

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**METILACIÓN ABERRANTE DEL GEN
p16^{INK4a} COMO MARCADOR TUMORAL
DEL CÁNCER VESICAL**

TESIS DOCTORAL

RAFAEL GALISTEO MOYA

Gf kqt<Wpkgtukf cf 'f g'I tpcfc0Vguku'F qevtcrqu
Cwqt<Tchcgn'I crkugq'O q{c
KUDP <; 9: /: 6/; 385/43; /3
WTK'j wr <lj f nj cpf ngpvgv1326: 31687: ; "

Los Doctores D. Armando Zuluaga Gómez, Catedrático de Urología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada; D^a. María Teresa Valenzuela Claros, Becaria postdoctoral del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y D. Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera, Catedrático de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Certifican:

Que el presente trabajo titulado: "Metilación aberrante del gen *p16^{INK4a}* como marcador tumoral del cáncer vesical", constituye la memoria presentada por D. Rafael Galisteo Moya para aspirar al grado de Doctor y ha sido realizada bajo nuestra dirección, reuniendo las condiciones necesarias para la obtención del Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.



Prof. Dr. Armando Zuluaga Gómez

M^a Teresa V C

Dra. María Teresa Valenzuela Claros



Prof. Dr. José Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera

Granada a 9 de mayo de 2003

AGRADECIMIENTOS

A D. Armando Zuluaga, por su apoyo constante y por su interés por encima de toda adversidad.

A D. Mariano Ruiz de Almodóvar, por su extraordinaria capacidad de trabajo y por su clarividencia científica.

A D^a. Maria Teresa Valenzuela, por su tesón, esfuerzo, paciencia y ganas de sacar este trabajo adelante, sin lo cual, esta memoria no hubiera visto la luz.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Urología del Hospital clínico San Cecilio, por el apoyo y colaboración que, desinteresadamente me han regalado.

Al personal de enfermería y auxiliares de la Sala de Urología, Litotricia y sobre todo al de Quirófano (Ana, Tomás, Marina, Paloma, Eugenia, Juan,...) sin cuya colaboración este estudio no habría sido posible.

A Lola Cabarroca, Pepi y Paqui, secretarias del Servicio de Urología que han facilitado extraordinariamente la localización y estudio de las historias clínicas.

A Mariquilla, Mari Luz y Carmen Vela, no sólo por su extraordinario ejemplo de entrega a los pacientes sino por su ayuda para facilitar las revisiones clínicas.

Al personal del Laboratorio de Investigaciones TumORAles "Mora Lara" del Hospital Clínico San Cecilio de Granada.

A D^a. Milagros Galisteo, por su valiosa colaboración.

A D. Antonio García Ríos por sus consejos para poder finalizar la tesis y sobre todo por ser el mago que ha puesto sentido informático a esta memoria.

A mi padre; su perseverancia, insistencia, apoyo y ejemplo me han ayudado a culminar este proyecto.

A mi familia.

A mis Amalias, por darme el tiempo y la paciencia para culminar este trabajo.

A todos los que, de alguna manera, han contribuido a la finalización de esta tesis.

A mi mujer
A mi hija

ÍNDICE

1.-INTRODUCCIÓN	1
1.1-EPIDEMIOLOGÍA	1
1.2-ETIOLOGÍA	2
1.2.1.- Exposición a las aminas aromáticas	2
1.2.2.- Tabaco	3
1.2.3.- Analgésicos	3
1.2.4.- Cistitis crónica	3
1.2.5.- Radioterapia pélvica	4
1.2.6.- Ciclofosfamida	4
1.2.7.- Metabolitos del triptófano	4
1.2.8.- Factores hereditarios	4
1.3- HISTOPATOLOGÍA	5
1.3.1.- Displasia urotelial	5
1.3.1.a.- Hiperplasia atípica	5
1.3.1.b.- Nidos de Von Brunn	5
1.3.1.c.- Cistitis Quística	5
1.3.1.d.- Cistitis Glandular	5
1.3.1.e.- Displasia	6
1.3.1.f.- Papiloma	6
1.3.1.g.- Papiloma invertido	6
1.3.1.h.- Metaplasia escamosa	6

1.3.1.i.- <i>Leucoplasia vesical</i>	6
1.3.2.- Carcinoma in situ (Cis)	6
1.3.3.- Carcinoma urotelial	7
1.3.4.- Carcinoma escamoso	7
1.3.5.- Adenocarcinoma	8
1.4.- PATRONES DE DISEMINACIÓN.....	8
1.4.1.- Extensión directa	8
1.4.2.- Diseminación metastásica	9
1.4.3.- Diseminación linfática	9
1.4.4.- Diseminación Vascular	9
1.4.5.- Implantación	10
1.5.- HISTORIA NATURAL	10
1.5.1.- Tumores superficiales	10
1.5.2.- Tumores infiltrantes	11
1.6.- INDICADORES DEL PRONÓSTICO	12
1.6.1.- Los indicadores clinicopatológicos.....	12
1.6.1.a.- <i>El grado histológico del tumor</i>	12
1.6.1.b.- <i>El estadio clínico-patológico</i>	13
1.6.1.c.- <i>La presencia de displasia urotelial o Carcinoma “in situ”</i>	13
1.6.1.d.- <i>Tamaño de la neoplasia</i>	13
1.6.1.e.- <i>La configuración de la neoplasia</i>	13
1.6.1.f.- <i>La multifocalidad</i>	13

1.6.1.g.- <i>La recurrencia tumoral</i>	13
1.6.2.- <i>Parámetros de laboratorio</i>	14
1.6.2.a.- <i>Expresión del antígeno de Thompson-Friedenreich (T)</i>	14
1.6.2.b.- <i>Antígenos de grupo sanguíneo ABH</i>	14
1.6.2.c.- <i>Receptores para factores de crecimiento epidérmicos</i>	14
1.6.2.d.- <i>Otros antígenos tumorales</i>	15
1.6.2.e.- <i>Moléculas de matriz extracelular y de adhesión celular</i>	15
1.6.2.f.- <i>Anormalidades cromosómicas</i>	16
1.6.2.g.- <i>Marcadores de proliferación</i>	17
1.7.- SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA	17
1.8.- DIAGNÓSTICO	18
1.8.1.- Pruebas citológicas	18
1.8.2.- Urografía intravenosa	19
1.8.3.- Ultrasonografía	19
1.8.4.- Uretrocistoscopia	20
1.9.- DIAGNÓSTICO PRECOZ	20
1.10.- ESTADIAJE TUMORAL	21
1.10.1.- Objetivos del estadiaje	21
1.10.2.- Técnicas complementarias y estadio	22
1.10.2.a.- <i>Tomografía Axial Computerizada (TAC)</i>	22

1.10.2.b.- Resonancia Nuclear Magnética (RNM)	22
1.10.2.c.- Ecografía	22
1.10.2.d.- Linfografía	23
1.10.2.e.- Rastreo torácico con radiografía y TAC	23
1.10.2.f.-Rastreo óseo	23
1.10.3.- Sistemas de estadificación	23
1.10.3.a.- Jewett- Strong-Marshall (JSM)	23
1.10.3.b.-Tumor-nódulos linfáticos - metástasis (TNM)	24
1.11.-TRATAMIENTO DEL CÁNCER VESICAL	24
1.11.1.- Cáncer vesical superficial: Estadios 0 y A	24
1.11.1.a.- Resección de los tumores vesicales	24
1.11.1.b.- Tratamientos adyuvantes	26
1.11.1.c.- Seguimiento de los pacientes	32
1.11.2.- Cáncer vesical invasor (estadios T2-T4, N0-N2)	33
1.11.2.a.- La preservación vesical	33
1.11.2.b.- La reconstrucción vesical	39
1.11.3.- Enfermedad metastásica: estadios N3 M1	46
1.11.3.a.- Quimioterapia citotóxica	46
1.11.3.b.- Paclitaxel (Taxol)	47
1.11.3.c.- Ifosfamida	47

1.11.3.d.- Nitrato de Galio	47
1.11.3.e.- Inmunoterapia y cáncer vesical metastático	47
1.11.4.- Tratamiento paliativo del cancer vesical	48
1.11.4.a.- Radioterapia paliativa	48
1.11.4.b.- Instilación intravesical de aluminio o formol	48
1.11.4.c.- Embolización paliativa de la arteria hipogástrica y cistectomía paliativa	48
1.11.5.- Predictores de progresión del cáncer vesical invasor	49
1.11.5.a.- Predicción de metástasis linfática y de la invasión a distancia	49
1.11.5.b.- Predictores de quimiosensibilidad o quimioresistencia	49
1.11.5.c.- Expresión de p53 nuclear y otros marcadores moleculares de pronóstico.....	49
1.12.-MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER	50
1.12.1.- Metilación en genes supresores de tumores	51
1.12.2.- Metilación de receptores de señales, o de proteínas incluidas en rutas de señalización	52
1.12.3.- Metilación en genes relacionados con los mecanismos de control del ciclo celular	52
1.12.4.- Metilación de promotores de genes implicados en la reparación del ADN	53
1.12.5.- Papel de la ADN metil transferasa	54

1.12.6.- Diversas alteraciones moleculares pueden detectarse en el tumor y en el suero de pacientes afectos de cáncer	55
1.12.7.- La hipermetilación de promotores de genes como diana terapéutica .	56
2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
2.1.-HIPÓTESIS	61
2.2.- OBJETIVOS	62
3.-MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1.-PACIENTES Y CONTROLES	65
3.1.1.- Duración y fuentes del material de estudio	65
3.1.1.a.- Datos clínicos	65
3.1.1.b.- Datos analíticos	65
3.1.2.- Características de los pacientes y de los controles	65
3.1.2.a.- Pacientes	66
3.1.2.b.- Grupo control	68
3.1.3.- Tiempo de seguimiento	69
3.1.4.- Estudio anatomopatológico de las biopsias tumorales.....	69
3.2.- MÉTODO	71
3.2.1.- Método clínico-patológico	71
3.2.2.- Métodos analíticos in vitro	74
3.2.2.a.- Epigenotipo del ADN de líneas celulares y tumores	74

3.2.2.b.- Extracción del ADN de la muestra de suero y del tumor de los sujetos incluidos en el estudio	74
3.2.2.c.-Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación:MSP. 76	
3.2.3.- Métodos radiobiológicos <i>in vitro</i> : Lesión molecular inicial radioinducida	80
3.2.3.a.- Células obtenidas a partir del tumor vesical	80
3.2.3.b.- Células obtenidas a partir de sangre	80
3.2.3.c.- Irradiación	81
3.2.3.d.- Preparación de los plugs de agarosa	81
3.2.3.e.- Lisis de las células incluidas en moldes	81
3.2.3.f.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	82
3.2.3.g.- Método de análisis de imagen	82
3.2.3.h.- Método semicuantitativo de análisis de la lesión inicial	83
3.2.3.i.- Método cuantitativo de análisis de la lesión inicial	84
3.2.4.- Métodos estadísticos	86
3.2.4.a.- Análisis estadístico descriptivo	87
3.2.4.b.- Test estadístico de homogeneidad de dos muestras cualitativas.....	87
3.2.4.c.- Test estadístico de homogeneidad de varias muestras cualitativas....	87
3.2.4.d.- Tablas de vida de prosecución (Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia)	87
3.2.4.e.- Regresión lineal	88

4.- RESULTADOS	89
4.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	91
4.1.1.- Datos personales	91
<i>4.1.1.a.- Sexo</i>	91
<i>4.1.1.b.- Edad</i>	91
<i>4.1.1.c.- Tabaquismo</i>	92
4.1.2.- Antecedentes personales y familiares	92
<i>4.1.2.a.- Patologías anteriores</i>	93
<i>4.1.2.b.- Patologías concomitantes</i>	93
<i>4.1.2.c.- Tratamientos</i>	94
4.1.3.- Parámetros analíticos	95
4.1.4.- Síntomas urinarios	96
4.1.5.- Tratamiento antitumoral recibido	97
<i>4.1.5.a.- Cirugía</i>	97
<i>4.1.5.b.- Radioterapia</i>	98
<i>4.1.5.c.- Quimioterapia</i>	99
4.1.6.- Anatomía patológica de los casos de cáncer vesical incluidos en este estudio	100
4.1.7.- Seguimiento y supervivencia	101
<i>4.1.7.a.- Supervivencia y grado de diferenciación celular "G"</i>	103

4.1.7.b.- Supervivencia y grado de infiltración en la pared vesical "T".....	104
4.1.7.c.- Supervivencia e invasión vascular	105
4.1.7.d.- Supervivencia y multifocalidad	106
4.1.7.e.- Supervivencia y Tratamiento en tumores superficiales	106
4.1.7.f.- Supervivencia y Tratamiento en tumores infiltrantes	107
4.2.-CARACTERÍSTICAS DE LOS CONTROLES	108
4.2.1.- Datos personales	108
4.2.1.a.- Sexo	108
4.2.1.b.- Edad	108
4.2.1.c.- Tabaquismo	109
4.2.2.- Antecedentes personales	110
4.2.2.a.- Patologías anteriores	110
4.2.2.b.- Patologías concomitantes	110
4.2.3.- Parámetros analíticos	111
4.2.4.- Síntomas urinarios	112
4.3.- DETERMINACIÓN EN SUERO DEL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ INACTIVADO POR METILACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE VEJIGA	113
4.3.1.- Epigenotipo del ADN de líneas celulares tumorales	113
4.3.2.- Sensibilidad del ensayo MSP	114

4.3.3.- Determinación del estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en el suero de enfermos afectos de cáncer vesical	116
4.3.3.a.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y edad	117
4.3.3.b.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y tabaquismo	118
4.3.3.c.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y características anatomopatológicas	118
4.3.3.d.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y parámetros analíticos en el momento del diagnóstico	122
4.3.3.e.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y síntomas urinarios en el momento del diagnóstico	123
4.4.- DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ EN LA PIEZA TUMORAL DE ENFERMOS AFECTOS DE CÁNCER VESICAL	123
4.4.1.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en tumor y características anatomopatológicas	124
4.4.1.a.- Tipo de tumor	124
4.4.1.b.- Grado	124
4.4.1.c.- T	125
4.4.1.d.- N y M	125
4.4.1.d.- JSM	126
4.4.1.e.- Invasión vascular y Multicentricidad	126
4.4.1.f.- Localización	127

4.4.2.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en tumor y parámetros analíticos en el momento del diagnóstico	128
4.4.3.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en tumor y síntomas urinarios en el momento del diagnóstico	128
4.5.- RELACION ENTRE EL ESTATUS DE METILACIÓN EN EL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ DETERMINADO EN SUERO Y EN EL TUMOR DE UN MISMO PACIENTE AFECTO DE CÁNCER VESICAL	128
4.6.- DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ EN EL SUERO Y BIOPSIAS DE VEJIGA DE LOS CONTROLES	129
4.6.1.- Utilidad como marcador tumoral sérico del promotor de $p16^{INK4a}$ en el diagnóstico de los pacientes afectados de cáncer vesical	130
4.6.2.- Utilidad como marcador tumoral sérico del promotor de $p16^{INK4a}$ en el seguimiento de los pacientes afectados de cáncer vesical.	131
4.7.- PERFIL EPIGENÉTICO DE LA PATOLOGÍA VESICAL TUMORAL..	133
4.7.1. Perfil epigenético del cáncer vesical	134
4.7.2.- Frecuencia de metilación de los promotores evaluados en los tumores de cáncer vesical	135
4.7.3.- Asociación entre patrón de metilación y parámetros anatomopatológicos.....	137
4.7.4.- Asociación entre genes metilados en tumor y recidiva.....	137
4.7.4.a.- $p16^{INK4a}$ y probabilidad de recidiva	137
4.7.4.b.- $hMLH1$ y probabilidad de recidiva	138

4.7.4.c.- $\sigma 14-3-3$ y probabilidad de recidiva	138
4.7.4.d.- RAR- β y probabilidad de recidiva	139
4.7.4.e.- Twist y probabilidad de recidiva	139
4.7.5.- Asociación entre índice de metilación (IM) y probabilidad de recidiva	140
4.7.6.- Evaluación del perfil epigenético de la patología vesical tumoral en el tumor primario y en las recidivas	140
4.8. SENSIBILIDAD A LA RADIACIÓN IONIZANTE DE LOS PACIENTES AFECTOS DE CÁNCER VESICAL	142
4.8.1.- Radiosensibilidad tumoral	142
4.8.2.- Radiosensibilidad del tejido sano (linfocitos)	142
4.8.3.- Correlación entre la radiosensibilidad tumoral y la radiosensibilidad del tejido sano en un mismo paciente	143
4.8.4.- Comparación entre la radiosensibilidad del tejido sano de pacientes con neoplasias de distinto origen	143
5.- DISCUSIÓN.....	145
5.1.- INTRODUCCIÓN.....	147
5.1.1.- Marcadores tumorales séricos y cáncer genito-urinario.....	150
5.1.2.- Marcadores tumorales basados en la cuantificación de ADN.....	151
5.1.3.- Alteraciones de ADN y métodos de detección.....	152
5.1.4.- Marcadores tumorales derivados del estudio del ADN circulante en pacientes afectos de cáncer urológico.....	154

5.2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN NUESTRA SERIE.....	155
5.2.1.- Etiología.....	155
5.2.1.a.- Género.....	156
5.2.1.b.- Tabaquismo.....	156
5.2.2.- Sintomatología clínica.....	157
5.2.3.- Diagnóstico, tratamiento y sus complicaciones.....	159
5.2.4.- Seguimiento, supervivencia y supervivencia libre de enfermedad.....	161
5.2.4.a.- Grado de diferenciación del tumor.....	164
5.2.4.b.- Invasión "T" del tumor en la pared vesical.....	164
5.2.4.c.- Invasión vascular.....	164
5.2.4.d.- Multicentricidad.....	165
5.2.4.e.- Tratamiento.....	165
5.3.- VALORACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ COMO MARCADOR TUMORAL EN CÁNCER VESICAL.....	166
5.3.1.- Marcadores moleculares para el estudio del cáncer.....	166
5.3.2.- $p16^{INK4a}$ sérico como marcador tumoral vesical.....	168
5.3.2.a.- Comentario editorial al artículo.....	172
5.4.- ESTADO DE METILACIÓN Y CÁNCER VESICAL.....	174
5.5.- PERSPECTIVAS.....	176
5.5.1.- Las 'firmas' moleculares de cada tumor serán dianas terapéuticas.....	177

Anexo 1.....	179
6.- CONCLUSIONES.....	189
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	195

INTRODUCCIÓN

1.-INTRODUCCIÓN

En todo órgano de la anatomía humana se pueden originar neoformaciones primarias a partir de cualquiera de sus estructuras celulares (tanto de extirpe epitelial como de extirpe mesenquimal) y también, asentar tumores metastásicos. La vejiga queda sujeta a este enunciado básico de la biología del cáncer pero, sin embargo, el 98% de los tumores vesicales tienen su origen en el epitelio mucoso, siendo, por lo tanto, carcinomas. De este 98%, el 90% son uroteliales o transicionales, el 6% son epidermoides y el 2% son adenocarcinomas (Martínez Piñeiro, 1970 y 1993).

1.1-EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer vesical supone, aproximadamente, el 2% de todos los tumores malignos; siendo el quinto más frecuente en los varones occidentales y el octavo en las mujeres. Es el segundo cáncer más frecuente dentro de la patología urológica en los hombres y el primero en mujeres. Es uno de los tumores con menor variabilidad geográfica con una relación de 6:1 entre los países de mayor y menor frecuencia.

El "Libro blanco de la Oncología Española" (Martínez García, 1988) calculó para España en 1986 una incidencia de 7.733 nuevos casos es decir, 19,5 nuevos casos por cada 100.000 habitantes y año. La tasa de mortalidad fue, en el periodo 1975-1979, de 5,3 por cada 100.000 habitantes y año. En EEUU en 1988 la American Cancer Society calculó una incidencia de 16 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año con un total de 46.400 nuevos casos, y 10.400 muertes (Martínez Piñeiro, 1993). Diez años después, este mismo organismo, establece una incidencia de 54.000 casos con una mortalidad próxima a los 12.000 (Lee y Droller, 2000). Estas cifras ponen de manifiesto cierta tendencia al aumento de la incidencia y una mayor esperanza de vida. Quizás ambos factores están ligados a una mejora de la atención sanitaria y a la modernización de la estrategia diagnóstica que permite la detección de la enfermedad tumoral en estadios superficiales cuya respuesta al tratamiento es más favorable.

En la presentación de la enfermedad por razas (siendo esto representativo en EEUU) en blancos es más frecuente que en negros en una proporción 16: 8 por 100.000 habitantes. (Si bien es un factor en estudio por el sesgo socioeconómico que se plasma en una mayor mortalidad en la raza negra) (Catalona, 1994).

Si estudiamos la distribución por sexo la incidencia es netamente superior en hombres con una proporción de 3:1 en los países occidentales más industrializados. En España la tardía incorporación de la mujer al mundo laboral y al hábito tabáquico, así como el largo periodo de latencia de los carcinógenos, hacen que en 1970 la proporción sea de 8:1 (Cifuentes y

cols., 1982) y en estudios prospectivos más recientes oscile entre 5,5:1 y 8,7:1 (Sánchez de la Muela y cols., 1991).

La relación del cáncer vesical con la edad, adopta la forma de curva exponencial con un aumento progresivo en ambos sexos y con un pico máximo que aparece entre los 60-70 años. En este intervalo de tiempo se dan el 50% de los casos (Martínez Piñeiro, 1970; Martínez García, 1988; Cifuentes y cols., 1982). El cáncer vesical en menores de 30 años es infrecuente y, habitualmente, se asocia a patrones histológicos de buena diferenciación. Sin embargo, estos pacientes deben de ser tratados independientemente del factor edad (Martínez Piñeiro, 1993). El progresivo incremento de la esperanza de vida de la población en los países occidentales justifica el sensible aumento de la incidencia, que de esta patología, se ha observado en los últimos años.

1.2-ETIOLOGÍA

El cáncer vesical es una enfermedad de bases genéticas y epigenéticas en la que los mecanismos elementales que regulan la diferenciación y la proliferación celulares están afectados. Estas alteraciones se pueden atribuir a trastornos del material génico del huésped, ya heredados, ya adquiridos. Así, algunos mecanismos que conducen a un estímulo continuado de la proliferación celular cuya consecuencia puede ser el desarrollo de cáncer pueden ser la inducción de oncogenes por carcinógenos químicos, la anulación de genes tumor supresor y la amplificación o sobreexpresión de los genes que codifican factores de crecimiento o receptores (Lee y Droller, 2000).

Los principales agentes carcinógenos que se han relacionado con las neoplasias vesicales son: El tabaquismo, la exposición profesional a las aminas aromáticas, sondas y cálculos vesicales, parasitosis (*Schistosoma haematobium*), ingesta de analgésicos, edulcorantes, fármacos citotóxicos y radioterapia pélvica, entre otros. Anomalías en el ADN en relación con el cáncer vesical, se han descrito en diferentes cromosomas (1, 5, 7, 9, 11, 17, 18 y 21) (Catalona, 1994). La exposición repetida a carcinógenos puede provocar lesiones en el material genético que favorezcan la aparición del tumor.

Entre los factores que, etiológicamente, han sido relacionados con el cáncer vesical se describirán los siguientes:

1.2.1.- Exposición a las aminas aromáticas

En la industria un gran número de profesionales tienen contacto directo con una serie de compuestos aromáticos cuya relación con el cáncer vesical fue postulada a fines del siglo XIX (Rehn, 1895). Entre otros, la asociación se ha descrito con: anilinas, 2-naftilamina (presente en el humo del cigarrillo), benzidina, xenilamina (4-aminobifenilo), 4-nitrobifenilo, 2-amino-1-naftol, hidrocarburos alifáticos clorados, el hollín, aldehídos como la acroleína, etc. Se ha estimado que el tiempo de latencia del cáncer vesical es de 30-50 años y que la carcinogénesis química puede ser la causa del 25-30% de los tumores vesicales.

Los colectivos más afectados son los de aquellas personas que trabajan habitualmente con productos químicos como pintores y trabajadores de la industria textil, cuero, automóviles, hilo, papel, sogas, limpieza en seco, peluqueros y cosmetólogos (Messing y Catalana, 1998).

De hecho existe una relación entre el índice de afectación de personas con cáncer vesical y el nivel de exposición al carcinógeno, fenómeno que es dosis dependiente.

1.2.2.- Tabaco

Se ha comprobado que la incidencia del cáncer vesical es 4 veces mayor en el fumador que en el no fumador y, además, se ha vinculado al tabaco como responsable directo del 30% de los tumores vesicales. Los diferentes estudios epidemiológicos muestran que el riesgo de cáncer vesical es directamente proporcional al tiempo que dura el hábito, al número de cigarrillos consumidos y a la cantidad de humo inhalado.

Se desconoce qué carcinógeno específico existente en el tabaco es responsable del cáncer de vejiga aunque se ha supuesto que sean la 2-naftilamina, el 4-aminobifenil y las nitrosaminas presentes en el humo. También se ha relacionado esta neoplasia con el aumento de metabolitos del triptófano en orina, aunque se desconoce con certidumbre si estos últimos son o no carcinógenos (Messing y Catalana, 1998).

Tampoco se conoce si el tabaquismo altera el curso clínico del cáncer vesical o si se asocia específicamente con diferentes tipos de cáncer. Lo que sí se está valorando son factores propios del huésped que pudieran explicar la aparición de la enfermedad a través de diferencias en las vías metabólicas de las aminas aromáticas. Los metabolitos de las aminas N-hidroxiladas son cancerígenos mientras que los de las N-acetiladas no. Además, el gen de la N-acetiltransferasa, no dominante, (NAT2) genera la principal encima acetiladora del urotelio, por lo que los homocigotos del alelo NAT2 son menos susceptibles de presentar procesos malignos (Lee y Droller, 2000).

1.2.3.- Analgésicos

Se ha comprobado mayor incidencia de cáncer vesical en aquellas personas que consumen analgésicos como la FENACETINA, cuya molécula corresponde también a una amina aromática. El incremento de riesgo en mujeres consumidoras habituales de este fármaco, según datos de Gil y colaboradores (1988), puede llegar a ser de hasta 2,6 veces mayor respecto al grupo control.

1.2.4.- Cistitis crónica

En pacientes portadores de sonda permanente, con litiasis vesical o con infección vesical crónica, se ha descrito mayor incidencia de adenocarcinoma escamoso vesical. Así, entre el 2 y el 10% de parapléjicos, en los que es necesaria la utilización de sonda permanente, desarrollan cáncer vesical siendo, el 80% de éstos, escamosos.

Entre las infecciones crónicas es significativo el hecho de que en Egipto el tipo de cáncer vesical más frecuente sea el escamoso, hecho que se relaciona con la elevada incidencia en dicho país de parasitosis por el *Schistosoma haematobium*. El carcinógeno, en estos casos, parece ser la presencia incrementada de nitritos en la orina de estos pacientes como fruto del metabolismo microbiológico o parasitario. También se ha investigado el papel del papilomavirus humano (PVH) que se ha encontrado que en el 7 al 35% de los tumores vesicales analizados (Messing y Catalona, 1998).

1.2.5.- Radioterapia pélvica

Se ha considerado la irradiación de la vejiga urinaria como factor etiológico del cáncer vesical, tras observar que las mujeres con tumores pélvicos ginecológicos tratados con radioterapia presentan de 2 a 4 veces mayor riesgo de padecer cáncer vesical. Estos tumores relacionados con la radiación suelen ser más agresivos y más indiferenciados (Messing y Catalona, 1998).

1.2.6.- Ciclofosfamida

Los pacientes tratados con este citostático presentan un riesgo de cáncer vesical 4.5 veces superior con respecto al grupo control. Se ha postulado que la acroleína, metabolito de la ciclofosfamida, sería responsable del tumor vesical; además se ha comprobado que en pacientes tratados con ciclofosfamida, la administración simultánea de un protector con grupos sulfhidrilos, el ácido 2-mercaptoetanosulfónico (MESNA), reduce el riesgo en pacientes de cáncer vesical (Fairechild y cols., 1979).

1.2.7.- Metabolitos del triptófano

Aunque no se ha establecido una clara relación causa-efecto entre estas sustancias y el cáncer vesical, sí se ha documentado el aumento de estos metabolitos en la orina de los pacientes con esta neoplasia. Los metabolitos del triptófano también se han correlacionado con la recurrencia de los tumores superficiales ya que la administración de piridoxina, sustancia que neutraliza la vía metabólica de estas sustancias, reduce importantemente los índices de recurrencia en estos tumores (Messing y Catalona, 1998).

1.2.8.- Factores hereditarios

Son pocos los datos que permiten pensar que existan factores genéticos hereditarios implicados en el desarrollo del cáncer vesical. Se han descrito racimos familiares de cáncer vesical relacionados con exposición similar a los mismos factores de riesgo. Además se ha visto una incidencia aumentada de HLA-B 25 y CW-4 en pacientes con cáncer vesical aunque estos datos no tienen consistencia científica (Catalona, 1994).

1.3- HISTOPATOLOGÍA

El urotelio vesical es un epitelio de transición de hasta siete capas de espesor. Se observa una membrana basal con lámina propia y con una muscularis mucosae. Sobre la membrana basal se apoyan una o más capas de células intermedias y una capa superficial formada por células planas y grandes en forma de sombrilla. Los ejes longitudinales de los núcleos ovalados son perpendiculares a la membrana basal dándole un típico aspecto de polaridad. (Angulo y cols., 1995)

1.3.1.- Displasia urotelial

Ante la irritación, la inflamación o la exposición reiterada a carcinógenos, se producen unos cambios morfológicos en el urotelio que pueden identificarse como:

1.3.1.a.- Hiperplasia atípica

Aumento de capas celulares con pequeña alteración de núcleos y desorganización parcial de la capa de células en sombrilla y de la arquitectura urotelial (Koss y cols., 1974). Se ha comprobado que la presencia de atipia en urotelio vecino a las lesiones cancerosas en pacientes con cáncer vesical, se asocia a riesgo de desarrollo de enfermedad invasora en un 35-40% de los casos (Althausen y cols., 1976).

1.3.1.b.- Nidos de Von Brunn

Se trata de una displasia en la que se visualizan islotes de urotelio normal localizados a nivel submucoso. Este hallazgo se observa en el urotelio supramontanal y se detecta en el 90% de vejigas estudiadas en necropsias (Kierman y Gafney, 1987).

1.3.1.c.- Cistitis Quística

Displasia urotelial consistente en la presencia de material licuado eosinófilo en el centro de los nidos. Se observa en el 60% de vejigas estudiadas en autopsia (Wiener y cols., 1979).

