de uno o varios centímetros cuadrados, e incluso menores. La síntesis de los arrays supone la impresión y fijación de sondas de ácidos nucleicos sobre un soporte sólido con afinidad por éstos. Dichos soportes, generalmente, son membranas de nitrocelulosa o nailon, o bien portaobjetos recubiertos con residuos de polilisinas u otro compuesto capaz de unirse al ácido nucleico. En cuanto a las sondas, pueden ser clones procedentes de una genoteca, productos de PCR obtenidos a partir del genoma de interés o bien oligonucleótidos sintéticos.

En general, se pueden distinguir dos tipos de arrays: consideramos macroarrays aquéllos en los que las sondas se depositan e inmovilizan sobre un soporte tipo membrana, generalmente de nitrocelulosa o nailon, mientras que, en los microarrays los soportes utilizados son portaobjetos o chips microelectrónicos. Otra de las diferencias fundamentales frente a los macroarrays es la gran cantidad de sondas que pueden fijarse sobre una pequeña superficie de soporte sólido.

Su finalidad es la detección específica de un ácido nucleico (ADN o ARN). Para ello, el ácido nucleico que se quiera detectar debe estar purificado y marcado, bien con un marcador radiactivo, con un fluorocromo, o con otro marcador químico, como la biotina. Una vez marcado el ácido nucleico se procede a su hibridación específica con las sondas presentes en el array sintetizado previamente, uniéndose cada ácido nucleico a la sonda correspondiente. A continuación se somete al array a una serie de lavados para eliminar el exceso de ácidos nucleicos que no hayan hibridado específicamente y, tras el revelado, se procede a la medición de la señal. En cualquiera de los casos se genera una imagen que se somete a un proceso de digitalización, normalización y cuantificación. Tras este tratamiento se obtiene una colección de datos con las intensidades correspondientes a cada gen incluido en el array. Finalmente, se procede al análisis de los datos, que, en ocasiones, se convierte en una tarea compleja, sin embargo, frente a ello, la ventaja de esta técnica es que permite obtener una enorme cantidad de información en un único experimento.

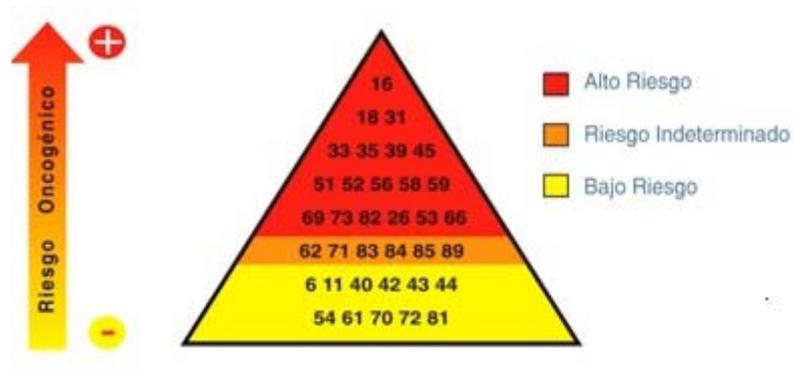
Por lo tanto, la principal ventaja de esta metodología es la posibilidad de hibridación simultánea de un gran número de sondas, lo que permite detectar a la vez un amplio número de microorganismos. Además, permite, no sólo la identificación del microorganismo, sino también el análisis de genotipos y la presencia de factores de

patogenicidad, virulencia y resistencia mediante detección de genes específicos o mutaciones (Doménech-Sánchez y Vila, 2004).

Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano

Con el Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano (GENOMICA S.A.U., Coslada, España) (Chacón y cols., 2007) se puede detectar la presencia de los 35 genotipos del virus VPH con mayor importancia clínica (figura 5) en distintos tipos de muestras clínicas (torundas impregnadas, biopsias, suspensiones celulares y tejido fijado en formol o incluido en parafina).

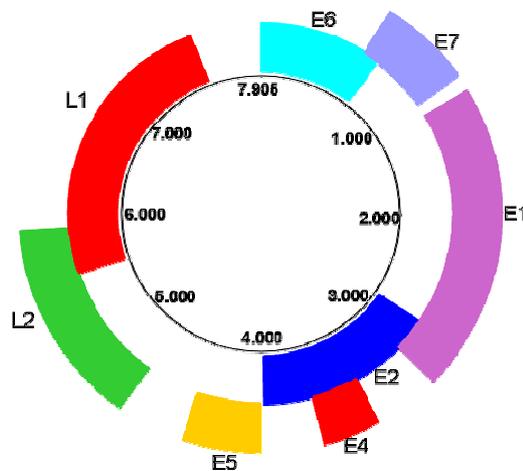
Figura 5: Clasificación de los genotipos de VPH según el riesgo oncogénico (European Consortium of Cervical Cancer, 2004)



La detección se lleva a cabo mediante la amplificación, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de un fragmento de unos 450 pb dentro de la región L1 del virus (figura 6), por tratarse de una secuencia que está altamente conservada entre los distintos tipos de VPH.

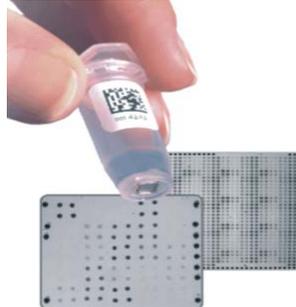
Sin embargo, esta región presenta suficientes variaciones como para poder diferenciar cada tipo de virus con sondas de captura específicas. De esta manera, se asegura la especificidad de la detección.

Figura 6: Estructura del virus del papiloma humano (en <http://sameens.dia.uned.es>)



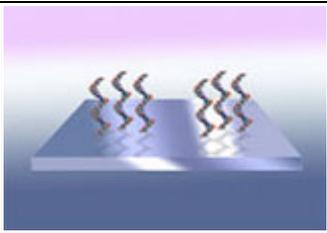
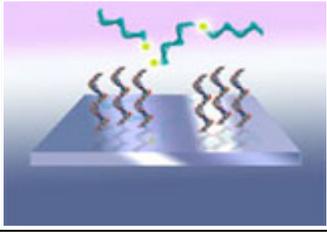
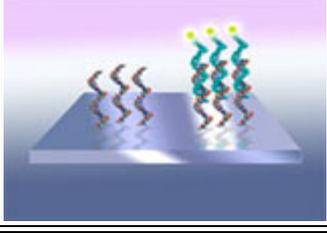
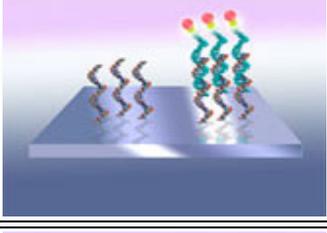
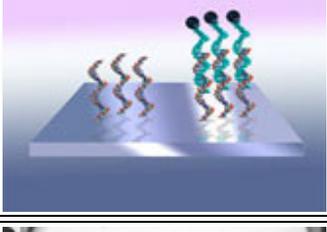
Posteriormente, se detecta el producto amplificado por PCR mediante una plataforma tecnológica basada en microarrays dentro de un tubo (ArrayTube, AT). La plataforma AT se fundamenta en incluir un microarray (impreso en un pequeño cristal de 9 mm²) en la parte inferior de un tubo de ensayo tipo eppendorf (figura 7). Este tipo de tecnología permite la detección simultánea de múltiples marcadores moleculares de utilidad diagnóstica, en este caso, como hemos visto, un fragmento de la región L1 de 35 tipos distintos de VPH, y de los controles necesarios para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Figura 7: Tecnología de microarray en tubo (en: <http://www.genomica.es>)



El sistema de detección de la hibridación en el kit Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del tubo AT en las que se produce la captura específica de los productos amplificados. Durante la PCR, los productos amplificados quedan marcados con biotina (ya que los primers utilizados en dicha reacción están marcados con biotina). Después de la amplificación se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del tubo AT, tras lo cual se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (HRP, Horse Radish Peroxidase). El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), con lo que se produce la precipitación de éste en las zonas del tubo AT en las que ocurre la hibridación (figura 8).

Figura 8: Funcionamiento de la tecnología AT (en: <http://www.genomica.es>)

	El microarray de un AT es un vidrio recubierto de una sustancia polimérica sobre el que se depositan 120 puntos de hibridación compuestos de cadenas de ADN monocatenario. Cada punto posee sondas específicas que hibridan con las secuencias buscadas
	El ADN de la muestra, amplificado previamente y marcado con biotina, se añade sobre el microarray
	El ADN marcado con biotina se une específicamente a sus sondas complementarias sobre el microarray
	Se añade HRP, que se une a las moléculas de biotina con las que se marcó el ADN de la muestra
	En presencia de TMB, se induce la precipitación de un compuesto insoluble sobre las zonas donde se produjo la hibridación del ADN
	Al final se obtiene una imagen del microarray.

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del ADN de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del ADN debido a una inadecuada conservación o por pérdida del ADN de la muestra durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del virus (presencia de hemoglobina, restos de parafina, sales, etc).

En el kit Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano se han introducido dos controles internos en el mismo tubo de reacción donde se analiza la muestra, con la finalidad de eliminar los falsos negativos. Por un lado, la amplificación de ADN del propio paciente (ADN genómico) sirve como control de la presencia de ADN en la muestra. La amplificación del ADN del paciente se lleva a cabo gracias a que todos los tubos de reacción del kit contienen una pareja de primers que amplifican un fragmento de 892 pb del gen humano CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, gen responsable de la fibrosis quística). Por otro lado, todos los tubos de reacción contienen, también, un plásmido modificado que sirve como control de la reacción de amplificación (control interno de la PCR). Este control interno se amplifica con los mismos primers que el gen CFTR humano, pero el tamaño del amplificado es distinto (1202 pb). Los dos controles

(genómico e interno) se amplifican simultáneamente junto con el VPH en un único tubo de reacción.

DETECCIÓN DEL VPH EN MUESTRAS DE BIOPSIA

Se usaron los kit “Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano: Kit de Extracción, Purificación y Amplificación” y “Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano: Kit de Genotipado” realizándose todos los procedimientos según las normas del fabricante, como se describen a continuación.

Extracción del ADN de la muestra

Preparación previa de los reactivos

- Se preparó la solución B3 añadiendo el tampón B1 al tampón B2. El tampón resultante B3, se almacenó protegido de la luz y a temperatura ambiente.
- Se disolvió la proteinasa K en el tampón PB, alcanzando una concentración de 20 mg/ml. La proteinasa K, una vez disuelta, se conservó a 4°C.
- Se añadió etanol (96-100%) a la solución de lavado (según la cantidad de etanol indicada en el bote de dicha solución).
- Se calentó la solución de elución a 70°C.

Procedimiento de extracción

- Se cortó y se machacó adecuadamente el tejido de la biopsia vesical sobre un portaobjetos estéril.
- El tejido procesado se introdujo en un eppendorf estéril y se añadieron 180 µl de solución de lisis.
- Se mezcló con vórtex.
- Se añadieron 25 µl de proteinasa K a cada muestra.
- Se mezcló con vórtex.
- Cada muestra se incubó a 56°C durante 3 horas con agitación, hasta que la muestra estuvo totalmente lisada.
- Una vez transcurrido el tiempo de lisis, se hizo una centrifugación rápida de las muestras para evitar el agua de condensación en la tapa.
- Se añadieron 200 µl de solución B3 a cada muestra.
- Se mezcló en vórtex
- Las muestras se incubaron a 70°C durante 10 minutos sin agitación.
- Se volvió a hacer una centrifugación rápida de las muestras para evitar el agua de condensación en la tapa.
- Se añadieron 210 µl de etanol al 96% a cada muestra y se agitó en vórtex.
- Se preparó una columna de purificación por muestra, se identificó correctamente y se colocó en un tubo de recogida de 2 ml.

- Se añadió la muestra a la columna correspondiente. Se centrifugó durante 1 minuto a 12.000 g.
- Se descartó el fluido filtrado y se volvió a poner la columna en su tubo de recogida.
- Se añadieron 500 µl de la solución de lavado a la columna. Se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto.
- Se descartó el fluido filtrado y se volvió a poner la columna en su tubo de recogida.
- Se añadieron 600 µl de solución de lavado a la columna. Se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto.
- Se volvió a centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto para eliminar cualquier resto de la solución de lavado.
- Se colocó la columna en un tubo limpio de tipo eppendorf. Se eluyó el ADN con 50 µl de la solución de elución, previamente calentada a 70°C. Se incubó esta solución caliente en la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto.
- Se recuperó el filtrado en un eppendorf y se congeló a -20°C.

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) (Mullis y cols., 1986) es una técnica que permite la

amplificación de un fragmento de ADN específico mediante síntesis enzimática *in vitro* a partir de mínimas cantidades de material de partida. La técnica copia la doble cadena de ADN consiguiendo, por repetición del proceso, una amplificación exponencial del material genético. Usa dos oligonucleótidos sintéticos (complementarios a los extremos de la secuencia diana y en sentido antiparalelo uno respecto a otro) como cebadores o iniciadores (primers) de una reacción de replicación catalizada por una ADN polimerasa termoestable. La amplificación es el resultado de la repetición de una serie de ciclos compuestos de tres fases: desnaturalización (ruptura, mediante la aplicación de temperatura elevada seguida de un enfriamiento rápido, de los puentes de hidrógeno que mantienen la doble cadena de ADN dando lugar a dos cadenas sencillas sobre las cuales pueda actuar la ADN polimerasa), hibridación (se hace descender la temperatura para que los primers puedan unirse específicamente a las secuencias complementarias en el ADN diana) y elongación (la Taq-ADN polimerasa utiliza los dNTP presentes en el medio para sintetizar la cadena complementaria a partir del cebador hibridado con su secuencia diana en sentido 5' a 3'). Antes de comenzar los ciclos se programa una fase de desnaturalización inicial larga con el fin de asegurar que todo el ADN (fragmento diana y primers) quede en forma monocatenaria, y después del último ciclo de PCR se suele realizar

una elongación final prolongada con el fin de terminar todas las elongaciones parciales en curso.

Las nuevas cadenas de ADN, producidas en cada ciclo, sirven de molde en el ciclo siguiente, por lo que la repetición de un ciclo de PCR produce una amplificación exponencial del material de partida igual a 2^n , siendo “n” el número de ciclos realizados.

Una vez finalizada la PCR la detección del producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN se separan según su tamaño. El gel se tiñe con bromuro de etidio, que se une al ADN de cadena doble de forma inespecífica y se visualiza con luz ultravioleta.

El kit Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano está diseñado para realizar la amplificación de un fragmento de la región L1 del VPH mediante una PCR múltiple.

Éstas son reacciones en las que en un único tubo de reacción se pueden amplificar simultáneamente distintas secuencias específicas, lo cual implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de los demás. En el caso de los primers y el programa de temperaturas utilizado es necesario tener en cuenta varias premisas: escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen oligómeros; que tengan temperaturas de anillamiento

similares; que cada pareja amplifique una única secuencia diana, y que generen amplicones de tamaño suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth, 2004).

El kit de amplificación ya posee tubos convenientemente preparados con la concentración adecuada de sales, nucleótidos, primers y ADN polimerasa necesarios para que se den las condiciones idóneas de la PCR. Sólo es necesario añadir el ADN de la muestra que se desee amplificar (en un volumen de 5 µl). El volumen de este tubo de reacción es de 45 µl, por lo que la PCR se realiza en un volumen final de 50 µl.

Cada tubo de reacción contiene un plásmido modificado que se usa como control interno, los primers necesarios para la amplificación de dicho plásmido y del ADN humano (son los mismos), así como aquellos que son necesarios para amplificar un fragmento de 450 pb de la región L1 del virus, considerando todas las variaciones genéticas que correspondan a cada genotipo. Todos estos primers se encuentran marcados con biotina.

Para la amplificación del ADN se siguió el siguiente procedimiento:

- Se descongeló el extraído de cada muestra y se mantuvo en hielo durante todo el procedimiento.

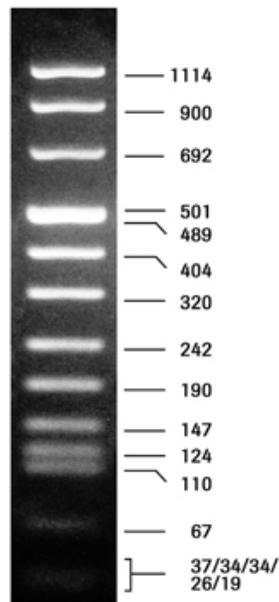
- Se descongeló un tubo de reacción por cada muestra a estudiar y se mantuvo en hielo.
- Se centrifugaron unos segundos los tubos de reacción para que todo el líquido quedase en el fondo del tubo.
- Se añadieron 5 μ l del extraído a los tubos de reacción y se resuspendieron varias veces con la micropipeta.
- Las condiciones empleadas en el termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) fueron las siguientes:
 - 95°C 9 minutos (desnaturalización inicial)
 - 45 ciclos de:
 - 94°C 0,5 minutos (desnaturalización)
 - 55°C 1 minuto (hibridación)
 - 72°C 1,5 minuto (elongación)
 - 72°C 8 minutos (elongación final prolongada)

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron geles de agarosa al 2% en un tampón de Tris-Borato-EDTA 0,5x (Tris 0,1 M; ácido bórico 0,08 M; EDTA 0,1 mM) con bromuro de etidio y en ellos se depositaron las muestras, tras lo cual el gel se sometió a electroforesis a 90 V durante 30 minutos y se visualizó mediante luz ultravioleta.

Se utilizó como marcador de peso molecular el marcador VIII de Roche (Roche Diagnostics, España) (figura 9), que permite diferenciar las tres bandas que se podrían detectar: 450, 892 y 1202 pb.

Figura 8: Marcador de peso molecular VIII de Roche



Lectura del producto amplificado mediante tecnología AT

Dilución de la solución de lavado

Para cada 24 muestras, se añadieron 3 ml de solución TL (tampón de lavado) a 27 ml de agua destilada.

Desnaturalización

Previa a la hibridación mediante el AT, los productos de amplificación se desnaturalizaron a 95°C durante 10 minutos. Tras este

periodo los tubos se colocaron inmediatamente en un recipiente con hielo.

Prelavado del tubo AT

Se añadieron 300 µl de tampón de lavado diluido a cada AT y se invirtió el tubo 4 ó 5 veces. Se desechó la solución TL con vacío. Este paso fue necesario para lavar los tubos antes de añadir la muestra y se debe dejar el tubo sin restos de la solución de lavado.

Hibridación

Se añadieron 100 µl de solución de hibridación (SH) a cada tubo AT. Se añadieron también 5 µl del producto de PCR desnaturalizado al tubo AT y se resuspendieron varias veces para mezclarlos con la solución SH, con cuidado de no tocar el cristal. Se incubaron en agitación en termobloque durante 1 hora a 55°C y a 25 g. Tras esta incubación se desechó la solución SH con vacío.

Lavado

Se añadieron 300 µl de tampón de lavado diluido a cada tubo AT y se invirtieron los tubos de 5 a 10 veces. Se desechó la solución TL con vacío.

Conjugado

Se centrifugó la solución de conjugado (CJ) durante 10 segundos antes de usarla. A continuación se diluyó la solución CJ mezclando en un tubo 100 μ l de diluyente del conjugado (DC) y 0,75 μ l de solución CJ por cada AT.

Se añadieron al tubo AT 100 μ l de solución CJ diluida, que contiene la enzima estreptavidina-peroxidasa. Se incubó en agitación durante 15 minutos a 30°C y a 550 rpm. Tras esta incubación, se desechó la solución del tubo AT con vacío, rápidamente.

Lavado

Se realizaron dos lavados consecutivos, añadiendo, en cada uno de ellos 300 μ l de tampón de lavado diluido a cada tubo AT y se invirtieron los tubos de 5 a 10 veces. Se desechó la solución TL diluida con vacío.

Es importante que no queden restos de solución CJ ya que ésta reaccionaría con la solución de revelado (RE) dando lugar a una señal inespecífica.

Revelado

Tras eliminar todo el tampón de lavado, se añadieron 100 μ l de solución RE, que contiene el sustrato TMB, al tubo AT y se incubaron 10

minutos a 25°C, sin agitación. Se realizó este paso de forma seriada con todos los tubos AT.

Lectura de resultados

Una vez finalizado el proceso de hibridación se realizó la lectura automatizada del microarray. El equipo de lectura y análisis (figura 10) presentó un informe en el que se indicaron los resultados.

Figura 10: Lector de AT



Tras la lectura, se obtuvo una imagen del microarray (figura 11), que fue interpretada por el propio equipo.

Figura 11: Visualización del microarray



La imagen obtenida responde al siguiente patrón de impresión de sondas sobre el microarray:

R	70	71	72	73	81	82	83	84	85	89	R
51	52	53	54	56	58	59	61	62	66	68	
R	18	26	31	33	35	39	40	42	43	44	45
	81	82	83	84	85	89	CI	ADN	6	11	16
54	56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73
31	33	35	39	40	42	43	44	45	51	52	53
82	83	84	85	89	CI	ADN	6	11	16	18	26
56	58	59	61	62	66	68	70	71	72	73	81
	39	40	42	43	44	45	51	52	53	54	
R	CI	ADN	6	11	16	18	26	31	33	35	R

R: Control de revelado. En estas posiciones hay colocadas sondas con biotina, por tanto, siempre que el revelado se realice correctamente, estas localizaciones se revelan. Esto permite conocer adecuadamente cómo se ha situado el array en la lectura. No detecta ningún producto de PCR
CI: Sondas para la detección del control interno de la PCR (1202 pb)
ADN: Sondas para la detección del ADN genómico de la muestra (892 pb)
En blanco: No hay sonda impresa
Como se observa, todos los genotipos van por triplicado

Según este patrón, en la figura 11 sólo se detectaría la presencia del control interno y del control de ADN genómico (además de los cinco controles de revelado). No hay señal positiva para ningún genotipo de VPH.

Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se realiza a través de un software. La valoración de positividad por parte de este software viene

dada por la intensidad de la señal emitida en la zona donde está la sonda, en relación con el ruido de fondo que existe en el área local a esa sonda, y en toda la placa en general.

El equipo proporcionó una interpretación de los resultados obtenidos. Para ello generó una tabla en la que, además de los datos de identificación de la muestra, aparecen tres columnas (figura 12): en la columna de la izquierda aparecen los genotipos de VPH que el sistema puede detectar; en la del centro, si la detección en esa muestra ha sido positiva o negativa para cada genotipo, y en la columna de la derecha aparece la conformidad de los controles de ADN y de amplificación.

Figura 12: Interpretación de los resultados

RESULTADOS	
RESULTADOS Análisis de Virus de Papiloma	
Referencia del Análisis:	1
Código AT:	118610430040204
Tipo de Análisis:	tmb a punto final
Fecha y Hora:	2006-01-03 16:33

Virus		
Virus	Resultado	Controles
Tipo 6	Negativo	Conforme
Tipo 11	POSITIVO	Conforme
Tipo 16	Negativo	Conforme
Tipo 18	POSITIVO	Conforme
Tipo 26	Negativo	Conforme
Tipo 31	Negativo	Conforme

Las posibilidades quedan reflejadas en la tabla 6.

Tabla 6: Interpretación de resultados

Genotipo	Control interno	ADN genómico	Comentario
Positivo	Positivo	Positivo	1
Positivo	Positivo	Negativo	2
Positivo	Negativo	Positivo	3
Positivo	Negativo	Negativo	4
Negativo	Positivo	Positivo	5
Negativo	Positivo	Negativo	6
Negativo	Negativo	Positivo	7
Negativo	Negativo	Negativo	8

- Comentario 1: La PCR ha funcionado correctamente y se ha detectado el genotipo correspondiente.
- Comentario 2: La PCR ha funcionado correctamente y se ha detectado el genotipo correspondiente. La extracción también ha sido correcta puesto que se ha detectado el ADN del virus.
- Comentario 3: La PCR ha funcionado correctamente y se ha detectado el genotipo correspondiente. No se detecta el control interno pero hay ADN de la extracción.
- Comentario 4: La PCR ha funcionado correctamente y se ha detectado el genotipo correspondiente. Sabemos que hay ADN de la muestra porque hay ADN del virus. En cualquier caso, descartar contaminación.
- Comentario 5. La PCR ha funcionado correctamente pero no se ha detectado ADN vírico.

- Comentario 6: La PCR ha funcionado correctamente pero no se ha detectado ADN genómico ni del virus. Puede que no se haya hecho correctamente la extracción.
- Comentario 7: La PCR ha funcionado correctamente puesto que ha detectado ADN genómico, pero no se ha detectado ADN del virus. La extracción ha sido correcta.
- Comentario 8: No hay ningún tipo de ADN en la muestra o la PCR está inhibida.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usó la prueba T de Student para comparar los casos frente a los controles en cuanto a la edad media de los pacientes, y para establecer la relación entre la edad y la infección por VPH en ambos grupos.

Se utilizó la prueba Chi cuadrado de Pearson para establecer las siguientes relaciones:

- Entre los casos:
 - ✓ Antecedente de tabaquismo e infección por VPH
 - ✓ Antecedente de consumo de alcohol e infección por VPH
 - ✓ Estadio tumoral e infección por VPH
 - ✓ Grado histológico e infección por VPH
 - ✓ Tamaño del tumor e infección por VPH
 - ✓ Número de lesiones tumorales e infección por VPH

- ✓ Categoría del tumor e infección por VPH
- ✓ Estadio tumoral y antecedentes de tabaquismo
- ✓ Estadio tumoral y antecedentes de consumo de alcohol
- ✓ Grado histológico y antecedentes de tabaquismo
- ✓ Grado histológico y antecedentes de consumo de alcohol
- ✓ Tamaño tumoral y antecedentes de tabaquismo
- ✓ Tamaño tumoral y antecedentes de consumo de alcohol
- Entre los controles:
 - ✓ Antecedente de tabaquismo e infección por VPH
 - ✓ Antecedente de consumo de alcohol e infección por VPH
- Comparación entre casos y controles:
 - ✓ Relación entre infección por VPH y grupo al que se pertenece
 - ✓ Relación entre la distribución de genotipos y grupo al que se pertenece
 - ✓ Relación entre antecedentes de tabaquismo y grupo al que se pertenece
 - ✓ Relación entre antecedentes de consumo alcohólico y grupo al que se pertenece

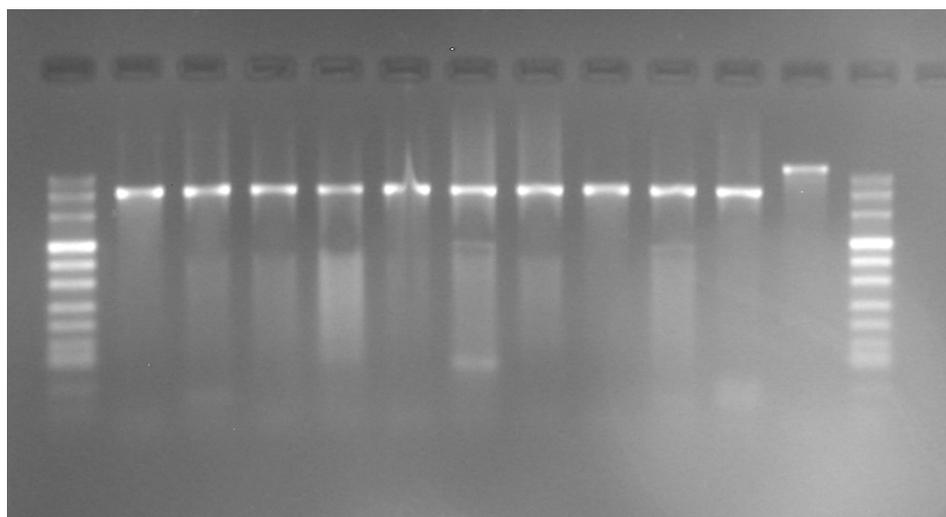
Cuando no se cumplieron los criterios de validez de la prueba Chi cuadrado de Pearson (tamaño muestral inferior a 50 o menos del 20% de las casillas con una frecuencia esperada inferior a 5), se usó el test exacto de Fisher para tablas 2x2.

RESULTADOS

DETECCIÓN DEL VPH TRAS VISUALIZACIÓN EN GEL

Tras la amplificación de todas las muestras (casos y controles) y, posteriormente, la visualización mediante electroforesis en gel de agarosa, se obtuvieron los resultados reflejados en las figuras 13 a 18. En todas las muestras se amplificó el ADN genómico (banda de 892 pb), a excepción de la muestra 14, donde, sin embargo, sí amplificó correctamente el control interno. En las muestras 6, 9, 14, 53 y 60 también se observó una banda de 450 pb.

Figura 13: Muestras 1 a 10



De izquierda a derecha:

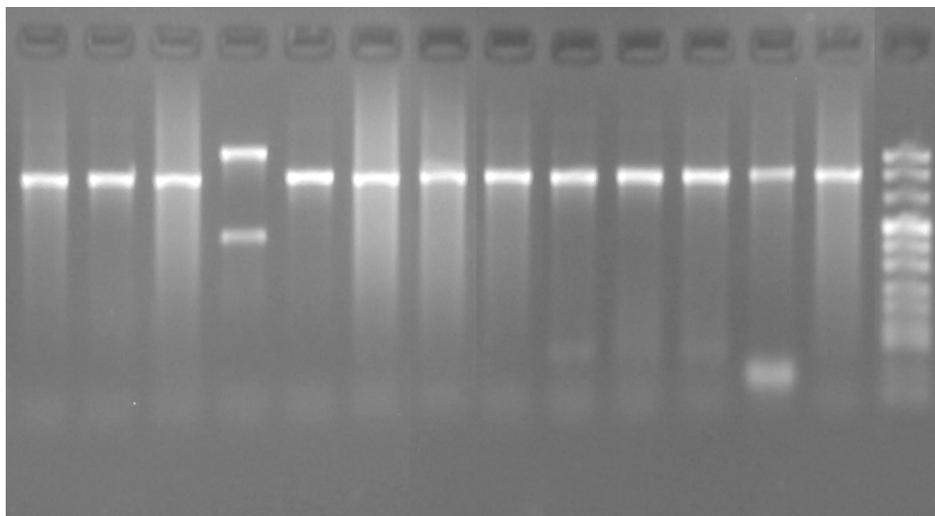
Marcador PM

Muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10

Control negativo (agua): Sólo amplifica el control interno de la PCR

Marcador PM

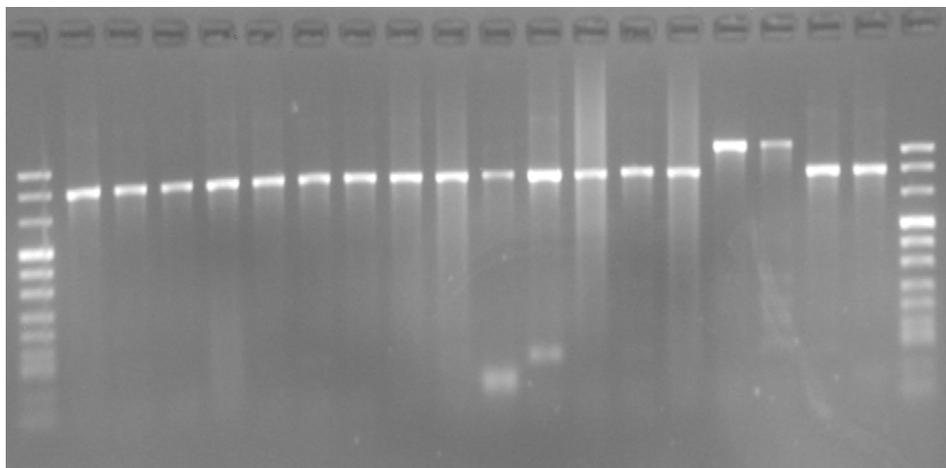
Figura 14: Muestras 11 a 23



De izquierda a derecha:

Muestras 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, y 23
Marcador PM

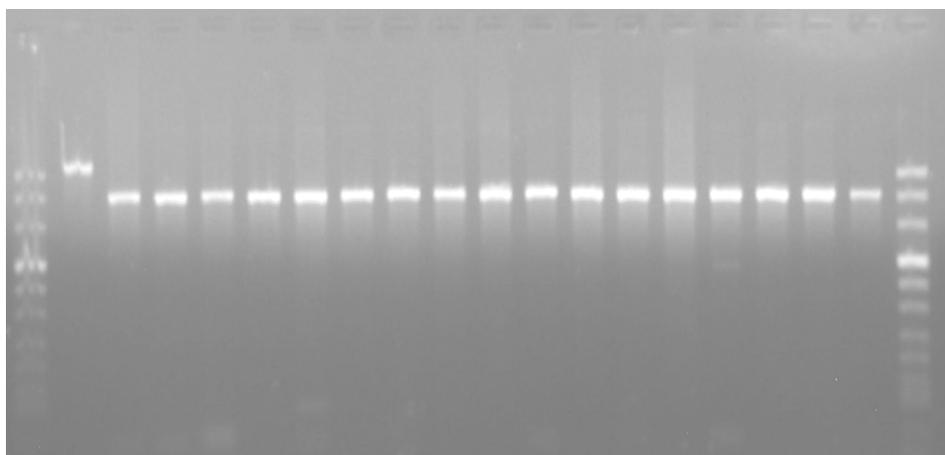
Figura 15: Muestras 24 a 39



De izquierda a derecha:

Marcador PM
Muestras 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37
Dos controles negativos (agua): Sólo amplifica el control interno de la PCR
Muestras 38 y 39
Marcador PM

Figura 16: Muestras 40 a 56



De izquierda a derecha:

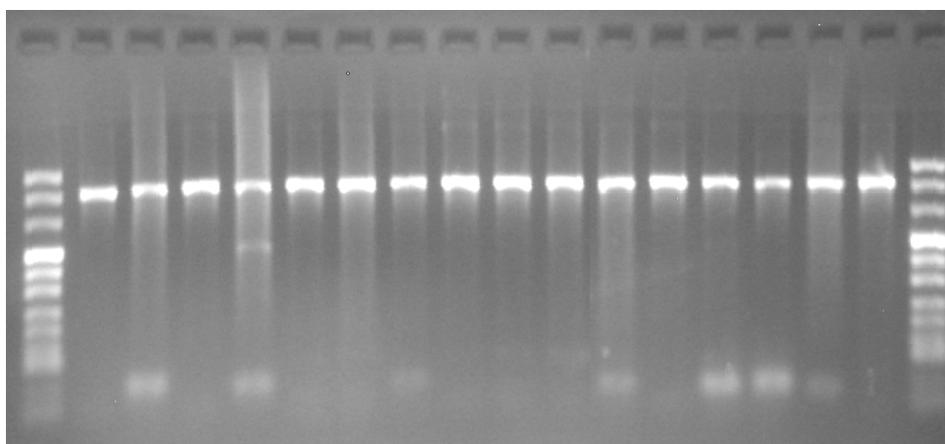
Marcador PM

Control negativo (agua): Sólo amplifica el control interno de la PCR

Muestras 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56

Marcador PM

Figura 17: Muestras 57 a 72



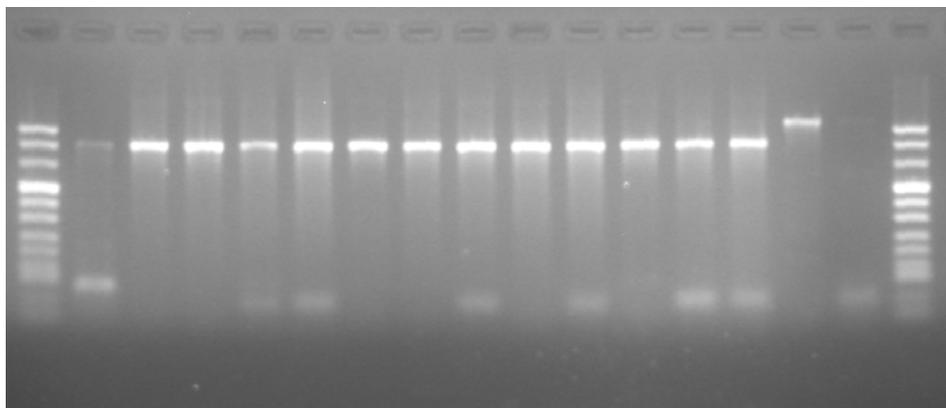
De izquierda a derecha:

Marcador PM

Muestras 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72

Marcador PM

Figura 18: Muestras 73 a 85



De izquierda a derecha:

Marcador PM

Muestras 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 y 85

Dos controles negativos (agua): Sólo amplifica el control interno de la PCR

Marcador PM

DETECCIÓN DEL VPH EN EL ARRAY EN TUBO

Tras la visualización del gel, a cada muestra se le realizó el proceso de hibridación específica mediante la tecnología de array en tubo, con la finalidad de detectar la presencia del VPH y los genotipos presentes. Los resultados obtenidos por esta técnica, en los casos y controles, aparecen en la tabla 7.

Tabla 7: Genotipos detectados mediante array en tubo

Muestra	Tipo	Genotipos							
		16	35	39	51	52	58	61	82
1	Caso								
2	Caso								
3	Caso								
4	Caso								
5	Caso								+
6	Caso	+							
7	Caso								
8	Caso					+			
9	Caso							+	+
10	Caso								+
11	Caso								
12	Control								
13	Caso								
14	Control								+
15	Caso	+							
16	Caso								
17	Caso								+
18	Caso								
19	Caso								
20	Caso	+							
21	Caso						+		
22	Caso					+			
23	Caso								
24	Caso								
25	Caso								
26	Caso								
27	Caso								
28	Caso	+							
29	Control				+				
30	Caso								
31	Caso								
32	Control								
33	Caso								
34	Caso								
35	Caso								
36	Caso								
37	Caso						+		
38	Caso								
39	Control								

Tabla 7: Continuación

Muestra	Tipo	Genotipos							
		16	35	39	51	52	58	61	82
40	Control	+							
41	Control	+							
42	Control	+							
43	Control								
44	Control								
45	Control								
46	Control								+
47	Control								
48	Control								
49	Control								
50	Control								
51	Control								
52	Control								
53	Control	+	+						
54	Control								
55	Control								
56	Control				+				
57	Control								
58	Control								
59	Control								
60	Control		+						+
61	Control								
62	Control								
63	Control								
64	Control								
65	Control								
66	Control								+
67	Control								
68	Control								
69	Control								+
70	Control			+					+
71	Control								
72	Control								
73	Control								
74	Control								
75	Control					+			
76	Control								
77	Control								
78	Control								
79	Control								
80	Control								
81	Control	+							
82	Control								
83	Control								
84	Control								
85	Control								

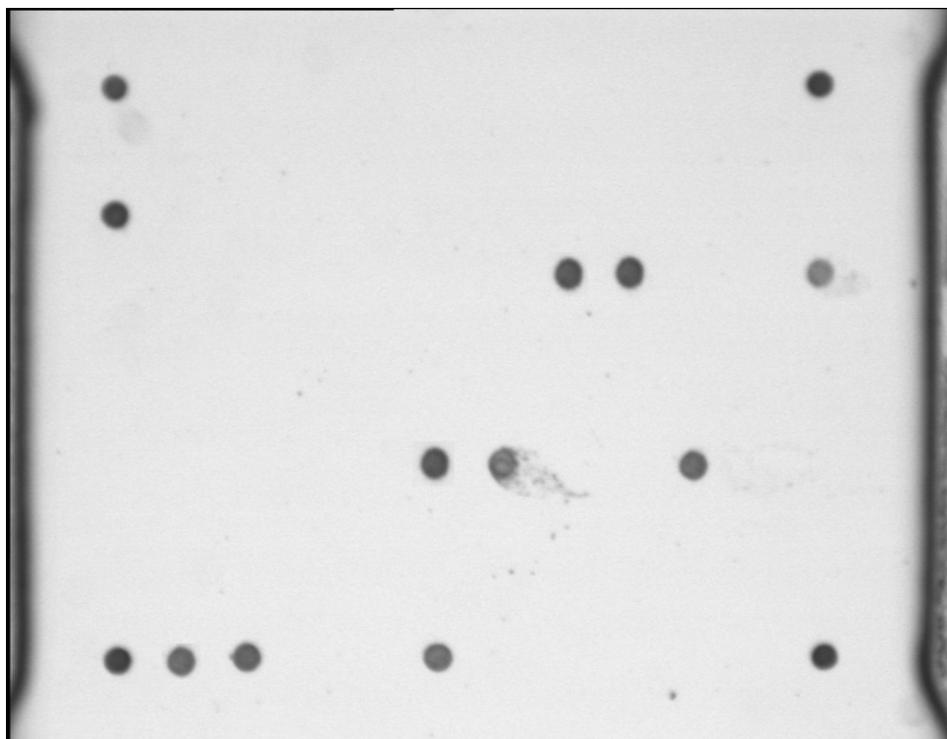
En resumen, hubo 12 casos en los que se detectó el virus (35,29%) (4 con genotipo 16, 2 con genotipo 52, 2 con genotipo 58, 3 con genotipo 82 y 1 con genotipos 61 y 82); y hubo 14 controles positivos (27,45%) (4 con genotipo 16, 2 con genotipo 51, 1 con genotipo 52, 4 con genotipo 82, 1 con genotipos 16 y 35, 1 con genotipos 35 y 82, y 1 con genotipos 39 y 82).

DETECCIÓN DE CADA GENOTIPO

Genotipo 16

En la figura 19 se observa la imagen del array en tubo obtenida por el sistema, y positiva para el genotipo 16.

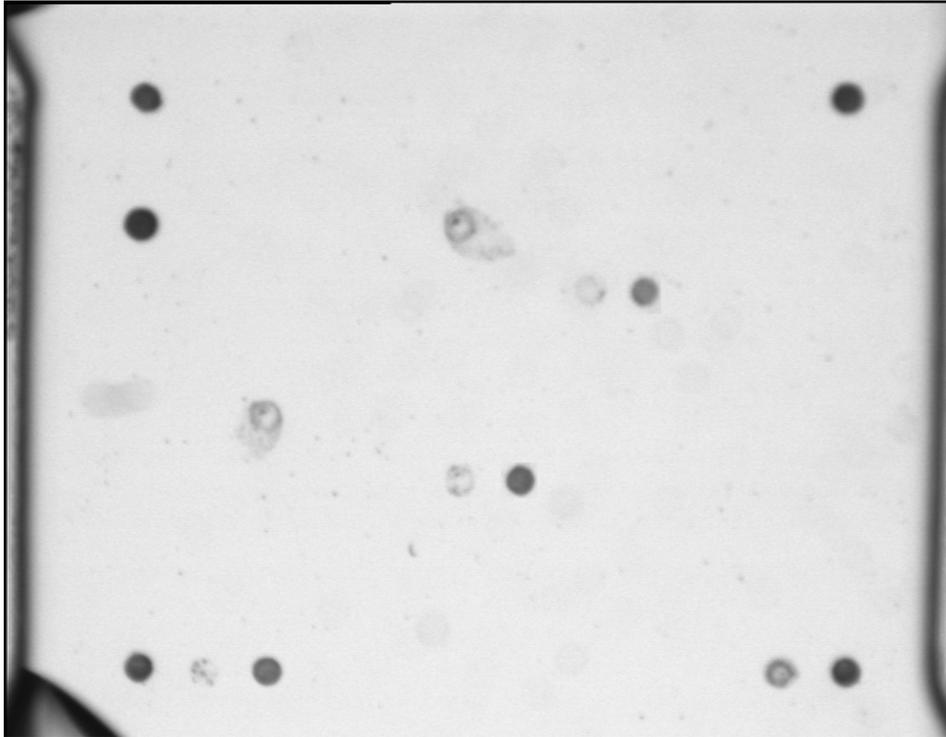
Figura 19: Detección del genotipo 16



Genotipo 35

En la figura 20 se observa la imagen del array en tubo obtenida por el sistema, y positiva para el genotipo 35.