1.3.1.d.- Cistitis Glandular

Es una displasia en la que se observan islotes de urotelio con metaplasia glandular submucoso con el centro eosinófilo. Esta lesión puede ser precursora del adenocarcinoma vesical y suele asociarse a lipomatosis pelviana (Gordon y cols., 1990).

1.3.1.e.- Displasia

Este término supone una alteración de la polaridad del urotelio y no supone aumento de capas de epitelio ni aumento de figuras mitóticas. Según lo cuantioso de la alteración hablaremos de displasia leve, moderada o grave, siendo esta última difícil de distinguir del carcinoma *in situ*.

1.3.1.f.- Papiloma

Tumor papilar constituido por una delicada zona central estromal fibrovascular recubierta de urotelio normal.

1.3.1.g.- Papiloma invertido

Es un papiloma cuyas papilas se proyectan hacia el estroma fibrovascular en lugar de protruir a la luz vesical (endofítica). La lesión también se recubre de urotelio normal. En casos excepcionales se ha descrito malignización (Lazarevic y Garret, 1978).

1.3.1.h.- Metaplasia escamosa

Lesión proliferativa en la que el urotelio normal es sustituido por epitelio escamoso maduro no queratinizado. Su potencial premaligno es muy dudoso y se observa en casi la mitad de las mujeres y en el 10% de los hombres sometidos a autopsias (Wiener y cols., 1979).

1.3.1.i.- Leucoplasia vesical

Queratinización de un epitelio normalmente no queratinizado. Supone una metaplasia escamosa con pronunciada queratinización, crecimiento hacia abajo de papilas dérmicas (acantosis), atipia celular y displasia. Es considerada una lesión premaligna o centinela de tumor en otra localización vesical pues es la respuesta del urotelio a una fuerte agresión. Hasta en un 20% de casos degenera en carcinoma escamoso vesical (Benson y cols., 1984).

1.3.2.- Carcinoma in situ (Cis)

Se manifiesta cistoscópicamente como una placa eritematosa aterciopelada y a menudo resulta invisible. Histológicamente es un carcinoma de epitelio transicional pobremente diferenciado pero confinado al urotelio (Utz y Farrow, 1984). La escasa cohesión intercelular que presenta, hace que sea detectable mediante estudios citopatológicos de orina en un 80-90% de casos. Es más frecuente en varones y puede ser asintomático o manifestarse

como síndrome cistítico (disuria, polaquiuria y urgencia), por lo que el diagnóstico diferencial se establecerá con las siguientes entidades: infección urinaria, cistitis intersticial, prostatismo y vejiga neurógena. Se asocia a un pronóstico favorable aunque existe riesgo de progresión y recurrencia tumoral.

1.3.3.- Carcinoma urotelial

Más del 90% de los tumores vesicales son de células transicionales y se caracterizan por mayor cantidad de capas celulares con invaginaciones papilares de la mucosa, pérdida de la polaridad celular, maduración celular anormal, células gigantes, hacinamiento nuclear, nucleolos prominentes, cúmulos de cromatina y aumento del número de mitosis (Koss, 1975). Estos tumores pueden presentar diferentes patrones de crecimiento macroscópico: papilar (70%), sesil infiltrante, nodular (10%), mixto (20%) e intraepitelial plano. A menudo, el diagnóstico tumoral está muy refinado con el de la propia normalidad ya que la membrana basal está poco definida, lo que hace difícil valorar una posible invasión de la lámina propia. También puede ser difícil de discriminar la afectación de la *muscularis mucosae* de la afectación del propio detrusor (Engel y cols., 1992).

Aproximadamente en la tercera parte de los tumores vesicales pueden encontrarse células fusiformes, células escamosas o componentes adenocarcinomatoides, fruto de la alta capacidad metaplasizante del urotelio.

Aunque no existe una gradación del tumor vesical universalmente aceptada, los sistemas más utilizados consideran tres grados en función de la anaplasia del urotelio y que se corresponden a tumores bien, moderadamente o mal diferenciados (grados I, II y III respectivamente) (Friedel y cols., 1980). Existe una firme correlación entre grado y estadio tumoral (Jewett y Strong, 1946) de manera que la mayoría de neoplasias bien diferenciadas corresponden a tumores superficiales y la mayoría de tumores mal diferenciados se corresponden con neoplasias invasoras. Para tumores de un mismo estadio, existe una correlación significativa entre grado y pronóstico aunque más firme aún es la correlación entre estadio tumoral y pronóstico.

Además existen datos citogenéticos y moleculares suficientemente fuertes como para afirmar un origen diferente para los tumores de bajo grado (superficiales) y los de alto grado (invasores) como son, respectivamente, la pérdida o alteración de uno o varios genes supresores de tumor del cromosoma 9 y las alteraciones de p53 (Spruck y cols., 1994).

1.3.4.- Carcinoma escamoso

Constituyen en nuestro entorno el 6% de los tumores vesicales aunque su prevalencia varía según la geografía y en función de los factores de riesgo. Así, en Egipto, por la alta prevalencia de esquistosomiasis, este tipo constituye el 75% de los tumores vesicales.

Los tumores relacionados con *Schistosoma* afectan a personas 10-20 años más jóvenes que los transicionales y son lesiones exofíticas nodulares bien diferenciadas y con una baja

agresividad probablemente por ser tumores de bajo grado (El-Bolkainy y cols., 1981). Los no producidos por este parásito parecen derivar de la irritación vesical crónica.

Histopatológicamente, el cáncer escamoso se caracteriza por presentar células queratinizadas con agregados concéntricos llamados perlas escamosas y a menudo se asocia a metaplasia escamosa y Cis.

1.3.5.- Adenocarcinoma

Constituye apenas el 2% de los tumores vesicales y puede presentarse en los conductos o derivaciones intestinales continentales. Pueden ser papilares o sólidos y se caracterizan por aparición de células en anillo de sello que provocan una limitis plástica vesical. A menudo se asocian a cistitis glandular y habitualmente son poco diferenciados y de carácter invasor. Suelen asentarse en base-trígono, paredes laterales contiguas al anterior y en cúpula.

Con frecuencia se muestran como tumores metastáticos en recto, estómago, endometrio, mama, próstata y ovarios, y como carcinoma del uraco.

1.4.- PATRONES DE DISEMINACIÓN

1.4.1.- Extensión directa

El proceso de invasión tumoral es un mecanismo en el que la célula urotelial maligna consigue atravesar la membrana basal alcanzando el tejido conectivo de la lámina propia y posteriormente alcanzar el músculo vesical y la grasa perivesical. En este proceso se ponen en marcha diferentes mecanismos en los que participa la neoangiogénesis, la proteólisis por secreción de colagenasas, el incremento de la motilidad celular y de la proliferación, así como la disminución de los factores de cohesión intercelulares. Todo esto parece combinarse con una disminución de la vigilancia local por parte del sistema inmune.

Se ha comprobado que las células malignas uroteliales secretan proteasas, como la colagenasa tipo IV, que puede romper el tejido conectivo de la membrana basal y favorecer el paso de las células neoplásicas a través de la lámina propia. La expresión de colagenasa IV en muestras de tumores uroteliales humanos se ha asociado a histología tumoral invasiva (Liu y Liotta, 1992).

También se ha investigado la presencia de receptores de factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) en células endoteliales y en células uroteliales malignas como señales endo/paracrinas capaces de inducir motilidad en las células uroteliales cancerosas (Korman y cols., 1996).

En ese sentido, también se ha mencionado la importancia de las moléculas de adhesión intracelular (integrinas y cadherinas) y de la integridad de los receptores del factor de crecimiento epitelial y su relación con el pronóstico de la enfermedad.

Son tres los mecanismos de extensión directa del tumor vesical. El más común (60%) es en bloque, a modo de frente activo invasor que progresa directamente por debajo de la lesión primaria. Le sigue en frecuencia la invasión tentacular en un 25% de los casos. La menos frecuente (10%) es la invasión lateral con lesiones que se extienden por debajo del urotelio normal. Cuando las células tumorales rompen y rebasan la lámina propia acceden a la submucosa y a la capa muscular. Una vez en esta estructura, las células tumorales tienen acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos por donde podrán diseminarse. Jewet y Strong (1946) hace 55 años ya confirmaron la correlación entre invasión muscular y metástasis estableciendo una clasificación que es útil tanto para enfocar el tratamiento, como para indicar el pronóstico de esta dolencia. También el cáncer vesical en su extensión directa afectará a órganos vecinos como próstata, útero, recto, intestino, vagina y uréter.

Es interesante considerar, por su repercusión en el manejo terapéutico del cáncer invasor, que en más del 40% de pacientes varones intervenidos mediante cistectomía existe afectación prostática (Hardeman y cols., 1988).

1.4.2.- Diseminación metastásica

Aproximadamente el 5% de los tumores vesicales superficiales y casi el 20% de los pacientes con Carcinoma in situ de alto grado, desarrollan metástasis cuando las células tumorales atraviesan la lámina propia y acceden a los vasos linfáticos y sanguíneos situados inmediatamente por debajo de dicha lámina. Realmente algunos pacientes con tumores superficiales que ya han desarrollado metástasis latentes, presentan una lesión que queda patológicamente infraestadiada al presentar lesiones músculoinvasoras escondidas (Freeman y cols., 1995).

1.4.3.- Diseminación linfática

Las metástasis linfáticas se producen antes y, a veces, independientemente de las hematógenas como se demuestra en los pacientes que se curan con cistectomía radical más linfadenectomía (Lerner y cols., 1993). Los estudios en autopsias también muestran que el 25-33% de fallecidos por cáncer vesical no tienen metástasis linfática (Babaian y cols., 1980). Los ganglios más frecuentemente afectados son los de la región pélvica (78%), seguidos de los de la zona del obturador (74%) y de los ilíacos externos (65%) (Smith y Withmore, 1981 a).

1.4.4.- Diseminación vascular

Los sitios más frecuente de metástasis hematógena son el hígado (38%), los pulmones (34%), los huesos (27%), glándulas suprarrenales (21%), e intestino (13%) (Babaian y cols., 1980).

1.4.5.- Implantación

El cáncer vesical también puede diseminarse por implantación en heridas abdominales, en el urotelio denudado, en la celda prostática tras resección e incluso en la uretra traumatizada. La implantación es más frecuente cuando los tumores son de alto grado.

1.5-HISTORIA NATURAL

El modelo tradicional de la génesis tumoral propone una secuencia de estadios de evolución lineal que indican la progresión desde una lesión superficial hasta una enfermedad con invasión muscular. A pesar de esto, la variedad y disparidad de expresiones clínicas del cáncer vesical sugiere la existencia de un amplio espectro de procesos patogénicos diferentes relacionados entre sí. Es posible diferenciar dos categorías de pacientes: los que presentan tumores papilares superficiales o lesiones planas y los que presentan tumores musculoinfiltrantes (Martínez Piñeiro, 1993; Lee y Droller, 2000).

1.5.1.- Tumores superficiales

En el momento del diagnóstico, aproximadamente el 55-60% de los cánceres de vejiga son tumores superficiales bien o moderadamente diferenciados, con la particularidad de que entre el 50 y el 80% de estos pacientes hacen recurrencias después de la resección transuretral (RTU). Además, por lo general, los tumores de bajo grado y superficiales al diagnosticarse lo siguen siendo de por vida y sólo el 25% de estos tumores progresan a mayor grado. En torno al 10% de los pacientes con tumores superficiales progresarán ulteriormente hacia tumores invasores o metastáticos (Messing y Catalona, 1998). Sin embargo, resultan sorprendentes las cifras bajas de supervivencia bruta obtenidas en el análisis de grandes series de tumores vesicales con una media del 38% y un rango que oscila entre el 33 y el 50% (Cifuentes, 1982; Fisher y cols., 1986; Lamm y Griffith, 1992).

Dentro de la categoría de tumores superficiales por su ubicación intraepitelial está el Carcinoma in situ. Sin embargo, ésta es una entidad de comportamiento biológico diferente al de los tumores papilares superficiales pues su nivel de progresión a cáncer infiltrante, si no se someten a tratamiento es del 80%, siendo probablemente origen de los tumores superficiales de alto grado o de los infiltrantes. El Cis puede presentarse como:

- ◆ Cis primario oculto, de diagnóstico casual, asintomático.
- ◆ Cis multifocal difuso caracterizado por clínica irritativa vesical e importante carácter progresivo e irreversible.
- ◆ Cis asociado a tumores vesicales sincrónicos o asincrónicos con progresión e invasión en el 80% de los casos (Algaba, 1987).

1.5.2.- Tumores infiltrantes

En el momento del diagnóstico, el 40-45% de los tumores vesicales son de alto grado y, en estos casos, más del 50% de los pacientes ya tienen diseminación a distancia. Asimismo, el 50% de los pacientes con cáncer vesical que invade músculo ya padecen metástasis ocultas lo que conlleva un mal pronóstico puesto que su esperanza de vida se limita a, aproximadamente, dos años tras el diagnóstico (Messing y Catalona, 1998). Los tumores infiltrantes tienen una historia sintomática muy corta, dándose la progresión y la diseminación metastásica muy rápidamente.

La mayoría de pacientes con metástasis ocultas desarrollan evidencias clínicas de metástasis a distancia al año del diagnóstico del tumor primario; y prácticamente todos los pacientes con cáncer vesical metastático (95%) no sobreviven más de 2 años (Babaian y cols., 1980; Loherer y cols., 1992). Entre el 10 y el 35% de pacientes con metástasis linfática regional limitada sobreviven 5 o más años tras cistectomía radical y linfadenectomía pélvica (Freeman y cols., 1995).

Dos hipótesis tratan de explicar el comportamiento del cáncer vesical:

- ◆ La primera se basa en el alto porcentaje de Cis coexistente con cáncer invasor que supone la existencia de un proceso secuencial muy rápido desde tumor superficial a invasor.
- ◆ La segunda postula que el desarrollo de los tumores vesicales da origen a una invasión y crecimiento veloz hacia la muscular produciéndose el fenómeno exofítico responsable de la clínica más tardíamente (Martínez Piñeiro, 1993).

Sin embargo, el hecho de que pacientes con tumores de bajo grado desarrollen recurrencias de alto grado, y la posibilidad de concurrencia sincrónica de ambos tipos de tumores puede hacer sospechar un origen común (Messing 1990, Golijanin y cols., 1995). El desarrollo de algunos estudios de biología molecular sobre elementos implicados en la etiopatogenia del cáncer vesical ha permitido afianzar y subrayar la naturaleza dimórfica del cáncer vesical. De hecho, al menos la alteración del cromosoma 9 con deleciones que afectan a genes implicados en la regulación del ciclo celular predispone hacia lesiones proliferativas, aunque no necesariamente de tipo invasor ni metastático. Las alteraciones del cromosoma 9 se han asociado mayoritariamente a tumores papilares y superficiales (Spruck y cols., 1994; Wheelless y cols., 1994). También se han descrito alteraciones en p53 que supondrán un déficit del mecanismo de control del ciclo celular y de la apoptosis de células con daño irreparable en el ADN y como consecuencia se puede producir una gran inestabilidad genómica. Además la alteración de p53 se ha asociado a lesiones de alto grado y también a la promoción y progresión del tumor (Spruck y cols., 1994; Esrig y cols., 1994).

1.6.-INDICADORES DEL PRONÓSTICO

El conocimiento del pronóstico de la enfermedad tumoral vesical es fundamental a la hora de decidir la estrategia terapéutica para el paciente. De un tratamiento correcto se obtiene el beneficio de una mayor supervivencia y/o de una mayor tasa de curación, de ahí la acuciante necesidad de disponer en la clínica de factores pronósticos fiables. En ese tema debemos tener presentes varias premisas:

- ◆ La incierta evolución y la alta frecuencia de recidiva de los tumores vesicales, así como el hecho de que la historia de los tumores vesicales no es en absoluto homogénea.
- ◆ El tratamiento debe equilibrar radicalidad y eficacia, de modo que a pesar de que la cistectomía radical prácticamente garantiza la curación en tumores superficiales (por razones obvias) fuera deseable limitarla a tumores superficiales agresivos, cuyo pronóstico tras RTU es inaceptablemente malo.
- ◆ Por razones opuestas, deberíamos evitar la morbilidad de la cistectomía radical, en tumores infiltrantes que acabarán irremediablemente en éxitus por la diseminación a distancia.

En el cáncer de vejiga es esencial preguntar qué pretendemos medir con el supuesto factor pronóstico. En relación a lo anterior, téngase en cuenta que no es lo mismo analizar factores pronósticos respecto al riesgo de muerte, que respecto al riesgo de recidiva en un tumor superficial, o respecto al riesgo de transformación en un tumor infiltrante.

Todo se hace más complejo cuando deseamos analizar factores pronósticos que rentabilicen la administración de un tratamiento complementario o que predigan la respuesta a los mismos.

En cualquier caso es fundamental seleccionar aquellos factores pronósticos con mayor valor predictivo y reproducibilidad.

En la literatura, y con este fin, se ha evaluado la utilidad de múltiples parámetros clínicopatológicos y de datos de laboratorio.

1.6.1.- Los indicadores clínicopatológicos

1.6.1.a.- El grado histológico del tumor

Se basa en la valoración del grado de anaplasia de las células tumorales. (Friedel y cols., 1980).

- ◆ Grado I: Bajo grado o bien diferenciado. Se caracteriza por presentar polaridad nuclear normal en más del 95% del tumor acompañado de mínimo pleomorfismo.

- ◆ Grado II: Grado intermedio o moderadamente diferenciado. Caracterizado por la existencia de polaridad nuclear normal en el 50-95% del tumor y asociado a moderado pleomorfismo.
- ◆ Grado III: Alto grado o indiferenciado que se corresponde con la presencia de pérdida completa de la polaridad celular e intenso pleomorfismo.

1.6.1.b.- El estadio clínico-patológico

En este apartado nos referimos al grado de penetración vesical que presenta la neoplasia, la afectación de estructuras linfáticas regionales o la aparición de enfermedad diseminada extravesical y que queda clasificado y reflejado en el apartado 1.10.

1.6.1.c.- La presencia de displasia urotelial o Carcinoma “in situ” (Cis) en zonas uroteliales vecinas o distantes a la lesión clínica.

1.6.1.d.- Tamaño de la neoplasia

Los tumores de menos de 3 cm tienen menor riesgo de recidiva o progresión (Martínez Piñeiro, 1970; Sánchez de la Muela y cols., 1991; Fradet, 1992).

1.6.1.e.- La configuración de la neoplasia

Puede ser papilar (bajo grado), sólida (alto grado) o plana (carcinoma in situ). Las lesiones con edema mucoso, úlcera y rigidez de pared son muy agresivas. También son de tipo agresivo las necrosis con incrustaciones calcáreas.

1.6.1.f.- La multifocalidad

Es factor de riesgo de recidiva o progresión respecto al tumor solitario (Algaba, 1987).

1.6.1.g.- La recurrencia tumoral

Los tumores primarios tienen mejor índice pronóstico que los recurrentes (Wolf and Hojgaard, 1983; Madgar y cols., 1988).

Algunos datos bibliográficos han demostrado que los índices de recurrencia y progresión tumoral se correlacionan con neoplasias grandes (>10 g) o multifocales (Fitzpatrick y cols., 1986), con tumores de alto grado (Heney y cols., 1993), con lesiones que invaden la lámina propia (Dalesio y cols., 1983), con la presencia de enfermedad en los linfáticos (Anderstrom y cols., 1980; Freeman y cols., 1995), con procesos primarios asociados a presencia de displasia severa o carcinoma in situ (Althausen y cols., 1976) y con la existencia de citología positiva (Heney y cols., 1993).

Otros parámetros de mal pronóstico son la presencia de síntomas de irritación miccional (disuria, polaquiuria, tenesmo vesical y urgencia) y la extensión del Cis siendo los Cis focalizados los de curso más benigno. (Riddle y cols., ; Althausen y cols., 1976)

1.6.2.- Parámetros de laboratorio

1.6.2.a.- Expresión del antígeno de Thompson-Friedenreich (T)

Este antígeno es un precursor del sistema de grupo sanguíneo MN. Se trata de un disacárido críptico recubierto de ácido siálico presente en los eritrocitos del humano adulto que puede ser expuesto al tratamiento con neuraminidasa para poder determinar su expresión. Este antígeno se encuentra naturalmente expresado en forma abierta en las células del cáncer vesical (Radzikowski y cols., 1989; Oda y cols., 1990).

Este antígeno se expresa de forma independiente de los antígenos de grupo sanguíneo ABH. Su expresión se ha correlacionado con cáncer vesical músculo-invasor y, por lo tanto, asociado a mal pronóstico (Coon y cols., 1982; Javadpour, 1984).

Se le ha atribuido valor predictivo de la respuesta al tratamiento con inmunomoduladores (Bacilo tuberculoso atenuado de Calmette-Gering e Interleukina-2) (Dow y cols., 1989).

1.6.2.b.- Antígenos de grupo sanguíneo ABH

Los pacientes con sangre de tipo 0 y tumores superficiales vesicales presentan mayor incidencia de tumores de alto grado y progresión tumoral (Orihuela y Shahon, 1987).

Los antígenos de grupo sanguíneo son hidratos de carbono transportados por glucoproteínas o glucolípidos situados en la superficie de las células sanguíneas o epiteliales. Su biosíntesis viene mediada por cinco genes, ABO, Se, H, Le y X, los cuales codifican enzimas transferasas. La alteración de la glucosilación puede verse implicada en cambios de la cohesión del epitelio transicional que intervienen en la patogénesis y en el comportamiento del tumor vesical.

Con la transformación maligna las células del cáncer vesical dejan de expresarse los antígenos de grupo sanguíneo ABH (Coon y cols., 1982; Huben, 1984). La delección de los antígenos A y B en pacientes con tipo sanguíneo A y B, respectivamente, y la delección del antígeno H en los de tipo 0, se ha correlacionado con un mayor índice de recurrencia y con desarrollo de cáncer invasor (Malmstron y cols., 1988; Sheinfeld y cols., 1990). En general, la transformación maligna también parece asociarse a un incremento en la expresión del antígeno Lewis^x acompañada de una o más alteraciones en la expresión de los antígenos de grupo sanguíneo (Cordon Cardo y cols., 1988).

1.6.2.c.- Receptores para factores de crecimiento epidérmicos

Diferentes grupos de investigación han demostrado cómo la expresión alterada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el urotelio maligno, se correlaciona con mayor agresividad tumoral. Además, dicho receptor constituye un factor de predicción independiente de baja supervivencia como han puesto de manifiesto diversos análisis estadísticos multivariantes. Este receptor no se expresa en el urotelio normal, aumenta en casi la totalidad de los cánceres invasores y sólo en el 29% de los superficiales, siendo éstos los de mayor riesgo de progresión e invasión (Messing, 1990; Neal y cols., 1990; Mellon y cols., 1995). A pesar del interés de este hallazgo, la detección de este receptor plantea grandes problemas técnicos y económicos que han cuestionado su uso en la práctica clínica.

Los factores de crecimiento tumoral beta (TGF- β) constituyen una familia de hasta 5 proteínas que inhiben la proliferación celular, al menos en parte, a través de la estimulación de los genes *p27* y *p15*. Éstos transcriben proteínas nucleares que inhiben la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (*pRb*). Cuando Rb está desfosforilada, se une y secuestra proteínas que favorecen la proliferación celular. De hecho, los tumores vesicales con elevada expresión de TGF- β 1 tienen, significativamente, un comportamiento menos agresivo y con menor índice de proliferación (Coombs y cols., 1993).

1.6.2.d.- Otros antígenos tumorales

Se están estudiando como hipotéticos marcadores diagnósticos y/o pronósticos varios antígenos tumorales detectables mediante anticuerpos monoclonales siendo los más relevantes:

- ◆ El antígeno M344: detectable en, aproximadamente, el 70% de los tumores vesicales superficiales y casi nunca en los invasores. Se encuentra en células exfoliadas (Fradet y Cordon-Cardo, 1993).
- ◆ El antígeno T138, también detectable en células exfoliadas, se correlaciona con disminución de supervivencia e intervendría en la progresión cancerosa.
- ◆ El antígeno 19A211: parece estar relacionado con la menor probabilidad de recurrencia en los tumores superficiales (Fradet y cols., 1990).

De hecho, Fradet (1992) ha encontrado que la expresión conjunta de M344 y 19A211 se manifiesta en el 60% de los tumores papilares superficiales y cae al 22% en los Cis.

1.6.2.e.- Moléculas de matriz extracelular y de adhesión celular

Las alteraciones en las estructuras que cohesionan el urotelio y que constituyen la membrana basal y la matriz subepitelial como el colágeno, la fibronectina, integrinas, cadherinas..., van a ser las responsables de la progresión del tumor en profundidad. Así, la expresión alterada de E-cadherina, integrinas $\alpha 6 \beta 4$, o la síntesis de colagenasa IV se han asociado con fenotipo de cáncer vesical invasor (Liu y Liotta, 1992; Abou Farah y cols., 1993; Liebert y cols., 1994).

1.6.2.f.- Anormalidades cromosómicas

Diferentes referencias bibliográficas evidencian que las anormalidades cromosómicas, tales como un número aumentado de cromosomas, la presencia de cromosomas marcadores y la existencia de cromosomas de tamaño o de posición centromérica anormales, se correlacionan con un riesgo aumentado de recurrencia y progresión tumoral (Gibas y Sandberg, 1984; Carter y cols., 1987; Falor y Ward-Skinner, 1988). Además, las recurrencias y progresión tumorales son más frecuentes en pacientes cuyos tumores se asocian con cromosomas marcadores y células aneuploides (Gibas y Sandberg, 1984).

Una de las anormalidades cromosómicas más frecuentemente descritas en la literatura es la delección del cromosoma 9 (en el 67% de los tumores invasores de alto grado). Además en este cromosoma pueden detectarse otro tipo de alteraciones en el ADN; una de ellas la hipermetilación de las islas CpG que será analizada más adelante por ser la gran protagonista de este trabajo.

También se ha descrito mutaciones en el gen *H-ras*, localizado en el cromosoma 11 p, y que se traduce en el aumento de su producto *p21* en los tumores de alto grado, pero no en los de bajo grado. Estas alteraciones son acumulativas de modo que al unirse con la expresión del antígeno tumoral M344 conlleva comportamiento tumoral agresivo (Fradet y cols., 1990).

Las mutaciones y la delección del cromosoma 17p se ha asociado a cáncer invasor por incluir al gen tumor supresor *p53*. Se ha tratado de utilizar su detección mediante técnicas inmunohistoquímicas o inmunoluminiscencia con el anticuerpo PAb1801, como marcador pronóstico. Las alteraciones de *p53* son tardías en el cáncer vesical aunque puede detectarse en los Cis de índole más agresiva (Spruck y cols., 1994). *p53* ha sido el marcador molecular sobre el que más tinta se ha escrito en los últimos años. Como marcador diagnóstico no ha conseguido superar al análisis de orina, la citología y la cistoscopia de manera que se ha afianzado como indicador pronóstico. La valoración inmunohistoquímica de *p53* alterada podría ser útil en el estudio de los tumores vesicales tratados con BCG que han fracasado, pues es un marcador de predicción de progresión de la enfermedad y muerte; así a estos pacientes habría que ofertarles terapias más agresivas (Olumi, 2000). Pero, tal vez, su mejor utilidad está en los tumores vesicales localmente avanzados, ayudando a la decisión terapéutica de conservar la vejiga (Herr y cols., 1999) o de dar quimioterapia complementaria (Cote y cols., 1997). No obstante, los resultados expuestos en la literatura no son totalmente concluyentes por no presentar un consenso metodológico (técnica utilizada, tipo de anticuerpos y valores de corte) que permitan la comparación. (Olumi, 2000; Zlota y Schulman, 2000)

La trisomía del cromosoma 7, que lleva el gen *C-erb* y que codifica una proteína semejante al EGFR (receptores de factor de crecimiento epitelial), provocará la sobreexpresión por amplificación de dicha proteína, sobretodo en los tumores de tipo invasor.

Otra alteración genética es la pérdida de expresión del gen supresor *Rb* localizada en el cromosoma 13 que también se ha relacionado con mal pronóstico, si bien, actualmente

existen trabajos contradictorios. Igualmente la pérdida del gen nm23, que es un supresor del potencial metastático, también se asocia a mal pronóstico.

1.6.2.g.- Marcadores de proliferación

En cáncer en general, está demostrada la correlación entre un alto porcentaje de fenómenos de proliferación celular y agresividad tumoral. De hecho, diferentes grupos de investigación han puesto de manifiesto cómo el incremento de poblaciones celulares aneuploides y la proporción de células en fase S, se correlacionan con grado, estadio, mayor probabilidad de recurrencia, progresión y menor supervivencia (Koss y cols., 1989; Norming y cols., 1992; Wheelless y cols., 1993). Las técnicas utilizadas van desde la cuantificación grosera de ADN mediante citometría de flujo a otras más precisas como la detección de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) o el índice de proliferación Ki67 que son técnicas inmunohistoquímicas en las que un incremento de la expresión de estas proteínas, se correlaciona con mal pronóstico de la enfermedad (Cohen y cols., 1993; Waldman y cols., 1993). El problema con que se han enfrentado estos tests, radica en el hecho de que no existe consenso en su valoración, por lo que su aplicación individual es, en la actualidad, altamente cuestionable.

1.7.- SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA

El síntoma de presentación más frecuente en el cáncer vesical es la hematuria macroscópica indolora observándose en aproximadamente el 85% de los casos (Varkarakis y cols., 1974). Se trata de una hematuria no relacionada con el esfuerzo físico y con un color que va de levemente rosado a vino tinto. A veces se acompaña de coágulos que pueden obstruir la vía urinaria provocando retención urinaria. En algunas ocasiones puede incluso ser anemizante.

El complejo sintomático de irritación vesical, polaquiuria, urgencia y disuria, (síndrome cistítico) es la segunda forma de presentación más frecuente y constituye la única manifestación del Cis primario difuso. Estos síntomas se asocian casi siempre a hematuria aunque esta sea microscópica.

En los tumores sólidos infiltrantes, la sintomatología comienza por síndrome cistítico combinado con la hematuria.

La localización del tumor también influye en la presentación clínica; así, el tumor de zona pericervical puede cursar con hematuria al final de la micción o con retención urinaria completa o incompleta. Si el tumor está infiltrando el trigono puede provocar anuria y dolor renal con alto riesgo de infección de tracto urinario superior. Los tumores de cara lateral pueden obstruir en mayor o menor grado el uréter ipsilateral. Los tumores de fondo y cúpula serán los menos sintomáticos por ser los de localización de menor trascendencia funcional.