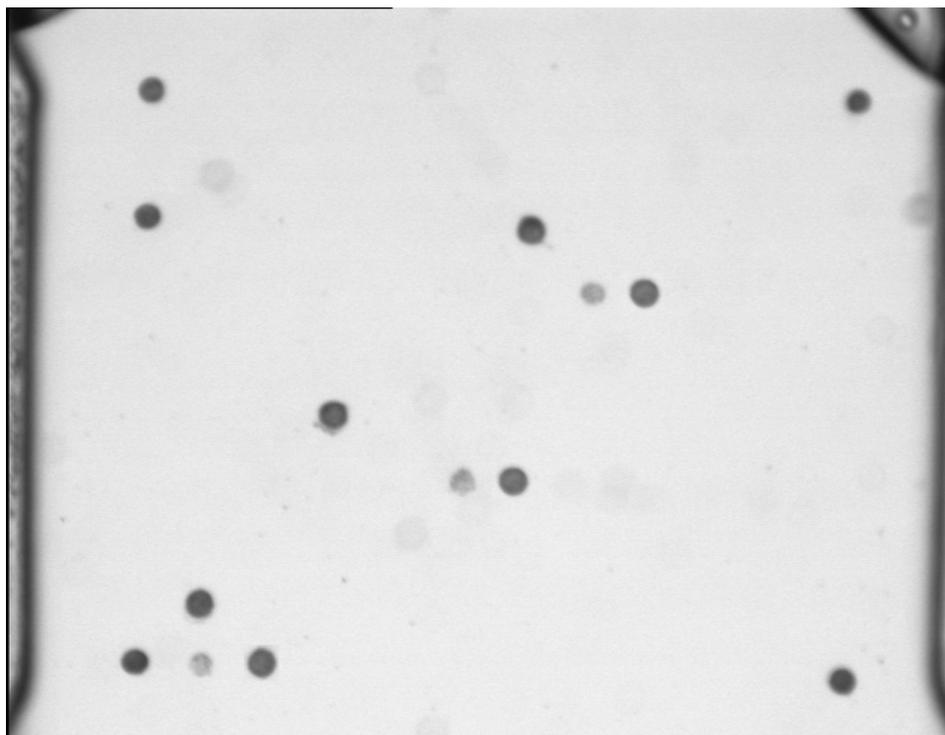
Figura 20: Detección del genotipo 35



Genotipo 39

En la figura 21 se observa la imagen del array en tubo obtenida por el sistema, y positiva para el genotipo 39.

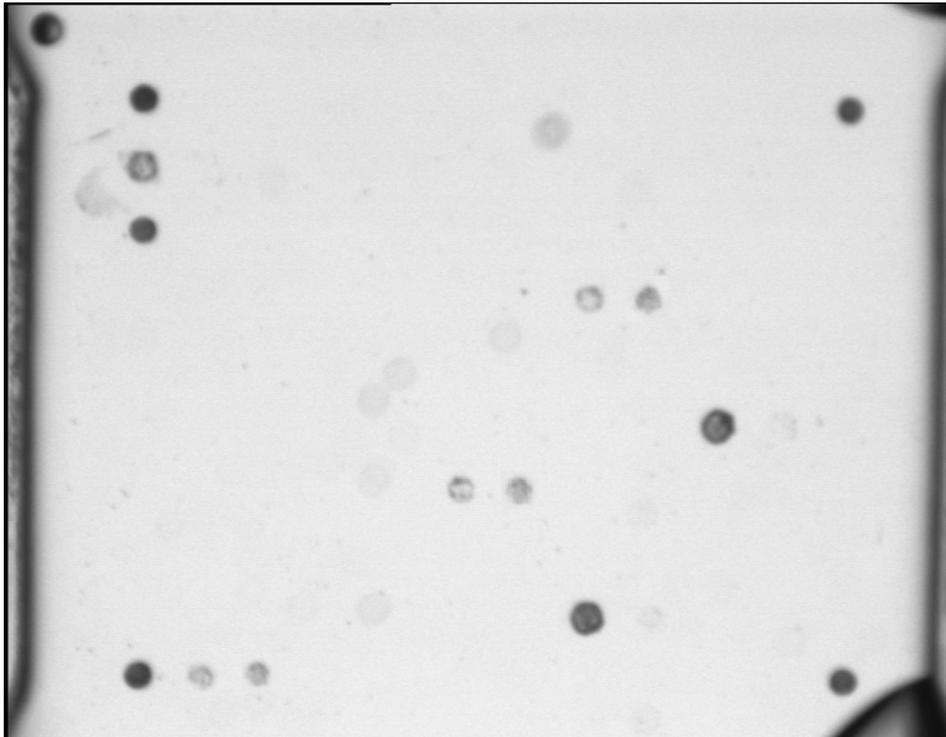
Figura 21: Detección del genotipo 39



Genotipo 51

En la figura 22 se observa la imagen del array en tubo obtenida por el sistema, y positiva para el genotipo 51.

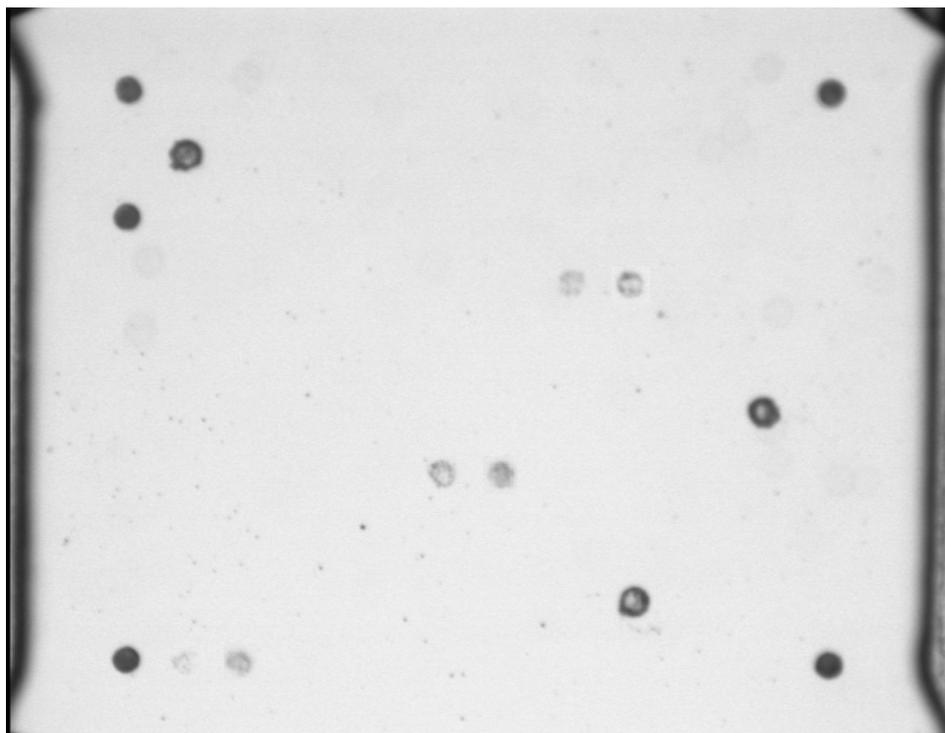
Figura 22: Detección del genotipo 51



Genotipo 52

En la figura 23 se observa la imagen del array en tubo obtenida por el sistema, y positiva para el genotipo 52.

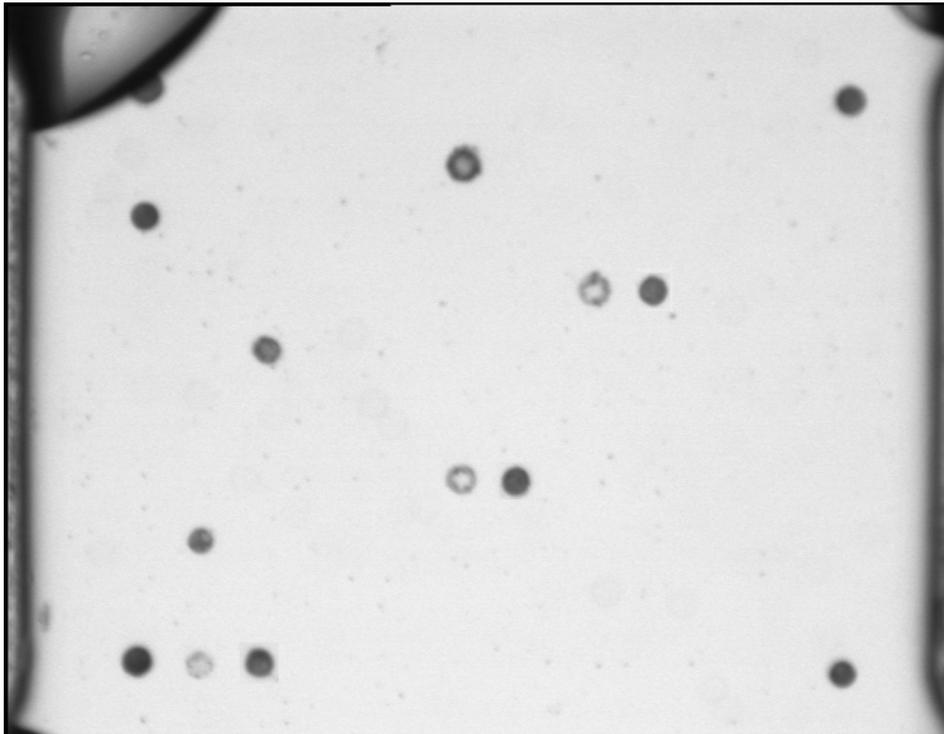
Figura 23: Detección del genotipo 52



Genotipo 58

En la figura 24 se observa la imagen del array en tubo obtenida por el sistema, y positiva para el genotipo 58.

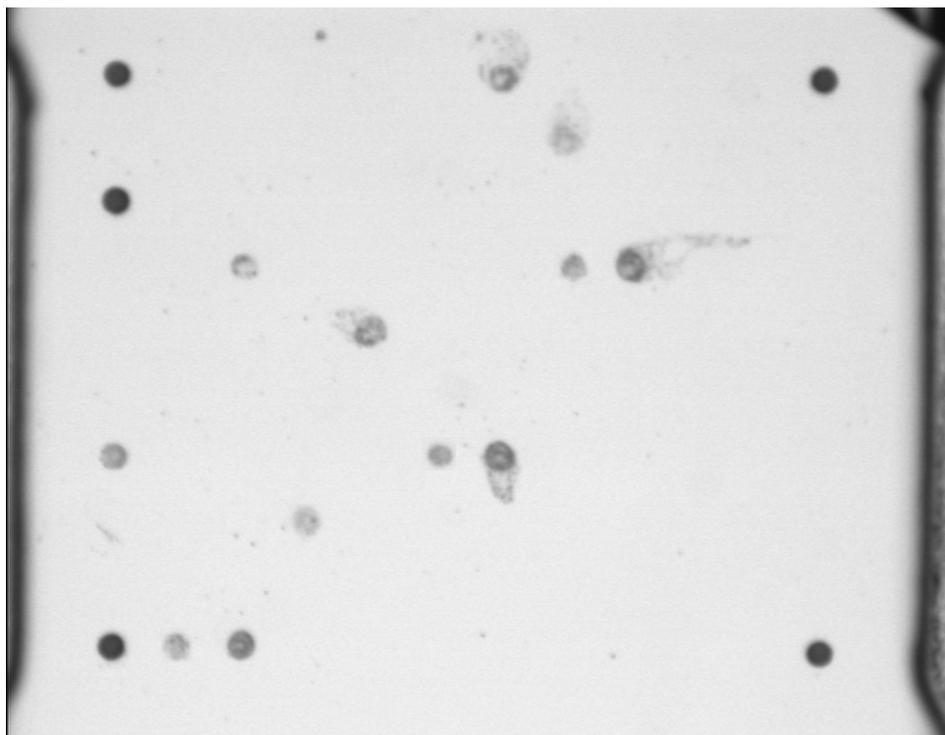
Figura 24: Detección del genotipo 58



Genotipos 61 y 82

En la figura 25 se observa la imagen del array en tubo obtenida por el sistema, y positiva para los genotipos 61 y 82.

Figura 25: Detección de los genotipos 61 y 82



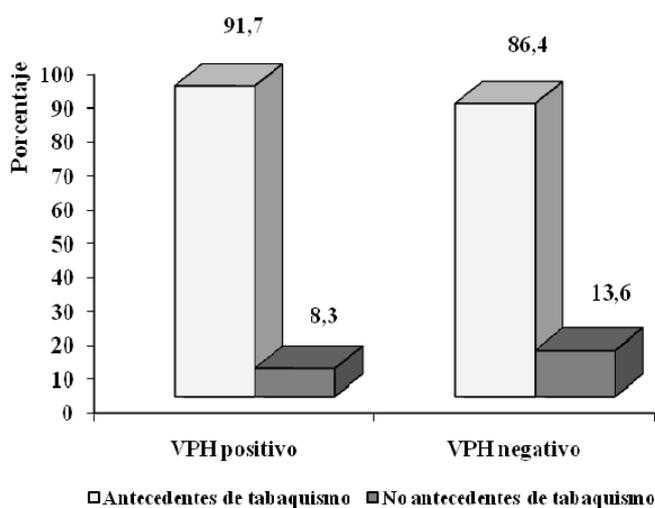
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS CASOS

A continuación se exponen los resultados del análisis estadístico sobre la relación de las distintas variables consideradas en los casos (antecedentes de tabaquismo, antecedentes de consumo de alcohol, edad, estadio tumoral, grado histológico, tamaño del tumor, número de lesiones y categoría), entre sí, y con la infección por VPH.

Relación entre antecedente de tabaquismo e infección por VPH

En la figura 26 se refleja la distribución, entre los casos, de fumadores o ex-fumadores (antecedentes de tabaquismo) frente a no fumadores (no antecedentes de tabaquismo), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 26: Distribución del antecedente de tabaquismo en los casos



La tabla 8 relaciona, en los casos, el antecedente de tabaquismo con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 8: Antecedente de tabaquismo frente a infección por VPH en los casos

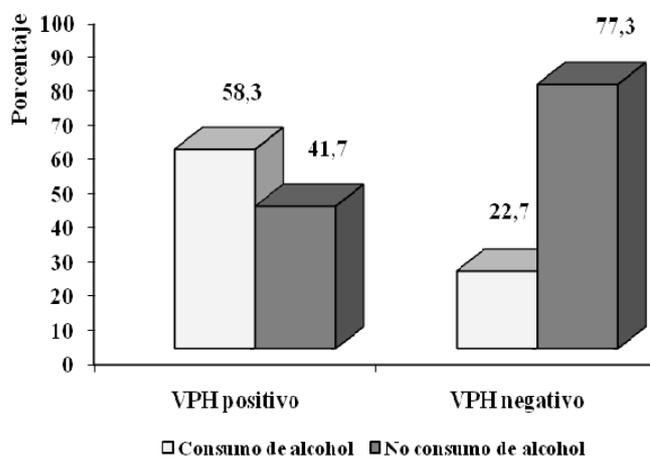
Variables	No fumador	Fumador	Total
VPH +	1	11	12
	8,3%	91,7%	100%
VPH -	3	19	22
	13,6%	86,4%	100%
Total	4	30	34
	11,8%	88,2%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de fumadores o ex-fumadores entre los casos infectados por VPH no fue significativamente distinta que entre los no infectados ($p=0,646$).

Relación entre antecedente de consumo de alcohol e infección por VPH

En la figura 27 se refleja la distribución, entre los casos, de bebedores o ex-bebedores (consumo de alcohol) frente a no bebedores (no consumo de alcohol), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 27: Distribución de consumo de alcohol en los casos



La tabla 9 relaciona, en los casos, el antecedente de consumo de alcohol con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 9: Antecedente de consumo de alcohol frente a infección por VPH en los casos

Variables	No bebedor	Bebedor	Total
VPH +	5	7	12
	41,7%	58,3%	100%
VPH -	17	5	22
	77,3%	22,7%	100%
Total	22	12	34
	64,7%	35,3%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de bebedores o ex-bebedores entre los casos infectados

por VPH fue significativamente mayor que entre los no infectados ($p=0,038$).

Relación entre edad e infección por VPH

La tabla 10 relaciona la edad de los casos con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 10: Edad e infección por VPH

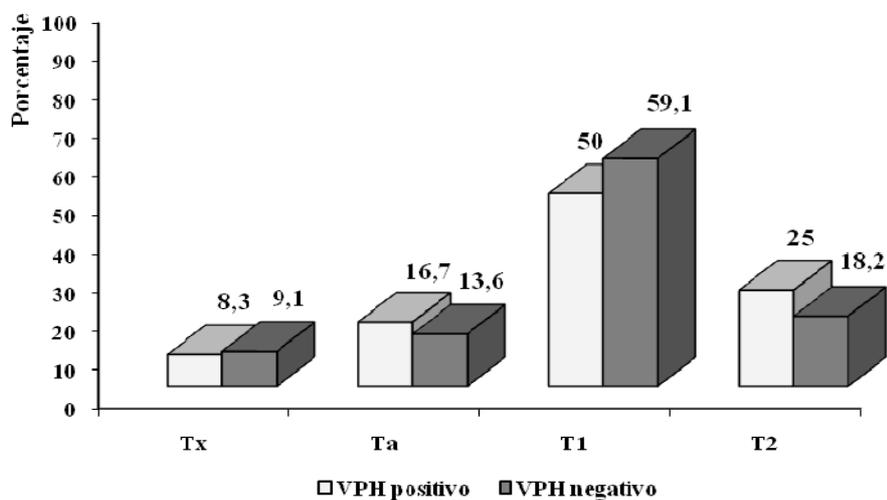
Variables	Media de edad	Desviación típica
VPH +	67,1	13,81
VPH -	65,6	11,16

Tras realizar la prueba T de Student para la igualdad de medias, se comprobó que la edad media de los casos infectados por VPH no fue significativamente distinta a la de los no infectados ($p=0,742$).

Relación entre estadio tumoral e infección por VPH

En la figura 28 se refleja la distribución, entre los casos, del estadio tumoral (Tx, Ta, T1 y T2), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 28: Distribución del estadio tumoral en los casos



La tabla 11 relaciona, en los casos, el estadio tumoral con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 11: Estadio tumoral frente a infección por VPH en los casos

Variables	VPH -	VPH +	Total
Tx	2	1	3
	9,1%	8,3%	8,8%
Ta	3	2	5
	13,6%	16,7%	14,7%
T1	13	6	19
	59,1%	50%	55,9%
T2	4	3	7
	18,2%	25%	20,6%
Total	22	12	34
	100%	100%	100%

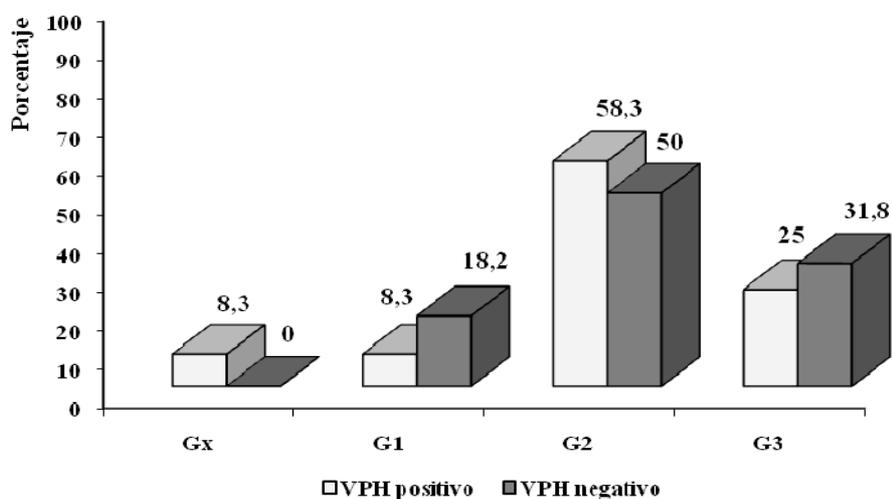
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los estadios tumorales entre los casos infectados por VPH no fue significativamente distinta que entre los no infectados ($p=0,952$).

Como 6 casillas (75%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre grado histológico e infección por VPH

En la figura 29 se refleja la distribución, entre los casos, del grado histológico del tumor (Gx, G1, G2 y G3), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 29: Distribución del grado histológico en los casos



La tabla 12 relaciona, en los casos, el grado histológico del tumor con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 12: Grado histológico frente a infección por VPH en los casos

Variables	VPH -	VPH +	Total
Gx	0	1	1
	0%	8,3%	2,9%
G1	4	1	5
	18,2%	8,3%	14,7%
G2	11	7	18
	50%	58,3%	52,9%
G3	7	3	10
	31,8%	25%	29,4%
Total	22	12	34
	100%	100%	100%

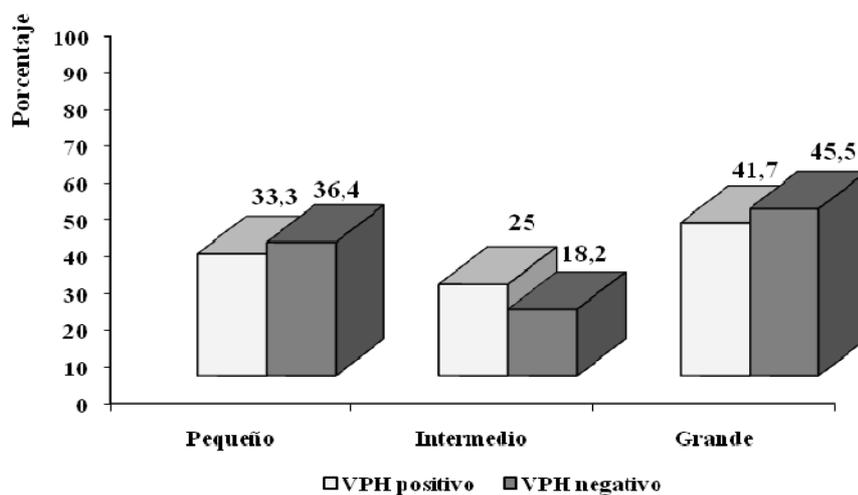
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los grados histológicos entre los casos infectados por VPH no fue significativamente distinta que entre los no infectados ($p=0,463$).

Como 5 casillas (62,5%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre tamaño del tumor e infección por VPH

En la figura 30 se refleja la distribución, entre los casos, del tamaño macroscópico del tumor (pequeño, intermedio y grande), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 30: Distribución del tamaño tumoral en los casos



La tabla 13 relaciona, en los casos, el tamaño del tumor con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 13: Tamaño del tumor frente a infección por VPH

Variables	VPH -	VPH +	Total
Pequeño	8	4	12
	36,4%	33,3%	35,3
Intermedio	4	3	7
	18,2%	25%	20,6
Grande	10	5	15
	45,5%	41,7%	44,1
Total	22	12	34
	100%	100%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los patrones de tamaño entre los casos

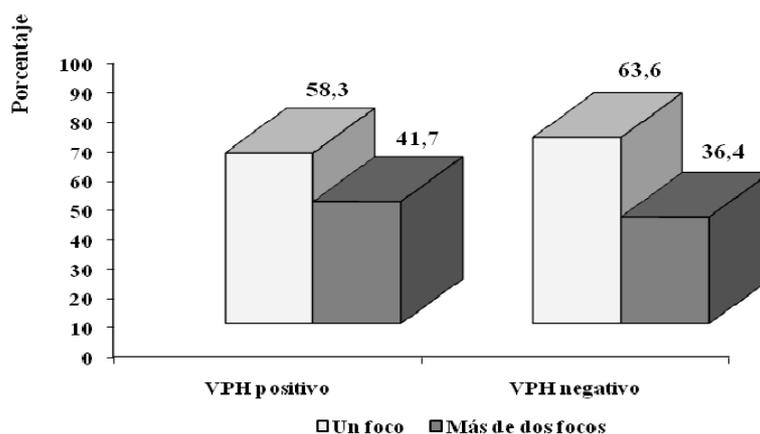
infectados por VPH no fue significativamente distinta que entre los no infectados ($p=0,895$).

Como 3 casillas (50%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre el número de lesiones tumorales e infección por VPH

En la figura 31 se refleja la distribución, entre los casos, del número de lesiones macroscópicas del tumor (presencia de uno o múltiples focos), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 31: Distribución del número de lesiones en los casos



La tabla 14 relaciona, en los casos, el número de lesiones tumorales con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 14: Multiplicidad frente a infección por VPH en los casos

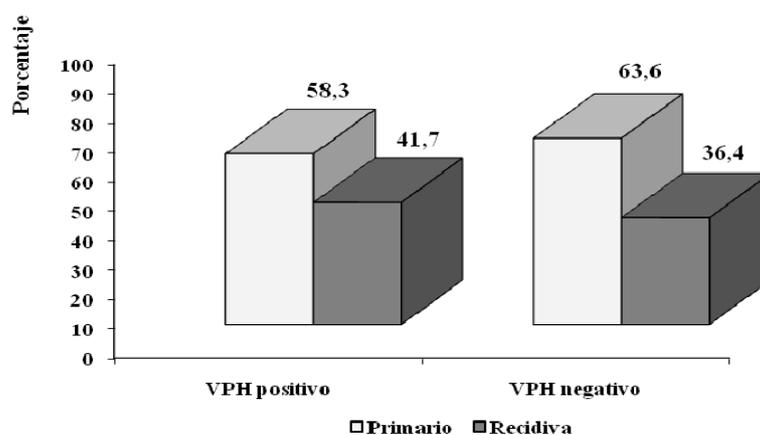
Variables	Lesión única	Lesión múltiple	Total
VPH +	7	5	12
	58,3%	41,7	100%
VPH -	14	8	22
	63,6%	36,4%	100%
Total	21	13	34
	61,8%	38,2%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que el número de localizaciones macroscópicas del tumor entre los casos infectados por VPH no fue significativamente distinto que entre los no infectados ($p=0,761$).

Relación entre categoría del tumor e infección por VPH

En la figura 32 se refleja la distribución, entre los casos, de la categoría del tumor (tumor primario o recidiva tumoral), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 32: Distribución de la categoría del tumor en los casos



La tabla 15 relaciona, en los casos, la categoría del tumor con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 15: Categoría tumoral frente a infección por VPH en los casos

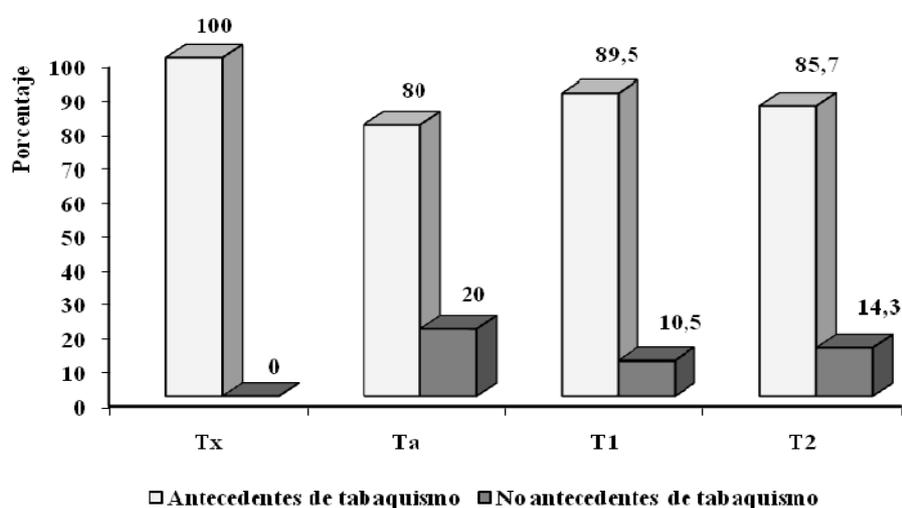
Variables	Primario	Recidiva	Total
VPH +	7	5	12
	58,3%	41,7%	100%
VPH -	14	8	22
	63,6%	36,4%	100%
Total	21	13	34
	61,8%	38,2%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la frecuencia de tumores primarios o recidivas entre los casos infectados por VPH no fue significativamente distinta que entre los no infectados ($p=0,761$).

Relación entre estadio tumoral y antecedentes de tabaquismo

En la figura 33 se refleja la distribución, entre los casos, del estadio tumoral (Tx, Ta, T1 y T2), según presentaron, o no, antecedentes de tabaquismo.

Figura 33: Distribución del estadio tumoral según el antecedente de tabaquismo



La tabla 16 relaciona, en los casos, el estadio del tumor con el antecedente de tabaquismo.

Tabla 16: Estadio tumoral frente a antecedente de tabaquismo en los casos

Variables	No fumador	Fumador	Total
Tx	0	3	3
	0%	100%	100%
Ta	1	4	5
	20%	80%	100%
T1	2	17	19
	10,5%	89,5%	100%
T2	1	6	7
	14,3%	85,7%	100%
Total	4	30	34
	11,8%	88,2%	100%

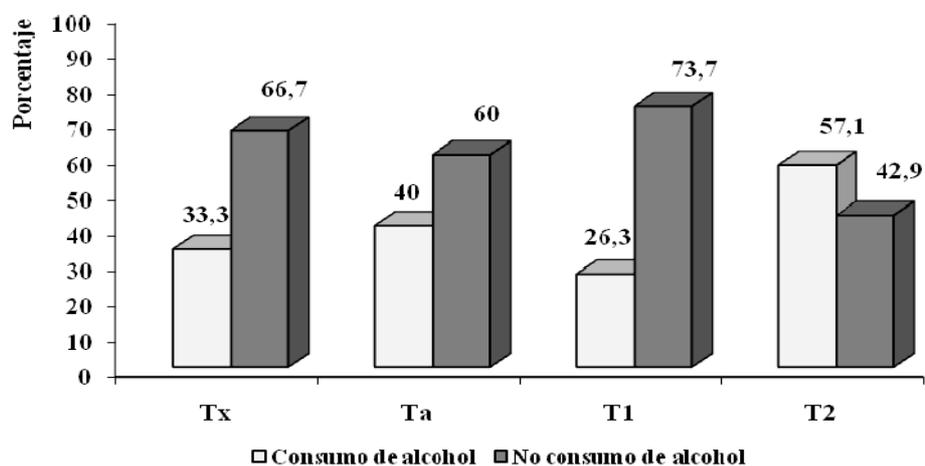
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los estadios tumorales entre los casos con antecedentes de tabaquismo no fue significativamente distinta que entre los que no eran fumadores ($p=0,850$).

Como 6 casillas (75%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre estadio tumoral y antecedentes de consumo de alcohol

En la figura 34 se refleja la distribución, entre los casos, del estadio tumoral (Tx, Ta, T1 y T2), según presentaron, o no, antecedentes de consumo de alcohol.

Figura 34: Distribución del estadio tumoral según el antecedente de consumo de alcohol



La tabla 17 relaciona, en los casos, el estadio del tumor con el antecedente de consumo de alcohol.

Tabla 17: Estadio tumoral frente a antecedente de consumo alcohólico en los casos

Variables	No bebedor	Bebedor	Total
Tx	2	1	3
	66,7%	33,3%	100%
Ta	3	2	5
	60%	40%	100%
T1	14	5	19
	73,7%	26,3%	100%
T2	3	4	7
	42,9%	57,1%	100%
Total	22	12	34
	64,7%	35,3%	100%

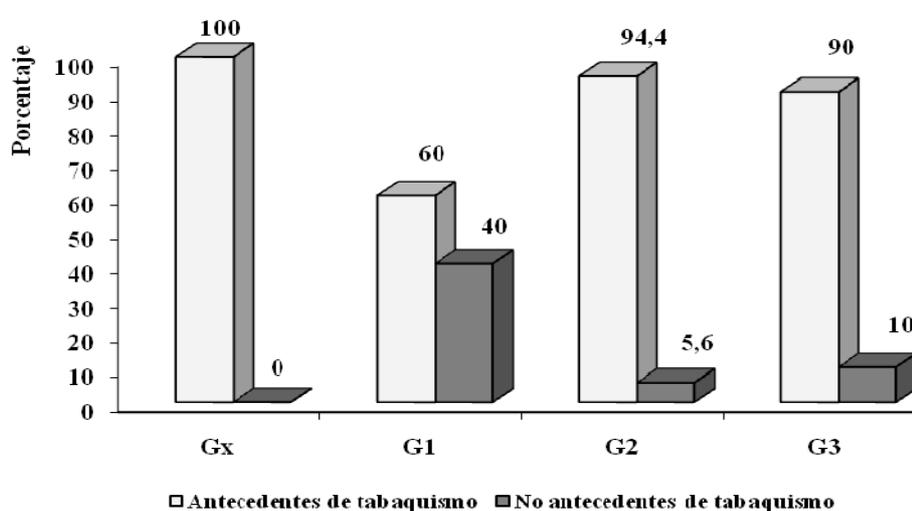
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los estadios tumorales entre los casos con antecedentes de consumo de alcohol no fue significativamente distinta que entre los que no eran consumidores ($p=0,534$).

Como 6 casillas (75%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre grado histológico y antecedentes de tabaquismo

En la figura 35 se refleja la distribución, entre los casos, del grado histológico del tumor (Gx, G1, G2 y G3), según presentaron, o no, antecedentes de tabaquismo.

Figura 35: Distribución del grado histológico según el antecedente de tabaquismo



La tabla 18 relaciona, en los casos, el grado histológico del tumor con el antecedente de tabaquismo.

Tabla 18: Grado histológico frente a antecedente de tabaquismo en los casos

Variables	No fumador	Fumador	Total
Gx	0	1	1
	0%	100%	100%
G1	2	3	5
	40%	60%	100%
G2	1	17	18
	5,6%	94,4%	100%
G3	1	9	10
	10%	90%	100%
Total	4	30	34
	11,8%	88,2%	100%

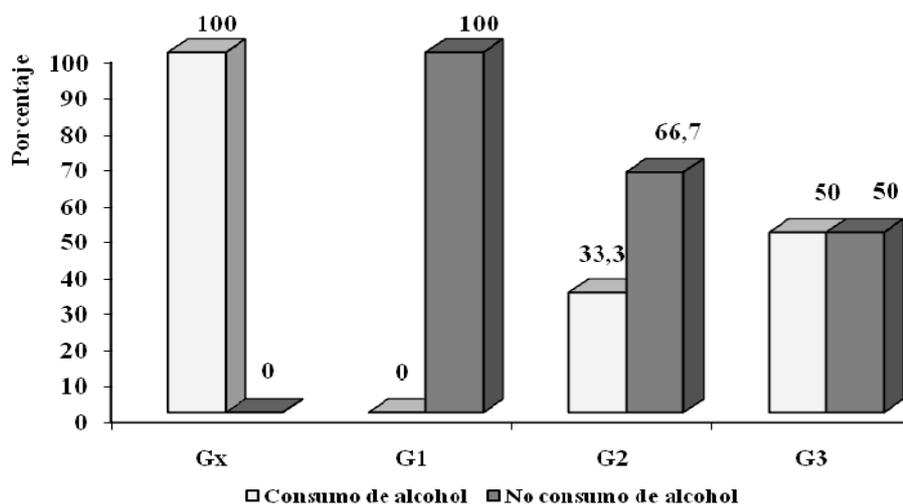
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los grados histológicos entre los casos con antecedentes de tabaquismo no fue significativamente distinta que entre los que no eran fumadores ($p=0,197$).

Como 6 casillas (75%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre grado histológico y antecedentes de consumo de alcohol

En la figura 36 se refleja la distribución, entre los casos, del grado histológico del tumor (Gx, G1, G2 y G3), según presentaron, o no, antecedentes de consumo de alcohol.

Figura 36: Distribución del grado histológico según el antecedente de consumo de alcohol



La tabla 19 relaciona, en los casos, el grado histológico del tumor con el antecedente de consumo de alcohol.

Tabla 19: Grado histológico frente a antecedente de consumo alcohólico en los casos

Variables	No bebedor	Bebedor	Total
Gx	0	1	1
	0%	100%	100%
G1	5	0	5
	100%	0%	100%
G2	12	6	18
	66,7%	33,3%	100%
G3	5	5	10
	50%	50%	100%
Total	22	12	34
	64,7%	35,3%	100%

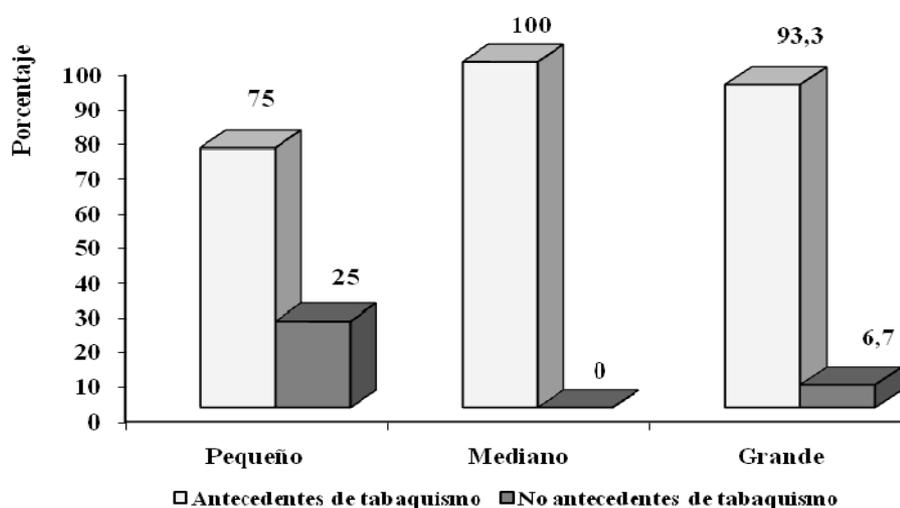
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los grados histológicos entre los casos con antecedentes de consumo de alcohol no fue significativamente distinta que entre los que no eran consumidores ($p=0,136$).

Como 3 casillas (37,5%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre tamaño tumoral y antecedentes de tabaquismo

En la figura 37 se refleja la distribución, entre los casos, del tamaño macroscópico del tumor (pequeño, intermedio y grande), según presentaron, o no, antecedentes de tabaquismo.

Figura 37: Distribución del tamaño tumoral según el antecedente de tabaquismo



La tabla 20 relaciona, en los casos, el tamaño del tumor con el antecedente de tabaquismo.

Tabla 20: Tamaño tumoral frente a antecedente de tabaquismo en los casos

Variables	No fumador	Fumador	Total
Pequeño	3	9	12
	25%	75%	100%
Intermedio	0	7	7
	0%	100%	100%
Grande	1	14	15
	6,7%	93,3%	100%
Total	4	30	34
	11,8%	88,2%	100%

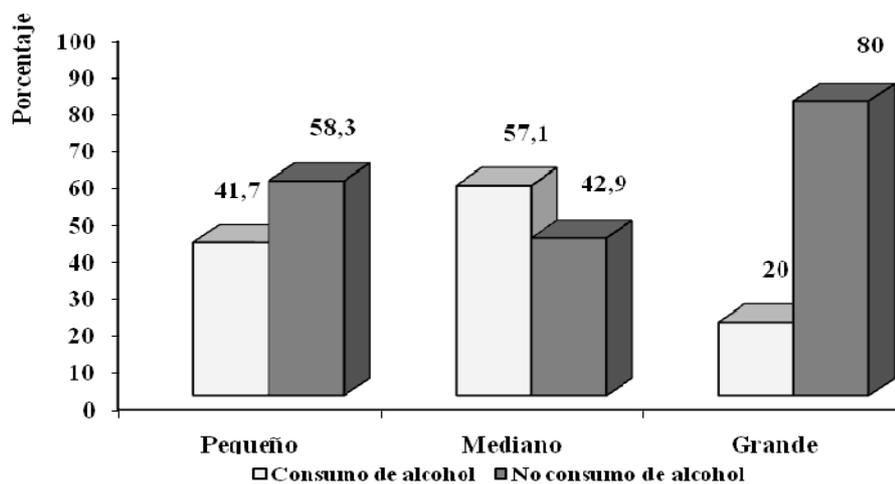
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los tamaños tumorales entre los casos con antecedentes de tabaquismo no fue significativamente distinta que entre los que no eran fumadores ($p=0,189$).

Como 3 casillas (50%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

Relación entre tamaño tumoral y antecedentes de consumo de alcohol

En la figura 38 se refleja la distribución, entre los casos, del tamaño macroscópico del tumor (pequeño, intermedio y grande), según presentaron, o no, antecedentes de consumo de alcohol.

Figura 38: Distribución del tamaño tumoral según el antecedente de consumo de alcohol



La tabla 21 relaciona, en los casos, el tamaño del tumor con el antecedente de consumo de alcohol.

Tabla 21: Tamaño tumoral frente a antecedente de consumo alcohólico en los casos

Variables	No bebedor	Bebedor	Total
Pequeño	7	5	12
	58,3%	41,7%	100%
Intermedio	3	4	7
	42,9%	57,1%	100%
Grande	12	3	15
	80%	20%	100%
Total	22	12	34
	64,7%	35,3%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de cada uno de los tamaños tumorales entre los casos con antecedentes de consumo de alcohol no fue significativamente distinta que entre los que no eran consumidores ($p=0,201$).

Como 3 casillas (50%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p>0,05$).

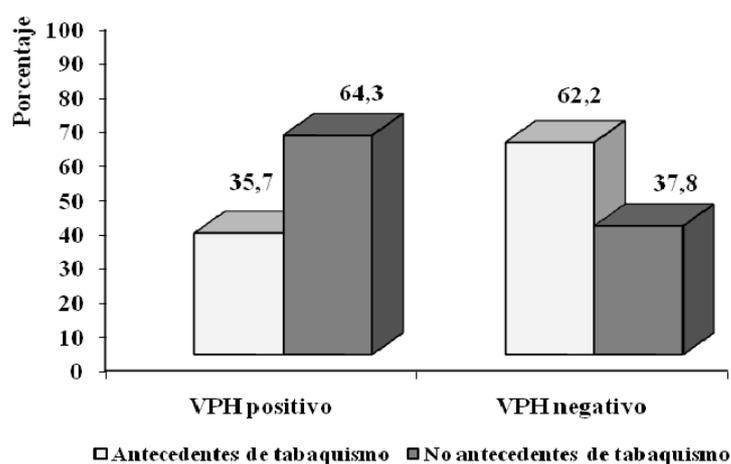
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS CONTROLES

A continuación se expondrán los resultados del análisis estadístico sobre la relación de las distintas variables consideradas en los controles (antecedentes de tabaquismo, antecedentes de consumo de alcohol y edad), y la infección por VPH.