En las fases avanzadas, la infiltración de nervios regionales (obturador, abdominogenital) puede producir terribles dolores pélvicos. La afectación linfática puede

desencadenar edemas de miembros inferiores. La afectación de órganos vecinos puede provocar desde hemorragia digestiva a obstrucción intestinal por afectación rectal. En las mujeres puede producirse metrorragias por afectación uterovaginal.

Los síndromes paraneoplásicos, que incluyen hipercalcemia y reacciones leucemoides, se manifiestan en pacientes con proceso metastático y se asocian a un pronóstico nefasto (Michel y cols., 1984); sin embargo se han comunicado síndromes paraneoplásicos en pacientes sin enfermedad metastásica (Bennet y cols., 1986). La clínica de la enfermedad metastásica variará en función de la localización y consistirá en tos (pulmón), dolores óseos y fracturas patológicas (hueso), ascitis y caquexia (hígado).

1.8.- DIAGNÓSTICO

El cuadro clínico debe ser el primer paso para el diagnóstico del tumor vesical. A partir de aquí se deben utilizar ciertas pruebas complementarias que nos permitan diagnosticar, estadiar y tratar lo más correctamente posible esta patología tumoral.

1.8.1.- Pruebas citológicas

Por su fácil realización las primeras pruebas diagnósticas se hacen a partir de muestras urinarias: la citología microscópica, la citometría de flujo y el análisis celular cuantitativo mediante imágenes fluorescentes. El mayor interés de estas pruebas reside en su capacidad de dar información sobre cualquier zona de urotelio. Además, pueden orientar hacia la presencia de tumores de alto grado o Cis cistoscópicamente invisibles en cualquier zona del urotelio sincrónicos a la presencia de un tumor papilar de bajo grado.

De estas pruebas la que tiene mayor aplicación por su fácil manejo y bajo coste en la práctica clínica es la citología pues permite detectar células uroteliales malignas descamadas que se identifican en la orina tras micción espontánea o con cateterismo y lavado con suero salino endovesical. La limitación de este método es el hecho de que los tumores bien diferenciados se asocian con un aspecto citológico normal, sin núcleos rugosos aumentados de tamaño y con cromatina irregular, y con mayor grado de cohesión celular descamándose pocas células en la orina. Por este motivo, aún cuando la prueba es específica en los tumores de alto grado o indiferenciados (90%) (Martínez Piñeiro y Muntañola, 1980), puede presentar hasta un 10% de falsos negativos. El índice de falsos positivos en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tratados por cáncer vesical oscila entre el 1-12% y se deben a atipia e inflamación ocasionadas por la quimioterapia endovesical, pudiendo estos cambios durar más de un año desde la instauración de estas terapias (Koshikava y cols., 1989).

La citología no es un método de detección efectivo por su costo elevado salvo si se utiliza en poblaciones de alto riesgo (Gamarra y Zein, 1984). Además, es mejor realizarla tras lavado vesical, pues el poder descamativo es mayor (Trot y Edwards, 1973). Las causas de error se asocian con retención urinaria, infección o irritación vesical crónica (vejigas

cateterizadas o calculosas) y en estas situaciones las citologías pueden resultar confusas (Gamarra y Zein, 1984).

La citometría de flujo mide el ADN celular de modo que cuantifica la población de células aneuploides y la actividad proliferativa y esto se ha correlacionado clínicamente con progresión tumoral de modo que los tumores diploides se asocian a bajo grado y mejor pronóstico que los triploides, y éstos a su vez mejor que los tetraploides (Wijkstrom y Tribukait, 1990). El problema de esta técnica reside en los límites arbitrarios para limitar la normalidad; también la aparición de células inflamatorias que pueden presentar fracciones celulares de hiperploidía puede dar origen a confusión. Además la fase S del ciclo celular es, en sí, una pequeña franja de este ciclo y tumores agresivos pueden expresar pocas células en dicha fase pudiéndose escapar del diagnóstico (Cordón Cardo, 1995). Los tumores superficiales de bajo grado suelen ser diploides y tienen con esta técnica resultados falsos negativos. Pero sobretodo el hecho de encontrar, de modo significativo, tumores diploides o casi diploides que progresan y tumores aneuploides que no lo hacen, impide que esta técnica sea de uso generalizado en el diagnóstico del paciente, independientemente de su costo elevado (Tribukait, 1987). La mejor resolución del método corresponde al diagnóstico de tumores aneuploides de alto grado o Cis en los que entre el 80-90% de tumores son correctamente identificados (Badalament y cols., 1990). Otra ventaja de la citometría es que permite determinar varios parámetros simultáneamente, como identificar el estado de las citoqueratinas

El análisis cuantitativo con imágenes fluorescentes es una técnica citológica que analiza células y cuantifica el ADN de cada célula de forma individual y no poblaciones celulares globalmente como la citometría de flujo. Así, mediante anticuerpos monoclonales marcados es posible incrementar el valor de la especificidad y la sensibilidad diagnóstica hasta conseguir resultados que superan los ofrecidos por otros métodos diagnósticos (Parry y Hemstreet, 1988). También puede aplicarse a la detección de lesiones cromosómicas como la delección del cromosoma 9 (Wheless y cols., 1994) o delecciones del cromosoma 17p. El mayor inconveniente del estudio de fluorescencia cuantitativo es su alto costo.

1.8.2.- Urografía intravenosa

La urografía intravenosa es obligatoria en todo paciente con sospecha clínica de tumor vesical (hematuria, síntomas irritativos vesicales persistentes) puesto que a pesar de no ser un método diagnóstico sensible, pues no detecta tumores pequeños, permite evaluar todo el urotelio. La imagen del tumor se muestra como defecto de repleción de contraste en la fase cistográfica del urograma. En tumores musculoinvasores puede poner de relieve fenómenos obstructivos de la vía urinaria.

1.8.3.- Ultrasonografía

La ecografía transabdominal por su inocuidad, por su bajo costo y su alto grado de resolución y elevada información sobre tamaño (descubre tumores exofíticos >5mm con una

seguridad del 80%), localización, infiltración (en el 80% de casos) y repercusión del tumor sobre el resto de la vía urinaria y el hígado, se ha impuesto como primera prueba diagnóstica de imagen del tumor vesical. Los tumores superficiales exofíticos muestran una imagen hiperecogénica bien delimitada intravesical que rompe el contorno regular de la interfase acuosa. En los tumores infiltrantes se aprecia interrupción parcial o total de la pared vesical. Sin embargo, esta prueba no tiene sensibilidad para detectar tumores muy pequeños ni, por supuesto, las lesiones planas como el Cis que no es diagnosticable radiológicamente. Este método diagnóstico se verá dificultado en pacientes obesos con mala transmisión sónica y siempre que la vejiga no esté replecionada.

1.8.4.- Uretrocistoscopia

Es la mejor forma de confirmar la sospecha diagnóstica del cáncer vesical. Tiene el inconveniente de su carácter invasor, pero la gran ventaja de que un buen endoscopista localiza y diagnostica lesiones de hasta 2,5 mm y también identifica las lesiones planas. Este método diagnóstico puede darnos, antes de iniciar el tratamiento, información pronóstica importante como tamaño, localización, focalidad, número y patrón de crecimiento.

1.9.-DIAGNÓSTICO PRECOZ

Es evidente que si los tumores vesicales se diagnosticaran cuando aún no han salido de la mucosa o no rebasan la lámina propia, la enfermedad podría tratarse con escasa morbilidad y con un alto índice de éxito terapéutico; esto también es aplicable a los tumores de alto grado y de mayor riesgo de progresión (Freeman y cols., 1995).

Las estrategias de detección precoz prácticamente no dañan al paciente y aportan la ventaja de identificar el tumor en fase preclínica y en estadios en los que la terapia puede evitar el ensombrecimiento de la supervivencia. Estos motivos justifican racionalmente la búsqueda de un diagnóstico precoz eficaz.

El diseño de una estrategia de diagnóstico precoz del cáncer vesical no está exento de escollos y sesgos. Debe partirse de una exhaustiva comparación prospectiva entre poblaciones similares y aleatorizadas a las que se somete y no a las pruebas de detección precoz y valorar comparativamente, mediante métodos estadísticos válidos, las mejoras diagnósticas, terapéuticas y pronósticas que puedan aportar. Los sesgos en que se puede incurrir son de selección o de seguimiento, entre otros (Morrison, 1992). Hasta el momento no se ha realizado ningún trabajo prospectivo aleatorizado con estas características. Además se debe partir de unas pruebas que sean sencillas, económicas y carentes de morbilidad.

Cuando existe una historia previa de tumor vesical que puede recidivar, se supone que todas las personas tienen alto riesgo de desarrollar la enfermedad y la uretrocistoscopia y la citología por lavado son las técnicas habituales de diagnóstico precoz. Esta actitud puede llevar indudablemente a salvar vidas y a administrar tratamientos que incluyan la conservación de la vejiga. Sin embargo, estas técnicas, aunque muy precisas, pueden ser

inapropiadas por su morbilidad, su carestía y su mala aceptación en pacientes que se consideren de alto riesgo pero sin historia previa de tumor vesical ni sospecha clínica del mismo (Messing y Catalona, 1998). Otras pruebas no invasoras serían la citología urinaria, el estudio en tiras del sedimento urinario, el análisis cuantitativo con imágenes fluorescentes, sólo o asociado a detección de otros marcadores antigénicos relevantes en orina (Antígeno Lewis^x, M344, DD23) que pueden detectar tumores antes incluso de su visualización endoscópica (Fradet y Cordon-Cardo, 1993).

Además las pruebas de diagnóstico precoz deben tener una alta sensibilidad (sin falsos negativos) una alta especificidad (sin falsos positivos) y unos valores predictivos positivo y negativo altos. Desgraciadamente la mayoría de las pruebas de detección precoz basan sus valores predictivos, su especificidad y sensibilidad en poblaciones sesgadas por edad avanzada, género y por el tiempo de exposición a factores de riesgo (controles de edad media-alta, fumadores y varones) y sobre todo por no incluirse una población real en la que la incidencia de cáncer vesical va a ser muy escasa.

En definitiva, en la población general no existe en la actualidad ninguna prueba de diagnóstico precoz del cáncer vesical por ser ésta, una patología poco prevalente y por cuanto las técnicas inmunocitológicas urinarias (las de mejores valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo) de un perfil costo-beneficio desfavorable. Por lo tanto, sólo una hipotética población expuesta a carcinógenos ambientales sí que podría verse beneficiada de alguna prueba de detección precoz del cáncer vesical.

1.10.-ESTADIAJE TUMORAL

Dada la gran importancia del estadio de cara al manejo terapéutico del paciente y a su pronóstico, es deseable contar con un sistema de clasificación lo más certero posible; sin embargo, esto no es fácil y, a menudo, existen errores. La infraestadificación se da con mayor frecuencia en aquellos pacientes con tumores de alto grado y estadio intermedio siendo aproximadamente el 33%; la supraestadificación se presenta en el 10% de los casos (Wijkstrom y cols., 1984).

1.10.1.- Objetivos del estadiaje

La primera decisión terapéutica basada en el estadio consiste en determinar si el tumor es superficial o infiltrante. La respuesta a esta situación nos la proporcionará el análisis patológico de la muestra tumoral extraída mediante RTU como hemos descrito antes. Si el tumor es superficial no es necesario investigar la presencia de enfermedad a distancia.

La segunda decisión terapéutica, según la estadificación tumoral, será la localización de aquellos pacientes con tumor invasor y que pueden beneficiarse de un tratamiento agresivo pero potencialmente curativo recurriéndose a diferentes técnicas de imagen para delimitar la extensión de la enfermedad (ECO, TAC, RNM). Sin embargo, estas técnicas no son precisas para detectar microinvasión de pared vesical o micrometástasis y pueden tener problemas de

interpretación con los cambios postresección, cambios postradioterápicos o la fibrosis postquimioterapia.

1.10.2.- Técnicas complementarias y estadio

1.10.2.a.- Tomografía Axial Computerizada (TAC)

La tomografía axial computerizada, es una técnica de imagen no sólo útil en la valoración de la extensión del tumor primario, sino también fundamental para valorar la presencia de adenopatías pelvianas y paraaórticas, y también para investigar metástasis a nivel hepático y suprarrenal. Para determinar el grado de penetración tumoral se aconseja realizar la TAC antes de la RTU pues los artefactos tras esta técnica quirúrgica pueden llevar a confusión (Husband y cols., 1989). Además, el uso de contraste aumenta la precisión de esta prueba (Sager y cols., 1987) y el desarrollo de la TAC helicoidal ha permitido discernir imágenes antes dudosas de metástasis como los hemangiomas cavernosos hepáticos. Sin embargo, aunque se vean adenopatías, la TAC no puede discriminar si su naturaleza es tumoral o inflamatoria, motivo por el que algunos autores cuestionan su uso ya que muestran series con hasta un 40% de no detección de metástasis en ganglios linfáticos (Lantz y Hattery, 1984; Nishimura y cols., 1988). Según la literatura, la TAC presenta una sensibilidad próxima al 50% y una especificidad de cerca del 90% (Ricos e Iborra, 1991). En cualquier caso, por la magnitud de los tratamientos en el cáncer musculoinvasor realizar TAC previo a cualquier terapia se considera una práctica prudente.

1.10.2.b.- Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las imágenes de la vejiga urinaria obtenidas con RMN no parecen ser superiores en la detección del cáncer vesical a las que ofrece la TAC (Husband y cols., 1989). Mejor resolución anatómica aportan las técnicas con espiral de doble superficie con medios de contraste paramagnéticos, como el complejo de ácido dietileno-triaminopentaacético con Gadolinio (Gd-DTPA) mejorando de este modo la visualización de los tejidos blandos. Esta técnica, al igual que la TAC, aportará más datos y mayor resolución conforme más avanzado sea el estadio del tumor (Sohn y cols., 1990).

1.10.2.c.- Ecografía

Ya hemos descrito la importancia creciente que tiene este método de imagen en el estudio inicial del cáncer vesical. Sin embargo, para valorar el grado de infiltración del tumor en la vejiga, la ecografía tiene menor capacidad de valoración que la TAC. Si la ecografía es transrectal puede ser útil en la evaluación de invasión regional de vesículas seminales o de la próstata en el hombre y de útero en la mujer. La única forma útil de aplicación de la ecografía de cara al estadiaje tumoral es la ecografía transuretral, sin embargo, tiene el inconveniente de ser invasiva y precisar anestesia (Koraitim y cols., 1995).

1.10.2.d.- Linfografía

Es una modalidad de detectar metástasis linfáticas que ha sido abandonada a raíz de la universalización de la TAC. A ello ha contribuido el diferente carácter invasor de una y otra, así como la ausencia de visualización linfográfica de la cadena ganglionar hipogástrica lo que ocasiona el elevado número de falsos negativos y positivos de hasta el 40% y 10% respectivamente. Algo muy similar podemos decir respecto a la punción aspiración con aguja fina (PAAF).

1.10.2.e.- Rastreo torácico con radiografía y TAC

Antes de encarar el tratamiento definitivo del cáncer vesical es preciso evaluar la posible existencia de enfermedad metastásica a distancia valorando los órganos que más frecuentemente sufren la diseminación hematógena. El hígado se estudia con TAC o TAC helicoidal; los pulmones, con radiografía simple de tórax que únicamente muestra metástasis mayores de 1 centímetro de diámetro. Existe una correlación entre el tamaño de la lesión pulmonar y la metástasis de modo que las lesiones no calcificadas mayores de 1 cm se consideran como metástasis. La TAC es un medio diagnóstico sensible para lesiones menores de un centímetro pero no distingue la metástasis de lesiones granulomatosas que son frecuentes, por lo que generalmente el estudio de extensión pulmonar se hará con radiografía simple pulmonar con o sin TAC.

1.10.2.f.-Rastreo óseo

El rastreo óseo es útil como estudio inicial pues permite posteriores comparaciones. Si un paciente tiene cifras de fosfatasa alcalina normales, no precisará de rastreo óseo gammagráfico. Si la fosfatasa se eleva, será preciso realizar dicho rastreo.

En síntesis, la evaluación de metástasis en pacientes con cáncer vesical invasor incluye: Radiografía (Rx) de tórax, TAC abdominopélvico, pruebas de función hepática y rastreo óseo gammagráfico. Si alguna de estas pruebas es positiva debe buscarse la confirmación histopatológica mediante la técnica menos invasiva, habitualmente la biopsia por aspiración con aguja fina (PAAF).

1.10.3.- Sistemas de estadificación

1.10.3.a.- Jewett- Strong-Marshall (JSM)

El más antiguo es el propuesto por Jewett y Strong en 1946 y que Marshall modificó diez años después y que distingue distintos estadios (Jewett y Strong, 1946; Marshall, 1956). Dicha clasificación se detallará en el apartado de material y métodos (Tabla 3.5).

1.10.3.b.-Tumor-nódulos linfáticos-metástasis (TNM)

La otra clasificación, que ha sido consensuada internacionalmente por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer Staging (AJC), es el TNM y es hoy en día la más tenida en cuenta por la comunidad científica (Hermanek y cols., 1997) (Tabla 3.4).

Es una clasificación que valora la extensión del tumor primario (T), la afectación linfática (N) y las metástasis (M). En esta clasificación no se incluye el papiloma y debe existir confirmación citológica de la enfermedad y se detallará en el apartado de material y métodos.

1.11.-TRATAMIENTO DEL CÁNCER VESICAL

1.11.1.- Cáncer vesical superficial: Estadios 0 y a.

1.11.1.a.- Resección de los tumores vesicales

En la práctica urológica habitual, ante la sospecha clínica de cáncer vesical se realizan como pruebas diagnósticas iniciales la citología, la ecografía, la cistoscopia y la UIV. Una vez hecho el diagnóstico se procederá a la resección endoscópica-bióptica del tumor y tras conocer los datos histopatológicos y estadiar el tumor, se darán los diferentes pasos terapéuticos.

La resección transuretral de los tumores vesicales es el método que permite tomar la muestra del tumor para su análisis histopatológico. Debe researse en su totalidad, aconsejándose tomar muestra de tejido muscular subyacente a la lesión para determinar el grado de infiltración de la neoplasia. Tras la resección se procede a la electrocoagulación del lecho quirúrgico. Soloway (1984) sugiere que en tumores superficiales no se profundice en la capa muscular para evitar una recurrencia ulterior secundaria a implantación que se asociaría con invasión muscular y obligaría a tratamientos más radicales y agresivos. En aquellos tumores superficiales de bajo grado y de difícil acceso, puede ser suficiente la electrocoagulación del mismo con el resectoscopio, aunque este procedimiento impedirá al patólogo disponer de muestra para evaluar el grado y la infiltración del tumor.

En aquellos pacientes con tumores de base ancha, extensos, sólidos e infiltrantes, no es necesario resear todo el tumor cuando se prevé una próxima cistectomía. Perforar estas vejigas puede suponer diseminación de células tumorales. Los tumores que infiltran el meato ureteral deben ser reseados en su totalidad sin tener en cuenta el meato pero con precaución de no fulgurar en su ubicación y provocar estenosis. Puede ser adecuado colocar un catéter ureteral al final de la intervención para prevenir obstrucción por tejido cicatricial.

Los tumores de paredes laterales deben researse con sumo cuidado por el riesgo de perforación que supone la estimulación del nervio obturador provocando intensa aducción.

En los tumores ubicados en divertículos, el alto riesgo de perforación hace que lo indicado sea la toma de biopsias previa a una cistectomía parcial.

Cuando nos enfrentamos a un tumor vesical primario, es aconsejable no sólo una correcta resección sino también un mapeo biópsico vesical tomando muestras de trigono, caras laterales, uretra prostática y zona peritumoral. Estas muestras aportan importante información de valor pronóstico sobre la probabilidad de recurrencia ya que el 20-25% de los pacientes presentan displasia e incluso Cis cuando se tratan (Althausen y cols., 1976; Vicente Rodríguez y cols., 1987). Entre el 30 y el 70% de los tumores musculoinvasores vesicales se asocian a Cis. En oposición, algunos autores piensan que es una práctica innecesaria y que al denudar la mucosa, se favorece la implantación de células tumorales (Kiemeney y cols., 1994). Otros autores creen que la aplicación de citología urinaria por lavado o simple sería mejor indicador de Cis que la toma de biopsias (Harving et al, 1988). En cualquier caso, siempre que se contemple la posibilidad de practicar cistectomía parcial y, siempre que exista una citología urinaria sugerente de tumor de alto grado sin tumores visibles en endoscopia o visibles de aspecto de bajo grado, será aconsejable esta práctica diagnóstica.

No se debe olvidar la importancia de la resección para tomar datos importantes de cara al pronóstico como son la morfología de la lesión, el número o el tamaño y la localización. Esta suele ser trigonal, perimeática o en caras laterales en la presentación primaria del tumor mientras que las recidivas serán en cara anterior, cúpula o cuello lo que sugiere la existencia de un mecanismo de implantación tras el tratamiento inicial (Martínez Piñeiro, 1970). Además, debe aprovecharse este tiempo diagnóstico-terapéutico para efectuar un tacto bimanual vesical que nos indicará la extensión y profundidad aproximada de la neoplasia.

El tratamiento adecuado para la mayor parte de los pacientes con cáncer vesical superficial es la RTU del tumor. Este procedimiento proporciona un índice de supervivencia del 70% a los 5 años, lo cual demuestra su excelencia. La mayoría de fallecidos de este grupo lo hacen por causas extravesicales y tan sólo alrededor del 10-15% de estos pacientes precisarán más adelante un tratamiento más agresivo (Prout y cols., 1992).

Los tumores confinados a mucosa (T_a) rara vez progresan pero aquéllos que alcancen la submucosa (T_1) progresan en un 46% de casos. Así los pacientes con T_1 se consideran como portadores de tumores potencialmente agresivos y precisan de un estrecho seguimiento y tratamiento complementario que consiste en quimioterapia o inmunoterapia endovesical (Waples y Messing 1992). Un aspecto importante a considerar en estos pacientes con T_1 es que los tumores a veces no se resecan completamente. En un estudio realizado en Alemania se comprobó que más del 40% de los tumores T_1 que se creían completamente resecaos, presentaron enfermedad residual a las seis semanas de la primera RTU (Klan y cols., 1991).

Habitualmente las lesiones vesicales pueden ser bien resecaos y analizadas Histopatológicamente pero, a veces, localizaciones difíciles (cúpula o pared anterior), asentamiento en divertículos o tumores extensos, pueden hacer difícil el tratamiento con RTU.

Para aquellas lesiones superficiales y de bajo grado difíciles de resecaos se han sugerido tratamientos alternativos que actualmente están en fase de investigación clínica. Estos son:

1.11.1.a.1.- La terapia fotodinámica endovesical con derivados de la hematoporfirina

Es una modalidad terapéutica experimental que se basa en la sensibilización fotoquímica y la muerte celular mediante el uso de un agente sensibilizador como la hematoporfirina, luz y oxígeno. Se ha observado una respuesta mayor del 90% en tumores superficiales vesicales o en carcinoma in situ aunque no es útil en el tratamiento de tumores grandes ni en carcinomas invasores (Prout y cols., 1987). Como complicaciones se han descrito la fotosensibilización cutánea, las contracturas vesicales y otros síntomas de disfunción vesical importante que acontecen antes de los tres meses que siguen al tratamiento.

1.11.1.a.2.- Láser

Se han tratado tumores vesicales superficiales con láser de argón, que tiene una penetración de 1 mm lo que le hace muy seguro pero sólo útil en el tratamiento de tumores muy pequeños. El láser de Neodimio-Ytrio-Aluminio-granate (Nd:YAG), con una penetración de 4-15 mm, se utiliza en el tratamiento de tumores mayores; aunque con menor índice de seguridad y se ha usado con buenos resultados en tumores menores de 1,5 cm, no obstante, su papel en el tratamiento del cáncer vesical es incierto (Beer y cols., 1989). El láser quirúrgico se utiliza con éxito en la clínica especialmente en pacientes con tumor vesical avanzado que han rechazado cistectomía o presentan mal estado general, por sus propiedades de coagulación y vaporización tisular. Sin embargo, la terapia con láser no se ha impuesto ya que, su ventaja de que para su aplicación basta con un cistoscopio pequeño que no precisa anestesia general, obviando sangrados y sacudidas del obturador, es superado por los inconvenientes del riesgo de perforación intestinal y de la imposibilidad de obtener muestras del tumor para realizar su estudio histopatológico.

1.11.1.b.- Tratamientos adyuvantes

Dado el importante riesgo de recurrencia y progresión del tumor vesical superficial, y con la finalidad de controlar estos aspectos de la enfermedad, han surgido diferentes modalidades terapéuticas adyuvantes. Muchos de estos tratamientos se han probado pero no han sido adoptados en la práctica clínica general. Entre ellos los más importantes son:

1.11.1.b.1.- Radioterapia

La radioterapia convencional no es un tratamiento adecuado para este tipo de tumores, ya que no asegura que se evite el desarrollo de nuevos tumores (Goffinet y cols., 1975) y se le asocia una gran morbilidad (cistitis radioinducida); mientras que el tratamiento con cirugía endoscópica de los tumores superficiales es eficaz y económico y, por supuesto, menos mórbido. Se han propuesto tratamientos de radioterapia intersticial mediante alambres de iridio 192, oro radiactivo (^{198}Au), tántalo o radón; también radioterapia intracavitaria con cápsula de radio en catéter o el tratamiento intraoperatorio con haz de electrones combinado

con radioterapia externa convencional. Lo limitado de estas experiencias no permite su aplicación en condiciones que faciliten el contraste de resultados clínicos de una u otra estrategia.

1.11.1.b.2.- Cistectomía

La cistectomía total, aunque raramente, tiene indicación en el tratamiento de los tumores superficiales caracterizados por ser muy sintomáticos, extensos, de alto grado, irresecables o en los Cis con recidivas que no responden a tratamiento endovesical. También está indicado en los T₁ asociados a Cis multifocal (Matthews y cols., 1984). Los pacientes tratados con esta técnica, bien seleccionados, en estadio T_a y T₁ tienen una supervivencia similar a la de la población general. En los pacientes con enfermedad de alto grado refractarios a tratamiento conservador, este tratamiento aporta una supervivencia a los 5 años del 80% y la mayoría de los fallecidos por cáncer vesical lo son por tener enfermedad avanzada en el momento de la cistectomía. La radioterapia previa al tratamiento no mejora la supervivencia en estos pacientes.

1.11.1.b.3.- Tratamiento intravesical

La quimioterapia e inmunoterapia intravesical adyuvantes están indicadas en los pacientes con alto riesgo de recidiva tumoral (tumores recurrentes, tumores de alto grado asociados con atipia o Cis y tumores múltiples) y en los pacientes en los que quede tumor residual postRTU (Rubben y cols., 1988).

Se usan varios agentes intravesicales como tiotepa, Bacilo tuberculoso atenuado de Calmette-Guering (BCG), doxorubicina, interferón alfa y mitomicina C. Los dos primeros son los más económicos y el último el más caro. El BCG es actualmente el agente intravesical más eficaz, pero la cepa, la pauta y la dosificación más efectiva no ha sido aún consensuada.

Cuando se fracasa con un agente intravesical, debe utilizarse otro diferente para tratar de alcanzar éxito terapéutico. Sólo en casos excepcionales como puede ser el tratamiento del Cis o en tumores superficiales extensos en los que no es adecuada o deseada la cistectomía, se puede utilizar este tipo de tratamiento de forma primaria y no de forma adyuvante como es usual.

Los factores que deben considerarse en el tratamiento intravesical son múltiples. Así, se aconseja utilizar agua destilada en lugar de suero salino para diluir este tipo de fármacos quimioterápicos; el tiempo óptimo de contacto con el urotelio es de 1-2 horas y previo a la instilación se ha de vaciar la vejiga. El intervalo entre RTU y aplicación de la primera instilación, así como el tiempo de tratamiento, son factores importantes a considerar pues se ha observado que la tasa de recurrencia es menor en los pacientes que reciben una instilación precoz (menos de 15 días tras la RTU) o en los que mantienen el tratamiento un tiempo prolongado (1 año) (Duque y Loughlin, 2000).

1.11.1.b.3.a.- Tiotepa

La utilización de Trietilenotiofosforamina (Tiotepa) intravesical se inició en los años sesenta. Esta sustancia es un agente alquilante que genera enlaces cruzados en el ADN, ARN, proteínas y ácidos nucleicos. Se suele dar en dosis de 30 a 60 mg diluidos en 30 a 60 mL de agua destilada instiladas en vejiga donde se retienen 1-2 horas. El tratamiento se repite semanalmente durante 6-8 semanas y, a continuación, mensualmente hasta completar el año de tratamiento. Según un metaanálisis de nueve ensayos aleatorizados controlados en el que se compara RTU sola frente a RTU más tiotepa, el tratamiento adyuvante muestra una mejoría escasa de resultados. En cinco estudios, el tiotepa produce remisión completa del tumor entre el 12-41% de los casos mientras que en los cuatro restantes no existe ventaja alguna por lo que no se aconseja el uso de esta sustancia. El tiotepa proporciona los mejores resultados cuando se usa en el tratamiento de los tumores de bajo grado (Prout y cols., 1983) y los peores en el tratamiento del Cis (Koontz y cols., 1981). En un estudio prospectivo aleatorio comparativo de tiotepa frente a BCG, se ha demostrado que aquel es menos eficaz que BCG en el tratamiento del cáncer superficial de vejiga, (Brosman, 1982). El tiotepa es rápidamente absorbido por el urotelio distribuyéndose a nivel sistémico y provocando efectos indeseables como la mielosupresión en el 15-20% de los enfermos tratados. Además, se ha descrito cierto incremento del riesgo de desarrollar trastornos hematológicos malignos consecuentemente al uso de quimioterapia intravesical con tiotepa (Sonneveld y cols., 1990).

1.11.1.b.3.b.- Etooglúcido

Es un agente alquilante similar al tiotepa aunque de mayor peso molecular y, por lo tanto, tarda más tiempo en ser absorbido por el urotelio reduciendo la frecuencia de mielosupresión. En contraste, causa mayor irritación vesical (cistitis química). El protocolo terapéutico se inicia con una dosis del 1 % durante 1-2 semanas tras la RTU a lo que siguen entre 4 y 10 dosis de periodicidad semanal. Por último, se administra una dosis mensual hasta completar el año de tratamiento. La respuesta completa se obtiene en el 45% de los pacientes así tratados y la remisión parcial en el 35% del resto (Lamm, 1983). El tratamiento con etoglúcido tras RTU mejora los resultados de la RTU sola a nivel de tiempo de recurrencia aunque no afecta a la progresión ni a la supervivencia (Duque y Loughlin, 2000).

1.11.1.b.3.c.- Mitomicina C

La mitomicina C es un agente quimioterápico antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis del ADN. Su peso molecular es mayor que el de las anteriores por lo que se absorbe más lentamente por el urotelio y tiene mejor tolerancia. Se suele administrar en una dosis variable de 20-60 mg diluidos en agua en una proporción de entre 0,5-2mg/mL. Lo más común son las instilaciones vesicales de 40 mg en 40 mL de agua destilada semanales durante cuatro a ocho semanas seguidas de dosis mensuales de mantenimiento hasta alcanzar el año. La remisión completa se da en el 40% y la parcial aproximadamente en otro 40% (Lamm,

1983). La mitomicina C se muestra en los diferentes estudios como el agente más eficaz frente a los tumores de alto grado (Soloway, 1984). Aunque el principal efecto adverso de este tratamiento la cistitis química que se observa en un 10-15% de los casos puede llevar a la contracción de la vejiga, calcificaciones murales y erupción cutánea en genitales.

El uso de mitomicina C como profiláctico del desarrollo de cáncer musculoinvasivo se propuso en un controvertido ensayo clínico prospectivo (Huland y cols., 1984) en el que se excluían pacientes con tumores múltiples, recurrentes y de alto grado. Sus hallazgos de recurrencia y progresión no coincidían con los de otros autores (Denovic y cols., 1983) que sí incluían dicho grupo de pacientes. El uso de mitomicina C se ha tratado de comparar con BCG en el tratamiento del Cis o en tumores superficiales recurrentes. Como resultado de este ensayo se cree que el BCG proporciona índices de control significativamente mejores (Lamm et al, 1995). El tratamiento con mitomicina C tras RTU mejora los resultados de la RTU sola a nivel de tiempo de recurrencia aunque no afecta a la progresión ni a la supervivencia, (Duque y Loughlin, 2000).

1.11.1.b.3.d.- Doxorrubicina

La Doxorrubicina (Adriamicina) es un agente quimioterápico antibiótico de mayor peso molecular que la mitomicina C siendo su absorción por el urotelio mínima, menor del 1%. Suele administrarse en dosis que oscila entre 30 y 100 mg en una concentración de 1 mg/mL aunque se instila con una frecuencia no consensuada que varía de las tres veces por semana a una vez por mes. La remisión total aparece en algo menos de la mitad de los pacientes, y la remisión parcial en aproximadamente el tercio. La respuesta no depende del grado tumoral. En estudios comparativos con BCG para el tratamiento del Cis y la profilaxis contra la recurrencia tumoral, la doxorrubicina es significativamente menos eficaz (Lamm y cols., 1991). Entre los efectos adversos de este agente se incluye la cistitis química que puede llegar a ser severa en bastantes casos. Como en los fármacos anteriores, la doxorrubicina tras RTU mejora los resultados de la RTU sola a nivel de tiempo de recurrencia aunque no afecta a la progresión ni a la supervivencia (Duque y Loughlin, 2000).

1.11.1.b.3.e.- Epirubicina

La epirubicina es un derivado antracíclico de la doxorrubicina de similar mecanismo de acción pero con menor toxicidad. La dosis oscila entre 50-80 mg y una concentración de 1-1,6 mg/mL. La primera dosis es a la 1-2 semanas de la RTU siguiéndole dosis semanales durante ocho semanas y dosis mensuales de mantenimiento hasta alcanzar el año. Los estudios muestran un alto grado de respuesta con 62% de pacientes libres de recurrencia tras un seguimiento de 35 meses (Kurth y cols., 1991). Este fármaco es mejor que la doxorrubicina en lo que se refiere a tasa de recurrencia y toxicidad.

Los efectos adversos publicados hasta ahora son muy reducidos siendo la retracción vesical (1%) y las reacciones alérgicas los principales.

1.11.1.b.3.f.- Mitoxantrona

La mitoxantrona es un derivado sintético de la antraquinona y con una función similar a la de la doxorubicina. En un estudio prospectivo aleatorizado y controlado, la mitoxantrona no mejora las tasas de recurrencia respecto RTU sola ni mejora las cifras de progresión aunque sí optimiza y prolonga el tiempo hasta la recurrencia (Flamm y cols., 1995).

1.11.1.b.3.g.- BCG

El BCG es una cepa atenuada del *Mycobacterium bovis* que produce efectos de estimulación inmunológica de claros efectos antitumorales. Administrado por vía intravesical se ha mostrado como el agente terapéutico más eficaz frente al cáncer vesical superficial (Martínez Piñeiro y cols., 1990). Se sabe que el BCG actúa adhiriéndose al urotelio desnudo concretamente a la fibronectina de la membrana basal de modo que cualquier situación que interfiera esta afinidad repercutirá en un peor resultado de la terapia (Malmstrom y cols., 1993). En lo que a la dosis se refiere, no existe un consenso universal; lo que si ha de tenerse en cuenta es que el éxito o fracaso de esta terapia reside en dos variables que son:

- a) El estado inmunitario del huésped.
- b) La potencia de la vacuna.

Se piensa que cada instilación debe llevar un mínimo de 10⁷ microorganismos para ser eficaz. La dosis aconsejada para las diferentes cepas son: Armand-Frapier, 120 mg; Pasteur, 75-150 mg; Tice, 50 mg; Tokio, 40 mg; Connaught, 120 mg y Dutch (RIVM), 120 mg. Los estudios sobre dosificación muestran que una dosificación menor de BCG aportará menor toxicidad e iguales resultados en los tumores de malignidad intermedia pero no en el Cis ni en los de grado alto (Dalbagni y Herr, 2000).

El BCG se administra en tres situaciones clínicas:

1. Como profilaxis en pacientes libres de tumor tras RTU.
2. Como tratamiento del tumor residual de pacientes con tumor papilar urotelial que no sea Cis.
3. Como tratamiento de pacientes con carcinoma in situ.

Se han utilizado múltiples cepas atenuadas de BCG y se ha reforzado el tratamiento endovesical con administración suplementaria por vía intradérmica u oral con resultado satisfactorio.

Se ha sugerido la idoneidad de hacer dos ciclos de tratamiento con respecto a la pauta terapéutica de un solo ciclo pues se cree que así se incrementa la tasa de resolución completa de una manera estadísticamente significativa (Haaf y cols., 1986). Un tercer ciclo aportaría más riesgos que beneficios (Catalona y cols., 1987). También el segundo ciclo estará indicado en pacientes selectos en los que fracasa el primero. Se habla de fracaso de BCG cuando aparece una citología o una biopsia positivas al cabo de 6 meses de la administración; esta evaluación a los seis meses es el mejor factor para la previsión de progresión (Herr y cols., 1989a). Se ha escrito mucho sobre la terapia de mantenimiento de BCG; el tumor se controla

mejor con una pauta de un ciclo de seis semanas seguido de un mantenimiento con tres instilaciones semanales cada tres meses (seis meses) y luego cada seis meses hasta llegar a tres años. Tanto este método como la repetición del tratamiento en caso de recaída, son alternativas razonables para el control de los tumores no invasores (Lamm y cols., 1992a).

Los tumores superficiales vesicales se caracterizan por su clara tendencia a la recurrencia (60-70%) e incluso a la progresión (20-30%). El tumor original nos orienta sobre el comportamiento futuro de un tumor; así los T_aGI progresan en un 4% mientras que los T₁GI progresan en un 29% y los T₁GIII en un 70%. Los estudios prospectivos aleatorizados y controlados han demostrado la efectividad del BCG para prevenir la recurrencia tumoral (Lamm y cols., 1995, Jiménez Cruz y cols., 1997) aunque Herr y cols. (1997) han descrito un índice de progresión del 54% a los 6 años, lo que significa que en la mitad de los pacientes el BCG no tiene eficacia total y que la enfermedad puede resurgir cuando transcurre un tiempo suficientemente largo. Un mejor conocimiento de la biología tumoral permitiría en el futuro una terapia más eficaz.

En el tratamiento del tumor residual papilar urotelial que no sea Cis, con tasas de respuesta completa del 58%, algunos autores incluso han llegado a proponer la administración del BCG en los 10 días que siguen a la cirugía para que los bacilos actúen sobre la mucosa denudada. No obstante, esto se asocia a un mayor índice de complicaciones severas por lo que se aconseja iniciar el tratamiento con BCG tras dos semanas postresección (Messing y Catalana, 1998).

En el tratamiento de pacientes con carcinoma *in situ* es donde el BCG alcanza su mayor eficacia terapéutica de manera que en estudios con un seguimiento de 1-2 años se refleja en una respuesta completa en el 72% de los casos. Al aumentar el tiempo de seguimiento se aprecian tasas de remisión de algo más del 50% (Lamm y cols., 1991). La remisión se asocia a la desaparición de la clínica vesical irritativa. Sin embargo el BCG tampoco consigue alterar la progresión final de la enfermedad, siendo eficaz únicamente para retardar dicha progresión. Por esto, algunos autores preconizan que tras el fracaso de dos cursos terapéuticos con BCG debe considerarse otra modalidad terapéutica (Catalana y cols., 1987).

Los efectos adversos del BCG son múltiples destacando la irritabilidad vesical, que puede mejorar con anticolinérgicos como la tolterodina, además de disuria, polaquiuria, hematuria, fiebre, malestar general, náuseas, escalofríos, artralgias y prurito. También se han descrito prostatitis granulomatosas. En el 6% de los pacientes los síntomas son de tal intensidad que precisan de tratamiento antituberculoso.

1.11.1.b.3.h.- Interferones

Los interferones, por sus propiedades inmunoestimuladoras, antiangiogénicas y antiproliferativas, son utilizados frente a diferentes tipos de tumores. Se emplea en instilaciones vesicales a pesar de que recientes estudios aleatorizados prospectivos dan cifras de regresión tumoral completa inferiores a los descritos para BCG y quimioterapia intravesical (Messing y Catalana, 1998).

El interferón α -2b se ha mostrado eficaz en algunos ensayos frente al Cis. La pauta aconsejada es de cien millones de unidades una vez por semana durante 12 semanas y luego una vez mensual hasta alcanzar el año. Se trata de una dosis alta (las dosis bajas no son tan eficaces) con escaso poder tóxico pero resulta un tratamiento costoso. El uso de este producto parece más eficaz en aquellos pacientes que no se han sometido a quimioterapia intravesical previa que en aquellos en los que dicha terapia fracasó (Torti y cols., 1988). Además, el interferón administrado con otro agente intravesical como el BCG permite mantener buenos resultados con menor dosis y toxicidad por lo que ambos productos podrían actuar sinérgicamente (Brown y cols., 2000).

Se han utilizado otros inmunomoduladores y agentes biológicos como la bropiramina que es un inductor del interferón por vía oral que ha tenido buenos resultados iniciales y que sigue en estudio por responder bien ante casos en los que ha fracasado el BCG. También se han probado instilaciones de factor de necrosis tumoral, de la TP-40 y de interleucina-12, macromoléculas de interés indudable aun cuando están en periodo experimental.

De todo lo enunciado anteriormente parece claro que los quimioterápicos intravesicales no afectan a los índices de supervivencia ni a las tasas de progresión tumoral aun cuando pueden retrasar la recurrencia tumoral. En este sentido la epirrubicina y la mitomicina C parecen ser los agentes más eficaces. También se han hecho estudios en los que se han valorado pautas quimioterápicas combinadas sin resultados significativos. Por último se ha comparado Mitomicina C con BCG con resultados contradictorios.

En términos generales se recomienda el uso de la BCG pensando que ésa es la terapia más eficaz tras la RTU de los tumores superficiales vesicales y en caso de no poder utilizarse ésta, puede recurrirse a otros quimioterápicos para el mismo fin.

Como conclusión podemos afirmar que, en tumores vesicales superficiales de alto riesgo (T_a GIII, T_1 GIII y Cis) sólo el BCG ha mostrado ser eficaz en el retraso de la recurrencia tumoral y de la progresión, debiendo utilizarse como primer agente terapéutico, si nada lo contraindica. Conviene recordar el efecto sinergista del interferón, que puede reducir los efectos tóxicos del BCG sin alterar su eficacia terapéutica. En los tumores de riesgo moderado de recidiva (T_a , T_1 con GI-GII multifocales o recidivados) está indicado el tratamiento con Mitomicina C o de BCG. En los tumores superficiales de bajo riesgo de recidiva y progresión (T_a GI-GII) el escaso riesgo de recurrencia hace que no sea preciso tratamiento endovesical.

1.11.1.c.- Seguimiento de los pacientes

El seguimiento ideal de los enfermos con tumor vesical superficial sería el control cistoscópico y citológico trimestral durante los 18-24 meses que sigan a la RTU del tumor inicial; luego, semestralmente durante 2 años y, por último, revisiones anuales. Se recomienda realizar urografía excretora anual o bianualmente; no en vano, la incidencia de tumor urotelial alto tras un intervalo promedio de 70 meses después del diagnóstico de un tumor vesical es del 2-5% (Zincke y cols., 1984). Esta actitud se preconiza sobre todo en casos de tumores

vesicales próximos a meato ureteral, tumores de alto grado, Cis y existencia de reflujo vesicoureteral que tienen mayor riesgo de desarrollar carcinoma urotelial alto (Miller y cols., 1993a).

Algunos autores han propuesto separar más las revisiones en aquellos pacientes de T_a de bajo grado (Abel, 1983) si la primera cistoscopia trimestral es normal. Pero trabajos como el de Morris (1995) que muestran que el 13% y 22% de dichos pacientes presentan un nuevo tumor a los dos y cinco años respectivamente, obligan a mantener cuidadosamente su seguimiento. La cistoscopia se realizará con el cistoscopio flexible que, en manos de un urólogo adiestrado detectará lesiones de hasta dos milímetros de diámetro.

No se debe obviar el papel creciente que está tomando el uso de la ecografía transabdominal como método de seguimiento de estos pacientes por su inocuidad, por su bajo costo, su alto grado de resolución y elevada información sobre tamaño (descubre tumores exofiticos >5mm con una seguridad del 80%), localización, infiltración (en el 80% de casos) y repercusión del tumor sobre el resto de la vía urinaria y que, en no pocos casos, dilata el tiempo que transcurre entre cada cistoscopia.

1.11.2.- Cáncer vesical invasor (estadios T₂-T₄, N₀-N₂)

En la actualidad existen dos enfoques diferentes para el tratamiento del cáncer vesical con invasión muscular:

1.11.2.a.- La preservación vesical

El objetivo de la preservación vesical consiste en erradicar el cáncer y mantener una función vesical apropiada. Esta tendencia terapéutica tiene como principal arma a la radioterapia radical con intención curativa, aunque también en casos selectos se puede practicar cistectomía parcial y RTU amplia del tumor. Son numerosos los estudios publicados que destacan sus resultados positivos; sin embargo, estos trabajos se focalizan en exceso sobre el subgrupo de pacientes que completan la totalidad del protocolo terapéutico. No obstante, esta tendencia terapéutica parece tener sus mejores resultados en pacientes con cáncer vesical urotelial escasamente invasor, como se refleja en los diferentes estudios publicados; así sólo el 20-30% de los pacientes con cáncer vesical invasor se curan con la radioterapia radical sola. A pesar de que parece que no existe correlación entre el grado de tumor y la respuesta a la radiación (Miller y Johnson, 1973), la radioterapia se usa como opción terapéutica. Su gran ventaja consiste en mejorar la calidad de vida que supone para el paciente la preservación de la función miccional y eréctil, aunque a menudo su toxicidad a corto y largo plazo pueden ser funestos (cistitis, radiodermatitis, rectitis, obstrucción intestinal...).

1.11.2.a.1.- Radioterapia radical sola o con cistectomía de salvamento

La radioterapia externa radical para el cáncer de vejiga consiste en administrar en el tumor una dosis total de 70 Gy en el curso de 7 semanas en 35 fracciones, con 50 Gy dirigidos

a la pelvis. Sin embargo, no se ha documentado que la irradiación de la pelvis permita controlar las metástasis en los ganglios linfáticos (Messing y Catalona, 1998). Las tasas de supervivencia con este tratamiento a los cinco años son del 35% en los T₁, 40% en los T₂, 35% en los T_{3a}, 20% en los T_{3b} y T₄ y del 7% en los N₁ y N₂ (Goffinet y cols., 1975; Greven y cols., 1990). No parece existir correlación entre el grado del tumor y la capacidad de respuesta a las radiaciones. Estos resultados deficientes podrían deberse en parte a errores de la estadificación tumoral, sobretudo en los trabajos más antiguos que basaban el estadiaje en la palpación bimanual (Miller y Johnson, 1973). En series más recientes se mantienen los resultados y, además, se aprecia una tasa de recurrencia tumoral del 50-70% a los 5 años (Pollack et al, 1994). Para reducir efectos colaterales se ha impuesto la irradiación de alto voltaje con acelerador lineal de 10 MeV o 25 MeV frente a la telecobaltoterapia.

La radioterapia intersticial (van der Werf-Messing, 1984) es una técnica que puede asociarse a cistectomía parcial o a radioterapia externa. Esta técnica se asocia con unas tasas de supervivencia del 70-80% a los 5 años; no obstante, presenta un riesgo aumentado de producir cistitis por radiación, por ello se indica sólo en pacientes selectos con tumores pequeños.

Otra técnica emergente es el uso del fraccionamiento acelerado previo al uso de la radioterapia externa convencional y que tendría un efecto facilitador de la respuesta a la radioterapia, aunque presenta un número significativo de complicaciones a corto y largo plazo.

Para el tratamiento del cáncer de vejiga también se han probado en ensayos clínicos el uso de otras partículas aceleradas con la intención de mejorar los resultados obtenidos con la radioterapia con fotones. En teoría, las partículas aceleradas, por sus propiedades, podrían ser al menos tres veces más eficaces que los fotones; sin embargo, su eficacia es variable según los diferentes tejidos. A pesar de todo, las partículas aceleradas no parecen ser más eficaces que los fotones y además se les asocia una mayor incidencia de complicaciones intestinales graves y, en algunos estudios incluso un aumento de la tasa de mortalidad relacionada con el tratamiento (Russell y cols., 1989).

Para mejorar el resultado obtenido con la radioterapia, se ha probado el uso de sustancias químicas que sensibilicen al tumor frente a la radiación. En este sentido fue evaluado el misonidazol. Los estudios preliminares sugerían un posible beneficio que no fue confirmado posteriormente. Además, presentaba una considerable neurotoxicidad. El misonidazol se ha recomendado en protocolos combinados de radioterapia y cistectomía (Ono y cols., 1989). El cisplatino y el 5-fluorouracilo son otras sustancias consideradas sensibilizadores potenciales a las radiaciones que también se están valorando. No obstante, los agentes radiosensibilizantes aún no han sido adoptados de manera general en el tratamiento del cáncer de vejiga (Bydder y col., 1989).

La hipertermia también se ha combinado con la radioterapia, con o sin quimioterapia, para mejorar la respuesta tumoral en pacientes con un cáncer de vejiga avanzado. Este enfoque se basa en el aumento de la susceptibilidad de las neoplasias malignas a los efectos tóxicos de la hipertermia (Kubota y cols., 1984). Se han comunicado respuestas locales completas en hasta un 42% de los pacientes. Los efectos tóxicos colaterales, por lo general,

son más importantes que los observados en pacientes tratados con radioterapia convencional y quimioterapia.

A pesar de ser un tratamiento conservador de la vejiga, la radioterapia tiene aproximadamente un 70% de complicaciones agudas y a utolimitadas durante su aplicación como son la disuria, la polaquiuria y la diarrea. Las complicaciones severas y persistentes se observan en menos del 10% de los casos. Una de las complicaciones más problemáticas es la cistitis actínica refractaria. Este trastorno puede requerir instilaciones de aluminio o formol o una cistectomía paliativa.

El disponer de ensayos predictivos de la respuesta del paciente a la radiación facilitaría extraordinariamente la elección del tratamiento del cáncer vesical infiltrante. Algunas publicaciones sugieren una mejor respuesta a la radioterapia de los tumores papilares respecto a los sólidos aunque otras lo contradicen. Otros estudios afirman que la existencia de elementos escamosos y una elevación de la secreción de gonadotrofina coriónica se asocian a mala respuesta a radioterapia. También se ha propuesto la medida mediante citometría de flujo de la contractilidad del ADN. En cualquier caso, ninguna de estas técnicas ha conseguido la finalidad deseada careciendo actualmente de la práctica clínica y del seguimiento preciso que las valide.

De los pacientes con una respuesta incompleta a la radioterapia, sólo entre el 8 % y el 15% son candidatos adecuados para la cistectomía de salvamento (Goffinet y cols., 1975; Goodman y cols., 1981). Los pacientes tratados de este modo presentan un índice global de supervivencia del 38% a los 5 años. En función de los hallazgos histopatológicos en la muestra de cistectomía, si no se observa tumor residual el índice de supervivencia a los 5 años es de aproximadamente un 70%; en presencia de tumor residual superficial del 50% y en presencia de un cáncer con infiltración profunda de sólo un 25% (Smith y Whitmore, 1981b). Las tasas de morbilidad operatorias asociadas a la cistectomía de salvamento son mínimamente superiores a las asociadas con las de la cistectomía primaria.

1.11.2.a.2.- Radioterapia y quimioterapia neoadyuvante

Otra estrategia destinada a preservar la función vesical en pacientes con un cáncer vesical infiltrante será la quimioterapia neoadyuvante junto a radioterapia, seguidas de cistectomía sólo en los casos necesarios. En este tipo de tratamiento, los pacientes reciben un régimen combinado de quimioterapia con metotrexato, vinblastina, adriamicina y cisplatino (M-VAC) y radioterapia con una dosis de 40 Gy (Shiple y cols., 1988). Luego se vuelve a evaluar al paciente y, en caso de que exista una regresión completa del tumor, se continúa con la radioterapia hasta alcanzar una dosis total de 65 Gy con la intención de esterilizar totalmente la vejiga. En los pacientes que no responden completamente después de la administración de 40 Gy y dos cursos de M-VAC, se recomienda la cistectomía. Los resultados de esta pauta alcanzan una probable superación del proceso manteniendo vejiga en el 29% de casos (Vogelzang y cols., 1993).

Otro protocolo, consiste en poner dos ciclos de cisplatino, uno el día después de la radioterapia y otro, a las tres semanas. Tras el segundo ciclo se realiza un nuevo estadiaje

endoscópico y, según la respuesta, se completa la radioterapia o se procede a la cistectomía. Un estudio realizado para evaluar un protocolo de cisplatino más radioterapia con 10 años de seguimiento mostró una supervivencia del 26%. Son unos resultados buenos respecto a otros más desalentadores publicados en series de poliquimioterapia más radioterapia con 2-4 años de seguimiento con el fin de salvar la vejiga (Raghavan y cols., 1995).

Se dispone de numerosas opciones terapéuticas para los pacientes con un cáncer de vejiga invasor. Sin embargo, en la actualidad, los estudios aleatorizados prospectivos y controlados que comparan la quimioterapia más radioterapia externa frente a la radioterapia sola, no muestran los beneficios de la forma combinada ya sea el cisplatino o el M-VAC el arma quimioterápica a administrar. Por eso, la quimioterapia más radioterapia no podrá ser considerada mejor tratamiento que la radioterapia del cáncer vesical invasor en los pacientes que no deseen o no puedan someterse a la cistectomía.

1.11.2.a.3.- Quimioterapia intraarterial

Varios autores han descrito un tratamiento quimioterápico, con uno o varios fármacos, administrados por vía intraarterial bilateral (vía femoral) más radioterapia con el objeto de proporcionar niveles altos de estos agentes al propio tumor y a los ganglios linfáticos. Los dos agentes más utilizados son el cisplatino y la doxorrubicina, de los que se ha referido un comportamiento radiosensibilizante y sinérgico con la radiación. Se administran tras las primeras 48 horas de radioterapia en una pauta de cuatro ciclos mensuales. Las cifras de supervivencia son muy interesantes, aunque la experiencia y seguimiento son limitados. Con cisplatino y radioterapia se ha descrito una supervivencia próxima al 90% a los dos años (Ethan y cols., 1989). Con doxorrubicina y radiación se ha documentado una supervivencia del 72% a los 5 años (Sumiyoshi et al, 1994). Otros autores han descrito resultados similares e incluso mejores en tratamiento con cisplatino intraarterial seguido de cistectomía.

En cualquier caso, hasta que no se hagan ensayos en fase III no tendremos una idea real del impacto que esta terapia puede tener sobre el tratamiento del cáncer invasor vesical.

1.11.2.a.4.- Resección transuretral

La resección transuretral, como tratamiento único, no está indicada en el cáncer de vejiga con invasión muscular. Las excepciones a esta regla son los pacientes con tumores pequeños asociados con un mínimo grado de invasión muscular superficial (B₁-T_{2a}). Barnes y cols. (1967) ya comunicaron un índice de supervivencia a los 5 años del 40% en pacientes con tumores que infiltraban el músculo vesical sin atravesarlo y que habían sido tratados con una resección transuretral exclusivamente. Esto se ha confirmado en estudios más recientes en los que el índice de supervivencia a los 5 años en pacientes con un cáncer de vejiga en estadios T₂-T_{3a} tratados exclusivamente con resección transuretral era superior al índice de supervivencia documentado en pacientes tratados con radioterapia preoperatoria seguida de una cistectomía radical, o con una cistectomía radical como único tratamiento, o con radioterapia definitiva exclusivamente (Henry y cols., 1988). Sin embargo, los pacientes

tratados con resección transuretral en este estudio, por lo general, presentaban tumores de menor tamaño que los incluidos en los otros grupos. Además, el riesgo de confundir muscularis mucosae y capa muscular por el anatomopatólogo, con el subsiguiente supraestadiaje, hace en estos casos este tratamiento favorable. En los pacientes tratados con RTU en caso de recurrencia local puede practicarse nueva RTU seguida de instilaciones de BCG (Solsona y cols., 1992).

La resección transuretral por lo tanto, debe reservarse para los pacientes con tumores pequeños de bajo o medio grado y una invasión superficial del músculo vesical y para los pacientes en quienes existan razones médicas que contraindiquen la cistectomía.

1.11.2.a.5.- Cistectomía parcial

Al igual que en la RTU, la cistectomía parcial es una opción terapéutica legítima en un grupo de pacientes selectos caracterizados por:

- . Presentar cáncer vesical invasor solitario.
- . No poder ser tratados sin riesgos mediante la resección transuretral.
- . No tener antecedentes de Cis.
- . No tener tumores en cuello vesical ni en trigono.

Así, en estos pacientes se encuentra indicada la obtención de biopsias en sitios seleccionados de la mucosa para garantizar la ausencia de una atipia severa o de un carcinoma in situ en otra parte de la vejiga o en la uretra prostática en la RTU diagnóstica; también se aconseja obtener un borde de resección de 2 cm alrededor del tumor. Si se aplican estos criterios, del 10 al 15% de los pacientes con un cáncer de vejiga invasor serán candidatos adecuados para la cistectomía parcial obteniéndose un índice de supervivencia superior o semejante al documentado con la cistectomía radical (Sweeney y cols., 1992). Podría ser conveniente administrar radioterapia preoperatoria en dosis de 10 a 12 Gy para prevenir la implantación de células tumorales por la apertura vesical en la herida quirúrgica (van der Werf-Messing, 1973).

Si el tumor se encuentra en la vecindad de un orificio ureteral puede ser necesaria una reimplantación del uréter, pero en general, sólo se considera apropiada si el tumor está ubicado en relación craneal o lateral con respecto al orificio ureteral.

La linfadenectomía pelviana se aconseja en los pacientes sometidos a una cistectomía parcial. Aunque no se dispone de informes que avalen su eficacia, en el peor de los casos, el conocimiento del estado del ganglio linfático puede influir sobre el estadiaje y, así afectará la decisión de administrar quimioterapia adyuvante.

Se ha publicado que la administración de quimioterapia preoperatoria con cuatro ciclos de M-VAC (Metotrexato, Vinblastina, Adriamicina y Cisplatino) da una tasa de supervivencia libre de enfermedad del 54% a los 5 años aunque el 46% de los pacientes así tratados, desarrollaron recurrencias la mayoría de las cuales eran de tumores superficiales (Herr y Scher, 1994).

En cualquier caso, los pacientes seleccionados para cistectomía parcial, con o sin quimioterapia previa, deben someterse a estrecho seguimiento cistoscópico por la alta frecuencia de recurrencias (Herr y Scher, 1994).

1.11.2.a.6.- Quimioterapia neoadyuvante

La mayoría de los pacientes con un cáncer de vejiga invasor que, finalmente, mueren, lo hacen como consecuencia de las metástasis a distancia. Por este motivo, se considera que en esos casos se ha llegado al límite de la terapéutica locorregional, representada por la cirugía radical y la radioterapia. Se precisa una terapia sistémica efectiva para tratar las metástasis a distancia ocultas y mejorar, de este modo, los índices de curación. El fundamento racional de la quimioterapia neoadyuvante consiste, no sólo en la posibilidad de disminuir el tamaño de un tumor localmente avanzado, sino también en erradicar las metástasis en los ganglios linfáticos y a distancia.

Los pilares de la quimioterapia neoadyuvante son los siguientes:

- ◆ La posibilidad real de que existan micrometástasis ocultas en el momento del diagnóstico.
- ◆ Conviene tratar las micrometástasis cuando su volumen es todavía pequeño.
- ◆ Un estadio tumoral más bajo que el estadio tumoral clínico inducido por la quimioterapia antes de la cistectomía podría aumentar el índice de supervivencia.
- ◆ El cisplatino puede actuar como radiosensibilizador.
- ◆ La quimioterapia sistémica antes de la radioterapia podría evitar las dificultades relacionadas con el acceso de los fármacos a la neoplasia como consecuencia de la esclerosis vascular inducida por las radiaciones.

La quimioterapia neoadyuvante ha sido evaluada de forma extensa en pacientes que presentan tumores localmente avanzados y extensión perivesical o con metástasis linfáticas regionales. El régimen quimioterápico utilizado es el M-VAC. Los estudios clínicos con el M-VAC después de una resección transuretral agresiva del tumor primario y una reoperación del sitio de dicho tumor han puesto de manifiesto una tasa de respuesta clínica completa del 50% y una incidencia de respuesta patológica completa del 25 al 30% (Herr, 1989b). No se sabe hasta qué punto estas respuestas se deben a la resección transuretral agresiva o al régimen de quimioterapia M-VAC. Los resultados finales del M-VAC sobre la tasa de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo no están bien documentados. Tampoco se sabe con certeza si los pacientes con respuestas clínicas completas deberían ser tratados con una cistectomía. Después del tratamiento con el régimen M-VAC existen errores significativos de supra o infraestadificación clínica de manera que las masas residuales detectables con la TAC pueden estar constituidas por tejido fibroso en el 30 al 40% de los casos; por otra parte, el 33-40% de los pacientes sin indicios clínicos de tumor residual pueden presentar focos tumorales microscópicos al llevar a cabo una cistectomía radical. No todos los estudios con quimioterapia neoadyuvante son alentadores (Tannock y cols., 1989) y se requieren más para concretar la utilidad clínica del régimen M-VAC como terapia

definitiva o como tratamiento neoadyuvante en una táctica de salvamento factorial multimodal.