Relación entre antecedente de tabaquismo e infección por VPH

En la figura 39 se refleja la distribución, entre los controles, de fumadores o ex-fumadores (antecedentes de tabaquismo) frente a no fumadores (no antecedentes de tabaquismo), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 39: Distribución del antecedente de tabaquismo en los controles



La tabla 22 relaciona, en los controles, el antecedente de tabaquismo con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 22: Antecedente de tabaquismo frente a infección por VPH en los controles

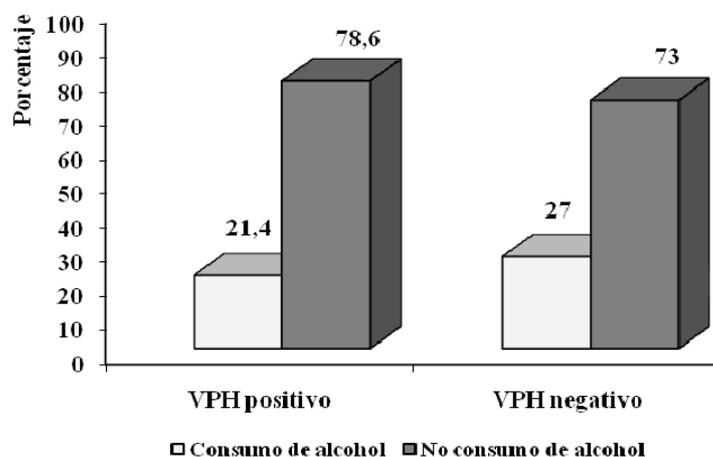
Variables	No fumador	Fumador	Total
HPV +	9	5	14
	64,3%	35,7%	100%
HPV -	14	23	37
	37,8%	62,2%	100%
Total	23	28	51
	45,1%	54,9%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de fumadores o ex-fumadores entre los controles infectados por VPH no fue significativamente distinta que entre los no infectados ($p=0,090$).

Relación entre antecedente de consumo de alcohol e infección por VPH

En la figura 40 se refleja la distribución, entre los controles, de bebedores o ex-bebedores (consumo de alcohol) frente a no bebedores (no consumo de alcohol), según presentaron, o no, infección por VPH.

Figura 40: Distribución de consumo de alcohol en los controles



La tabla 23 relaciona, en los controles, el antecedente de consumo de alcohol con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 23: Antecedente de consumo de alcohol frente a infección por VPH en los controles

Variables	No bebedor	Bebedor	Total
HPV +	11	3	14
	78,6%	21,4%	100%
HPV -	27	10	37
	73%	27%	100%
Total	38	13	51
	74,5%	25,5%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de bebedores o ex-bebedores entre los controles

infectados por VPH no fue significativamente distinta que entre los no infectados ($p=0,682$).

Relación entre edad e infección por VPH

La tabla 24 relaciona la edad de los controles con la presencia o ausencia de infección por VPH.

Tabla 24: Edad e infección por VPH

Variables	Media	Desviación típica
HPV +	70,4	6,21
HPV -	70,1	6,46

Tras realizar la prueba T de Student para la igualdad de medias, se comprobó que la edad media de los controles infectados por VPH no fue significativamente distinta a la de los no infectados ($p=0,853$).

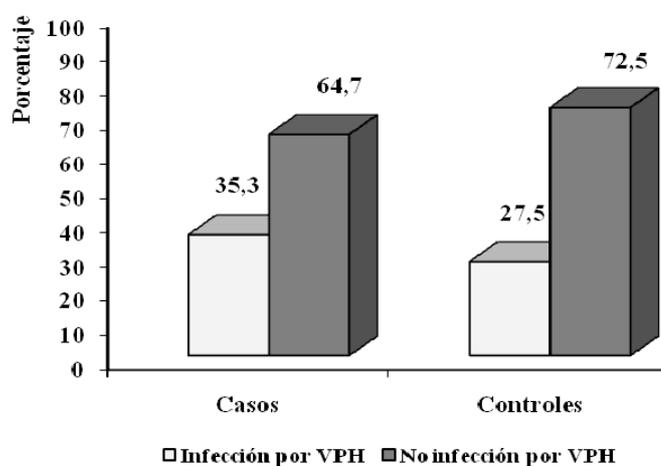
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS CASOS FRENTE A LOS CONTROLES

Por último se expondrán los resultados del análisis estadístico sobre la relación de las distintas variables consideradas (infección por VPH, distribución de genotipos, antecedentes de tabaquismo, antecedentes de consumo de alcohol y edad), y la pertenencia al grupo de casos o controles.

Relación entre infección por VPH y grupo al que se pertenece

En la figura 41 se refleja la distribución de la presencia, o no, de infección por VPH en los casos y controles.

Figura 41: Distribución de la infección por VPH en casos y controles



La tabla 25 relaciona la infección por VPH con la pertenencia al grupo de casos o controles.

Tabla 25: Infección por VPH y pertenencia al grupo

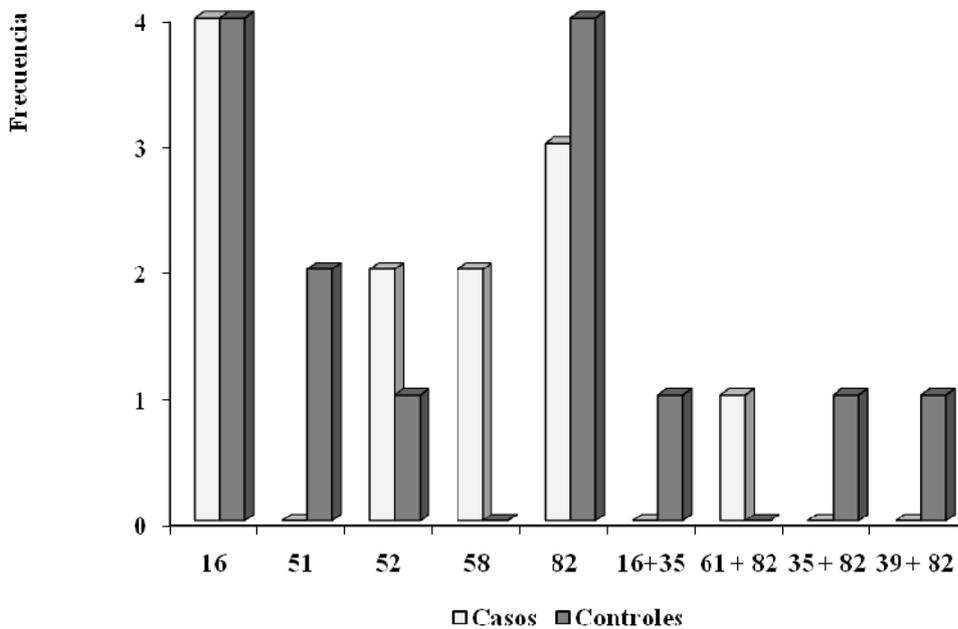
Variables	HPV -	HPV+	Total
Casos	22	12	34
	64,7%	35,3%	100%
Controles	37	14	51
	72,5%	27,5%	100%
Total	59	26	85
	69,4%	30,6%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de infección por VPH no fue significativamente distinta entre casos y controles ($p=0,442$).

Relación entre la distribución de genotipos y grupo al que se pertenece

La figura 42 refleja la frecuencia de aparición de cada uno de los genotipos detectados mediante el array en tubo en ambos grupos de muestras.

Figura 42: Frecuencia de detección de cada genotipo



La tabla 26 relaciona la distribución de genotipos con la pertenencia al grupo de casos o controles.

Tabla 26: Genotipo expresado y pertenencia al grupo

Genotipo	Casos	Controles	Total
Ausencia de infección	22	37	59
	62,9%	68,4%	66,3%
16	4	5	9
	11,4%	9,3%	10,1%
35	0	2	2
	0%	3,7%	2,2%
39	0	1	1
	0%	1,9%	1,2%
51	0	2	2
	0%	3,7%	2,2%
52	2	1	3
	5,7%	1,9%	3,4%
58	2	0	2
	5,7%	0%	2,2%
61	1	0	1
	2,9%	0%	1,2%
82	4	6	10
	11,4%	11,1%	11,2%
Total*	35	54	89
	100%	100%	100%

*Los casos y controles que presentan coinfección por dos genotipos se han considerado por separado (como dos muestras)

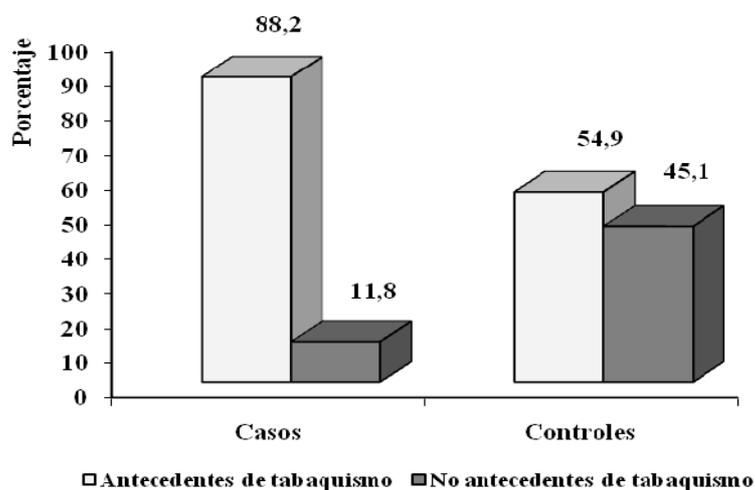
Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la distribución de genotipos no fue significativamente distinta entre casos y controles ($p=0,234$).

Como 14 casillas (77,8%) tuvieron una frecuencia esperada inferior a 5 y el tamaño muestral fue inferior a 50, no se cumplieron los criterios de validez de la Chi cuadrado de Pearson. Desglosando la tabla y realizando un test exacto de Fisher para tablas 2x2, tampoco se encontró significación en ninguna de las comparaciones ($p > 0,05$).

Relación entre antecedentes de tabaquismo y grupo al que se pertenece

En la figura 43 se refleja la distribución de fumadores o ex-fumadores (antecedentes de tabaquismo) frente a no fumadores (no antecedentes de tabaquismo), según pertenecieron al grupo de casos o de controles.

Figura 43: Distribución del antecedente de tabaquismo en casos y controles



La tabla 27 relaciona el antecedente de tabaquismo con la pertenencia al grupo de casos o controles.

Tabla 27: Antecedente de tabaquismo y pertenencia al grupo

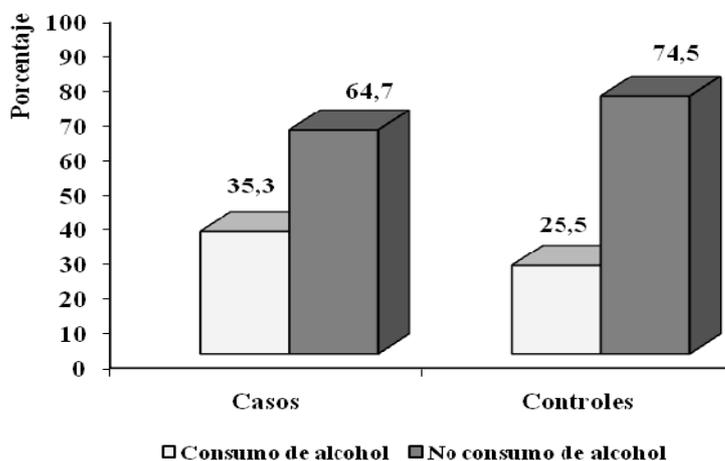
Variables	No fumador	Fumador	Total
Casos	4	30	34
	11,8%	88,2%	100%
Controles	23	28	51
	45,1%	54,9%	100%
Total	27	58	85
	31,8%	68,2%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que la proporción de fumadores o ex-fumadores entre los casos fue significativamente mayor que entre los controles ($p=0,001$).

Relación entre antecedentes de consumo alcohólico y grupo al que se pertenece

En la figura 44 se refleja la distribución de bebedores o ex-bebedores (consumo de alcohol) frente a no bebedores (no consumo de alcohol), según pertenecieron al grupo de casos o de controles.

Figura 44: Distribución del antecedente de consumo de alcohol en casos y controles



La tabla 28 relaciona el antecedente de alcoholismo con la pertenencia al grupo de casos o controles.

Tabla 28: Antecedente de alcoholismo y pertenencia al grupo

Variables	No bebedor	Bebedor	Total
Casos	22	12	34
	64,7%	35,3%	100%
Controles	38	13	51
	74,5%	25,5%	100%
Total	60	25	85
	70,6%	29,4%	100%

Tras realizar la prueba Chi cuadrado de Pearson, se comprobó que, para el consumo de alcohol no hubo diferencias significativas entre casos y controles ($p=0,331$).

Relación entre edad y grupo al que se pertenece

La tabla 29 relaciona la edad con la pertenencia al grupo de casos o controles.

Tabla 29: Edad y pertenencia al grupo

Variables	Media	Desviación típica
Casos	66,1	11,97
Controles	70,2	6,34

Tras realizar la prueba T de Student para la igualdad de medias, se comprobó que la edad media de los casos fue significativamente menor que la de los controles ($p=0,048$).

DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE ESTUDIOS PREVIOS SOBRE LA RELACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN POR VPH Y EL CÁNCER DE VEJIGA

Hasta la fecha, los mecanismos asociados a la iniciación y progresión del carcinoma de vejiga, así como los posibles factores de riesgo que puedan estar implicados, han sido motivo de diversos estudios. Sin embargo, no han sido muchos los trabajos recientes que han encontrado una asociación entre la infección por el VPH y el riesgo incrementado para el desarrollo de dicha neoplasia. Esta posible relación se basaría en el tropismo epitelial del VPH y la proximidad anatómica de las zonas urológica y genital.

En este sentido, nuestro grupo de estudio publicó, en el año 2006 (Gutiérrez y cols., 2006), un meta-análisis sobre 44 artículos, publicados entre noviembre de 1987 y febrero de 2005, que analizaban la relación entre el cáncer vesical y la infección por VPH (tablas 30 y 31). De ellos, en 41 estudios se investigó la presencia del ADN del virus, y en 7, la infección se investigó mediante la detección del antígeno viral o los anticuerpos (en 4 de los trabajos la presencia del VPH se determinó usando ambos procedimientos).

Estudios basados en la detección del ADN del VPH

En la tabla 30 se muestran los resultados obtenidos en los 41 estudios en los que se realizó detección del ADN del VPH, el material

empleado (en la mayor parte fueron biopsias de carcinomas de células transicionales) y la metodología utilizada (Gutiérrez y cols., 2006).

En la mayoría de los casos se empleó, entre otros, el método de PCR, aunque sólo en 14 estudios utilizaron un control interno de extracción y amplificación genética mediante el gen de la beta-globina; y sólo 8 emplearon biopsia de tejido congelada. Esto no excluye la utilización, por algunos autores (Chang y cols., 1994; Kamel y cols., 1995; Sur y cols., 2001, Yang y cols., 2005; Youshya y cols., 2005), de controles internos de amplificación, muy concretos, que aumentan la especificidad de los ensayos. Las regiones amplificadas fueron también diferentes y se informó del genotipo detectado (en la mayoría de los estudios correspondieron a los genotipos 16 ó 18).

Estos estudios encontraron una prevalencia de infección por el VPH que osciló entre el 0% y el 100%. El análisis de homogeneidad entre estudios mostró un resultado significativo con $Q_{exp}=723,3; 38$ g.l., lo que indicaba que no todos los estudios tuvieron estimaciones aproximadamente iguales. La estimación puntual conjunta de la prevalencia de la infección fue del 16% (IC_{95%}: 12,8-19,1). Para excluir si la causa de la importante heterogeneidad fue el empleo de la PCR, Gutiérrez y cols. (2006) repitieron el análisis anterior diferenciando los 29 estudios que emplearon la PCR (estimación de la prevalencia del 15,3%, IC_{95%}: 11,7-18,9), de los 12 que no la usaron (estimación de la

prevalencia del 18,2%, IC_{95%}: 10,3-26,1). Por lo tanto, que los análisis se hubieran hecho o no con PCR, no dio lugar a prevalencias significativamente diferentes, y, por tanto, no parece que ésta fuera la causa de la heterogeneidad importante entre los estudios.

La determinación de la medida conjunta de la asociación entre la presencia del virus y la enfermedad se hizo, primero, con los estudios que presentaban casos y controles bien definidos, y luego, por separado, para los que, de éstos, incluían pruebas con PCR y sin PCR.

Hubo un total de 13 artículos que contenían casos y controles bien definidos, obteniéndose, en la prueba de heterogeneidad, una $Q_{exp}=13,2$; 12 g.l., con un resultado no significativo, lo que informa de un importante parecido, con escasa dispersión de los resultados y sin discrepancia entre ellos, en términos de *Odds Ratio* (OR). Realizada la estimación conjunta de la OR, se obtuvo un valor de 2,31 (IC_{95%}: 1,31-4,07), con una asociación clara y fuerte entre el carcinoma vesical y la exposición al virus, determinada mediante la investigación del ADN. En la figura 45 se reflejan cada uno de los estudios, con su OR estimada, su intervalo de confianza y el peso asignado en la estimación conjunta. El sesgo de publicación no fue significativo, lo que sugiere que, de existir, no fue importante (Gutiérrez y cols., 2006).

Considerando los 10 estudios, con casos y controles bien definidos, que emplearon la técnica de PCR, se encontró una estimación

conjunta de la OR de 2,67 (IC_{95%}: 1,54-4,61) y sin que existieran diferencias significativas entre los estudios, con $Q_{exp}=8,0$; 9 g.l. (figura 46). Por el contrario, para el caso de los 3 estudios que no usaron la PCR, la estimación puntual fue de 0,7 (IC_{95%}: 0,13-3,90) y sin que existieran diferencias significativas entre los estudios, con $Q_{exp}=2,4$; 2 g.l. (figura 47). Los resultados obtenidos no permitieron decir que ambas estimaciones (con PCR y sin PCR) fuesen significativamente distintas, si bien se observó que cuando no se usó la PCR, la estimación fue bastante inferior. Tampoco se pudo afirmar que hubiera sesgo de publicación en estos estudios (Gutiérrez y cols., 2006).

Tabla 30: Estudios basados en la detección del ADN del virus del papiloma humano (tomado de Gutiérrez y cols., 2006)

Estudio	Nº casos positivos (FE) / Total de casos (TH)	Nº controles positivos (%) / Total de controles	Tejido	Pruebas para la detección de ADN	Genotipo estudiado (región del genoma)	Detección del gen β-globina
Agliano y cols., 1994	23 ^a (50) / 46 (CCT)	0 / 10 (vejiga sana)	Fijado	PCR selectiva + Dot-blot H.	16, 18 (E6)	Sí
Anwar y cols., 1992	39 (81,3) / 48 (46 CCT, 2 CCS)	7 (33) / 21 (vejiga sana)	Fijado	PCR + Dot-blot H. + SB-H.	6, 11, 16, 18, 33 (E6)	Sí
Aynaud y cols., 1998	0 (0,9) / 57 CCT	1 tipo 6 (100) / 1 (condiloma vesical)	Congelado	SB-H.; PCR + Dot- blot H.	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42 (L1, E1, E2, E6)	¿?
Boucher y cols., 1996	0 (0,9) / 55 (54 CCT, 1 CCS)	0 / 0	Fijado	Dot-Blot H.	6, 11, 16 (no se indica)	¿?
Bryant y cols., 1991	12 ^b (13) / 92 (66 CCTprf., 10 CCTsup., 2 mixtos, 3 CCS, 4 AD, 7 CI)	0 / 8 (3 displasia, 5 tum. benigno)	Fijado	Hibridación in situ	6, 11, 16, 18 (no se indica)	¿?
Chan y cols., 1997	13 tipo 18 (65) / 20 CCT	7 ^j (70) / 10 (papiloma invertido)	Fijado	PCR + Dot-blot H.	6, 11, 16, 18, 31, 33 (E6)	Sí
Chang y cols., 1994	0 (0,5) / 108 CCT	0 / 0	Fijado	PCR + SB-H.	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 45, 51, 59 (L1)	Sí
Chetsanga y cols., 1992	1 tipo 16 (2,3) / 44 CCT	0 / 0	Congelado	PCR + Dot-blot H.	Genérico (L1)	¿?