1.11.2.b.- La reconstrucción vesical

En la reconstrucción vesical el tratamiento inicial consiste en cistectomía radical seguida de la derivación o de la reconstrucción urinaria. La quimioterapia postoperatoria se agregará en los pacientes con hallazgos patológicos que sugieran un alto riesgo de recurrencia tumoral. La cistectomía radical es el tratamiento local más efectivo presentando índices de recurrencia locoregional pélvica del 10 al 20% frente al 50-70% de recurrencia pélvica en los enfermos tratados sólo con radioterapia, con quimioterapia o con la combinación de ambas. La implantación progresiva de derivaciones urinarias continentes y el desarrollo de técnicas preservadoras de nervios que aseguran la potencia sexual hacen que esta tendencia terapéutica sea cada vez más atractiva. Además, se ha descrito un espectacular descenso de la tasa de mortalidad asociada a la cirugía del 20% al 0,5-1%, mientras que la tasa de mortalidad de la quimioterapia se sitúa en el 2-6% (Messing y Catalona, 1998).

Actualmente no existe ningún ensayo en fase III que compare estas dos corrientes terapéuticas del cáncer vesical invasor.

1.11.2.b.1.- Cistectomía radical estándar

1.11.2.b.1.a- Cistectomía

En los hombres la cistoprostatectomía radical es el procedimiento quirúrgico estándar para el tratamiento del cáncer vesical con invasión del músculo. Consiste en una linfadenectomía pélvica (Skinner, 1982) con una escisión amplia de la vejiga y la próstata junto con los pedículos y la grasa perivesical. Si la neoplasia también compromete la uretra prostática se procede a una uretrectomía total. En ausencia de un compromiso tumoral de la próstata el índice de recurrencia uretral es inferior al 5% por lo que la uretrectomía no es necesaria. La cistoprostatectomía radical se asocia invariablemente con una disfunción eréctil.

En las mujeres la cistectomía radical consiste en la exenteración pélvica anterior con escisión amplia de la vejiga y la uretra en continuidad con el útero, las trompas de Falopio, los ovarios y la pared anterior de la vagina. Esta intervención disminuye la capacidad vaginal pero en la mayor parte de los casos no impide el coito vaginal postoperatorio. La uretra debe ser reseçada en todos los casos en que estén afectados cuello vesical y trigono aunque en tumores de cuello de hasta dos centímetros unifocales.

Es importante evaluar los uréteres distales mediante biopsias intraoperatorias en cortes congelados para garantizar la ausencia de cáncer residual. Si se detectan focos tumorales residuales los uréteres deben seccionarse en un nivel más craneal para obtener bordes libres de tumor pues, como es de esperar, los índices de recurrencia son más elevados en pacientes con bordes positivos (Zincke y cols., 1984). En situaciones excepcionales puede darse una atipia severa o un carcinoma in situ que comprometan la totalidad de uno o ambos tractos

urinarios superiores. Son casos poco habituales en los que a veces resulta imposible obtener bordes libres de tumor y puede ser necesario extirpar la totalidad de la unidad renal afectada o proceder con la anastomosis ureterointestinal o con una ureterostomía cutánea. Curiosamente, a pesar de la presencia de tumor en los márgenes de la resección, se han publicado índices de recurrencia tumoral sorprendentemente bajos en pacientes con bordes positivos en los que se ha preservado la unidad renal (Johnson y cols., 1989).

A finales de los ochenta, Schlegel y Walsh (1987) practicaron una modificación de la cistoprostatectomía radical con preservación de los nervios y la función eréctil en la mayor parte de los pacientes. La trascendencia de esta técnica es el impacto positivo que ejerce sobre la calidad de vida del paciente cistectomizado, clásicamente abocado a una pérdida de su vida sexual. También es posible preservar la potencia sexual en pacientes sometidos a una uretrectomía total, aunque es más fácil preservar la función eréctil si la uretra se conserva intacta. Se ha comunicado y aconsejado la uretrectomía diferida para aumentar la probabilidad de preservar la potencia sexual. La cistectomía con preservación de los nervios requiere la sección de las arterias y pedículos vesicales en un nivel inmediatamente contiguo a las vesículas seminales y los uréteres, para evitar de este modo la lesión de los segmentos craneales de los paquetes neurovasculares.

Se ha cuestionado la conveniencia de llevar a cabo una cistectomía radical con preservación de nervios, ya que se ha observado la presencia de ganglios linfáticos afectados en la zona de los pedículos vesicales no extirpados después de esta variante de cistoprostatectomía en el 60% de los pacientes (Pritchett y cols., 1988). La importancia clínica de estos ganglios linfáticos no está clara, pues los resultados comunicados con la técnica neuropreservadora no son desfavorables.

En aquellos casos en los que no es posible preservar la potencia sexual, la función eréctil, por lo general, puede ser restaurada mediante la inyección intracavernosa de agentes vasodilatadores, por la implantación de una prótesis peneana y, últimamente, con sildenafil u otros inhibidores de la fosfodiesterasa tipo V orales.

1.11.2.b.1.b.- Linfadenectomía

Es sin lugar a dudas la mejor forma de determinar el grado de afectación regional linfática del cáncer vesical y, en algunos casos, en los que no exista afectación de órganos a distancia, puede ser una práctica curativa (Freeman y cols., 1995). Siendo la progresión a través de los linfáticos una de las principales vías de diseminación del tumor en la afectación de los ganglios pélvicos, del obturador y de los ilíacos externos, esto obliga a una linfadenectomía amplia regional (Smith y Withmore, 1981). La afectación de ganglios inguinales, ilíacos comunes y paraórticos son ya considerados yuxtarrregionales y supone un peor pronóstico.

La linfadenectomía estándar para la estadificación incluye la extirpación de linfáticos desde la bifurcación ilíaca hasta la fosa obturatriz, el canal femoral y los pedículos vesicales. Ciertos autores son partidarios de resecciones ganglionares amplias mientras que otros no practican la linfadenectomía pelviana.

El beneficio terapéutico potencial derivado de esta práctica puede evaluarse teniendo en cuenta que del 10% al 40% de los pacientes con metástasis en ganglios linfáticos tratados con cistectomía, presentan metástasis limitadas entre el 35-70% (1-2 ganglios bajo la bifurcación ilíaca), y de éstos, el 10-35% se curan. La realización de linfadenectomía pelviana incrementa el índice de curación en un rango del 1 al 10% lo que significa que en pacientes de alto riesgo o edad avanzada, la omisión de esta práctica no alterará el curso del pronóstico final de la enfermedad.

1.11.2.b.1.c.- Derivaciones urinarias

A continuación se describen brevemente las distintas derivaciones urinarias utilizadas en pacientes sometidos a una cistectomía por un cáncer vesical invasor

1.11.2.b.1.c.1.- Ureterosigmoidostomía

Una de las primeras técnicas de derivación urinaria fue la Ureterosigmoidostomía, un procedimiento quirúrgico que en la actualidad se ha visto suplantado por otras técnicas debido a sus importantes efectos colaterales adversos postoperatorios. Los problemas asociados con la ureterosigmoidostomía se relacionaban sobretodo con las complicaciones de la anastomosis ureterocolónica, sobretodo el reflujo que provocaba cuadros sépticos que podían afectar importantemente la función renal. Para contrarrestarlas, se fueron desarrollando diferentes técnicas antirreflujo para las anastomosis ureterocolónicas. Pero estas técnicas sólo evitaban las complicaciones relacionadas con el reflujo y no la obstrucción, la formación de cálculos urinarios, los desequilibrios electrolíticos y la acidosis hiperclorémica sistémica. Además, a nivel de la anastomosis ureterocolónica se desarrollaban neoplasias del colon en casi el 10% de los pacientes. Estos adenocarcinomas podrían ser inducidos por la acción carcinógena de la combinación de los flujos de materia fecal y urinaria sobre la mucosa intestinal (Husmann y Spence, 1990). Éstos han sido, por lo tanto, los factores que han propiciado el abandono de esta técnica y la popularización de otras formas de derivación urinaria en las que el flujo de orina no se encuentra en continuidad con la materia fecal.

1.11.2.b.1.c.2.- Conductos intestinales

La derivación urinaria más popular en el tratamiento del cáncer vesical invasor mediante cistectomía radical y que ha resistido el paso del tiempo es el conducto ileal popularizado por Bricker (1950). Las principales complicaciones descritas en este tipo de derivación urinaria incluyen la inflamación periestomal, la hernia periestomal, la estenosis del estoma, la formación de cálculos urinarios, la estenosis de la anastomosis ureteroileal, la pielonefritis y el deterioro tardío del tracto urinario superior. Casi todos los pacientes se ven obligados a utilizar un dispositivo de recolección externo, que aunque incómodo en un principio, posteriormente la mayoría de los pacientes se adaptan a él.

En los pacientes con una enteritis actínica por radioterapia previa a la cirugía es preferible realizar un conducto yeyunal o de colon transverso. Los conductos yeyunales se usan con poca frecuencia debido al típico trastorno metabólico que causan las pérdidas de sodio y cloro (hiponatremia hipoclorémica) a nivel del yeyuno; este problema requiere una monitorización cuidadosa y reposición de sal. Los conductos colónicos son más apropiados para realizar anastomosis ureterointestinales sin reflujo pero pueden asociarse con una mayor incidencia de estenosis de la anastomosis en el caso de las anastomosis ureterointestinales tunelizadas antirreflujo.

1.11.2.b.1.c.3.- Derivaciones urinarias continentes

El desarrollo de técnicas de derivación urinaria continente que no requieren el uso de un dispositivo de recolección externo representa un avance importante sobretodo en la calidad de vida del paciente. Estas técnicas se basan en usar segmentos intestinales que crean un reservorio que puede vaciarse mediante cateterización intermitente a través de un estoma abdominal continente o que puede ser anastomosado a la uretra para formar una neovejiga ortotópica. Los reservorios construidos exclusivamente con íleon (bolsa de Kock) o con el segmento ileocecal (bolsa de Mainz), la bolsa de Indiana y las variaciones de estas técnicas son los procedimientos más empleados para las derivaciones urinarias continentes. Estas operaciones tienen un elevado índice de aceptación entre los pacientes aunque son técnicamente más complejas que el conducto ileal y el riesgo de complicaciones es mayor (Skinner y cols., 1984). Las complicaciones principales de este tipo de reservorios incluyen el escape de orina a través de las válvulas antiincontinencia, la formación de cálculos en el interior de los reservorios, la dificultad para cateterizar el estoma, las infecciones del tracto urinario y el reflujo vesicoureteral. Las derivaciones continentes pueden ser realizadas sin riesgos en pacientes previamente irradiados, pero estos pacientes se asocian con una mayor incidencia de escape urinario y diarrea postoperatoria (Ahlering y cols., 1988).

Uno de los primeros intentos de cirugía de sustitución vesical por intestino a modo de neovejiga ortotópica fue el procedimiento de Camey (Lilien y Camey 1984). Consiste en aislar y disponer un asa ileal en forma de V anastomosándose, por su borde antimesentérico, directamente a la uretra membranosa. El hecho de que el intestino no sea destubulizado hace que la incontinencia nocturna constituya un problema significativo que, en algunos casos, también se observa durante el día. Las presiones relativamente elevadas generadas por las contracciones peristálticas del asa ileal tubular pueden hacer fracasar el mecanismo antirreflujo provocando pielonefritis y dilatación de las unidades renales comprometiéndolas. Por todo ello, el procedimiento de Camey ha sido reemplazado paulatinamente por la construcción de reservorios ileales o ileocolónicos destubulizados y anastomosados a la uretra (Studer y cols., 1989). Con las neovejigas ortotópicas los pacientes orinan mediante la maniobra de valsalva y relajando el esfínter. Si la vejiga neoformada posee una capacidad adecuada (500 a 800 mL) y mantiene presiones internas reducidas, por lo general, permitirá una evacuación satisfactoria manteniendo una continencia diurna y nocturna. Si la neovejiga

es demasiado voluminosa, la evacuación será incompleta debiendo complementarse el valsalva con cateterismos intermitentes.

En las mujeres, tan sólo en las que se respete la uretra, puede realizarse la neovejiga ortotópica pero es imposible mantener la continencia. Una derivación urinaria continente posible en la mujer, consiste en una modificación de la ureterosigmoidostomía con una bolsa rectal valvulada que separe parcialmente los flujos urinario y fecal (Kock y cols., 1989). No obstante, cuenta con una experiencia insuficiente como para juzgar correctamente los resultados de esta operación.

Es importante señalar que se ha observado un aumento de la absorción del metotrexato en los pacientes con derivaciones urinarias (Fossa y cols., 1990). Este problema es aún mayor en caso de derivaciones urinarias con almacenamiento de orina. También existe la posibilidad de que se desarrolle un cáncer en los reservorios urinarios (Filmer y Spencer, 1990).

Con cualquier variante de derivación urinaria en la que la uretra permanezca en su sitio es importante el seguimiento postoperatorio del paciente con citología urinaria y uretroscopia.

El índice de complicaciones documentado en pacientes sometidos a cistectomía radical y derivación urinaria es aproximadamente del 25%. Entre las complicaciones más comunes se encuentran la infección de la herida (10%), la obstrucción intestinal (10%), la hemorragia, tromboflebitis, trombosis venosas y complicaciones cardiopulmonares. Se han observado lesiones del recto en un 4% de los pacientes. Si la lesión del recto es pequeña, la contaminación fecal es mínima y, si el paciente no ha sido irradiado, el recto puede cerrarse de forma primaria dilatando el esfínter externo y permitir así la curación primaria con bajas presiones intraintrales. En otros casos debe considerarse seriamente la posibilidad de una colostomía de descarga. El índice de reoperación después de la cistectomía es de aproximadamente un 10%. En la mayor parte de las instituciones médicas la tasa de mortalidad asociada con la cistectomía radical ha disminuido hasta alrededor del 1% (Messing y Catalana, 1998).

En conjunto, el procedimiento de reconstrucción vesical y concretamente la cistectomía es el tratamiento más eficaz para el tratamiento del carcinoma musculoinvasor y regional de células transicionales de la vejiga. En las series con este tratamiento en los estadios T₂ y T_{3a}, la tasa de supervivencia a los 5 años oscila entre el 65 y el 82% (Wishnow y cols., 1992). Para el estadio T_{3b} la tasa de supervivencia a los 5 años está entre el 37 y 61% (Skinner y cols., 1991). La tendencia al infraestadiaje clínico de los pacientes de estas series puede hacernos dudar de la superioridad de este tratamiento sobre las técnicas multimodales que persiguen el salvamento vesical pero aún así, los resultados de la cistectomía son considerablemente mejores que los del salvamento vesical.

En una pequeña proporción, pacientes con enfermedad microscópica linfática (N₁/N₂) pueden ser curados con la cistectomía radical más linfadenectomía pélvica alcanzándose tasas de supervivencia a los 5 años del 30% (Freeman y cols., 1995), aunque otros estudios resultan más desalentadores (Smith y Whitmore, 1981a).

De los pacientes sometidos a cistectomía por tumores musculoinfiltrantes (T₂, T_{3a}) fallecieron del 18 al 35% a causa de las metástasis. Las tasas de recurrencia pélvica local en

los estadios T_{3b} y T₄ están por debajo del 12% y aún menos en estadios T₂ y T_{3a}. Precisamente la relativa baja tasa de recurrencia pélvica, así como el hecho de que la mayoría de pacientes que la presentan tienen de forma concomitante o casi concomitante enfermedad a distancia hace que no sea sorprendente la poca repercusión de la radioterapia preoperatoria en la supervivencia. Alternativamente, las significativas tasas de fracasos motivadas por las metástasis han motivado la combinación de la quimioterapia preoperatoria (neoadyuvante) o postoperatoria (adyuvante) que se discutirán en apartados sucesivos.

1.11.2.b.2.- Radioterapia preoperatoria y cistectomía

Se ha estudiado también una terapia integrada por radioterapia preoperatoria seguida de cistectomía. Inicialmente se obtuvieron unos resultados de supervivencia significativos con respecto a radioterapia o cistectomía solas (Whitmore y cols., 1977); pero, posteriormente no se han visto confirmadas (Bloom y cols., 1982; Crawford y cols., 1987). El índice de supervivencia a los 5 años en la mayoría de los pacientes tratados con esta terapéutica integrada oscila entre el 35% y el 40% de los pacientes con un cáncer de vejiga en los estadios B₂ y C/ T₃ (Droller, 1982). Varios investigadores han publicado datos que corroboran unos índices de supervivencia similares, si no peores, en los pacientes tratados con la terapéutica integrada respecto a los de los tratados con una cistectomía exclusivamente (Mathur y cols., 1981; Skinner y Leiskovsky, 1984). En síntesis, la radioterapia preoperatoria no parece ser efectiva de forma uniforme en los pacientes con un cáncer de vejiga invasor.

La radioterapia preoperatoria puede retardar considerablemente la cistectomía; esta demora podría permitir la diseminación de las células tumorales en casos en los que la cistectomía temprana fuera curativa. Otros efectos negativos potenciales incluyen un aumento de la incidencia de las infecciones de heridas (Prout, 1976) y complicaciones intestinales, sobre todo en los pacientes de edad avanzada tratados con altas dosis de radiación (Whitmore y Batata, 1985); si a todo esto se le suma su elevado costo, la tendencia actual consiste en omitir esta modalidad antes de la cistectomía en pacientes con un cáncer de vejiga invasor.

A pesar de todo, se han barajado varios beneficios de la radioterapia preoperatoria como es la disminución del índice de recurrencia local en la pelvis; aunque esta observación no se ha confirmado. Otro efecto positivo es el beneficio que aporta en el tratamiento de los pacientes con cáncer vesical por bilharziasis en estadios T₃ y T₄ (Ghoneim y Awad, 1980), y en pacientes con un carcinoma invasor de células escamosas (Swanson y cols., 1990).

1.11.2.b.3.- Quimioterapia neoadyuvante y cistectomía

La quimioterapia neoadyuvante puede utilizarse junto a la cistectomía total o parcial. Los estudios realizados con M-VAC o con CMV seguido de una de estas técnicas quirúrgicas muestran tasas de supervivencia muy similares o mínimamente inferiores a las de las series de cistectomías contemporáneas. La realización de quimioterapia M-VAC perioperatoria, dos ciclos antes y dos después de la cistectomía, tampoco superan a la cistectomía. El efecto beneficioso que se ha atribuido a esta poliquimioterapia es su capacidad citorreductora del

tumor permitiendo que una serie de tumores irreseccables se transformen en operables; sin embargo, esto tan sólo será realmente útil en pacientes selectos con la enfermedad localmente avanzada y no en todos aquellos que presenten enfermedad regional o a distancia (Shultz y cols., 1994).

A falta de un estudio prospectivo aleatorizado controlado que compare la cistectomía sola con la quimioterapia neoadyuvante más cistectomía, se puede afirmar que la quimioterapia neoadyuvante no es el tratamiento estándar de los tumores vesicales infiltrantes y que tan sólo tiene un efecto beneficioso en pacientes con enfermedad localmente avanzada y con posibilidades de extirpación quirúrgica .

Las desventajas de la quimioterapia neoadyuvante son similares a las de la radioterapia preoperatoria:

- ◆ El índice de morbilidad puede ser lo bastante alto como para impedir una cistectomía ulterior.
- ◆ En los pacientes que no responden, la demora podría permitir que se desarrollaran metástasis.
- ◆ La imprecisión propia de la evaluación de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante puede inducir a error, sobretodo en los pacientes con respuestas clínicas completas que luego rechazan la cistectomía.

1.11.2.b.4.- Quimioterapia adyuvante

La finalidad de un tratamiento postcistectomía con quimioterapia sería combatir la enfermedad a distancia en aquellos tumores patológicamente más desfavorables (T_{3b} , T_4 , N_1 - N_3). Se han realizado estudios prospectivos aleatorizados con cisplatino, con el régimen M-VAC y con un régimen poliquimioterápico de cisplatino, ciclofosfamida y adriamicina (CISCA). El uso de tres ciclos de cisplatino postoperatorio se ha comparado con la cistectomía sola no dando resultados de supervivencia a los 5 años significativamente mejores, 57% vs. 54% (Studer y cols., 1994).

El uso de cuatro ciclos mensuales postoperatorios de CISCA mostraba un retraso temporal de la progresión de la enfermedad respecto a los tratados sólo con cistectomía 4,3 años vs. 2,4 años. Además los pacientes tratados con CISCA mostraban un índice de supervivencia libre de enfermedad a los tres años del 70% mientras que en el grupo control este índice era del 46% (Skinner y cols., 1991). El uso de régimen poliquimioterápico con M-VAC o MVEC (sustituye la adriamicina por epirrubicina) tras cistectomía radical con linfadenectomía pélvica se ha comparado con cistectomía sola en pacientes con estadios T_{3b} , T_4 , N_1 y N_2 apareciendo una mejoría significativa de la supervivencia libre de progresión tumoral a los tres años: 13% en las cistectomías vs. 58% de los tratados con quimioterapia (Stockle y cols., 1995).

Los trabajos arriba descritos han sido criticados por varios motivos en el diseño del ensayo que hace que tengan importantes sesgos, sobretodo de selección. Además, las diferencias estadísticamente significativas se apreciaron a nivel del estatus libre de enfermedad pero no en el de supervivencia. Como conclusión, parece que la situación en la

que el régimen terapéutico CISCA parece más ventajoso es en los pacientes con un solo ganglio positivo (N₁). Paradójicamente si hay afectación de más de un ganglio, la quimioterapia no aporta ventajas reales a la cistectomía sola (Skinner y cols., 1991).

Por lo tanto para evaluar este tratamiento se precisa un ensayo clínico bien diseñado, extenso en número y seguimiento y con la supervivencia como principal parámetro para analizar.

1.11.3.- Enfermedad metastásica: estadios N3 M1

1.11.3.a.- Quimioterapia citotóxica

Anteriormente hemos citado los agentes quimioterápicos con una actividad documentada contra el carcinoma del epitelio de transición, y que son el cisplatino, el metotrexato, la vinblastina y la doxorubicina. Administrados por separado, estos agentes inducen una regresión objetiva del tumor en el 20 al 30% de los pacientes aunque casi todas estas respuestas son sólo regresiones parciales de unos 6 meses de duración (Soloway, 1985).

El tratamiento combinado con tres o cuatro de estos fármacos ha sido evaluado en diferentes ensayos clínicos. Uno de estos regímenes se basa en el uso de cisplatino, metotrexato y vinblastina (CMV); otro combina los cuatro fármacos, M-VAC, y se consideran como el más efectivo disponible en la actualidad frente a la enfermedad diseminada del cáncer vesical. De hecho, en un ensayo en fase II este tratamiento, en pacientes bien seleccionados, se asoció con un índice de respuesta objetiva del 57 al 70% y con respuestas completas en el 30 al 50% de los pacientes. Estos índices de respuesta fueron menores en estudios posteriores, probablemente debido a que el régimen M-VAC fue utilizado en un espectro más amplio de pacientes. En estudios más avanzados, la tasa de respuesta completa fue del 13% y la supervivencia a los dos años, de apenas el 20%. Este bajo índice de respuesta prolongada se logra a expensas de una toxicidad relativamente elevada en pacientes que requieren internaciones hospitalarias frecuentes por sepsis secundarias a la granulocitopenia. El régimen M-VAC se asocia con un grado considerable de toxicidad y los efectos colaterales adversos más frecuentes son sepsis, insuficiencia renal, y mielosupresión. En total, un 4% de los pacientes fallecieron por causas relacionadas con los fármacos. Tanto la sepsis como la mielosupresión mejoraron después de la administración de factor estimulante de las colonias de granulocitos (Gablilove y cols., 1988). Se ha intentado usar esta sustancia para potenciar el efecto de la quimioterapia, lo que parece mejorar la respuesta total y parcial aunque no modifica la media de supervivencia e incrementa la mortalidad por la medicación a un 23%. Por este motivo no es una práctica que se haya impuesto.

En aquellos pacientes con importante insuficiencia renal en los que está contraindicado el cisplatino se ha sustituido este por carboplatino consiguiendo unos efectos similares.

La relación beneficio-riesgo de la quimioterapia citotóxica deja mucho que desear. Hasta el momento no se sabe con certeza si los casos de supervivencia prolongada se deben al régimen de quimioterapia o meramente a la biología de tumor. Por lo tanto, si bien el régimen

M-VAC ejerce una actividad indudable contra el carcinoma del epitelio de transición, está lejos de ser un régimen quimioterapéutico realmente satisfactorio.

1.11.3.b.- Paclitaxel (Taxol)

El taxol es un agente antimicrotubular con una actividad considerable en diferentes tipos de cáncer metastásicos de origen no urológico y, para evaluar su efecto terapéutico en éste último, se han comenzado diferentes ensayos. Los resultados en fase II cifran en un 42% la tasa de respuesta objetiva. Sería interesante probarlo en aquéllos que no respondieran al régimen M-VAC. Los efectos tóxicos asociados son sepsis por granulocitopenia, mucositis y neuropatías (Messing y Catalona, 1998).

1.11.3.c.- Ifosfamida

Se ha probado sola o en poliquimioterapia en otros tumores. Se está ensayando en aquellos pacientes que han fracasado previamente con la quimioterapia sistémica y se han dado datos de un 10-20% de respuesta en pacientes pretratados.

1.11.3.d.- Nitrato de Galio

El nitrato de Galio es un metal pesado como el cisplatino y el carboplatino con una actividad antitumoral similar, aunque con una importante toxicidad consistente en hipocalcemia e hipomagnesemia severas. Se utilizaría en el tratamiento del cáncer vesical metastático en el que fracasa la poliquimioterapia convencional (M-VAC) en ciclos cortos de infusión continua para evitar su toxicidad. Se ha documentado una respuesta parcial del 17%.

Se han probado pautas poliquimioterápicas para enfermedad vesical a distancia con Nitrato de Galio, ifosfamida y vinblastina (VIG) pero con resultados que no alcanzan a los obtenidos con CMV o con M-VAC por lo que en la actualidad nada justifica el uso de estos otros quimioterápicos.

1.11.3.e.- Inmunoterapia y cáncer vesical metastático

Se han efectuado estudios inmunológicos extensos del cáncer de vejiga, tanto en animales de experimentación como en seres humanos que han mostrado que se trata de una enfermedad inmunorrespondedora y que se ha reflejado en la terapia como hemos expresado más arriba en el tratamiento intravesical con BCG para el cáncer de vejiga superficial.

El uso de infusiones sistémicas de interleucina-2 recombinada y las reinfusiones de linfocitos estimulados in vitro con interleucina-2 no se han mostrado eficaces en el tratamiento del cáncer metastático de vejiga aunque en el futuro, el conocimiento a fondo de las estructuras antigénicas del cáncer vesical permitirá actuaciones específicas frente a esta enfermedad (Messing y Catalona, 1998).

1.11.4.- Tratamiento paliativo del cáncer vesical

1.11.4.a.- Radioterapia paliativa

La radioterapia con dosis de 30 a 35 Gy administradas en diez fracciones, a menudo, es eficaz para el alivio del dolor provocado por las metástasis óseas. El alivio del dolor, por lo general, es rápido. Es recomendable administrar radiaciones profilácticas en presencia de metástasis asociadas con síntomas mínimos que afecten los huesos que soportan el peso corporal, tales como las vértebras o el cuello del fémur. Las fracturas patológicas pueden ser prevenidas o tratadas mediante métodos de fijación interna.

La radioterapia paliativa con dosis de 40 a 45 Gy puede ser efectiva para el control de los síntomas locales causados por el tumor primario, pero las dosis de esta magnitud también pueden agravar estos síntomas (urgencia, polaquiuria, hematuria y disuria). (Messing y Catalona, 1998).

1.11.4.b.- Instilación intravesical de aluminio o formol

Una disolución de aluminio al 1 % puede ser efectiva en el tratamiento de la hemorragia secundaria a una cistitis rádica. La disolución puede ser instilada mediante irrigación vesical continua sin necesidad de anestesia y, por lo general, es bien tolerada. En ocasiones, puede ser necesario interrumpir el tratamiento debido a la aparición de dolor e irritabilidad vesical. Además existe el riesgo de convulsiones por toxicidad del aluminio en pacientes con una disminución de la función renal (Kavoussi y cols., 1986).

El formol es una disolución al 37% de formaldehído disuelto en agua. Las instilaciones intravesicales de formol se administran en concentraciones del 1 al 10% (formaldehído del 0,37 al 3,7%) con la finalidad de controlar la hemorragia provocada por un cáncer de vejiga avanzado o una cistitis actínica. La disolución de formol es muy irritante para la mucosa vesical, por lo que su instilación exige anestesia general o regional. Dado que una disolución de formol al 10% puede provocar fibrosis y obstrucción de los orificios ureterales, el tratamiento intravesical debe comenzar con la instilación de una disolución al 1% con la reinstilación ulterior de una disolución al 4% en caso de que sea necesario. Antes de comenzar la instilación de formol debe realizarse un cistograma para descartar un posible reflujo vesicoureteral. Si existe reflujo deben colocarse catéteres de Fogarty a lo largo de ambos uréteres y el paciente debe ser inclinado para proteger el tracto urinario superior de los efectos tóxicos del formol. La disolución de formol es instilada en la vejiga y mantenida en contacto con el urotelio durante unos 30 minutos (Messing y Catalona, 1998).

1.11.4.c.- Embolización paliativa de la arteria hipogástrica y cistectomía paliativa

En raras ocasiones, un cáncer de vejiga no controlado o una cistitis hemorrágica pueden provocar hemorragias potencialmente fatales. En estos casos, si la hemorragia no puede controlarse mediante la fulguración, el tratamiento con láser o las instilaciones

intravesicales de aluminio o formol, se lleva a cabo una embolización transfemoral percutánea de la arteria hipogástrica. Si la embolización o la ligadura de la arteria hipogástrica no logran controlar la hemorragia deberá recurrirse a la cistectomía paliativa como última opción (Messing y Catalona, 1998).

1.11.5.- Predictores de progresión del cáncer vesical invasor

1.11.5.a.- Predicción de metástasis linfática y de la invasión a distancia

El grado y la profundidad tumoral son los principales factores predictivos de la probabilidad de desarrollar metástasis linfáticas en los pacientes con tumores vesicales infiltrantes. Los tumores más anaplásicos y profundos (muscular profunda y grasa perivesical) son los que con mayor probabilidad afectarán a los ganglios linfáticos. Además, existe una correlación entre metástasis ganglionar y metástasis a distancia aunque, a veces, pueden darse las metástasis a distancia sin que se afecten los linfáticos (Kern, 1984).

1.11.5.b.- Predictores de quimiosensibilidad o quimiorresistencia

Una importante variedad de genes; entre los que se incluyen los que codifican la familia enzimática de la glutatión transferasa y el gen de multirresistencia a drogas resistente (MDR) que codifica p-glicoproteína se han visto implicados en la resistencia a la quimioterapia. Las proteínas codificadas por el gen MDR actúan como una bomba dependiente de energía que crea resistencia a múltiples sustancias farmacológicas. Desgraciadamente el grado de respuesta a la quimioterapia sistémica del cáncer urotelial es bajo y además, se ha comprobado una independencia de la acción de estos fármacos con respecto al gen MDR. Por todo ello, no se dispone de ningún predictor de la respuesta a la quimioterapia sistémica usada en el cáncer vesical avanzado (Messing y Catalona, 1998).

1.11.5.c.- Expresión de p53 nuclear y otros marcadores moleculares de pronóstico

El gen p53 es un gen tumor supresor que actúa como un factor de transcripción capaz de regular la expresión de muchos otros genes tales como *gadd45* o *p21*. Además p53 forma parte de una vía que:

- ◆ Retrasa o inhibe el proceso de síntesis de ADN como respuesta a las distintas situaciones de estrés como exposición a agentes genotóxicos, hipoxia,...
- ◆ Induce los mecanismos de reparación de ADN
- ◆ desencadena la muerte celular programada o apoptosis si el daño es irreparable. (Cordon-Cardo, 1995; Olumi, 2000)

La presencia de p53 en los núcleos de células tumorales (detectados mediante inmunohistoquímica) se correlaciona con la existencia de mutaciones de p53 en análisis genéticos y por tanto, con su inactivación (Esrig y cols., 1993). También se ha observado una correlación entre acumulación nuclear de p53 y pobre supervivencia tanto en los tumores

vesicales superficiales como en los infiltrantes (Esrig y cols., 1994). Sin embargo, las conclusiones de los trabajos publicados son controvertidas por no presentar un consenso metodológico que afecta a la técnica utilizada, el tipo de anticuerpos y los valores de corte que permitan la comparación de resultados y, por lo tanto, p53 no puede ser considerada por el momento un marcador pronóstico en el cáncer vesical (Olumi, 2000) (Zlota y Schulman, 2000).

Se ha especulado sobre la posibilidad de utilizar p53 como marcador de respuesta a la quimioterapia en base a trabajos en los que a pacientes tras la cistectomía por cáncer vesical invasor se les analizó la inmunorreactividad a p53 y se comprobó que los tumores más inmunorreactivos, que son los que tienen un peor pronóstico, serían también los que tendrían mejor respuesta a la quimioterapia adyuvante; sin embargo esto no se ha confirmado en otros estudios (Olumi, 2000).

Otro marcador molecular pronóstico propuesto es el receptor del factor de crecimiento epitelial ya discutido en la página 15.

1.12.-MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER

El cáncer, la metilación de ADN, la estructura de la cromatina y la transcripción del ADN han sido, hasta ahora, estudiados como fenómenos separados con escasa conexión entre sí. La investigación sobre el genoma humano está aportando pruebas de que entre los procesos anteriormente citados existe una compleja red de interacciones y de dependencias mutuas que se resumen a continuación:

El cáncer debe ser considerado como fenómeno poligenético y poli-epigenético. En efecto, la carcinogénesis es el resultado de múltiples procesos bioquímicos consistentes en cambios genéticos y epigenéticos que incluyen:

- ◆ Activación de oncogenes
- ◆ Pérdida de genes tumor supresor
- ◆ Alteraciones de genes que regulan la proliferación y la apoptosis celular
- ◆ Cambios en la respuesta celular a sustancias de naturaleza hormonal
- ◆ Disfunción de genes involucrados en la reparación del ADN.

Todo lo anterior tiene consecuencias sobre la cinética de proliferación celular y sobre las relaciones de las células tumorales con sus vecinas, fenómenos que caracterizan el cáncer y de los que derivan las alteraciones genéticas o epigenéticas que, transmisibles a la descendencia celular, se encuentran en la mayor parte de las células que pertenecen al proceso neoplásico.

Se han destacado mutaciones en genes individuales como causas determinantes de carcinogénesis. Entre ellas se incluyen la disrupción de las vías *Rb/p16^{INK4a}*, *APC/β-catenina/Tcf*, *p53/p14^{ARF}/MDM2*, *BRCA1* o *BCRA2*, por ejemplo. La investigación global del genoma puede hacerse por secuenciación o por cADN "microarrays" y, así, se ha conseguido una enorme cantidad de información acerca de los acontecimientos que son importantes en la génesis tumoral. Los estudios realizados, hasta ahora, no han permitido descubrir ninguna

alteración del ADN que pueda servir como elemento potencial de screening general del cáncer, ni como marcador de ningún tipo específico de tumor.

Uno de los fenómenos epigenéticos que más frecuentemente se observa es la metilación de citosinas, en las islas CpG situados en elementos reguladores de la expresión génica. La metilación de promotores se asocia con el retraso en la replicación del ADN, la condensación de la cromatina y la inhibición de la transcripción de los genes afectados. Esto puede ocurrir en las primeras etapas de la progresión tumoral e influir de manera decisiva en muchas de las rutas bioquímicas que anormalmente se activan en el cáncer.

La metilación de promotores está implicada en el origen de la pérdida de la función de los puntos de control del ciclo celular, en la alteración de la función de factores de transcripción, en los patrones de expresión intracelular de receptores, en la modificación de las interacciones célula-célula y célula-substrato, en la inactivación de señales de transducción, de señales de apoptosis y en la evolución de la inestabilidad genética (Baylin y cols., 2001). El ADN metilado se une específicamente con proteínas metil-CpG enlazantes para formar un complejo en el que se incluyen histonas deacetilasas. Esto da origen a una condensación local de la cromatina que excluye a los factores de transcripción y ocasiona la falta de expresión génica (Leonhardt y Cardoso, 2000). El silenciamiento de genes es clonal y se cree que es fisiológicamente irreversible en las células somáticas. A diferencia del tejido del cual proceden, las células neoplásicas contienen genes que, aberrantemente, se encuentran metilados. No se conoce cómo ni porqué se origina este patrón de metilación alterado. Sin embargo, las aportaciones científicas de Herman y Baylin (2000) y de otros autores (Esteller y cols., 2001a), nos han hecho saber que la metilación aberrante de determinados promotores de genes y su identificación en los especímenes tumorales, es un procedimiento que señala la perturbación metabólica de las células del cáncer. Su estudio, en los tumores más frecuentes, revela diferencias que sugieren la existencia, para cada tumor, de un perfil de genes hipermetilados distinto (Esteller y cols., 2001a). En los dos últimos años, como se resume a continuación, hemos asistido al incremento continuo de la información relativa al hallazgo de promotores de genes que se encuentran hipermetilados en distintos tipos de cáncer, a la confirmación de que esta anomalía conduce a la ausencia de la proteína por silenciamiento del gen y que la alteración de la cromatina, ocurre en las primeras etapas de la carcinogénesis. La extensión y la aplicación de estos ensayos a la oncología médica pueden ser de enorme interés.

1.12.1.- Metilación en genes supresores de tumores

En células neoplásicas en cultivo, y/o en piezas tumorales procedentes de biopsias, se han encontrado metilados los promotores de los siguientes genes tumor supresor:

p16^{INK4a} : en cáncer de cabeza y cuello (Sánchez-Céspedes y cols., 2000), colorrectal (Esteller y cols., 2000a; Liang y cols., 1999; Toyota y cols., 2000), mama (Silva y cols., 1999 a y b y 2000), pulmón (Belinsky y cols., 1998), vejiga (Salem y cols., 2000; Gonzalgo y cols., 1998; González-Zulueta y cols., 1995), cérvix (Nuovo y cols., 1999), estómago (Hoon Kang y cols., 2001; Tsujie y cols., 2000).

FHIT: en cáncer de pulmón y de mama (Zöchbauer-Müller y cols., 2001).

SYK: en cáncer de mama (Yuan y cols., 2001).

APC: *Adenomatous polyposis coli* en cáncer de mama (Jin y cols., 2001), pulmón (Brabender y cols., 2001), colorrectal (Hiltunen y cols., 1997), cervix (Dong y cols., 2001).

BRCAl: en cáncer esporádico de mama (Bianco y cols., 2000; Magdinier y cols., 2000; Esteller y cols., 2000b) y en cáncer de ovario no hereditario (Bianco y cols., 2000; Baldwin y cols., 2000).

p53: en cáncer de mama (Kang y cols., 2001).

RASSF1A: en cáncer de pulmón (Damman y cols., 2000) y en cáncer de mama (Damman y cols., 2001).

Delated Bladder Carcinoma Chromosomal region candidate DBCCR1 9q32-33: en cáncer de vejiga (Habuchi y cols., 2001).

1.12.2.- Metilación de receptores de señales o de proteínas incluidas en rutas de señalización

Entre ellas, se ha descrito la metilación del promotor de caspasa-8 en el mecanismo de inducción de apoptosis ligada a TRAIL (Eggert y cols., 2001); del receptor de estrógenos (*RE*) en leucemia (Issa y cols., 1996; Toyota y cols., 2001) y cáncer de mama (Nass y cols., 2000), de la proteína G de acoplamiento al receptor (Toyota y cols., 2001); de la proteína estrógeno dependiente pS2 (Fujimoto y cols., 2000). Se ha demostrado la metilación en el promotor del gen *DAP-kinasa* que codifica una proteína proapoptótica que está involucrada en múltiples rutas que llevan a la muerte celular, TNF-alfa, Fas, interferón gamma, entre otras (Cohen y Kimchi, 2001; Hoon Kang y cols., 2001; Tada y cols., 2002). *DAP-kinasa* se encuentra aberrantemente metilado en cáncer gástrico, de mama, de vejiga, de pulmón y de riñón. Sabemos que la metilación de este promotor acontece en los primeros estadios de la génesis tumoral. También se ha demostrado que la presencia de cambios epigenéticos a nivel del promotor del receptor beta del ácido retinoico y de twist ocasiona el silenciamiento de estos genes en una considerable proporción de casos de cáncer de mama (Evron y cols., 2001a). La E-cadherina es una molécula que permite la adhesión célula-célula y la pérdida de su expresión por metilación del promotor de su gen es también frecuente en cáncer (Fearon y cols., 2000).

1.12.3.- Metilación en genes relacionados con los mecanismos de control del ciclo celular

Los puntos de control del ciclo celular juegan un importante papel en el mantenimiento de la integridad de las células y de la fidelidad de la duplicación del ADN. La proteína 14-3-3 sigma está regulada por p53 e interviene en la parada de las células en el punto G₂/M del ciclo celular. El gen que codifica esta proteína se encuentra metilado a nivel de su promotor en cáncer gástrico, colorrectal, hepático (Suzuki y cols., 2000) y de mama (Ferguson y cols., 2000). La pérdida de expresión de ciclina D2 en la mayoría de los cánceres

de mama está también asociada con la hipermetilación de su promotor (Evron y cols., 2001 a y b).

1.12.4.- Metilación de promotores de genes implicados en la reparación del ADN

En cáncer de colon, la inestabilidad del genoma se inicia por el silenciamiento del gen *hMLH1* que ocurre por metilación de las citosinas de su promotor. El gen *hMLH1* participa del proceso de reparación del ADN (Grady y cols., 2001). Las personas, cuyas células del compartimiento germinal contienen una mutación en el gen *hMLH1* están predispuestas a padecer cáncer de colon familiar, el cual, se caracteriza por la presencia de mutaciones ampliamente distribuidas en secuencias repetidas del genoma que se denominan “*inestabilidad de microsatélites*” o fenotipo MIN+. La mayoría de los tumores con pérdida de esta capacidad de reparación muestran el fenotipo MIN+ y son deficientes en la expresión de la proteína *hMLH1* como consecuencia de la hipermetilación del promotor del gen (Plumb y cols., 2000; Hoon Kang y cols., 2001; Deng y cols., 1999; Yanagisawa y cols., 2000). En pacientes con cáncer de colon familiar es infrecuente la presencia de mutaciones en *hMLH1*, sin embargo el 70-80% de los cánceres MIN+ carecen de la proteína *hMLH1* (Baylin y cols., 2000).

Otra proteína implicada en el proceso de reparación del ADN a través de la vía de corrección por apareamiento equivocado de bases es la O⁶-metil-guanina-ADN metiltransferasa (*MGMT*). Las anomalías en la reparación del ADN durante el proceso de duplicación se consideran como elementos clave en la génesis de mutaciones. Recientemente se ha descrito que las alteraciones epigenéticas del gen *MGMT* son las responsables de corregir los aductos que los agentes alquilantes provocan sobre la guanina por adición de grupos metilo o etilo. La base modificada, O⁶-metilguanina, se lee como adenina y aparea con la timina durante los procesos de reduplicación o transcripción del ADN. Sabemos que las mutaciones que se producen como consecuencia de la exposición a agentes alquilantes son transiciones G:C a A:T. Evitar estos efectos mutágenos es un proceso que depende de la presencia y la actividad de la enzima *MGMT* que separa los grupos alquilo de la posición O⁶ de la guanina en una reacción que inactiva una molécula de *MGMT* por cada lesión que se repara. Utilizando modelos animales se ha demostrado que los ratones que sobreexpresan *MGMT* están protegidos frente a los aductos que sobre la guanina forma la metil-nitroso-urea y frente a las mutaciones G por A que ocurren en *K-ras* dentro de los tumores colorrectales y de pulmón. El silenciamiento de *MGMT* se asocia con las mutaciones en *K-ras* (Esteller y cols., 2000a). Muy recientemente se ha demostrado que el gen que codifica este enzima sufre metilación en la región del promotor lo que conduce a la ausencia de expresión de la proteína en cáncer (Esteller y cols., 1999a) y a la presencia de mutaciones por transición en el gen de p53 en cáncer colorrectal (Esteller y cols., 2001b). Lo anteriormente descrito es una prueba consistente de que las modificaciones epigenéticas son causa de alteraciones genéticas. Y puede proponerse que, ocurriendo la metilación de los promotores de numerosos genes muy precozmente en el proceso de oncogénesis, la mutación de otros genes biológicamente

importantes, como *p53*, podría ser consecuencia de la adquisición del fenotipo metilado en genes responsables de la reparación del ADN.

El *GSTP1* es un miembro de la superfamilia de Glutation-S-transferasa que cataliza la conjugación del péptido glutation con sustancias de carácter electrofílico presentes, habitual o circunstancialmente, en el interior de las células. Entre ellas están los radicales libres y numerosas moléculas químicas que se consideran carcinógenos potenciales. El enlace de unos y otras con glutation compite con la formación de aductos en las bases del ADN. De esta manera se eliminan los radicales libres y se neutralizan otros agentes genotóxicos. Las glutation transferasas, aunque no son enzimas responsables de la reparación del ADN, al intervenir metabólicamente antes que las lesiones se produzcan, deben ser el primer escalón de defensa frente al daño en el genoma. La concentración y la actividad de estas proteínas enzimáticas es muy variable en tejidos y en tumores la expresión de las enzimas parece dependiente del estado de metilación de su promotor (Esteller y cols., 1998), que este dato tenga relación con la oncogénesis está por demostrar.

1.12.5.- Papel de la ADN metil transferasa

La reacción de transferencia del grupo metilo a las bases citosina ocasiona la metilación del ADN y ocurre en el contexto de los CpG dinucleótidos en las denominadas islas CpG, regiones del ADN que contienen una alta densidad de este par de bases. En la reacción intervienen las proteínas ADN metil transferasas (DNMT). La actividad de estas enzimas se comprueba por:

- ◆ La metilación *de novo*. Proceso en el que se incorporan nuevos grupos metilos a las citosinas del ADN en lugares que previamente no estaban metilados (cadena sencilla del ADN).
- ◆ Por el mantenimiento de la metilación cuando las células se dividen lo que obliga a la conversión de los substratos hemimetilados al estado de metilación completo (cadenas doble del ADN).

Las ADN-metil transferasas identificadas hasta ahora son capaces de realizar ambos procesos. Por ello, la modificación epigenética en la célula se adquiere o se hereda. La metilación completa del promotor de un gen conduce a su silenciamiento. En cáncer, la transmisión del estado de metilación hace que todas las células derivadas del mismo clon manifiesten la anomalía. El estudio de la metilación del ADN extraído de los tumores, ha permitido demostrar que la cantidad de residuos citosina metilados no se relaciona con los niveles de expresión de ninguna de las metiltransferasas conocidas; tampoco ha sido posible demostrar la existencia de relación entre tipos de genes que específicamente se encuentran metilados y actividad de los enzimas DNMT intratumorales. Esto sugiere que la actividad de estas enzimas no desempeña ningún papel en la adquisición de los patrones de metilación aberrante, y específica, que son característicos de algunos tipos de cáncer (Eads y cols., 1999). Por tanto, la metilación es un fenómeno particular cuya magnitud e importancia, a los efectos de diagnóstico y de diseño de posibles estrategias terapéuticas, es independiente de la cantidad de enzima presente. La base molecular que determina la aparición del fenotipo

hipermetilado, en el ADN de los tumores que afectan a los seres humanos, es desconocida y debe buscarse ya en procesos que afectan a la regulación post-transcripcional de los enzimas, bien en la disrupción de los mecanismos que previenen el acceso de las DNMT al ADN (Eads y cols., 1999).

1.12.6.- Diversas alteraciones moleculares pueden detectarse en el tumor y en el suero de pacientes afectos de cáncer

Diagnosticar la presencia de cáncer utilizando marcadores tumorales representa todavía un reto. Los marcadores tumorales deberían ser moléculas capaces de predecir la presencia del cáncer, la eficacia de la terapéutica, la recurrencia y la progresión del tumor. También deberían proporcionar información sobre la multiplicidad del tumor, su agresividad y su tamaño. Es cierto que los marcadores tumorales que habitualmente se utilizan, con carácter general, en oncología poseen características que, al menos en parte, se aproximan a las que teóricamente debería tener un marcador biológico ideal (Reznikoff y cols., 2000; Konety y cols., 2001). En la búsqueda de mejores indicadores, otras moléculas que potencialmente podrían servir como marcadores tumorales están siendo continuamente sometidas a evaluación (Fradet y Lacombe, 2000). Entre ellas recientemente se ha descrito que la pérdida de expresión, en el tumor, de la proteína p21^{Waf1} se asocia con la menor supervivencia de los pacientes afectos de cáncer de vejiga (Korkolopoulou y cols., 2000). Sin embargo, la utilidad de este ensayo en clínica es, hoy día, controvertida (Chow y cols., 2000). Otros estudios han encontrado asociación entre bajos niveles de p27 y mayor grado de invasión vascular (Migaldi y cols., 2000). También se ha sugerido que, en cáncer vesical, la expresión de ciclina D1 está inversamente relacionada con el nivel de invasión del carcinoma de células transicionales en la muscular de la vejiga urinaria (Takagi y cols., 2000).

Parece, por tanto, que la demostración en la biopsia de los tumores de la presencia, o ausencia, de proteínas implicadas en la dinámica del ciclo celular o relacionadas con el tumor, podría mejorar los resultados de la terapéutica oncológica mediante:

- ◆ la identificación de los pacientes que tienen mayor riesgo de padecer recidiva o metástasis, tras el tratamiento inicial.
- ◆ La clasificación de los enfermos en diferentes grupos utilizando para ello criterios cuantitativos capaces de establecer el riesgo individual (Ruiz-García y cols., 1991).
- ◆ La determinación de quienes, de entre los enfermos, deben ser sometidos a estrategias de quimioprevención en orden de evitar la irreversible progresión de la enfermedad.

Conseguir lo que anteriormente se ha enunciado, obliga a buscar nuevas sustancias que cuantificadas en suero, o en otros fluidos biológicos, fueran representativas de las alteraciones bioquímicas o genéticas que ocurren en las células del tumor señalándolas de una manera fiable. Esto es algo que las nuevas tecnologías parecen ofrecer.

En este sentido, sabemos que es posible descubrir y analizar moléculas ADN circulante en la sangre de personas sanas y de pacientes oncológicos (Leon y cols., 1977; Raptis, 1980). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite, además, la

identificación de genes específicos y de las alteraciones genéticas o epigenéticas que les afecten. Mediante el procedimiento de MSP (PCR específica de metilación) se ha logrado demostrar que la metilación del promotor del gen *p16^{INK4a}* es un acontecimiento que probablemente ocurre en las primeras etapas de la oncogénesis y que es crítico para el desarrollo de diversos tumores. Así, la presencia de *p16^{INK4a}* metilado se ha demostrado en suero, o en otros fluidos biológicos, de pacientes afectados de cáncer de hígado (Issa y cols., 2001), de mama (Silva y cols., 1999 a y b), de cabeza y cuello (Grady y cols., 2001) y de pulmón (Esteller y cols., 1999b). Todo ello hace ver que éste es un campo cuya contribución a la oncología clínica puede ser enorme.

Esta última idea ha alcanzado el máximo de interés tras conocerse que Evron y cols. (2001) en un estudio de hipermetilación en tres genes distintos (Ciclina D2, RAR β y Twist), encontraron que al menos uno de dichos genes estaba metilado en el 95% de los cánceres de mama y que esta alteración se detectó en el 86% de las muestras de fluido que se obtiene tras del lavado intraductal de la mama antes de la cirugía. Estas cifras y la posible extensión del método de análisis, combinado de la metilación de tres o más promotores de genes, a muestras obtenidas de la sangre de pacientes sospechosos de padecer cáncer pueden dar origen a procedimientos útiles para el diagnóstico precoz o para el seguimiento de pacientes oncológicos y sus posibles beneficios pueden ser fácilmente imaginados.

1.12.7.- La hipermetilación de promotores de genes como diana terapéutica

Los datos que a lo largo de las páginas anteriores se resumen, parecen demostrar que durante el proceso de oncogénesis, desde la iniciación a la progresión tumoral, distintos genes pueden sufrir cambios epigenéticos que ocasionan que la expresión de sus productos esté ausente en el tumor. Esto puede tener consecuencias funcionales (desequilibrio de la homeostasis celular) y terapéuticas (cambios en la respuesta a agentes genotóxicos) diversas. La metilación de ADN es un acontecimiento que ocurre tras el proceso de replicación del genoma, y se realiza por el enzima DNMT que utiliza la S-adenosil-metionina como donador de grupos metilo los cuales se incorporan a las citosinas del ADN. La metilación del genoma es el mecanismo epigenético más importante para el control de la actividad transcripcional del mismo. Comprender la regulación de la expresión de DNMT, en células de distintos tejidos y de distintos tumores, parece una etapa crítica para llegar a entender cómo la metilación se coordina con otros procesos biológicos.

Muy interesante es el hecho de que la metilación de promotores de genes es diferente en las células del tumor respecto a los tejidos sanos que lo rodean. Es decir, se encuentra metilación de diversos genes en las células neoplásicas y, esos mismos genes, en los tejidos sanos del paciente se encuentran desmetilados (Damman y cols., 2001; Fujimoto y cols., 2000; Evron y cols., 2001b). Esto parece conferir ventaja a las células neoplásicas respecto al entorno en el que se desarrollan. También se ha señalado que la metilación de promotores puede ocurrir en casos diagnosticados como carcinoma in situ (Fujimoto y cols., 2000; Evron y cols., 2001a;), y también en zonas tisulares que manifiestan ciertos cambios preneoplásicos, la colitis ulcerosa (Issa y cols., 2001) o la gastritis crónica (Hoon Kang y cols., 2001); lo cual

es indicativo de que el cambio epigenético es un acontecimiento que ocurre en las primeras etapas de la carcinogénesis. Como quiera que la metilación de las islas CpG se ha relacionado también con la edad (Habuchi y cols., 2001), sería conveniente investigar si el proceso de metilación ocurre de manera patológica y exclusiva en el cáncer o si también aparece, de forma fisiológica, como un mecanismo de involución o de senescencia, en determinados tejidos como la glándula mamaria o el epitelio de la vejiga urinaria, por ejemplo, y finalmente, si este cambio predice el riesgo de padecer cáncer.

Por otra parte, también se sabe que mediante el empleo de inhibidores de la ADN metilasa (DNMT), en líneas celulares tumorales humanas, es posible revertir el fenotipo de hipermetilación de promotores. Mediante este procedimiento se logra que en las células del cultivo, o del tumor experimental, los genes silentes por metilación de su promotor se transcriban. El inhibidor de DNMT más utilizado es la 5' aza-deoxicitidina.

En oncología clínica, desde hace bastantes años, la azacitidina se emplea en el tratamiento de las leucemias y su uso ha sido recientemente revisado (Bigey y cols., 2000). Tras estudiar los resultados obtenidos en terapéutica, y sobre las bases de los hallazgos moleculares más recientes, se ha propuesto un nuevo programa de tratamiento que consiste en la administración de sucesivos ciclos de fármaco, utilizando dosis bajas de azacitidina (≈ 0.15 mg/kg durante diez días en dos semanas), que pueden repetirse a lo largo del tiempo. Se cree que esta pauta que puede ser eficaz para el control de las enfermedades linfoproliferativas y para el mantenimiento de las mismas en fase de remisión (Lubbert, 2000).

Con un esquema terapéutico como el anterior, que busca la reducción de los efectos secundarios indeseables, debe esperarse que la desorganización en la expresión de genes y la reexpresión de otros, provocada por el inhibidor de la DNMT, conduzca a un gradual descenso del número de células. Esto se justifica científicamente por los resultados de trabajos publicados en los dos últimos años en los que, utilizando modelos tumorales, se demuestra la eficacia del fármaco cuando el cultivo se somete a la acción de azacitidina durante 3-5 días (≈ 1 $\mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo a 37°C) y se consigue que los genes silentes se transcriban como ARN y se expresen como proteínas. El incremento de la sensibilidad de las células una vez que se ha conseguido el cambio en la conformación de la cromatina, a través de alterar el patrón de metilación del ADN y de acetilación de las histonas, ha sido ya demostrado en algún experimento (Eggert y cols., 2001; Plumb y cols., 2000).

La desmetilación inducida farmacológicamente, cuando afecta a regiones del genoma que son codificadoras de proteínas esenciales en la respuesta a las acciones genotóxicas, puede ser de interés para diseñar racionalmente combinaciones terapéuticas que intenten mejorar los resultados que hoy, con los medios disponibles, es posible alcanzar. En este sentido parece obvio que:

- ◆ Restaurar las rutas que conducen a la apoptosis de las células.
- ◆ Incidir sobre los mecanismos que regulan el discurrir de dichas rutas a lo largo del ciclo celular.
- ◆ Modular la cadena de señales en la que interviene p53 como sensor del daño inducido sobre el genoma.

- ◆ Inducir la sensibilización de las células del tumor como paso previo a la utilización de radiación.
- ◆ Restablecer la hormonodependencia de las células tumorales.

Son caminos enormemente sugerentes para el desarrollo de la investigación experimental en terapéutica.

Avanzar en cualquiera de ellos puede hacer que la transferencia de resultados desde los modelos experimentales, para la investigación biomédica, a las aplicaciones en oncología se concrete.

HIPÓTESIS
Y
OBJETIVOS

2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.-HIPÓTESIS

Con este trabajo de investigación se busca disponer de información suficiente para avanzar en el campo de la genómica funcional a través del siguiente planteamiento:

La metilación de los promotores de determinados genes, es una alteración epigenética clave en la carcinogénesis. Estas alteraciones epigenéticas proporcionan una señal positiva, indicativa de la presencia del tumor, que puede permitir su identificación en muestras de sangre periférica.

La hipótesis que subyace en este planteamiento se resume en que “A cada tipo de tumor se debe asociar un patrón de hipermetilación distinto y característico”. El conocimiento de tales patrones, y su estudio cuantitativo, puede dar origen al desarrollo de una línea de investigación clínica basada en el empleo de nuevos marcadores tumorales capaces de proporcionar información sobre la presencia/ausencia de la enfermedad neoplásica en etapas de promoción o progresión de la enfermedad previas a la fase en la que es posible el diagnóstico clínico. Las posibilidades que abre esta línea de trabajo tanto para el sector clínico como para la transferencia de resultados a la industria biosanitaria son fácilmente imaginables.

De igual forma, la demostración del papel de esta alteración en el cáncer vesical, proporcionaría la base experimental necesaria para el empleo de los inhibidores de la metilación del ADN como fármacos radiosensibilizantes en oncología radioterapéutica.

E síntesis: el estudio del estado de metilación de genes importantes en biología tumoral debe permitir la definición del perfil epigenético característico del cáncer vesical y este conocimiento puede posibilitar el diagnóstico precoz del proceso neoplásico y aportar nuevos datos capaces de orientar la terapéutica

2.2.- OBJETIVOS

- 1.- Poner a punto los métodos necesarios para identificar la presencia y el estado de metilación de los promotores de genes que podrían ser considerados como marcadores tumorales del cáncer vesical, *p16^{INK4a}*, *hMLH1*, *ciclina D2*, *σ 14-3-3*, *RAR-β* y *Twist*.
- 2.- Cuantificar el ADN en suero de pacientes afectados de cáncer vesical.
- 3.- Conseguir de pacientes que vayan a ser sometidos a cirugía por cáncer de vejiga urinaria, previa petición de consentimiento informado, las siguientes muestras:
 - i) 5 mL de sangre y
 - ii) cuando sea posible, un fragmento del tumor ($\approx 0.5 \times 0.5 \times 0.5$ cm). Utilizando éstas muestras se valorará la utilidad de cada supuesto marcador en términos de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo.
- 4.- Sobre la pieza de tumor de cáncer vesical, determinar el patrón de hipermetilación de los genes mencionados y asociarlo a las distintas manifestaciones clínico-patológicas.
- 5.- Identificar qué genes pueden ser útiles como marcadores tumorales e iniciar un programa de investigación clínica conducente a la valoración de los mismos como elementos capaces de aportar información válida para el diagnóstico precoz de las enfermedades tumorales primarias o metastásicas y para el seguimiento clínico de los pacientes oncológicos.
- 6.- Valorar si la determinación de *p16^{INK4a}* en suero puede ser útil como marcador tumoral de esta neoplasia.
- 7.- Analizar la posible relación entre la presencia de ADN específico y las alteraciones que presente con los parámetros clinicopatológicos característicos de esta patología.
- 8.- Realizar y validar in vitro tests predictivos de radiosensibilidad sobre la pieza tumoral y en linfocitos, siendo éstos, modelo de tejido sano sobre los que evaluar la morbilidad asociada a la radioterapia. Comparar los resultados observados en la clínica y los parámetros obtenidos “in vitro”.