VPH y cáncer vesical

Tabla 30: Continuación

Estudio	Nº casos positivos (FE) / Total de casos (TH)	Nº controles positivos (%) / Total de controles	Tejido	Pruebas para la detección de ADN	Genotipo estudiado (región del genoma)	Detección del gen β -globina
Cooper y cols., 1997	0 (1,9) / 25 CCS	0 / 0	No se indica	Hibridación in situ + PCR	6, 11, 16, 18, 31, 33 (E6)	Sí
De Gaetani y cols., 1999	17 ^d (39,5) / 43 CCT	0 / 0	Fijado	PCR + RFLP	Genérico (L1)	Sí
Fioriti y cols., 2003	1 tipo 6 (3,1) / 32 (no se indica)	0 / 20 (vejiga sana)	No se indica	Hibridación in situ	16, 18, 33 (no se indica)	¿?
Furihata y cols., 1993	28 ^c (31,1) / 90 CCT	0 / 0	Fijado	Hibridación in situ	6/11, 16/18, 31/33/35 (no se indica)	¿?
Gazzaniga y cols., 1998	16 ^c (45,7) / 35 CCT	0 / 10 (vejiga sana)	Congelado	PCR + Dot-Blot H.	16, 18 (no se indica)	Sí
Gopalkrishna y cols., 1995	3 tipo 16 (30) / 10 CCT	0 / 0	No se indica	Hibridación in situ + PCR	16 (región reguladora upstream)	¿?
Kamel y cols., 1995	27 ^g (57,4) / 47 (40 CCT, 7 CCS)	0 / 0	Fijado	Hibridación in situ	6, 11, 16, 18, 31, 33 (no se indica)	¿?
Kerley y cols., 1991	1 tipo 11 (4,5) / 22 (18 CCT, 3 CCS, 1 AD)	0 / 5 (vejiga sana)	Fijado	Hibridación in situ + PCR	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 (no se indica)	Sí

Tabla 30: Continuación

Estudio	Nº casos positivos (FE) / Total de casos (TH)	Nº controles positivos (%) / Total de controles	Tejido	Pruebas para la detección de ADN	Genotipo estudiado (región del genoma)	Detección del gen β-globina
Khaled y cols., 2001	23 (46) / 50 (23 CCS, 22 CCT, 3 AD, 7 CI)	0 / 0	Fijado	Hibridación in situ	16, 18 (no se indica)	¿?
Khaled y cols., 2003	48 ^f (48,5) / 99 (no se indica)	0 / 0	Congelado	PCR general + PCR selectiva	6, 11, 16, 18, 33 (L1)	¿?
Kitamura y cols., 1988	1 tipo 16 (10) / 10 (9 CCT, 1 AD)	0 / 0	No se indica	PCR + Dot-blot H.	1, 2, 6, 11, 16, 18 (no se indica)	¿?
Knowles, 1992	0 (0,4) / 120 (100 CCT, 6 CI in situ, 2 AD, 1 CCS, 11 CI)	0 / 3 (cistitis)	Congelado	PCR + SB-H.	6, 8, 11, 16, 18, 33 (L1, E1)	¿?
LaRue y cols., 1995	28 tipos 11 y 16 (39,4) / 71 (no se especifica)	0 / 8 (vejiga sana)	Congelado	PCR + H. in-situ	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 (no se indica)	¿?
López-Beltrán y cols., 1996a	12 tipos 16 y 18 (15,8) / 76 CCT	0 / 0	Fijado	Hibridación in situ	6/11, 16/18, 31/33/35 (no se indica)	¿?
López-Beltrán y cols., 1996b	7 tipos 16 y 18 (9,2) / 76 CCT	0 / 0	Fijado	PCR + SB-H.	6, 11, 16, 18 (L1, E5, E6)	Sí
López-Beltrán y cols., 1995	11 tipos 16 y 18 (14,5) / 76 CCT	0 / 0	Fijado	PCR + H. in-situ	6/11, 16/18, 31/33/35 (L1, E5, E6)	¿?

VPH y cáncer vesical

Tabla 30: Continuación

Estudio	Nº casos positivos (FE) / Total de casos (TH)	Nº controles positivos (%) / Total de controles	Tejido	Pruebas para la detección de ADN	Genotipo estudiado (región del genoma)	Detección del gen β -globina
Lu y cols., 1997	0 (1,6) / 31 (22 CCT, 4 AD, 5 CCS)	0 / 0	Fijado	Hibridación in situ	16, 18 (no se indica)	¿?
Ludwig y cols., 1996	6 tipo 6b (26,1) / 23 (21 CCT, 1 AD, 1 CCS)	3 tipo 6b (7,3) / 41 (32 vejiga sana, 9 cistitis crónica)	No se indica	PCR + RFLP	6b, 11, 16, 18 (L1)	Sí
Maloney y cols., 1994	1 tipo 18 (2,4) / 42 (22 CCS, 20 CCT)	0 / 0	No se indica	PCR selectiva	6b, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 45, 51 (L1, E6)	¿?
Mincione y cols., 1994	1 tipo 31-33-51 (5,6) / 18 (CCT)	0 / 0	Fijado	Hibridación in situ	6/11, 16/18, 31/33/51 (no se indica)	¿?
Mvula y cols., 1996	1 tipo 16 (2,8) / 36 (34 CCT, 2 CCS)	0 / 0	Fijado	PCR selectiva	6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52, 58 (L1, E7)	¿?
Noel y cols., 1994a	2 tipo 16 (100) / 2 (CCT)	0 / 2 (vejiga sana)	Fijado	PCR selectiva	6b, 11, 16, 18 (E7)	¿?
Saltzstein y cols., 1993	0 (1,5) / 33 (CCT)	0 / 0	No se indica	PCR + SB-H.	6, 11, 16, 18, 31, 33 (L1, E1)	¿?
Shibutani y cols., 1992	4 ^h (19) / 21 (20 CCT, 1 CCS)	2 ^k (100) / 2 (1 displasia, 1 tejido inflamatorio)	No se indica	SB-H.	6/11, 16/18, 31/33 (L1)	¿?

Tabla 30: Continuación

Estudio	Nº casos positivos (FE) / Total de casos (TH)	Nº controles positivos (%) / Total de controles	Tejido	Pruebas para la detección de ADN	Genotipo estudiado (región del genoma)	Detección del gen β -globina
Simoneau y cols., 1999	16 ⁱ (8,6) / 187 CCT	0 / 0	Congelado	PCR + SB-H / Dot- blot H.	6, 11, 16, 18, 33 (L1)	¿?
Smetana y cols., 1995	20 (33,9) / 59 (CCT)	2 (4,9) / 41 (tejido no tumoral de caso)	Fijado	H. in-situ + PCR	6/11, 16/18 (E1)	¿?
Sur y cols., 2001	1 (1,6) / 64 CCT	0 / 0	No se indica	PCR + H. in-situ	6, 11, 16, 18, 31, 33 (L1)	Sí
Tekin y cols., 1999	1 tipo 16 (4,8) / 42 (CCT)	0 / 10 (vejiga sana)	No se indica	PCR selectiva	16, 18 (L1)	¿?
Tenti y cols., 1996	26 tipos 16 y 18 (32,9) / 79 CCT	0 / 0	Fijado	PCR + SB-H	6, 11, 16, 18, 33 (E6, E7)	Sí
Westenend y cols., 2001	0 (2,9) / 16 (CCS)	0 / 0	Fijado	Hibridación in situ	6/11, 16/18, 31/33/51 (no se indica)	¿?
Wilczynski y cols., 1993	1 tipo 6 (4,5) / 22 (CCS)	0 / 0	Congelado	PCR + SB-H.	6, 11, 16, 18 (L1, E7)	Sí
Yang y cols., 2005	24 tipo 16 (100) / 24 (no se indica)	0 / 0	No se indica	MassARRAY	16, 18 (E7)	Sí

VPH y cáncer vesical

Tabla 30: Continuación

Estudio	Nº casos positivos (FE) / Total de casos (TH)	Nº controles positivos (%) / Total de controles	Tejido	Pruebas para la detección de ADN	Genotipo estudiado (región del genoma)	Detección del gen β-globina
Youshya y cols. 2005	0 (0,6) / 78 (CCT)	0 / 0	Fijado	PCR	Genérico (L1)	¿?

FE: frecuencia estimada; TH: tipo histológico; %: porcentaje

CCT: carcinoma de células transicionales; CCS: carcinoma de células escamosas; AD: adenocarcinoma; CI: carcinoma indiferenciado

prf: profundo; sup: superficial; mixto: profundo/superficial

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SB: southern blot; H.: hibridación; RFLP: restriction fragment length polymorphisms

¿?: no se indica

^a: 11 tipo 16, 5 tipo 18, 7 tipo 16/18; ^b: tipo 16/18; ^c: tipo 16, 18, 33; ^d: 1 tipo 6/11, 6 tipo 16/18, 10 tipo 31/33/35; ^e: 8 tipo 16, 8 tipo 18; ^f: 31 tipo 16, 9 tipo 18, 3 tipo 6/11, 5 tipo 16/18; ^g: 19 tipo 31, 16 tipo 18, 13 tipo 33, 10 tipo 16, 10 tipo 11, 13 tipo 6; ^h: 2 tipo 6/11, 1 tipo 16/18, 1 tipo 31/33; ⁱ: 9 tipo 16, 1 tipo 11, 4 tipo 6, 4 tipo 18; ^j: 1 tipo 16, 6 tipo 18; ^k: 1 tipo 6/11, 1 tipo 16/18

Figura 45: Relación de los 13 estudios empleados para realizar la medida conjunta de la asociación entre la infección por el VPH y la presencia de la enfermedad, con su OR estimada, su intervalo de confianza y el peso asignado en la estimación conjunta (tomado de Gutiérrez y cols., 2006)

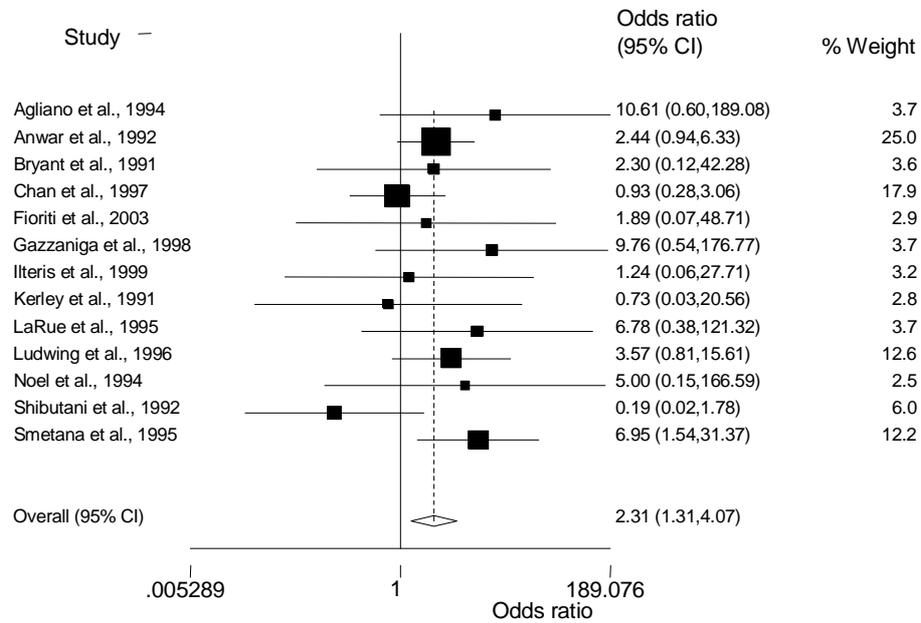


Figura 46: Relación de los 10 estudios que utilizan la PCR, empleados para realizar la medida conjunta de la asociación entre la infección por el VPH y la presencia de la enfermedad, con su OR estimada, su intervalo de confianza y el peso asignado en la estimación conjunta (tomado de Gutiérrez y cols., 2006)

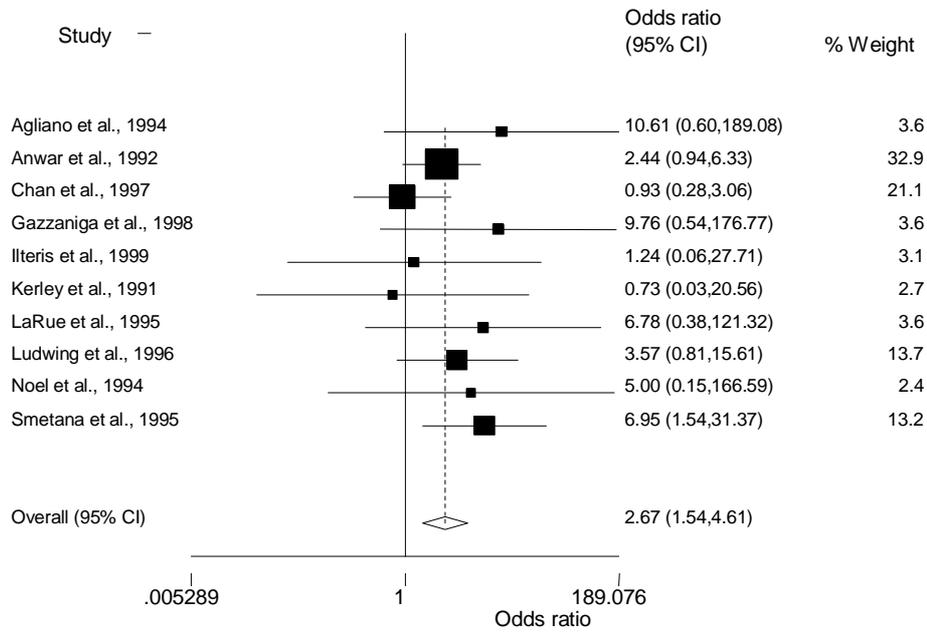
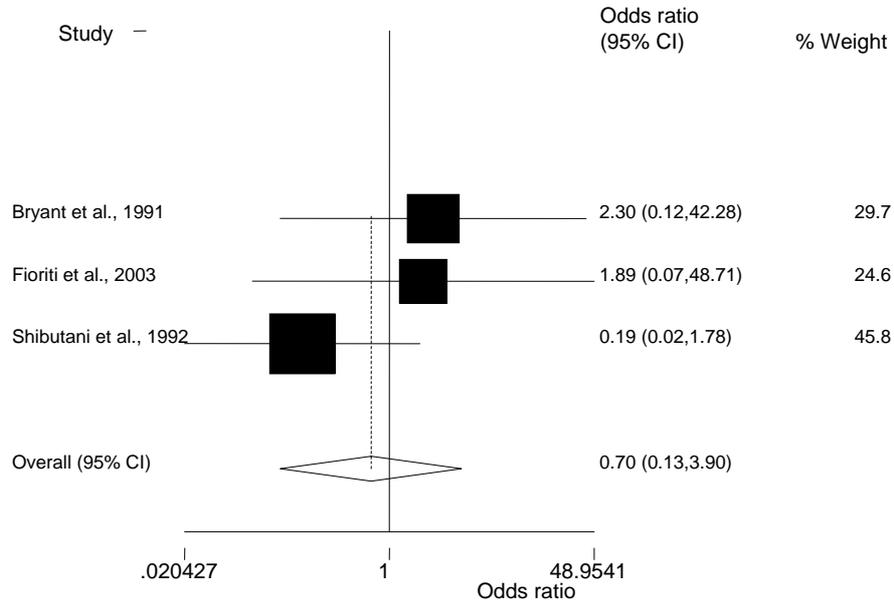


Figura 47: Relación de los 3 estudios que no utilizan la PCR, empleados para realizar la medida conjunta de la asociación entre la infección por el VPH y la presencia de la enfermedad, con su OR estimada, su intervalo de confianza y el peso asignado en la estimación conjunta (tomado de Gutiérrez y cols., 2006)



Estudios no basados en la detección del ADN del VPH

En la tabla 31 se muestran los resultados obtenidos en los 7 estudios no basados en la detección del ADN del VPH (5 investigaron la presencia del antígeno de la cápside del virus y 2 determinaron los anticuerpos en suero mediante la técnica de western-blot), el material empleado y la metodología utilizada (Gutiérrez y cols., 2006).

La prevalencia de la infección osciló entre un 14% y un 60%. El estudio de homogeneidad entre los trabajos mostró un resultado significativo, con $Q_{exp}=71,6$; 6 g.l., es decir, éstos estudios no mostraron estimaciones aproximadamente iguales, lo que indicaba una importante dispersión de los resultados obtenidos entre los estudios. La estimación puntual conjunta de la prevalencia de infección por el virus, a través de la detección del antígeno o los anticuerpos, fue del 32,4% (IC_{95%}: 17,0-47,8).

Tabla 31: Estudios basados en la detección de antígenos y anticuerpos frente al VPH (tomado de Gutiérrez y cols., 2006)

Autores	Nº casos positivos (FE) / Total de casos (TH)	Nº controles positivos (%) / Total de controles	Tejido	Prueba (gen empleado)
Bryant y cols., 1987	7 (14) /50 (16 CCS, 2 CCT sup., 32 CCT prf.)	0 /0	Fijado	IPO con Ac anti-cápside
López-Beltrán y cols., 1996a	25 (3,9) /76 CCT	0 /0	Fijado	IPO con Ac anti-cápside
Ludwig y cols., 1996	5 ^a (21,7) /23 (21 CCT, 1 AD, 1 CCS)	2 ^b (4,9) /41 (32 vejiga sana, 9 cistitis crónica)	Emplea suero	Western Blot con Ag de tipos 6b (L1, L2), 16 (L2, E4, E7) y 18 (L2, E7)
Mantovani y cols., 1994	27 (60) /45 CCT	28 (23,1) /121 (75 vejiga sana, 46 lesión no neoplásica)	Emplea suero	ELISA y Western Blot con Ag de género
Roussel y cols., 1991	1 (16,7) /6 CCT	0 /0	No se indica	IPO con Ac anti-cápside
Smetana y cols., 1995	19 (17,3) /110 CCT	0 /41 (tejido no tumoral de los casos)	Fijado	IPO con Ac anti-cápside
Youshya y cols., 2005	47 (60,2) /78 CCT	0 /0	Fijado	IPO con Ac anti-cápside

FE: frecuencia estimada; TH: tipo histológico; %: porcentaje

CCT: carcinoma de células transicionales; CCS: carcinoma de células escamosas; AD: adenocarcinoma

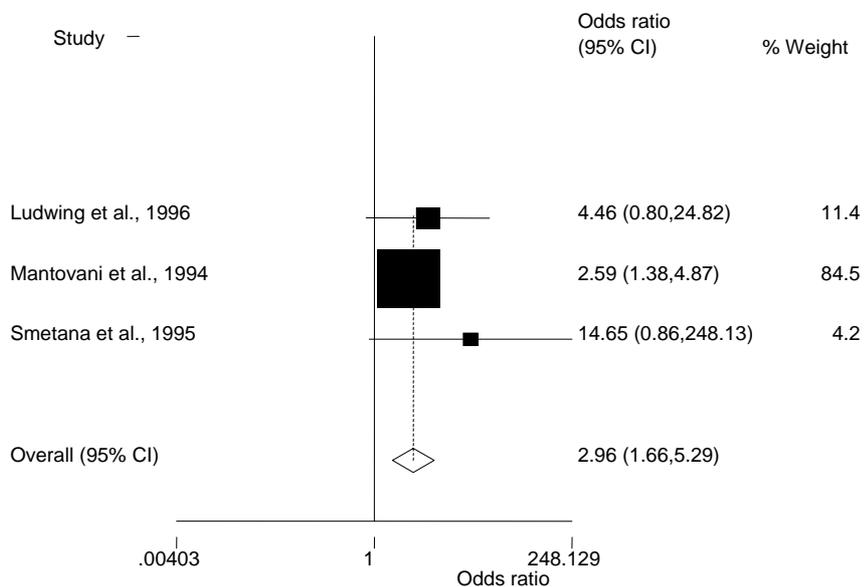
prf: profundo; sup: superficial

Ac: anticuerpo; Ag: antígeno; IPO: inmunoperoxidasa

^a: 1 con Ac anti-VPH 16, 1 con Ac anti-VPH 6b, 1 con Ac anti-VPH 16/18 y 2 con Acs anti-VPH 18; ^b: 1 con Ac anti-VPH 18 y 1 con Ac anti-VPH 16

La determinación de la medida conjunta de la asociación entre la presencia del virus y la enfermedad se hizo para todos los estudios que presentaban casos y controles bien definidos. Así, sólo se dispuso de 3 de los 7 trabajos, con una prueba de heterogeneidad no significativa, con $Q_{exp}=1,8$; 2 g.l., que indicaba un importante parecido entre los estudios, y sin discrepancia entre ellos en términos de las OR. La estimación conjunta de la OR mostró un valor de 2,96 (IC_{95%}: 1,66-5,29). En la figura 48 se reflejan los estudios, con su OR estimada, su intervalo de confianza y el peso asignado en la estimación conjunta.

Figura 48: Relación de los 3 estudios que no detectan el ADN, empleados para realizar la medida conjunta de la asociación entre la infección por el VPH y la presencia de la enfermedad, con su OR estimada, su intervalo de confianza y el peso asignado en la estimación conjunta (tomado de Gutiérrez y cols., 2006)



Estimación de la asociación entre la exposición al VPH y la presencia de cáncer vesical, según los estudios anteriores

El valor de las Q_{exp} obtenidas a partir de los 44 estudios anteriores, informan de una importante dispersión de los datos obtenidos (Gutiérrez y cols., 2006). Por esa razón, los autores se centraron sólo en 16 artículos, que contaban con grupos de casos y controles bien definidos y una escasa dispersión de los resultados, para obtener una OR global que permitiera llegar a una conclusión aproximativa.

Según los autores, los resultados obtenidos resultan esperanzadores, ya que de los 13 estudios seleccionados del total de los basados en el ADN (figura 45), se obtuvo una OR conjunta de 2,31, que indicaba que existía una clara y fuerte asociación entre la exposición al VPH y la presencia del carcinoma vesical. En cualquier caso, tanto en los estudios que usan el ADN, como en los que no, la estimación de la OR fue muy parecida (2,31 vs. 2,96), lo que indicaría una cierta “estabilidad” entre técnicas, y permitiría conjeturar que el hallazgo era “consistente”.

En algunos casos, el nivel de significancia y el peso no concordaron entre sí. Esto es debido a que no existió homogeneidad entre los parámetros analizados en todos los artículos, ya que cada autor utilizó un número distinto de casos y controles (y la mayoría ninguno). Esta situación fue contemplada por el meta-análisis, y no influyó en el cálculo de los resultados, sino que fue meramente informadora.

Este análisis mostró una moderada relación entre la infección por el virus y el tumor. Sin embargo, los autores afirmaban que, para obtener una conclusión definitiva, sería necesario un estudio con suficiente número de casos, comparativo frente a controles, y que utilice la combinación de varias técnicas microbiológicas en un mismo sujeto y muestra.