MATERIAL
Y
MÉTODOS

3.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-PACIENTES Y CONTROLES

3.1.1.- Duración y fuentes del material de estudio

La recogida de datos clínicos y analíticos que se presentan en esta memoria de tesis doctoral se realizó entre enero de 1999 y diciembre de 2001. Dichos datos se han obtenido de las siguientes fuentes:

3.1.1.a.- Datos clínicos

- ◆ De la evaluación clínica directa de los pacientes que iban a ser intervenidos por el diagnóstico de sospecha de neoplasia vesical en el quirófano de Urología del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada. En el mismo, se realizaba la toma de la muestra de sangre y de una biopsia del tumor, siempre que éste tuviera un tamaño suficiente y que su obtención no impidiera la realización del estudio histopatológico y del estadiaje.
- ◆ De la evaluación clínica directa de los pacientes con la sospecha clínica-diagnóstica de cáncer vesical o ya diagnosticados y tratados de esta patología que se realizaba en las Consultas Externas de Urología del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada. Tras su reconocimiento se obtenía una muestra de suero.
- ◆ De la evaluación clínica evolutiva de todos los pacientes integrados en el estudio. Para ello se contó con la colaboración del Servicio de Documentación Clínica del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada.

3.1.1.b.- Datos analíticos

- ◆ Se obtuvieron una vez que las distintas muestras de suero y de tumor de los sujetos incluidos en el estudio se procesaron en el Laboratorio de Investigaciones Médicas “Mora Lara” del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada.

3.1.2.- Características de los pacientes y de los controles.

En este estudio se han obtenido muestras procedentes de 44 controles sanos y de 141 pacientes con la sospecha clínico-diagnóstica de cáncer vesical lo que hace una suma de 185 participantes en el estudio. En total se han procesado 297 muestras de suero (150 muestras séricas solas de pacientes, 102 muestras séricas tomadas a la par que las biopsias vesicales y

45 muestras séricas de los 44 controles), 47 de sangre total (de los primeros 47 pacientes para estudio de radiosensibilidad en linfocitos) y 117 biopsias vesicales. Todos los pacientes y controles se escogieron de forma aleatoria aceptando su inclusión en el estudio tras haber firmado un consentimiento informado.

3.1.2.a.- Pacientes

Los 141 pacientes estudiados se pueden clasificar según los siguientes criterios:

3.1.2.a.1.- Según el número veces en las que se obtuvo muestras durante el tiempo de seguimiento

- ◆ Pacientes de los que se obtuvo una sola muestra de suero y/o tumor: 76.
- ◆ Los sometidos a varias tomas de muestras de suero y/o tumor: 65 pacientes. Esto nos permitió valorar a estos pacientes a lo largo del tiempo que duró el estudio. De aquéllos en los que se produjo recidiva, se obtuvieron varias muestras tanto de tumor como de suero.

La tabla 3.1 muestra la distribución de los 141 pacientes en función del número y del origen de la muestra analizada: suero sólo y muestra de tumor/suero conjuntas.

Tabla 3.1.-: Distribución de 141 pacientes en función del número y origen de la muestra analizada.

Muestras/ Tiempo seguimiento	Pacientes	NºRegistros (muestras x pacientes)	*Bx vejiga + Suero	Sólo Suero	Total muestras procesadas
1	76	76	*44 + 35	32	111
2	30	60	*23 + 22	37	82
3	17	51	*23 + 20	28	71
4	12	48	*13 + 12	35	60
5	4	20	*10 + 10	10	30
6	2	12	*4 + 3	8	15
	141	267	*117 + 102	150	369

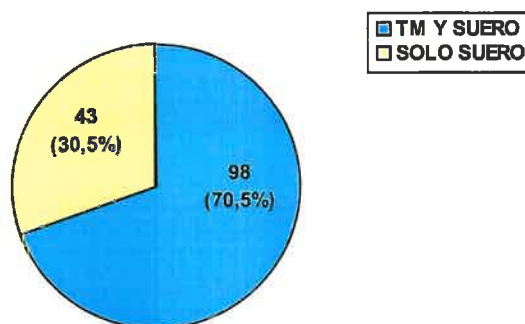
* Bx = Biopsias

3.1.2.a.2.- Según el tipo de muestras del que se dispone (Gráfica 3.1)

- ◆ En 43 pacientes (30,5% del total) se obtuvo únicamente muestra de suero y nunca una biopsia para analizar.

- ◆ En los 98 restantes, 69,5% del total, se dispuso de muestra de sangre o suero y de tejido extraído en el acto quirúrgico, al menos en una ocasión.

Gráfica 3.1.-: Distribución de los 141 pacientes según el tipo de muestra obtenido



El disponer de dos tipos distintos de muestras de un mismo paciente (suero y tumor) nos permitirá comparar y correlacionar el patrón de hipermetilación génica encontrado en el tumor con el observado en la muestra de suero. En la tabla 3.2 se clasifican los 98 pacientes de los que se analizó tejido tumoral en función del número de biopsias que se obtuvieron durante el tiempo de seguimiento.

Tabla 3.2.-: Clasificación de 98 pacientes de cáncer vesical en Función del Número de Biopsias de Tejido Obtenidas durante el Tiempo de Seguimiento.

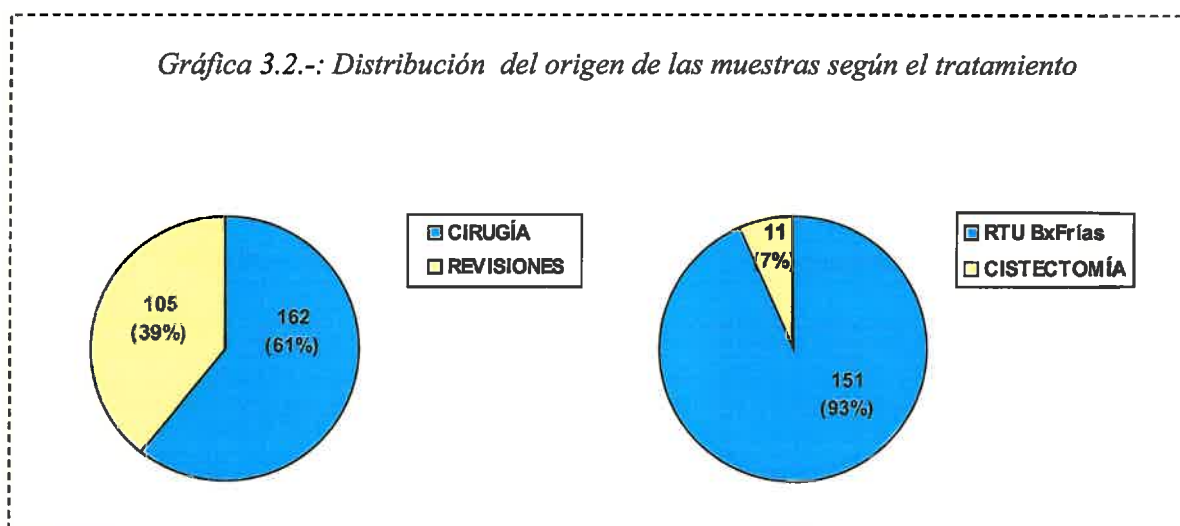
Nº MUESTRAS/ 36 meses	Nº PACIENTES	MUESTRA DE TUMOR + SUERO
1	85	85+71
2	9	18+17
3	2	6+6
4	2	8+8
	98	117+102

3.1.2.a.3.- Según el tratamiento al que se han sometido:

En este apartado distinguiremos aquellos pacientes en los que hemos obtenido muestra sérica y/o biopsica durante el acto terapéutico, de aquellos otros que han cedido su muestra en la consulta en el transcurso de una revisión. Ambos grupos pueden tener los mismos pacientes sucediendo en 50 casos (Intervenidos y revisados). Tan sólo 11 pacientes se sometieron a toma de muestra sérica en consulta sin haberlo hecho antes en el quirófano. Por el contrario en 80 pacientes la toma sérica y/o tumoral se tomó en el acto operatorio exclusivamente.

- ◆ Tratamiento de intención curativa o paliativa:
 - **Tratamiento quirúrgico:** Se llevó a cabo en 162 ocasiones 151 mediante resección transuretral (RTU) o biopsias frías (Bx frías) de mucosa vesical y 11 mediante cistectomía radical (*Gráfica 3.2*).
 - **Radioterapia**
 - **Quimioterapia**
- ◆ Pacientes en revisión y en tratamiento posquirúrgico de tumor vesical. En este caso se obtuvieron 105 muestras de suero pertenecientes a 61 pacientes.

Gráfica 3.2.-: Distribución del origen de las muestras según el tratamiento



3.1.2.b.- Grupo control:

El grupo control está formado por 44 sujetos de los que 31 son completamente sanos y 13 presentan distintas patologías urológicas benignas que se detallan en la tabla 3.3. El único criterio de exclusión en el grupo control es el haber padecido o padecer alguna otra neoplasia. De todos ellos se obtuvo una muestra de suero; biopsia vesical únicamente en 2 casos.

Tabla 3.3.-: Características de los 44 Controles

Número	Patologías
31	Ninguna conocida
13	Patología urinaria benigna
7	Hiperplasia benigna prostática (HBP)
1	Cistitis eosinófila y HBP
1	Cistitis glandular con moderados fenómenos proliferativos
1	Cistitis glandular
1	Edema e inflamación
1	HBP y prostatitis crónica focal
1	Material con cálculos, metaplasia escamosa de cuello vesical

En el paciente con patología urológica no tumoral (edema más inflamación) se tomaron dos muestras separadas por seis meses de seguimiento.

3.1.3.- Tiempo de seguimiento.

Los pacientes se han sometido a seguimiento clínico-patológico y analítico durante un máximo de 18 meses y un mínimo de tres tras la toma de la primera muestra de suero y/o tumor vesical.

3.1.4.- Estudio anatomopatológico de las biopsias tumorales.

Todas las muestras tumorales obtenidas se estudiaron anatomopatológicamente con el fin de determinar el grado de diferenciación tumoral y la profundidad del tumor y, de esta manera, estadiar la enfermedad tumoral. Para ello se utilizaron la clasificación TNM (Hermanek y cols., 1997) y el sistema propuesto por Jewet-Strong-Marshall (Marshall, 1956), los cuales se resumen en las tablas 3.4 y 3.5. En el análisis de datos, también se ha evaluado el grado de afectación vascular y la multifocalidad tumoral; ambas se han registrado como variables binarias (Sí/No).

TABLA 3.4.-: Clasificación TNM

	T: Tumor Primario	N: Linfáticos Regionales	M: Metástasis
X	Tis: Tumor intraepitelial	No se puede evaluar	No se puede evaluar
0	No se demuestra existencia de tumor	No se demuestra existencia de tumor	No se demuestra
1	Tumor que infiltra corion	1 ganglio: diámetro ≤ 2 cm	Sí metástasis
2	Tumor afecta muscular	1 ganglio: $2 \text{ cm} < \text{diámetro} < 5 \text{ cm}$. Varios ganglios: $< 5 \text{ cm}$	
3	Tumor infiltra tejido perivesical	1 ganglio: diámetro $> 5 \text{ cm}$	
4	Tumor invade otros órganos		

TABLA 3.5.-: Estadiaje según Jewett-Strong-Marshall

Estadio	0	A	B*	C	D*
	Tumor papilar no invasor Carcinoma in situ	Tumor que afecta la submucosa	Tumor que infiltra la muscular	Tumor que invade la grasa perivesical	Tumor con afectación extravesical

B*: B1: afectación muscular superficial
B2: afectación muscular profunda

D*: D1: afectación de vísceras pelvianas o ganglios regionales
D2: afectación visceral a distancia o ganglios yuxtarrregionales

3.2.- MÉTODO

3.2.1.- Método clínico-patológico

La recopilación de datos a partir de las historias clínicas se realizaron en el Servicio de Documentación Clínica e "in situ" en las Consultas Externas de Urología del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, haciendo énfasis en una serie de parámetros como son:

- Edad
- Sexo
- Actividad profesional
- Tabaquismo: sí o no; cantidad y tiempo desde que lo abandonó en el caso de exfumadores.
- Antecedentes personales y familiares
- Patologías concomitantes
- Tratamientos concomitantes
- Clínica urológica al diagnóstico con puntuación numérica de síntomas vesicales modificada de Madsen e Iversen (1983): hematuria, polaquiuria, nicturia, urgencia y disuria (Tabla 3.6). Además valoración de tenesmo, incontinencia y jet miccional.
- Clínica urológica tras tratamiento con puntuación numérica de síntomas vesicales modificada de Madsen e Iversen (1983): hematuria, polaquiuria, nicturia, urgencia y disuria (Tabla 3.6). Además valoración de tenesmo, incontinencia y jet miccional.
- Datos analíticos al diagnóstico: hemoglobina (g/dL), creatinina sérica (mg/dL) y PSA (ng/mL).
- Datos analíticos tras tratamiento: hemoglobina (g/dL), creatinina sérica (mg/dL) y PSA (ng/mL).
- Tratamiento y complicaciones del mismo con valoración numérica de calidad de vida de Miller y cols. (1981). (Tabla 3.7): Cirugía, RT con valoración de sus efectos agudos y tardíos (RTOG puntuación LENT-SOMA, 1995) QT sistémica o endovesical.
- Evolución clínica a los 3, 6, 12 y 18 meses de la primera muestra.
- Existencia de tumor en momento de la toma de muestras.
- Anatomía patológica del tumor cuando está presente en la fecha de la toma de la muestra; tipología del tumor y grado de diferenciación.
- Estadio TNM y JSM. (Hermanek y cols., 1997; Jewett y Strong , 1946; Marshall, 1956)
- Invasión vascular
- Multicentricidad tumoral
- Localización tumoral

Estos datos se anotaron inicialmente en fichas diseñadas para tal finalidad (Tabla 3.8) y posteriormente se almacenaron como base de datos en soporte informático (tablas de Excel, Microsoft Word).

TABLA 3.6.-: Puntuación numérica de clínica vesical modificada de Madsen e Iversen

	Hematuria	Polaquiuria	Nicturia	Urgencia	Disuria
0	Nunca	> 3 horas	0 a 1 vez	No	No
1	A veces	2 a 3 horas	2 veces	Leve	Quemazón ocasional
2	Coágulos en orina	1 a 2 horas	3 a 4 veces	Moderada	Quemazón en más de la mitad de las micciones
3	Retención por coágulos	< 1 hora	> 4 veces	Severa (no llega al aseo)	Frecuente y dolorosa

TABLA 3.7.-: Puntuación numérica de calidad de vida Miller y cols. (1981)

0	1	2	3	4
Desarrolla actividad normal	Leve limitación física puede realizar trabajos simples	Incapaz de cualquier trabajo. Capaz de su cuidado personal	Sólo capaz de algunos cuidados. > 50% del tiempo despierto está en cama o silla	Confinado a cama o sillón sin capacidad de autonomía

TABLA 3.8.-: FICHA DE REVISIONES DE HISTORIAS DE TM VESICALES

FILIACIÓN:

SEXO:

EDAD:

PROFESIÓN:

TABAQUISMO:

Cantidad

Desde cuando no

ANTECEDENTES:

Personales:

Patologías previas

Patologías concomitantes

Tratamientos

Familiares:

Padres

Hermanos

CLÍNICA:

Al diagnóstico

Postratamiento

Existencia de tumor en data de toma

Evolución 3,6,12 y 18 meses

SÍNTOMAS URINARIOS:

Hematuria

Polaquiuria

Nicturia

Disuria

Incontinencia

Tenesmo vesical

Jet miccional

ANALÍTICA:

Hemoglobina

Creatinina

PSA

ANATOMIA PATOLÓGICA:

Grado

Tipo tumoral

Estadaje

Localización

Invasión vascular

Multicentricidad

TRATAMIENTO DEL TM

Evolución

Efectos 2º

Cirugía

RT

QT

HT

3.2.2.- Métodos analíticos in vitro

3.2.2.a.- Epigenotipo del ADN de líneas celulares y tumores:

Para optimizar el estado de metilación de los promotores de los genes que en esta memoria de tesis doctoral se iban a estudiar, se han utilizado líneas celulares tumorales humanas establecidas. Todas ellas fueron cultivadas a 37° C, en condiciones de esterilidad y atmósfera con 5 % de CO₂ y saturada de humedad. Así se determinó el epigenotipo de las siguientes líneas celulares:

- Cáncer de mama: MCF-7 (clones BUS, BB, GS), T47D, EVSA-T, MDA-MB-231
- Cáncer de vejiga: RT-112
- Leucemia: HL-60
- Meduloblastoma: D283
- Plasmacitoma: Sultan

3.2.2.b.- Extracción del ADN de la muestra de suero y del tumor de los sujetos incluidos en el estudio.

3.2.2.b.1.- Extracción del ADN en suero

Las muestras de suero se transportan en tubos de bioquímica; una vez en el laboratorio, se centrifugaron a 3000 rpm, 10 minutos, y el suero resultante, se trasladó desde los tubos primitivos a tubos eppendorfs nuevos. Las muestras se almacenaron a -80° C o a -20° C hasta su análisis. Antes de proceder a la extracción del ADN, las proteínas de cada muestra se cuantificaron utilizando el *Biorad protein assay*.

El ADN sérico se extrajo utilizando el *Kit QIAamp Blood Kit* (Quiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para ello se partió de 2 mL de suero y el ADN resultante se resuspendió en un volumen final de 200 µL de Tris-EDTA pH=8.

Tris-EDTA pH=8 (TE)

Tris HCl 10 mM pH=8

EDTA 1mM

3.2.2.b.2.- Extracción del ADN del tumor

Las muestras de tumor se toman asépticamente en el quirófano durante la cirugía (RTU o cistectomía) siendo transportadas inmediatamente al laboratorio donde se congelan a -80° C hasta su procesamiento. Para la extracción del ADN se usó un sistema de disgregación enzimática del tejido, y posterior extracción con fenol:cloroformo. El protocolo se resume a continuación:

El fragmento tumoral se homogenizó por digestión enzimática e incubación a 37° C durante 24 horas en agitación suave.

Cocktail de enzimas

Pronasa 0,002 mg
 Colagenasa .. 0,002 mg
 ADN-asa 0,002 mg
 DMEM+FBS 1% c.s.p. 20 mL

La suspensión resultante se centrifuga y el pellet obtenido se lava con PBS al menos dos veces. El pellet se resuspende en 200 µL de TE y 2 mL de una disolución de lisis y se incuba a 37° C durante 1 hora.

PBS

Na₂HPO₄ · 12 H₂O3,56 g
 NaH₂PO₄ · 2 H₂O.....0,52 g
 Na Cl 8,5 g
 H₂O c.s.p. 1 litro (pH=µ 7,2)

Disolución de lisis

Tris 10mM pH=8
 EDTA 0,1 M pH=8
 RNAsa 20 µg/mL
 0,5% SDS

A continuación se añade proteinasa K en una concentración de 100 µg/mL y se incuba a temperatura ambiente en agitación toda la noche.

Para extraer el ADN, a la mezcla se le añade un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agita 10 minutos manualmente, tras los que se centrifuga a 3500 rpm otros 10 minutos. La fase acuosa superior, que es la que contiene el ADN, se deposita en un tubo de polipropileno o en un eppendorf. Para precipitar el ADN, se añaden 0,1 volumen de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol 100% a -20° C. Se agita suavemente, se centrifuga 10 minutos a 3000 rpm y se elimina el sobrenadante. El pellet se lava con etanol al 70% al menos dos veces. Finalmente se elimina el etanol con cuidado y el ADN se resuspende en 200-400 µL de TE.

Los volúmenes de este protocolo son para biopsias muy pequeñas. A mayor tamaño, mayor volumen de partida de TE y de disolución de lisis.

3.2.2.b.3.- Determinación de proteínas: biorad protein assay

Se trata de un ensayo basado en el cambio de color diferencial de un colorante frente a distintas concentraciones de proteínas (dye-binding assay). El colorante es una disolución ácida de "Coomassie Brilliant Blue G-250" que tiene una absorbancia máxima en 465 nm y pasa a ser 595 nm cuando se une a la proteína. Este principio es muy útil ya que el coeficiente de extinción del complejo colorante albúmina en disolución es constante. En un amplio rango de concentración de proteínas el método da una respuesta aguda pero no totalmente lineal. Para llevar a cabo el ensayo se ha de elaborar una curva de calibración que sirva de patrón de

referencia. La presencia de detergentes (NaOH) interfiere en la técnica, de ahí la importancia de eliminarlos mediante diálisis y ajustar los pH adecuadamente.

El reactivo se diluye 1/5 y los sueros 1/200. Para obtener la curva de calibración, se prepara una disolución madre de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de concentración y se realizan las siguientes diluciones de las que se utilizarán 10 μL en la placa del ensayo:

Concentración ($\mu\text{g} / 10 \mu\text{L}$)	Patrón (μL)	Agua (μL)
10	1000	0
9	900	100
8	800	200
7	700	300
6	600	400
5	500	500
4	400	600
3	300	700
2	200	800
1	100	900
0	0	1000

El ensayo se realiza en placas de 96 well de fondo plano en donde se adicionan 200 μL del reactivo Biorad en tantos pocillos como se vayan a utilizar. En cada uno de estos pocillos se ponen 10 μL de los puntos de la curva de calibración y de cada suero a analizar. Los sueros se hacen por duplicado. Antes de medir la densidad óptica (DO) a 595 nm en el espectrofotómetro o lector automático de densidad óptica (Titertek Multiskan MK11, ICN Flow) se ha de esperar entre 5-60 minutos para que la reacción sea completa.

3.2.2.c.- Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación: MSP.

Este método se basa en que al tratar el ADN con bisulfito, los residuos de citosina no metilados se transforman en uracilos. Por otra parte, los residuos metilados de citosina permanecen tal cual. Así, las regiones genómicas metiladas o no metiladas del ADN tras la conversión bisulfítica son diferentes y por tanto distinguibles utilizando primers específicos (Herman y cols., 1996).

La conversión bisulfítica se realizó con el *CpGenome DNA Modification Kit* (Oncor) tal y como dice el protocolo. Se partió de 100 μL de ADN. Las reacciones de PCR,

correspondiente a cada uno de los promotores de los genes que se han ensayado se han realizado utilizando los primers que a continuación se especifican:

- p16:** **Metilado:** 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'
5'-GACCCCGAACCGC-GACCGTAA-3'
T. hibridación: 60° C Tamaño del fragmento: 150
- No metilado:** 5'-TTA-TTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'
5'-CAACCCCAAACCACAAC-CATAA-3'
T. hibridación: 60° C Tamaño del fragmento: 151
- hMLH1:** **Metilado:** 5'- AACGAATTAATAGGAAGAGCGGATAGCG-3'
5'-CGTCCCTCCCTAAAACGACTACTACCC-3'
T. hibridación: 57° C Tamaño del fragmento: 91
- No metilado:** 5'-TAAAAATGAATTAATAGGAAGAGTGGATAGTG-3'
5'-AATCTCTTCATCACCTCCCTAAAACA-3'
T. hibridación: 62° C Tamaño del fragmento: 102
- Ciclina D2:** **Metilado:** 5'- GTTATGGTTATGTTTGTGTTGTATG-3'
5'-TAAAATCCAACACAATCA-3'
T. hibridación: 52° C Tamaño del fragmento: 276
- No metilado:** 5'-TACGTGTTAGGGTCGATCG-3'
5'-CGAAATATCTACGCTAAACG-3'
T. hibridación: 52° C Tamaño del fragmento: 222
- Rarβ:** **Metilado:** 5'-GAACGCGAGCGATTTCGAGT-3'
5'-GACCAATCCAACCGAAACG-3'
T. hibridación: 57° C Tamaño del fragmento: 142
- No metilado:** 5'-GGATTGGGATGTTGAGAATGT-3'
5'-CAACC-AATCCAACCAAAACAA-3'
T. hibridación: 57° C Tamaño del fragmento: 163
- σ14-3-3:** **Metilado:** 5'-TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC-3'
5'-CCTCTAACCGCCCACCACCG-3'
T. hibridación: 55° C Tamaño del fragmento: 105
- No metilado:** 5'-ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT-3'
5'- CCCTCTAACCACCACCAACA-3'
T. hibridación: 55° C Tamaño del fragmento: 107

- 7 μL de NaOH 3M
2. Incubar 10 minutos a 37° C.
 3. Adicionar 550 μL del reactivo *DNA Modification Reagent I* (recién preparado).
 4. Incubar a 50° C durante 16-20 horas.

◆ Reactivos "Día 2"

◆ *DNA Modification Reagent II*

Preparar la disolución A: 20 mL de agua y 1 μL de 2-mercapto-etanol.

Para cada muestra usar 750 μL de disolución A y 1,35 mg de *DNA Reagent II*

Mezclar bien.

◆ *20 mM NaOH / 90% EtOH (recién preparado)*

Para preparar 1 mL: 900 μL de etanol 100% + 93,4 μL de agua + 6,6 μL de NaOH

Modificación (día 2)

1. Resuspender vigorosamente en el vórtex el DNA Modification Reagent III y adicionar a cada uno de los tubos 5 μL
2. Adicionar a cada uno de los tubos 750 μL de DNA Modification Reagent II y mezclar suavemente. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
4. Adicionar al pellet 1 mL de etanol 70%. Vórtex.
5. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
6. Repetir este paso un total de 3 veces.
7. Una vez eliminado el sobrenadante del tercer lavado, centrifugar los tubos 3 minutos a 13.000 rpm y la gota de líquido que ha quedado, eliminarla con una micropipeta con mucho cuidado.
8. Adicionar 50 μL de 20 mM NaOH / 90% Etanol (recién preparado). Vórtex suavemente para resuspender el pellet e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm y adicionar 1 mL de etanol al 90%. Vórtex.
10. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
11. Repetir este paso 1 vez más
12. Una vez eliminado el sobrenadante del 2° lavado, centrifugar los tubos 5 minutos a 13.000 rpm y la gota de líquido que ha quedado, eliminarla con una micropipeta.
13. Adicionar 25 μL de TE. Vórtex suavemente e incubar 15 minutos a 50-60° C para disolver el ADN.
14. Centrifugar los tubos 3 minutos a 13.000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Congelar a -20° C.

3.2.2.c.2.- Análisis de los productos de las PCRs:

Los fragmentos de ADN obtenidos como resultado de las distintas PCRs se han analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1x y tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) a 115 V durante 30-50 minutos. El ADN obtenido en la reacción, migra en función de su tamaño y se visualiza, por tinción con bromuro de etidio, bajo iluminación ultravioleta. Se fotografía y se procede al análisis de la imagen obtenida.

TAMPÓN Tris-Bórico-EDTA (TBE x10)

Tris-base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA	9,3 g
H ₂ O c.s.p.	1 l (pH=8,4)

En uno de los pocillos del gel se carga un marcador de peso molecular de tamaño conocido; la posición a la que cada uno de estos fragmentos migra sirve para calibrar el tamaño de cada fragmento producido en la PCR.

3.2.3.- Métodos radiobiológicos *in vitro*: Lesión molecular inicial radioinducida

La lesión radioinducida sobre el ADN se realizó sobre las células de cada grupo experimental: células del tumor disgregadas enzimáticamente y linfocitos obtenidos de la sangre como modelo de tejido sano.

3.2.3.a.- Células obtenidas a partir del tumor vesical

La muestra tumoral vesical se disgregó mecánicamente con ayuda de un bisturí en fragmentos de 1-2 mm que, posteriormente, se trataron enzimáticamente durante 1 hora a 37° C en una mezcla compuesta por 0,05 mg/mL de deoxirribonucleasa I (Sigma, St. Louis, MO), 0,05 mg/mL de pronasa E (Sigma) y 0,1 mg/mL de colagenasa tipo IA (Sigma). El tratamiento enzimático se interrumpió añadiendo a la mezcla anterior un medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal a una concentración del 10% en el que se dejaron las células a 37° C durante toda la noche. Las células se centrifugaron, se resuspendieron en medio de cultivo frío y se contaron en la cámara de Neubauer con un microscopio óptico para, finalmente, conocer el número de células por mL de medio de cultivo utilizado.

3.2.3.b.- Células obtenidas a partir de sangre

Se obtuvieron muestras sanguíneas, mediante venopunción, utilizando el sistema "Venoject" que incluye en el tubo la presencia de 0,06 mL de EDTA (K₃) como anticoagulante.

Las células mononucleares se separaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 30 minutos en un gradiente de densidad de ficoll de $1,077 \pm 0,001$ g/mL (Ficoll/Hypaque, Sigma). En la capa intermedia queda, en forma de anillo, el conjunto de células mononucleares, fundamentalmente linfocitos, que se retiró utilizando una pipeta Pasteur. Las células mononucleares separadas se lavaron dos veces con tampón PBS, se contaron y se resuspendieron en medio de cultivo antes de ser incluidos en agarosa para realizar el ensayo de radiosensibilidad molecular.

3.2.3.c.- Irradiación:

Los experimentos se realizaron con fotones de 18 MeV producidos por un acelerador lineal de electrones (Mevatron KDS, Siemens).

3.2.3.d.- Preparación de los plugs de agarosa.

En ambos casos, el procedimiento fue el siguiente:

Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con PBS frío. Posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y el botón celular se resuspendió en 200 μ L de agarosa tipo IX, de muy bajo punto de fusión, al 1% en PBS. Una alícuota de la suspensión celular resultante se pipeteó sobre un molde (BioRad, 250 μ L) y se mantuvo a 4° C hasta completada la gelificación (aproximadamente 1 hora). La mezcla de agarosa con células, que recibe el nombre de *plugs*, se transfirió a tubos universales con medio de cultivo a una temperatura de 0 a 4° C. La irradiación se efectuó a esta misma temperatura; para ello los viales se introducen en hielo picado fundente. Las dosis de radiación administradas fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 Gy.

3.2.3.e.- Lisis de las células incluidas en moldes.

Una vez irradiados los *plugs*, el medio de los tubos universales se retiró y se sustituyó por 2 mL de un tampón de lisis frío mantenido en frío cuyo objetivo es destruir las membranas celulares por solubilización y separar las proteínas que junto con el ADN constituyen la cromatina (Iliakis, 1991). El tampón se dejó actuar durante 1 hora a 4° C y después los tubos se incubaron a 37° C durante 24 horas más. Este procedimiento se estima suficiente para la liberación completa del ADN intracelular. Terminado el proceso de lisis, el estudio electroforético del ADN puede hacerse inmediatamente o tras almacenamiento de las muestras a 4° C durante períodos de tiempo no superiores a 15 días. Tiempos mayores de almacenamiento facilitan la degradación del ADN (Whitaker, 1992).