Posteriormente a los artículos recogidos en el meta-análisis citado, entre febrero de 2005 y julio de 2007, se publicaron 4 artículos más: Barghi y cols. (2005); Guo y cols. (2006); Helal y cols. (2006) y Nordenvall y cols. (2006). Los dos primeros descartan la relación entre el VPH y el cáncer vesical, y los dos últimos la establecen. Estos artículos, al igual que los anteriores, incluidos en el meta-análisis, adolecen de la información metodológica suficiente como para establecer una conclusión definitiva.

Justificación de la utilización de una técnica de amplificación y otra de hibridación mediante microarrays

La mayor parte de los estudios citados anteriormente, basados en la detección del ADN del VPH (tabla 30), se han basado en un análisis cualitativo del ADN, es decir, en la detección específica de secuencias de ADN del VPH en tejido vesical, permitiendo así, por tanto, identificar el tipo de virus presente en la muestra. Básicamente, todas estas pruebas

consisten en enfrentar el ADN de una determinada muestra con un fragmento conocido de un ácido nucleico cuya secuencia es complementaria de la secuencia de ADN que intentamos detectar. Dicho fragmento conocido se denomina sonda y el proceso hibridación.

Existen numerosas técnicas de análisis cualitativo del ADN y una gran diversidad de variaciones y modificaciones de estas técnicas. Estas diferentes técnicas presentan entre sí diferencias en cuanto a su sensibilidad, complejidad y reproductibilidad. Algunas de ellas se encuentran disponibles comercialmente (Digene Hybrid Capture[®], Inform[®] HPV, Amplicor[®] High Risk-HPV, Linear Array[®] HPV 37, Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano), si bien, hasta ahora, su utilidad se ha centrado, fundamentalmente, en la determinación de la presencia de ADN del VPH en muestras de tejido cervical uterino.

A continuación se discute, brevemente, las técnicas de biología molecular más empleadas en el estudio del VPH.

Captura de híbridos

En estas técnicas se utilizan sondas de ARN capaces de detectar varios tipos de VPH. Cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido ARN-ADN que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA que utiliza un compuesto quimioluminiscente para revelar la reacción y

que proporciona incluso información sobre la cantidad de ADN viral presente en la muestra (Digene Hybrid Capture[®], Digene, EEUU).

Se trata de pruebas con una elevada sensibilidad y un alto valor predictivo negativo, puesto que su negatividad prácticamente descarta la existencia de infección (Castle PE y cols., 2002).

Hibridación in situ

La hibridación *in situ* consiste en aplicar sondas de ácidos nucleicos complementarias marcadas con sustancias radioactivas o con colorantes que permitan su posterior visualización sobre un corte del tejido problema o sobre una extensión citológica. Esta técnica se puede aplicar tanto en muestras de citología, como en biopsias, tras su procesamiento habitual (fijación) (Inform[®] HPV, Ventana Medical Systems Inc., EEUU)

La principal ventaja de este método consiste en que es el único que permite visualizar la morfología de las células en las que se halla el VPH, mientras que el resto de técnicas se realiza en fragmentos de ADN, por lo que no permiten la valoración morfológica de las células. Una segunda ventaja es su gran especificidad: la detección de VPH mediante esta técnica se asocia a la presencia de lesiones citológicas e histológicas (Qureshi MN y cols., 2003). Sin embargo, el gran inconveniente de esta técnica es su baja sensibilidad, puesto que necesita un número elevado de

copias (entre 20 y 25 en cada célula) para obtener un resultado positivo. Aunque, en algunos métodos, la hibridación *in situ* se combina con una amplificación por PCR previa, la complejidad del procedimiento los ha hecho poco populares.

Técnicas basadas en la PCR

El fundamento de la PCR consiste en aplicar un proceso que multiplica el número de copias de un segmento de ADN si está presente en la muestra. Este proceso, hace que sea una técnica extraordinariamente sensible, capaz de detectar la presencia de muy pocas copias de ADN del virus (entre 10 y 100 en una muestra), aunque estén presentes en una sola célula entre varios miles.

Se pueden utilizar diferentes estrategias, pero en la actualidad tienden a aplicarse métodos capaces de amplificar regiones muy conservadas del genoma del VPH mediante el uso de cebadores genéricos, con lo que con una sola amplificación pueden detectarse gran parte de los diferentes tipos de VPH (Amplicor[®] High Risk-HPV junto con Linear Array[®] HPV 37, Roche Diagnostics, Suiza). Tras esta amplificación, la tipificación viral puede realizarse mediante hibridaciones con sondas específicas para cada virus, con sondas que permitan separar solamente virus de alto o bajo riesgo, o mediante

digestión con enzimas de restricción (PCR + RFLP), que proporcionan patrones diferentes para cada tipo.

Las técnicas basadas en la amplificación por PCR son rápidas y relativamente poco laboriosas. Son técnicas muy sensibles, sin embargo, esta gran sensibilidad es también su principal debilidad, puesto que detectan un número elevado de pacientes con infecciones no progresivas e infecciones latentes sin alteraciones citológicas, cuya evolución podría ser hacia la resolución espontánea (Coggin JR y zur Hausen H, 1979).

De todas formas, las técnicas basadas en la PCR tampoco permiten cuantificar adecuadamente el ADN viral presente en la muestra. Otro de sus defectos es la elevada probabilidad de contaminaciones y falsos positivos.

Analizando, por tanto, los estudios anteriores (tabla 30), ninguno había utilizado, para el estudio de la relación entre el cáncer vesical y la infección por el VPH, una técnica que combinara la elevada sensibilidad de la PCR con la nueva tecnología del microarray, que permitiría, con una sola amplificación, detectar diferentes tipos de VPH. De esta manera, a la elevada sensibilidad de la PCR, se le suma la especificidad de la detección del tipo viral

Con el Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano se puede detectar la presencia de los 35 genotipos del virus VPH con mayor

importancia clínica en distintos tipos de muestras clínicas. La detección se lleva a cabo mediante la amplificación, por PCR, de un fragmento de unos 450 pb dentro de la región L1 del virus, una secuencia que está altamente conservada entre los distintos tipos de VPH. Sin embargo, esta región presenta suficientes variaciones como para poder diferenciar cada tipo de virus con sondas de captura específicas.

Además, esta tecnología permite la detección de dos controles internos (ADN genómico, del propio paciente, y un control de la reacción de amplificación) necesarios para asegurar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH: PCR FRENTE A MICROARRAY

Si bien la técnica de detección de la infección por el VPH mediante el sistema Clinical Arrays[®] Papillomavirus Humano es un procedimiento único, en dos fases (amplificación mediante PCR primero, y detección del genotipo mediante AT después), pudimos observar que, la PCR, por sí sola, tras visualización por electroforesis en gel de agarosa (figuras 13 a 18) fue positiva para, tan solo, 5 de las 85 (5,88%) muestras del estudio (muestras 6, 9, 14, 53 y 60). Todas ellas confirmaron su positividad al realizar el AT, sin embargo, tras éste, el número de muestras positivas se incrementó hasta el 30,59% (26 muestras positivas).

Esto indica, que, aunque la PCR es una técnica altamente sensible, la asociación, en este caso, a la técnica del microarray, incrementa, considerablemente, dicha sensibilidad en la detección de la infección por el VPH.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PRESENTE ESTUDIO

Tras determinar, estadísticamente, las relaciones entre los distintos factores considerados en el grupo de casos, se observó que no existió relación entre la infección por el VPH y el consumo de tabaco, la edad, el estadio tumoral, el grado histológico del tumor, el tamaño de éste, la presencia o no de múltiples lesiones y si el tumor fue primario o recidiva. Es decir, los casos infectados por VPH fueron similares, estadísticamente, a los no infectados, si consideramos estos siete parámetros. Sin embargo, la proporción de bebedores o ex-bebedores entre los casos infectados por VPH fue significativamente superior que entre los no infectados.

Entre los controles, tampoco existió relación entre la infección por el VPH y el consumo de tabaco, de alcohol y la edad. Por tanto, los controles infectados por VPH fueron similares, estadísticamente, a los no infectados, si consideramos estos tres parámetros.

A su vez, tras realizar la comparación estadística entre los dos grupos de estudio (casos frente a controles), sólo se encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos para el consumo de tabaco, de forma que el porcentaje de fumadores o ex-fumadores entre los casos fue mayor que entre los controles. Es conocido que el tabaco es el principal factor de riesgo ambiental relacionado con el cáncer vesical (Hartge y cols., 1987). Nuestros datos, por tanto, son acordes con este hecho, ya que es el único factor de riesgo estudiado que claramente es más frecuente entre los pacientes afectados por el cáncer de vejiga.

Sin embargo, el tabaco no se relacionó ni con el estadio tumoral, ni con el grado histológico, ni con el tamaño de la lesión tumoral. Es decir, el tabaquismo no se relacionó con un peor pronóstico de la lesión, según nuestros resultados.

No se encontraron diferencias significativas, entre ambos grupos, para el consumo de alcohol. No existen, actualmente, en la literatura, estudios que demuestren, de forma clara, la asociación entre el consumo de bebidas alcohólicas y el cáncer vesical. Algunos estudios han mostrado una débil asociación, pero probablemente el tabaco actúa como factor de confusión (Silverman y cols., 1992). Tampoco el consumo de alcohol se relacionó con el estadio tumoral, ni con el grado histológico, ni con el tamaño de la lesión tumoral. Es decir, el hábito alcohólico no se relacionó con un peor pronóstico de la lesión, según nuestros resultados.

Por otro lado, la incidencia del cáncer de vejiga se incrementa con la edad, ya que son poco frecuentes por debajo de los 40 años, mientras que el 80% de los casos se presentan por encima de los 60. En nuestro estudio, aunque hubo diferencias significativas en cuanto a la edad, ya que la edad media de los casos (66,1 años) fue significativamente inferior a la de los controles (70,2 años), no consideramos que éste sea un factor relevante, sino que fue debido a que los grupos no se distribuyeron homogéneamente para este parámetro en el momento de la selección.

Hubo dos posibles factores de riesgo asociados al cáncer vesical, que no pudieron ser considerados en el presente trabajo como consecuencia de la falta de datos exhaustivos en las historias clínicas de los pacientes. Uno de ellos fueron los antecedentes familiares de cáncer, especialmente del vesical, dato que no estaba recogido en la mayor parte de las historias. El otro factor fue el de la posible exposición a compuestos químicos relacionados con el cáncer de vejiga (2-naftilamina, 4-aminobifenilo, 4-nitrobifenilo, bencidina, 2-amino-naftol, etc.). En este sentido, sólo se había recogido en la historia el dato referente al trabajo que desempeñaban, pero no la exposición a tóxicos. Los datos reflejados en las tablas 3 y 4 del apartado “material y métodos” no nos permitieron realizar una comparación estadística y establecer si existían o no profesiones más o menos frecuentes entre los casos. De cualquier modo, tanto entre los casos como entre los controles

predominaron los sujetos dedicados a las tareas agrícolas y a la construcción. Otros estudios sí han relacionado determinadas exposiciones laborales con un incremento de la probabilidad de desarrollar una neoplasia vesical (Soll-Johanning y cols., 1998; Ward y cols., 1997)

Pero lo más importante es que no se encontraron diferencias significativas entre casos y controles para el principal factor de riesgo que habíamos considerado, la infección por el VPH. Además, tampoco hubo diferencias en cuanto a la distribución de los genotipos presentes en ambos grupos, existiendo infección por genotipos de alto riesgo oncogénico en todas las muestras que fueron positivas, tanto en el grupo de casos como en el de controles. Por tanto, no se puede afirmar, según la metodología empleada en nuestro estudio, que el cáncer de vejiga esté relacionado con la infección por el VPH, ni siquiera con genotipos de alto riesgo oncogénico.

CONCLUSIONES

1. El estudio comparativo de los factores de riesgo considerados, presencia del ADN del virus del papiloma humano y consumo de tabaco o alcohol, puso de manifiesto que sólo hubo diferencias significativas entre los pacientes con cáncer vesical y los controles para el consumo de tabaco: El porcentaje de fumadores o ex-fumadores entre los casos fue mayor que entre los controles
2. No existió relación entre la infección por el virus y el estadio del tumor, su grado histológico, el tamaño de éste, la presencia o no de múltiples lesiones y si fue primario o recidiva. Es decir, la presencia del virus tampoco se relacionó con factores pronóstico de la lesión tumoral.
3. El consumo de tabaco o alcohol no se relacionaron con el estadio, grado histológico o tamaño de la lesión tumoral. Es decir, no se relacionaron con un peor pronóstico de la lesión, según nuestros resultados.
4. No existió relación estadística entre la infección por el virus del papiloma humano y el consumo de tabaco o la edad de los sujetos. Sin embargo, la proporción de bebedores o ex-bebedores entre los

casos infectados fue significativamente superior que entre los no infectados.

5. No hubo diferencias en cuanto a la distribución de los genotipos detectados. Por tanto, no se puede afirmar, según la metodología empleada, que el cáncer de vejiga esté relacionado con la infección por el virus, ni siquiera con genotipos de alto riesgo oncogénico.

6. Para obtener una conclusión definitiva sobre la relación entre el virus del papiloma humano y el cáncer de vejiga se requiere la realización de estudios de casos y controles en el que se analicen los factores de riesgo asociados junto con la detección del ADN del virus en la mucosa vesical de los sujetos con cáncer, tanto de la lesión neoplásica como de mucosa sana distante. Dicho estudio debería realizarse mediante el uso de una técnica de contrastada sensibilidad para la detección, tipificación y cuantificación del virus.

BIBLIOGRAFÍA

- Agliano AM, Gradilone A, Gazzaniga P, y cols. *High frequency of human papillomavirus detection in urinary bladder cancer*. Urol Int 1994; 53: 125-129.
- Al-Ahdal MN, Kardar AH, Selim AM, y cols. *Occurrence of human papillomavirus types 16 and 18 in benign prostatic hyperplasia tissues of Saudi patients*. Genitourinar Med 1996; 72: 345-346.
- Anwar K, Naiki H, Nakakuki K, y cols.. *High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder*. Cancer 1992; 70: 1967-1973.
- Aynaud O, Tranbaloc P y Orth G. *Lack of evidence for a role of human papillomaviruses in transitional cell carcinoma of the bladder*. J Urol 1998; 159: 86-89.
- Barghi MR, Hajimohammadmehdiarbab A, Hosseini SMM, y cols. *Correlation between human papillomavirus infection and bladder transitional cell carcinoma*. BMC Infect Dis 2005; 5: 102.
- Bertran JS y Craig AW. *Specific induction of bladder cancer in mice by Butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and effects of hormonal modifications on the sex difference in response*. Eur J Cancer 1972; 8: 487-492.
- Beutner KR, Wiley DJ, Douglas JM, y cols. *Genital warts and their treatment*. Clin Infect Dis 1999; 28: S37-S56.
- Blair A, Stewart PA, Tolbert P, y cols. *Cancer and other causes of death among a cohort of dry cleaners*. Br J Ind Med 1990; 47: 162-168.
- Bonnez W. *Editorial comment: Issues with HIV and oral human papillomavirus infections*. AIDS Reader 2002; 12: 174-176.

Bonnez W, Da Rin C, Rose RC, y cols. *Evolution of the antibody response to human papillomavirus type 11 (HPV11) in patients with condyloma acuminatum according to treatment response.* J Med Virol 1993; 39: 340-344.

Bosch FX y De Sanjose S. *Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer: Burden and assesment of causality.* J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31: 3-13.

Boucher NR, Scholefield JH y Anderson JB. *The aetiological significance of human papillomavirus in bladder cancer.* Br J Urol 1996; 78: 866-869.

Bousarghin L, Combita-Rojas AL, Touze A, y cols. *Detection of neutralizing antibodies against human papillomaviruses (HPV) by inhibition of gene transfer mediated by HPV pseudovirions.* J Clin Microbiol 2002; 40: 926-932.

Broders AC. *Epithelioma of the genitourinary organs.* Ann Surg 1922; 75: 574-604.

Broders AC. *The grading of carcinoma.* Minn Med 1925; 8: 726.

Bryant P, Davies P y Wilson D. *Detection of human papillomavirus DNA in cancer of the urinary bladder by in situ hybridisation.* Br J Urol 1991; 68: 49-52.

Bryant P, Skelly J y Wilson D. *Demonstration of papillomavirus structural antigen in human urinary bladder neoplasia.* Br J Urol 1987; 60: 405-409.

Burd EM. *Human papillomavirus and cervical cancer.* Clin Microbiol Rev 2003; 16: 1-17.

- Campo MS. *Animal models of papillomavirus pathogenesis*. Virus Res 2002; 89: 249-261.
- Castellsague X y Muñoz N. *Cofactor in human papillomavirus carcinogenesis: Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking*. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31: 20-28.
- Castellsague X, Boch FX, Muñoz N, y cols. *Male circumcision, penile human papillomavirus infection and cervical cancer en female partners*. N Engl J Med 2002; 346: 1105-1112.
- Castle PE y Giuliano AR. *Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients: Assessing their roles as human papillomavirus cofactors*. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31: 29-34.
- Castle PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I, y cols. *Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible*. J Clin Microbiol 2002; 40: 1088-1090.
- Catalona WJ. *Tumores uroteliales del tracto urinario*. En: Campbell's urology. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, y cols. Philadelphia: Saunders, 1992. 6ª ed. p. 1090-1154.
- Chacón J, Sanz I, Rubio MD, y cols. *Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25: 311-316.
- Chan KW, Wong KY y Srivastava G. *Prevalence of six types of human papillomavirus in inverted papilloma and papillary transitional cell carcinoma of the bladder: an evaluation by polymerase chain reaction*. J Clin Pathol 1997; 50: 1018-1021.

Chang F, Lipponen P, Tervahauta A, y cols. *Transitional cell carcinoma of the bladder: failure to demonstrate human papillomavirus deoxyribonucleic acid by in situ hybridization and polymerase chain reaction.* J Urol 1994; 152: 1429-1433.

Chapman WH, Kirchheim D y McRoberts JW. *Effect of the urine and calculus formation on the incidence of bladder tumors in rats implanted with paraffin wax pellets.* Cancer Res 1973; 33: 1225-1229.

Chetsanga C, Malmstrom PU, Gyllensten U, y cols. *Low incidence of human papillomavirus type 16 DNA in bladder tumor detected by the polymerase chain reaction.* Cancer 1992; 69: 1208-1211.

Coggin JR y zur Hausen H: *Workshop on Papillomaviruses and cancer.* Cancer Research 1979; 39: 545-552.

Combata AL, Bravo MM, Touze A, y cols. *Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in colombian women with invasive cervical cancer.* Int J Cancer 2002; 97: 796-803.

Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, y cols. *Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.* Br J Cancer 1991; 63: 601-608.

Cooper K, Haffajee Z y Taylor L. *Human papillomavirus and schistosomiasis associated bladder cancer.* Mol Pathol 1997; 50: 145-148.

- Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, y cols. *Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53*. Cancer Res 1998; 58: 1090-1094.
- Cubilla AL, Velazques EF, Reuter VE, y cols. *Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: A report of 11 cases and proposed classification of "verruciform" penile tumors*. Am J Surg Pathol 2000; 24: 505-512.
- Cummings KB. *Uroepithelial tumors*. En: Oncology. Mossa AR, Robson MC, Schimpeff SC, y cols. eds. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 901-920.
- Cupp MR, Malek RS, Goellner JR, y cols. *The detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis*. J Urol 1995; 154: 1024-1029.
- De Gaetani C, Ferrari G, Righi E, y cols. *Detection of human papillomavirus DNA in urinary bladder carcinoma by in situ hybridisation*. J Clin Pathol 1999; 52: 103-106.
- De Sanjose S y Palefsky J. *Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men*, Virus Res 2002; 89: 201- 211.
- De Torres I, Fortuño MA, Raventos A, y cols. *Primary malignant melanoma of the bladder: immunohistochemical study of a new case and review of the literature*. J Urol 1995; 154: 525-527.
- Derkay CS. *Recurrent respiratory papillomatosis*. Laryngoscope 2001; 111: 57-69.

Doménech-Sánchez A y Vila J. *Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 46-54.

El-Gabry EA, Strup SE y Gomella LG. *El cáncer superficial de vejiga: epidemiología, diagnóstico e historia natural*. AUA update Series edición española 2001; 1: 85-108.

El-Merzabani MM, El-Aaser AA y Zakhary NI. *A study of the aetiological factors of bilharzial bladder cancer in Egypt-I. Nitrosamines and their precursors in urine*. *Eur J Cancer* 1979; 15: 287-291.

Esrig D, Elmajian D, Groshen S, y cols. *Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer*. *N Engl J Med* 1994; 331: 1259-1264.

European Consortium of Cervical Cancer. *The Health Professional's Handbook "Human Papillomavirus and Cervical Cancer"*. 2004. Disponible en: <http://www.cervical-cancer.de> (Consultado 12/02/2008)

Fairley CK, Gay NJ, Forbes A, y cols. *Hand-genital transmission of genital warts? An analysis of prevalence data*. *Epidemiol Infect* 1995; 115: 169-176.

Fehrmann F y Laimins LA. *Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation*. *Oncogene* 2003; 22: 5201-5207.

Fioriti D, Pietropaolo V, Dal Forno S, y cols. *Urothelial bladder carcinoma and viral infections: different association with human*

polyomaviruses and papillomaviruses. Int J Immunopathol Pharmacol 2003; 16: 283-288.

Fleshner N y Fair W. *Impact of environment on urologic cancer.* AUA update Series 1996; 15: 262-267.

Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, y cols. *Assignment of the human Ki-67 gene (MK 167) to 10q25-qter.* Genomics 1991; 11: 476-477.

Fradet Y. *Markers of prognosis in superficial bladder cancer.* Semin Urol 1992; 10: 28-38.

Furihata M, Inoue K, Ohtsuki Y, y cols. *High-risk human papillomavirus infections and overexpression of p53 protein as prognostic indicators in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.* Cancer Res 1993; 53: 4823-4827.

Gallie BL. *Retinoblastoma gene mutations in human cancer.* N Engl J Med 1994; 330: 786-787.

Gardiner RA, Walsh MD, Allen V, y cols. *Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression.* Br J Urol 1994; 73: 526-532.

Gazzaniga P, Vercillo R, Gradilone A, y cols. *Prevalence of papillomavirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 2 in urinary bladder cancer.* J Med Virol 1998; 55: 262-267.

Gherdovich S, Barbacci R, Mitrione MP, y cols. *Detection of the human papillomavirus in hyperplastic and cancerous prostatic tissue with PCR.* Minerva Urol Nefrol 1997; 49: 73-77.

Gibas Z, Prout GR Jr, Connolly JG, y cols. *Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder*. *Cancer Res* 1984; 44: 1257-1264.

Gopalkrishna V, Srivastava AN, Hedau S, y cols. *Detection of human papillomavirus DNA sequences in cancer of the urinary bladder by in situ hybridisation and polymerase chain reaction*. *Genitourin Med* 1995; 71: 231-233.

Griffiths TR y Mellon JK. *Human papillomavirus and urological tumours: I. Basic science and role in penile cancer*. *BJU Int* 1999; 84: 579-586.

Griffiths TR y Mellon JK. *Human papillomavirus and urological tumours: II. Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer*. *BJU Int* 2000; 85: 211-217.

Guo CC, Fine SW y Epstein JI. *Noninvasive squamous lesions in the urinary bladder: A clinicopathologic analysis of 29 cases*. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 883-891.

Gutiérrez J, Jiménez A, Luna JD, y cols. *Meta-analysis of studies analyzing the relationship between bladder cancer and infection by human papillomavirus*. *J Urol* 2006; 176: 2474-2481.

Habel LA, Van Den Eeden SK, Sherman KJ, y cols. *Risk factors for incident and recurrent condylomata acuminata among women. A population-based study*. *Sex Transm Dis* 1998; 25: 285-292.

Hansemann D. *Ueber asymmetrische zelltheilung in epithelkrebsen und deren biologische bedeutung*. *Virchows Arch Pathol Anat* 1890; 119: 299-326.

- Hartge P, Silverman D, Hoover R, y cols. *Changing cigarette habits and bladder cancer risk: a case-control study*. J Natl Cancer Inst 1987; 78: 1119-1125.
- Hashimoto Y y Kitagawa HS. *In vitro neoplastic transformation of epithelial cells of rat urinary bladder by nitrosamines*. Nature 1974; 252: 497-499.
- Hasui Y, Osada Y, Kitada S, y cols. *Significance of invasion to the muscularis mucosae on the progression of superficial bladder cancer*. Urology 1994; 43: 782-786.
- Helal TE, Falel MT y El-Sayed NK. *Human Papilloma Virus and p53 expression in bladder cancer in Egypt: Relationship to Schistosomiasis and clinicopathologic factors*. Pathol Oncol Res 2006; 12: 173-178.
- Hellin T, Rodriguez Pichardo A y Ribera E. *Enfermedades de transmisión sexual*. En: Protocolos Clínicos de la SEIMC. Bouza ER, coord. 2002. p. 29. También disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/clinicos/> (Consulta 12/02/2008).
- Herr HW. *El tumor vesical T1*. En: Tratamiento del cáncer vesical. Casos prácticos de urología. 1995. p. 1-11.
- Hildesheim A y Wang SS. *Host and viral genetic and risk of cervical cáncer. A review*. Virus Res 2002; 89: 229-240.
- Ho GY, Studentsov Y, Hall CB, y cols. *Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the*

protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. J Infect Dis 2002; 186: 737-742.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, y cols. *p53 mutations in human cancers.* Science 1991; 253: 49-53.

Hudson MA y Herr HW. *Carcinoma in situ of the bladder.* J Urol 1995; 153: 564-572.

Huguet-Pérez J, Palou J, Millán-Rodríguez F, y cols. *Upper tract transitional cell carcinoma following cystectomy for bladder cancer.* Eur Urol 2001; 40: 318-323.

Iftner T y Villa LL. *Chapter 12 : Human papillomavirus technologies.* J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31: 80-88.

Ikenberg H, Gissmann L, Gross G, y cols. *Human papillomavirus type 16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis.* Int J Cancer 1983; 32: 563-565.

Ismail MT, Lattime EC y Gomelia LG. *Current management of superficial bladder cancer: BCG and beyond.* Monogr Urol 1998; 19: 33-55.

Kamel D, Paakko P, Pollanen R, y cols. *Human papillomavirus DNA and abnormal p53 expression in carcinoma of the urinary bladder.* APMIS 1995; 103: 331-338.

Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, y cols. *Epidemiological characteristic of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder.* Cancer Res 1988; 48: 3853-3855.

- Kaplinsky RS, Pranikoff K, Chasan S, y cols. *Indications of urethroscopy in male patients with penile condylomata*. J Urol 1995; 153: 1120-1121.
- Karem KL, Poon AC, Bierl C, y cols. *Optimization of a human papillomavirus-specific enzyme-linked immunosorbent assay*. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 577-582.
- Kawana K, Yasugi T, Kanda T, y cols. *Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia*. Biochen Biophys Res Commun 2002; 296: 102-105.
- Kawana K, Yasugi T, Yoshikawa H, y cols. *Evidence for the presence of neutralizing antibodies against human papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata*. Am J Perinatol 2003; 20: 11-16.
- Kelly K y Siebenlist V. *The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic cell*. J Clin Immunol 1985; 5: 65-77.
- Kempton CL, Kurtin PJ, Inwards DJ, y cols. *Malignant lymphoma of the bladder: evidence from 36 cases that low-grade lymphoma of the MALT-type is the most common primary bladder lymphoma* Am J Surg Pathol 1997; 21: 1324-1333.
- Kerley SW, Persons DL y Fishback JL. *Human papillomavirus and carcinoma of the urinary bladder*. Mod Pathol 1991; 4: 316-319.
- Khaled HM, Bahnassi AA, Zekri AR, y cols. *Correlation between p53 mutations and HPV in bilharzial bladder cancer*. Urol Oncol 2003; 21: 334-341.

Khaled HM, Raafat A, Mokhtar N, y cols. *Human papillomavirus infection and overexpression of p53 protein in bilharzial bladder cancer*. Tumori 2001; 87: 256-261.

Kitamura T, Yogo Y, Ueki T, y cols. *Presence of human papillomavirus type 16 genome in bladder carcinoma in situ of a patient with mild immunodeficiency*. Cancer Res 1988; 48: 7207-7211.

Knowles MA. *Human papillomavirus sequences are not detectable by Southern blotting or general primer-mediated polymerase chain reaction in transitional cell tumours of the bladder*. Urol Res 1992; 20: 297-301.

Koutsky L. *Epidemiology of genital human papillomavirus infection*. Am J Med 1997; 102: 3-8.

Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, y cols. *A controlled trial of human papillomavirus type 16 vaccine*. N Engl J Med 2002; 347: 1645-1651.

Kyo S, Inoue M, Koyama M, y cols. *Detection of high-risk human papillomavirus in the cervix and semen of sex partners*. J Infect Dis 1994; 170: 862-865.

La Vecchia C y Airoidi L. *Human bladder cancer: epidemiological, pathological and mechanistic aspects*. IARC Sci Publ 1999; 147: 139-157.

Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF, y cols. *Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guérin therapy: correlation to clinical outcome*. J Clin Oncol 1996; 14: 2646-2652.

- Lamarcq L, Deeds J, Ginzinger D, y cols. *Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening*. J Mol Diagn 2002; 4: 97-102.
- LaRue H, Simoneau M y Fradet Y. *Human papillomavirus in transitional cell carcinoma of the urinary bladder*. Clin Cancer Res 1995; 1: 435-440.
- Leonard C, Huret JL, y Groupe français de cytogénétique oncologique. *From cytogenetics to cytogenomics of bladder cancers*. Bull Cancer 2002; 89: 166-173.
- Levi F. *Cancer prevention: Epidemiology and perspectives*. Eur J Cancer 1999; 35: 1912-1924.
- Lewin F, Cardoso AP, Simardi LH, y cols. *Verrucous carcinoma of the bladder with koilocytosis unassociated with vesical schistosomiasis*. Sao Paulo Med J 2004; 122: 64-66.
- Lindeberg H y Elbrond O. *Malignant tumours in patients with a history of multiple laryngeal papillomas: The significance of irradiation*. Clin Otolaryngol Allied Sci 1991; 16: 149-151.
- López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, y cols. *State of cancer in Spain: incidence*. An Sist Sanit Navar 2004, 27: 165-173.
- Lopez-Beltran A y Escudero AL. *Human papillomavirus and bladder cancer*. Biomed Pharmacother 1997; 51: 252-257.
- Lopez-Beltran A, Escudero AL, Carrasco-Aznar JC, y cols. *Human papillomavirus infection and transitional cell carcinoma of the bladder. Immunohistochemistry and in situ hybridization*. Pathol Res

Pract 1996a; 192: 154-159.

Lopez-Beltran A, Escudero AL, Vicioso L, y cols. *Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients*. Br J Cancer 1996b; 73: 124-127.

Lopez-Beltran A y Munoz E. *Transitional cell carcinoma of the bladder: low incidence of human papillomavirus DNA detected by the polymerase chain reaction and in situ hybridization*. Histopathology 1995; 26: 565-569.

Lowy DR y Howley PM. *Papilomaviruses*. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, y cols., eds. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins 2001. 4th ed. p. 2-264.

Lu QL, Lalani el-N y Abel P. *Human papillomavirus 16 and 18 infection is absent in urinary bladder carcinomas*. Eur Urol 1997; 31: 428-432.

Ludwig M, Kochel HG, Fischer C, y cols. *Human papillomavirus in tissue of bladder and bladder carcinoma specimens. A preliminary study*. Eur Urol 1996; 30: 96-102.

Maloney KE, Wiener JS y Walther PJ. *Oncogenic human papillomaviruses are rarely associated with squamous cell carcinoma of the bladder: evaluation by differential polymerase chain reaction*. J Urol 1994; 151: 360-364.

Mantovani G, Cermelli C, Malagoli M, y cols. *IgG antibodies to papillomavirus genus-antigens in adult men with cancer of the urinary bladder*. New Microbiol 1994; 17: 1-8.

McGlennen RC. *Human papillomavirus oncogenesis*. Clin Lab Med 2000; 20: 383-406.

- Méndez-Álvarez S y Pérez-Roth E. *La PCR múltiple en microbiología clínica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 183-191.
- Messing EM. *Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma*. *Cancer Res* 1990; 50: 2530-2537.
- Metcalf D y Stanley ER. *Quantitative studies on the stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by normal human urine*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1969; 47: 453-466.
- Mincione GP, Messerini L, Saltutti C, y cols. *HPV and p53 in urinary bladder carcinoma*. *Pathologica* 1994; 86: 244-246.
- Moreno J, López JA, Redondo E, y cols. *Utilidad de la oncoproteína p53-IHQ en el seguimiento del carcinoma vesical: estudio a 5 años*. *Arch Esp Urol* 1999; 52: 662-674.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, y cols. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-273.
- Munger K y Howley PM. *Human papillomavirus immortalization and transformation functions*. *Virus Res* 2002; 89: 213-228.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, y cols. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-527.
- Murphy WM, Beckwith JB y Farrow GM. *Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures*. *Atlas of Tumor Pathology 3rd series* 1994; fascicle 11.

Mvula M, Iwasaka T, Iguchi A, y cols. *Do human papillomaviruses have a role in the pathogenesis of bladder carcinoma?* J Urol 1996; 155: 471-474.

Nakanishi K, Kawai T, Toricata C, y cols. *Immunohistochemical evaluation of p53 oncoprotein in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract.* Hum Pathol 1996; 27: 1336-1340.

Navon JD, Soliman H, Khonsari F, y cols. *Screening cystoscopy and survival of spinal cord injured patients with squamous cell cancer of the bladder.* J Urol 1997; 157: 2109-2111.

Neal DE, Marsh C, Bennett MK, y cols. *Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer. Comparison of invasive and superficial tumours.* Lancet 1985; 1: 366-368.

Noel JC, Peny MO, Mat O, y cols. *Human papillomavirus type 16 associated with multifocal transitional cell carcinomas of the bladder in two transplanted patients.* Transpl Int 1994a; 7: 340-343.

Noel JC, Thiry L, Verhest A, y cols. *Transitional cell carcinoma of the bladder: Evaluation of the role of human papillomaviruses.* Urology 1994b; 44: 671-675.

Nordenvall C, Chang ET, Adami HO, y cols. *Cancer risk among patients with condylomata acuminata.* Int J Cancer 2006; 119: 888-893.

Olatunbosun O, Deneer H y Pierson R. *Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction.* Obstet Gynecol 2001; 97: 357-360.

- Omer O, Erdem E, Atsu N, y cols. *Propuesta de cambio en la cistoscopia en pacientes con tumor vesical de bajo grado pTa*. Eur Urol (Ed Esp) 2001; 8: 98-100.
- Orth G, Favre M, Majewski S, y cols. *Epidermodysplasia verruciformis defines a subset of cutaneous human papillomaviruses*. J Virol 2001; 75: 4952-4953.
- Palefsky JM y Holly EA. *Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV*. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31: 41-46.
- Parkin DM, Pisani P y Ferlay J. *Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990*. Int J Cancer 1999; 80: 827-841.
- Peyrí E, Arango O y Álvarez R. *Lesiones tumorales cutáneas de los genitales masculinos*. 1999. ELFAR, S.A.-Laboratorios Drag. Barcelona.
- Pfister H. *Biology and biochemistry of papillomaviruses*. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1984; 99: 111-181.
- Pfister H. *Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer*. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31: 52-56.
- Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, y cols. *Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV*. Diagn Cytopathol 2003; 29: 149-155.
- Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, y cols. *Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis*. Nat Genet 2002; 32: 579-581.

Rhen L. *Blasengeschwultste bei Anilinarbeiten*. Arch Clin Chir 1895; 50: 588-600.

Rintala M, Pöllänen PP, Nikkanen VP, y cols. *Human papillomavirus DNA is found in the vas deferens*. J Infect Dis 2002; 185: 1664-1667.

Roden RB, Lowy DR y Schiller JT. *Papillomavirus is resistant to desiccation*. J Infect Dis 1997; 176: 1076-1079.

Roussel F, Picquenot JM y Rousseau O. *Identification of human papillomavirus antigen in a bladder tumor*. Acta Cytol 1991; 35: 273-276.

Saltzstein DR, Orihuela E, Kocurek JN, y cols. *Failure of the polymerase chain reaction (PCR) to detect human papilloma virus (HPV) in transitional cell carcinoma of the bladder*. Anticancer Res 1993; 13: 423-425.

Sato K, Moriyama M, Mori S, y cols. *An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma*. Cancer 1992; 70: 2493-2498.

Schairer C, Hartge P, Hoover RN. y cols. *Racial differences in bladder cancer risk: a case-control study*. Am J Epidemiol 1988; 128: 1027-1037.

Schatte E, Gruenenfelder J, Fradet Y, y cols. *Epidemiology of bladder cancer*. En: Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology. Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, y cols. eds. Source: Lippincott Williams & Wilkins, 2000 2ª ed. p. 282-288.

- Schulte PA, Ringen K, Hemstreet GP, y cols. *Risk factors for bladder cancer in a cohort exposed to aromatic amines*. *Cancer* 1986; 58: 2156-2162.
- Schwartz RA. *Verrucous carcinoma of the skin and mucosa*. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 1-21.
- Sherman ME. *Chapter 11: Future directions in cervical pathology*. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 72-79.
- Shibutani YF, Schoenberg MP, Carpiello VL, y cols. *Human papillomavirus associated with bladder cancer*. *Urology* 1992; 40: 15-17.
- Silverman DT, Hartge P, Morrison AS, y cols. *Epidemiology of bladder cancer*. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992; 6: 1-30.
- Silverman DT, Morrison AS y Devesa SS. *Bladder cancer*. En: *Cancer Epidemiology and Prevention*. Schottenfeld D y Fraumeni JF, eds. Nueva York: Oxford University Press, 1996. p. 1156-1179.
- Simoneau M, LaRue H y Fradet Y. *Low frequency of human papillomavirus infection in initial papillary bladder tumors*. *Urol Res* 1999; 27: 180-184.
- Smetana Z, Keller T, Leventon-Kriss S, y cols. *Presence of human papillomavirus in transitional cell carcinoma in Jewish population in Israel*. *Cell Mol Biol* 1995; 41: 1017-1023.
- Soll-Johanning H, Bach E, Olsen JH, y cols. *Cancer incidence in urban bus drivers and tramway employers: A retrospective cohort study*. *Occup Environ Med* 1998; 55: 594-598.

Spano JP, Marcelin AG y Carcelin G. *HPV and cancer*. Bull Cancer 2005; 92: 59-64.

Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, y cols. *Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder*. Cancer Res 1994; 54: 784-788.

Stoler MH, Schiffman M y Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS) Group. *Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: Realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study*. JAMA 2001; 285: 1500-1505.

Strickler HD, Burk R, Shah K, y cols. *A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma*. Cancer 1998; 82: 1118-1125.

Studentsov YY, Schiffman M, Strickler HD, y cols. *Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus*. J Clin Microbiol 2002; 40: 1755-1760.

Sur M, Cooper K y Allard U. *Investigation of human papillomavirus in transitional cell carcinomas of the urinary bladder in South Africa*. Pathology (Phila) 2001; 33: 17-20.

Swaminathan S y Reznikoff C. *Biochemical and molecular bladder cancer carcinogenesis*. En: Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology. Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, y cols. eds. Source: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 2ª ed. p. 289-297.

- Syrjänen S. *Human papillomavirus infections and oral tumors*. Med Microbiol Immunol 2003; 192: 123-128.
- Tekin MI, Tuncer S, Aki FT, y cols. *Human papillomavirus associated with bladder carcinoma? Analysis by polymerase chain reaction*. Int J Urol 1999; 6: 184-186.
- Tenti P, Zappatore R, Romagnoli S, y cols. *p53 overexpression and human papillomavirus infection in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: correlation with histological parameters*. J Pathol 1996; 178: 65-70.
- Tetu B, Fradet Y, Allard P, y cols. *Prevalence and clinical significance of HER-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer*. J Urol 1996; 155: 1784-1788.
- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, y cols. *Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors*, Oncogene 2003; 22: 1225-1237.
- Tomita Y, Shirasawa H y Simizu B. *Expression of human papillomavirus types 6b and 16 L1 open reading frames in Escherichia coli: detection of a 56,000-dalton polypeptide containing genus-specific (common) antigens*. J Virol 1987; 61: 2389-2394.
- Underwood M, Bartlett J, Reeves J, y cols. *C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors?*. Cancer Res. 1995; 55: 2422-2430.
- Van den Eeden SK, Habel LA, Sherman KJ, y cols. *Risk factors for incident and recurrent condyloma acuminata among men. A population-based study*. Sex Transm Dis 1998; 25: 285-292.

Vaskó J. *Prognosis in bladder cancer. A study of cytometric, morphometric and immunohistochemical techniques.* Scand J Urol Nephrol Suppl 1994; 160: 1-73.

Wade TR, Kopf AW y Ackerman AB. *Bowenoid papulosis of the penis.* Cancer 1978; 42: 1890-1903.

Walther M, O'Brien DP y Birch HW. *Condylomata acuminata and verrucous carcinoma of the bladder: case report and literature review.* J Urol 1986; 135: 362-365.

Ward EM, Burnett CA, Ruder A, y cols. *Industries and cancer.* Cancer Causes Control 1997; 8: 356-370.

Wee A, Teh M y Raju GC. *Clinical importance of p53 protein in gall bladder carcinoma and its precursor lesions.* J Clin Pathol 1994; 47: 453-456.

Westenend PJ, Stoop JA y Hendriks JG. *Human papillomaviruses 6/11, 16/18 and 31/33/51 are not associated with squamous cell carcinoma of the urinary bladder.* BJU Int 2001; 88: 198-201.

Wiener JS, Lui ET y Walther PJ. *Oncogenic human papillomavirus type 16 is associated with squamous cell cancer of the male urethra.* Cancer Res 1992; 52: 5018-5023.

Wilczynski SP, Oft M, Cook N, y cols. *Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix.* Hum Pathol 1993; 24: 96-102.

Witjes JA, Kiemeney LA, Oosterhof GO, y cols. *Prognostic factors in superficial bladder cancer. A review.* Eur Urol 1992; 21: 89-97.

- Wright C, Mellon K, Johnston P, y cols. *Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder*. Br J Cancer 1991; 63: 967-970.
- Xi LF, Toure P, Critchlow CW, y cols. *Prevalence of specific types of human papillomavirus and cervical squamous intraepithelial lesions in consecutive, previously unscreened, West-African women over 35 years of age*. Int J Cancer 2003; 103: 803-809.
- Yang H, Yang K, Khafagi A, y cols. *Sensitive detection of human papillomavirus in cervical, head/neck, and schistosomiasis-associated bladder malignancies*. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 7683-7688.
- Young RH. *Pathology of carcinomas of the urinary bladder*. En: Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology. Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, y cols. eds. Source: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 2ª ed. p. 310-21.
- Youshya S, Purdie K, Breuer J, y cols. *Does human papillomavirus play a role in the development of bladder transitional cell carcinoma? A comparison of PCR and immunohistochemical analysis*. J Clin Pathol 2005; 58: 207-210.
- Zhau HE, Zhang X, von Eschenbach AC, y cols. *Amplification and expression of the c-erbB-2/neu proto-oncogene in human bladder cancer*. Mol Carcinog 1990; 3: 254-257.
- Zur Hausen H. *Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer 2002; 2: 342-350.