Tampón de lisis

N-lauril-sarcosil..... 2 %
Proteinasa K 0,5 mg/mL
EDTA 0,5 M pH=7,6

3.2.3.f.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Tras la lisis, fragmentos de los plugs de, aproximadamente, 25 μ L de volumen se depositan en los pozos de un gel de agarosa tipo VII (Sigma) al 0,8% en 0.5x TBE. Una vez cargado el gel, los pocillos se sellan con agarosa y se introduce en la cubeta de electroforesis que se encuentra llena de tampón TBE 0.5x (pH = 8,2) termostaticado a 14-16° C. El gel se somete durante 96 h a la fuerza eléctrica creada por una diferencia de potencial de 45 V. El sentido del campo eléctrico se varía cada 60 minutos con un ángulo de separación de 120°. Una vez finalizado el tiempo de la electroforesis, se procede a la tinción del gel con una disolución acuosa de bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) durante al menos 2 h. Posteriormente, el gel se lava un mínimo de 4 horas en agua destilada y se fotografía bajo iluminación ultravioleta.

Dos de los pocillos del gel se cargaron con trozos de plugs de agarosa que contienen cromosomas de *Sacharomyces cerevisiae* y *Schizosacharomyces pombe* (BioRad) de tamaño conocido;

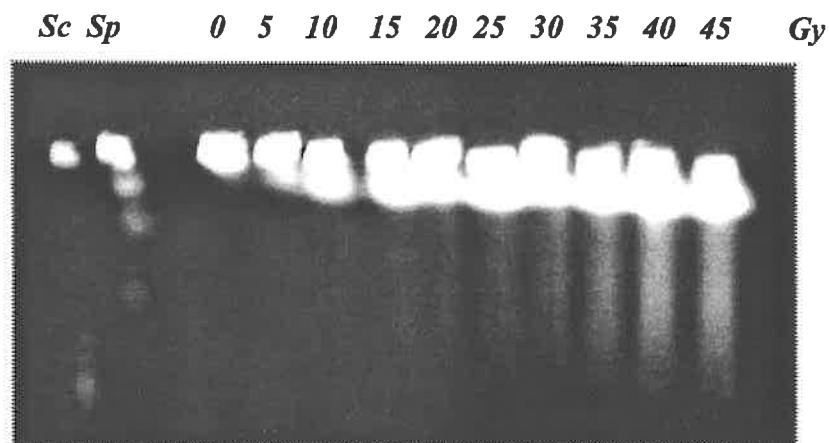
- *S. Cerevisiae*: 2.2, 1.6 y 0.1 Mpb
- *S. Pombe*: 5.7, 4.6 y 3.5 Mpb

La posición a la que cada uno de estos fragmentos migra, sirve para calibrar el tamaño de cada fragmento producido por la radiación en nuestras muestras. Pues, entre el tamaño del cromosoma expresado en Mpb y la distancia a la que migra existe una relación lineal. Los puntos experimentales de cada una de las relaciones tamaño/distancia se ajustan a una línea recta utilizando el ajuste por mínimos cuadrados. De esta manera es posible calcular el tamaño medio de los fragmentos de ADN separados electroforéticamente a través de su posición en el gel

3.2.3.g.- Método de análisis de imagen.

Las imágenes de los geles fueron adquiridas bajo iluminación ultravioleta con un sistema de análisis de imagen Visiolog 5.0. Posteriormente, se obtuvo un perfil de cada línea de migración de ADN, sobre la que se calculó la intensidad luminosa por píxel. Cada línea de migración se dividió en 8 segmentos (iguales para todas las calles), obteniéndose para análisis el valor sumatorio de intensidad lumínica por píxel en cada uno de ellos.

Figura 3.1: Fotografía de un gel tras someterlo a electroforesis de campo pulsado. Lesión inicial radioinducida en linfocitos de un paciente con cáncer vesical. La dosis administrada estuvo comprendida entre 0-45 Gy. Las calles 1 y 2 corresponden a *Sacharomyces cerevisiae* (Sc) y *Schizosacharomyces pombe* (Sp) respectivamente. En la imagen puede apreciarse la fluorescencia que corresponde al "plug" celular y la banda de migración del DNA fragmentado por la radiación ionizante.



3.2.3.h.- Método semicuantitativo de análisis de la lesión inicial.

Se acepta (Blöcher, 1990) que el número de rupturas dobles de cadena de ADN inducido inicialmente sobre las células irradiadas está relacionado con la fracción de ADN que resulta fragmentada y posee el tamaño apropiado para migrar en el gel en las condiciones de electroforesis anteriormente descritas. La comprobación experimental de esta relación se ha llevado a cabo utilizando un sistema de marcaje celular con [^{125}I] UdR y analizando con posterioridad la equivalencia entre el número de desintegraciones emitidas por el ^{125}I y la fracción de ADN extraído por electroforesis (Iliakis, 1991). De esta forma, la cantidad de daño que sufren las células irradiadas puede ser cuantificada en términos de fracción intensidad lumínica fuera del pozo. Esta fracción (FAE, fracción de actividad extraída) se calculó de la siguiente forma:

$$\text{FAE} = \frac{\sum \text{Intensidad lumínica por pixel (línea)}}{\sum \text{Intensidad lumínica por pixel (pozo)} + \sum \text{Intensidad lumínica por pixel (línea)}}$$

Se ha demostrado (Whitaker, 1992) que la curva de respuesta de FAE en función de la dosis tiene un aspecto bifásico, mostrando un primer tramo aproximadamente lineal (hasta aproximadamente 30 Gy) al que sigue un aplanamiento progresivo de la curva. Así, la forma de la curva dosis/respuesta podría estar relacionada con la existencia de uniones cruzadas entre fragmentos de ADN capaces de limitar su movilidad (Stamato y Denko, 1990). De cualquier manera, parece claro que la función que relaciona la fracción de actividad liberada con la dosis de radiación tiene un límite al que tiende asintóticamente. Este límite, cuando la representación se hace porcentual, evidentemente, es el 100% de la actividad inicialmente colocada en el pocillo.

3.2.3.i.- Método cuantitativo de análisis de la lesión inicial.

Para la cuantificación más precisa de los datos extraídos de la electroforesis en campo pulsado Whitaker y McMillan (1992) aplicaron los principios teóricos de un procedimiento diseñado para estudiar el tamaño de las moléculas de ADN tras ultracentrifugación en gradiente de densidad de sucrosa. El método exige el conocimiento aproximado del tamaño del fragmento de ADN. Esto se consigue determinando, simultáneamente en el mismo gel, el desplazamiento de moléculas de ADN de tamaño conocido. Mediante este procedimiento se ha podido calcular la probabilidad de producción de rupturas dobles de cadena (rdc) radioinducidas de ADN por unidad de dosis (Gy) y por unidad de ADN (par de bases).

El análisis cuantitativo de las rdc de ADN mediante electroforesis en campo pulsado exige, según el modelo de Cook y Mortimer (Cook, 1991), basado en las células de levadura como modelo experimental Contopoulou, 1987), tres premisas:

- a) La producción de una rdc de ADN en cualquier localización del genoma es equiprobable e independiente de la localización de anteriores rupturas.
- b) Si esto es así, el número promedio de rdc en moléculas o partes de moléculas debe ser proporcional a su longitud.
- c) La ecuación de Poisson describe la frecuencia del número de rdc y la distribución de tamaños de los fragmentos rotos.

La ecuación que describe la frecuencia de distribución del tamaño de los fragmentos de ADN, cuando se realiza el análisis de la intensidad de tinción con bromuro de etidio detectada en la línea del gel de electroforesis como intensidad lumínica, es:

$$F(x) = (\mu/S) e^{-(\mu/S)x} G(x) \quad [I]$$

Donde

$$G(x) = x \cdot [2 + \mu(S - x)/S]$$

Siendo

$F(x)$, la intensidad de distribución de los fragmentos

x , el tamaño del fragmento

S , el tamaño del cromosoma intacto

μ , el promedio de rupturas por cromosoma.

Utilizando como base este modelo matemático, se ha derivado (Ruiz de Almodóvar y cols., 1994a) un sistema de ecuaciones que permite la aplicación del mismo al estudio de la distribución de tamaños de fragmentos de ADN procedentes de células humanas sometidas a irradiación. Para ello se hace uso de los datos cuantitativos de intensidad lumínica relativa por segmento, tras electroforesis en campo pulsado, medida en cada sección de la línea del gel y relacionamos esta distribución con el tamaño medio relativo (x/S) del fragmento de ADN. En este trabajo el valor de S es de 200 Mpb.

Aplicando la ecuación [I] a cada una de las distribuciones de intensidad lumínica originadas tras la irradiación de las células a dos dosis D_1 y D_2 distintas (siendo $D_2 > D_1$), tenemos:

$$F(x_1) = (\mu_1/S) e^{-(\mu_1 x/S)} G(x_1)$$

$$F(x_2) = (\mu_2/S) e^{-(\mu_2 x/S)} G(x_2)$$

Dividiendo una ecuación por otras:

$$F_R = \frac{F(x_1)}{F(x_2)} = A e^{[(\mu_1 - \mu_2) x/S]}$$

Donde

$$A = \frac{x \frac{\mu_1}{S} \left[2 + (S-x) \frac{\mu_1}{S} \right]}{x \frac{\mu_2}{S} \left[2 + (S-x) \frac{\mu_2}{S} \right]}$$

Si x tiende a cero, esto es, cuando los fragmentos de ADN son muy pequeños en relación al tamaño del cromosoma, circunstancia que ocurre para la técnica de electroforesis en campo pulsado en la que el límite de tamaño de ADN que penetra en el gel es del orden del 5% del tamaño del cromosoma humano (Ahn, 1991), podemos simplificar la ecuación anterior y, llamando A_0 al límite de A cuando x tiende a 0, tenemos:

$$A_0 = \frac{\mu_1(2 + \mu_1)}{\mu_2(2 + \mu_2)} \quad [\text{II}]$$

y

$$F_R = A_0 e^{(\mu_2 - \mu_1) \frac{x}{S}} \quad \text{[III]}$$

o

$$\text{Ln}(F_R) = (\mu_2 - \mu_1) \frac{x}{S} + \text{Ln}(A_0) \quad \text{[IV]}$$

La representación gráfica de $\text{Ln}(F_R)$ frente a x/S da una línea recta de pendiente $(\mu_2 - \mu_1)$ e intercepción en el origen $\text{Ln}(A_0)$. Si B es el valor en la ecuación [II], entonces $B = \mu_2 - \mu_1$. Podemos resolver un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas y obtener los valores individuales del promedio de rdc de ADN para cada una de las dos dosis de radiación utilizadas: (μ_1) , promedio de rdc originadas por la dosis D_1 , y (μ_2) , promedio de rdc originadas por la dosis D_2 .

La solución para μ_1 es:

$$2\mu_1 + \mu_1^2 = 2A_0(B + \mu_1) + A_0(B + \mu_1)^2 \quad \text{[V]}$$

y despejando μ_i , se obtiene:

$$\mu_1 = \frac{-(2 - 2A_0 - 2A_0B) + \sqrt{(2 - 2A_0 - 2A_0B)^2 + 4(1 - A_0)(A_0B)(2 + B)}}{2(1 - A_0)}$$

μ_2 se calcula, una vez conocido μ_1 , a partir de $B = \mu_2 - \mu_1$.

Así, la comparación de distribuciones de actividad para dos dosis produce un número de rdc (μ) para cada dosis. Una representación de μ frente a la dosis (D) está compuesta por una combinación de todos los valores μ derivados de todas las posibles comparaciones entre dos dosis diferentes. La pendiente de esta línea da la frecuencia de inducción de rdc de ADN (en términos de rdc/Gy/unidad de ADN).

3.2.4.- Métodos estadísticos

Para la realización del presente estudio y para expresar los resultados obtenidos en el mismo, se ha partido de las tablas de "Microsoft Excel" donde se han registrado todos los datos anatomoclínicos y analíticos.

Además de reflejar en tablas y en histogramas los datos estadísticos meramente descriptivos, aquellas variables cuyo estudio ha parecido de mayor trascendencia han seguido un tratamiento estadístico más complejo haciéndose uso del soporte informático GraphPad Prism compatible con Windows.

3.2.4.a.- Análisis estadístico descriptivo

Se ha efectuado un conjunto de procedimientos necesarios para recoger, clasificar y representar las diferentes variables, cualitativas o cuantitativas, que recoge este estudio. Lo más común ha sido la expresión en tablas y diagramas de la distribución de frecuencias que se muestra tanto en las gráficas 1, 3-11, 21, 23-34, 36, 37, 44 y 46; como en las tablas 1, 4-9, 12, 13, 15, 17-21, 23, 25-31, 38 y 39.

También se han utilizado medidas descriptivas de posición y dispersión (media y desviación estándar, moda, rango) como se refleja en las gráficas 2, 22; y en las tablas 2, 3, 10, 11, 16 y 24.

3.2.4.b.-Test estadístico de homogeneidad de dos muestras cualitativas

Al estudiar la radiosensibilidad, al comparar dos muestras cualitativas que no seguían una distribución normal, se ha aplicado el test de comparación de dos muestras de variables cualesquiera de Wilcoxon.

3.2.4.c.-Test estadístico de homogeneidad de varias muestras cualitativas

La gran mayoría de variables que se han analizado estadísticamente en este trabajo son de tipo cualitativo. Se ha perseguido llevar a cabo una evaluación de la independencia/dependencia de estas variables, (que son exhaustivas y excluyentes) utilizando el test de χ^2 aplicado a partir de tablas de contingencia. Cuando estas tablas son de 2 x 2 puede aplicarse indistintamente el test de χ^2 o el test de comparación de proporciones, así puede apreciarse junto a las gráficas 28-30, 32-34 y explicando las tablas 18-21, 27-30. Cuando no se dan las condiciones de validez para χ^2 , cuando alguna cantidad esperada sea menor que 1 y cuando más del 20% de las mismas sean superiores a 5 se ha aplicado el test exacto de Fisher como en las tablas 17, 32, 34.

3.2.4.d.-Tablas de vida de prosecución (Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia)

Las tablas de vida de prosecución, más conocidas como curvas actuariales de supervivencia o de Kaplan-Meier, tienen por objeto básico la idea de formalizar los datos de acontecimientos (en este caso defunciones o recurrencia tumoral) en un modelo de probabilidades consistente.

Se han confeccionado las curvas de supervivencia a partir de sus correspondientes tablas de valores numéricos (*Tabla 3.9*). En dicha tabla las filas vienen categorizadas por intervalos temporales que corresponden a los periodos de tiempo en los que se efectúan las revisiones clínicas programadas a los pacientes. Para los pacientes, incluidos en la serie objeto de estudio, se han podido completar los siguientes intervalos: 0-3 meses; 3-6 meses; 6-12 meses y 12-18 meses. En las columnas se disponen las variables (V_x) de posible influencia sobre la probabilidad de supervivencia del cáncer vesical en términos de ternas categóricas de

evolución de la enfermedad (Libre de enfermedad, recidiva, “éxitus”). Cuando se tiene en consideración las defunciones y la supervivencia se habla de supervivencia global (S.G). Si se considera la situación de enfermedad clínicamente manifiesta o enfermedad ausente se habla de “recidivas” y de “libre de enfermedad” y se construye la curva de supervivencia libre de enfermedad (S.L.E)

Tabla 3.9.-: Tabla modelo utilizada para la confección de las curvas de supervivencia.

	V _x	V _x	V _x
	Libre de enfermedad	Recidiva	Exitus
0-3 meses			
3-6 meses			
6-12 meses			
12-18 meses			

En el eje de abcisas se representa el tiempo y en el eje de ordenadas la estimación de la probabilidad de S.G o S.L.E. El procedimiento de cálculo estadístico permite también el conocimiento de los valores medios de probabilidad y de su correspondiente desviación que se representan en la forma habitual. La unión de los puntos con una línea escalonada proporciona las curvas de supervivencia. Para analizar la existencia o no de significación estadística entre las diferentes curvas que tendrá cada variable (por ejemplo el Grado de diferenciación con GI, GII y GIII) se utiliza el estadístico χ^2 mediante la aplicación del test log-rank con $P < 0,05$ como límite de la significación estadística.

Las gráficas 12-20, 35, 38-43, muestran este tipo de análisis estadístico.

3.2.4.e.- Regresión Lineal

Es una herramienta estadística que permite abordar y comprobar si dos variables cuantitativas están relacionadas o no entre sí mediante la confección de una recta en función de cuyos parámetros existirá o no relación entre dichas variables. Se ha hecho uso de ella en la comparación entre la radiosensibilidad de células tumorales y células sanas en la gráfica 45.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

4.1.1.- Datos personales

Del análisis de los datos personales más relevantes recogidos en las historias clínicas de los pacientes que han sido incluidos en este estudio resulta que el paciente prototipo es varón con una edad situada en el final de la séptima década de la vida y con hábito tabáquico mantenido a lo largo de su existencia. Los datos referentes a la distribución de los pacientes de acuerdo con el género y con la edad se han representado en las gráficas 4.1 y 4.2.

4.1.1.a.- Sexo

Gráfica 4.1.-: Distribución de los 141 pacientes por sexo.

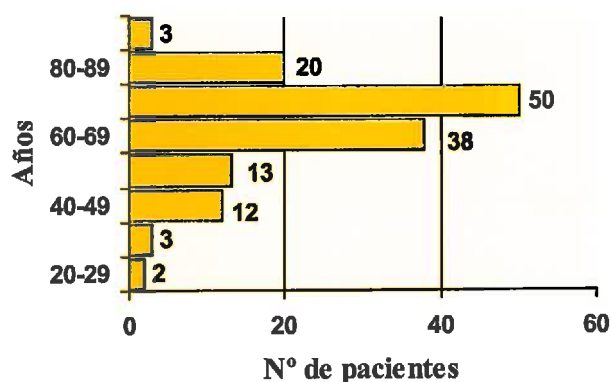


Total de pacientes: 141

- Hombres: 122 (87%)
- Mujeres: 19 (13%)
- Relación: 6,4/1

4.1.1.b.- Edad

Gráfica 4.2.-: Distribución de los pacientes según la edad

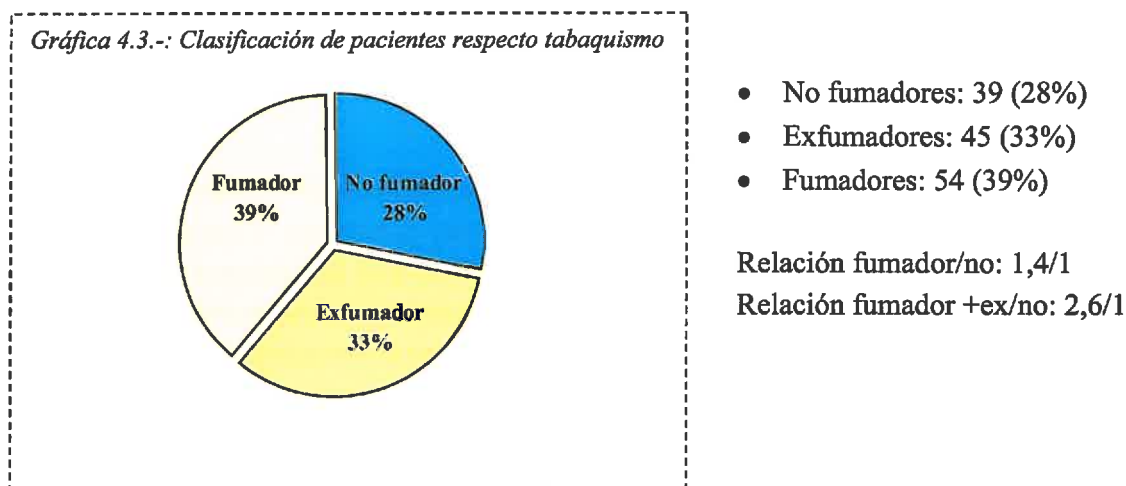


Estadísticos referentes a la edad

- Media: 67,6 ± 13,2 años
- Moda: 73,0 años
- Mínimo: 20,0 años
- Máximo: 92,0 años

4.1.1.c.- Tabaquismo

De los 141 pacientes, tres no revelaron su actitud frente al hábito tabáquico. Con los datos recogidos de los 138 restantes se ha construido la Gráfica 4.3:



El análisis de estos datos revela que el grupo más importante es el de fumadores, el cual se ha desglosado según la cantidad de cajetillas consumidas (tabla 4.1). En dicha tabla los exfumadores se han clasificado según el tiempo transcurrido desde el abandono del hábito de fumar. Dado que la distribución de enfermos en cada una de las clases que han sido establecidas es similar, puede aceptarse la homogeneidad de la serie en lo que a esta característica se refiere.

Tabla 4.1.-: Distribución de la cantidad de paquetes/día consumida por los fumadores activos y años desde el abandono del hábito tabáquico en exfumadores

54 Fumadores activos			45 Exfumadores		
< 1 paquete/día	1-2 paquetes/día	> 2 paquetes/día	< 5 años	6-10 años	> 10 años
21	18	15	19	10	16

4.1.2.- Antecedentes personales y familiares

En este apartado se han resumido los antecedentes de patología previa referida por los pacientes, los procesos médicos concomitantes con la patología neoplásica vesical, los tratamientos farmacológicos que les han sido prescritos y las patologías que afectaron a sus familiares (padres, hermanos, etc.). En la mayoría de las historias clínicas se ha detectado que

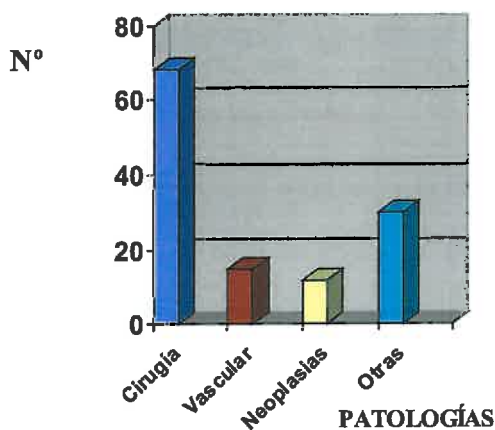
la información referente a los antecedentes familiares era insuficiente y, por eso, este dato no se ha considerado en el análisis de resultados.

4.1.2.a.- Patologías anteriores

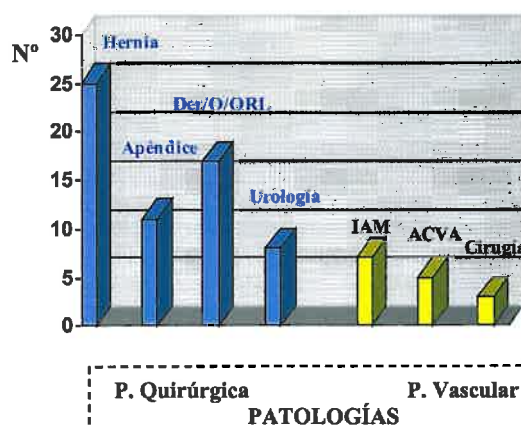
De los 141 pacientes estudiados, 32 de ellos (23%) no presentaban patologías previas concomitantes a su enfermedad vesical. Los 109 restantes (77%) presentaron una o varias patologías hasta totalizar 125 padecimientos. En la gráfica 4.4 se han resumido estos datos agrupándolos en distintas categorías:

- Patologías quirúrgicas en 68 casos (*Gráfica 4.5*): 25 Herniorrafias
11 Apendicectomías
17 Oftalmodermolaringopatías
8 Patología urológica benigna
7 Otras
- Patología Vascular en 15 casos (*Gráfica 4.5*): 7 Coronariopatías, 5 ACVA, 3 Cirugía vascular.
- Patología neoplásica: 12 casos.
- Otras patologías: 30 casos (ulcus, traumatismos, litiasis biliar y urinaria, brucelosis...)

Gráfica 4.4.-: Distribución de las patologías anteriores al diagnóstico de patología vesical



Gráfica 4.5.-: Desglose de las patologías anteriores más prevalentes en los 141 pacientes estudiados



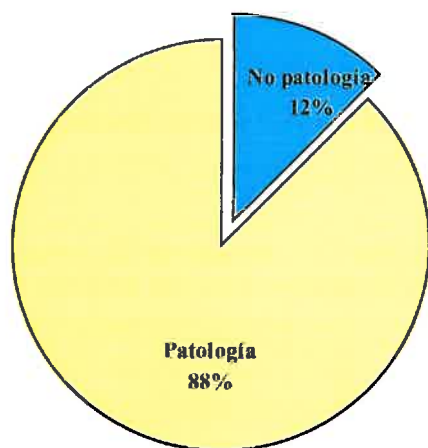
4.1.2.b.- Patologías concomitantes

Las patologías concomitantes con el proceso vesical suelen ser las prevalentes en las edades de presentación del cáncer vesical. Por ello son comunes la hipertensión arterial (HTA), la diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID), la hiperplasia prostática

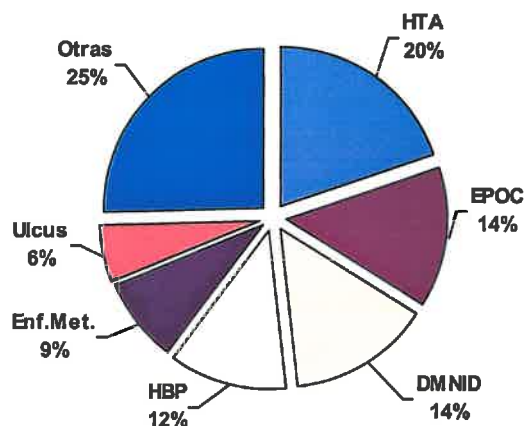
benigna (HBP), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o las enfermedades metabólicas (dislipemias, hiperuricemia, etc.). El 14% de los pacientes estudiados (20 casos) no presentaron patología concomitante alguna, mientras que en los 121 pacientes restantes se registraron hasta 227 patologías destacando las arriba citadas (*Gráficas 4.6 y 4.7*):

- HTA: 45 casos (20%)
- EPOC: 32 casos (14%)
- DMNID: 32 casos (14%)
- HBP: 27 casos (12%)
- Enfermedades metabólicas.: 20 casos (9%)
- Ulcus: 13 casos (6%)
- Otras: arritmias, espondiloartrosis, litiasis, etilismo, etc.: 58 casos (25%)

Gráfica 4.6.-: Distribución de las patologías concomitantes



Gráfica 4.7.-: Distribución de las 227 patologías concomitantes en 121 pacientes



4.1.2.c.- Tratamientos

Los tratamientos que, con anterioridad al diagnóstico del cáncer vesical, se habían recomendado a los pacientes incluidos en este estudio, se asocian a las patologías que concomitantemente padecían y que ya han sido descritas. Así, 20 de los pacientes no tomaban habitualmente ningún fármaco. Los 121 pacientes restantes estaban siendo tratados de un total de 227 procesos patológicos y los fármacos eran los adecuados a dichos padecimientos.

4.1.3.- Parámetros analíticos

En este apartado se han resumido los valores de algunos parámetros analíticos que se consideran importantes. Entre ellos, se indican las cifras medias de proteínas, ADN sérico y hemoglobina tanto en el diagnóstico como tras el tratamiento (*tabla 4.2*). Los valores de creatinina sérica, y de PSA (éste sólo en varones) cuantificados en el diagnóstico y después del tratamiento se reflejan en la *tabla 4.3*. Tanto las cifras de hemoglobina como las de creatinina sérica se encuentran dentro de la normalidad. Sin embargo, la presencia de algún caso de cáncer de próstata entre los pacientes estudiados dispara las cifras medias del PSA hasta valores que no son relevantes en la población estudiada, aunque la gran desviación estándar observada y el valor de la moda revelan que, en su mayor parte estas cifras están dentro de la normalidad para la casi totalidad de los pacientes.

Tabla 4.2.-: Análisis estadístico descriptivo de las cifras de hemoglobina, proteínas y ADN en suero de pacientes afectados de cáncer vesical

	Proteínas (g/dL)	DNA (mg/mL)	Hemoglobina (g/dL)	
			Diagnóstico	Postratamiento
Media	6,5	42,9	14,1	14,0
Desviación estándar	1,3	54,2	1,9	1,7
Moda	6,7	4,0	14,5	13,9
Mínimo	0,2	0,1	5,5	1,1
Máximo	11,4	460,0	17,5	16,7

Tabla 4.3.-: Análisis estadístico descriptivo de las cifras de creatinina sérica y PSA en pacientes afectados de cáncer vesical

	Creatinina sérica (mg/dL)		PSA (ng/mL)	
	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento
Media	1,3	1,2	31,0	68,4
Desviación estándar	1,3	0,4	250,9	293,1
Moda	1,1	1,2	1,5	0,0
Mínimo	0,7	0,6	0,1	0,0
Máximo	13,9	3,0	2.204,0	1.681,0

4.1.4.- Síntomas urinarios

Los síntomas urinarios referidos por los pacientes incluidos en esta serie se han analizando siguiendo la valoración en forma de puntuaciones numéricas propuesta por Madsen e Iversen (1983) (tabla 4.4). Entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad en los pacientes sometidos a estudio, destaca claramente su presentación inicial en forma de hematuria. En un caso la enfermedad se presentó bajo la sintomatología de anuria obstructiva. Otros datos clínicos fueron referidos por los pacientes que padecían prostatismo.

Tabla 4.4.-: Distribución de pacientes según la puntuación modificada de Madsen e Iversen para síntomas clínicos vesicales

	<i>HEMATURIA</i>		<i>POLAQUIURIA</i>		<i>NICTURIA</i>	
	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento
<i>0</i>	11	130	61	71	67	75
<i>1</i>	15	2	69	58	59	52
<i>2</i>	81	6	6	10	9	10
<i>3</i>	33	2	4	1	5	3
	140	140	140	140	140	140
	<i>URGENCIA</i>		<i>DISURIA</i>		<i>TENESMO VESICAL</i>	
	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento
<i>0</i>	114	120	119	120	128	132
<i>1</i>	21	15	18	16	12	8
<i>2</i>	5	5	3	3	0	0
<i>3</i>	0	0	0	1	0	0
	140	140	140	140	140	140

4.1.5.- Tratamiento antitumoral recibido

Se han analizado globalmente los tratamientos que han sido aplicados sobre los 141 pacientes recogidos en este trabajo. En su análisis se ha considerado tanto la respuesta tumoral como los efectos secundarios asociados y el curso evolutivo de los pacientes.

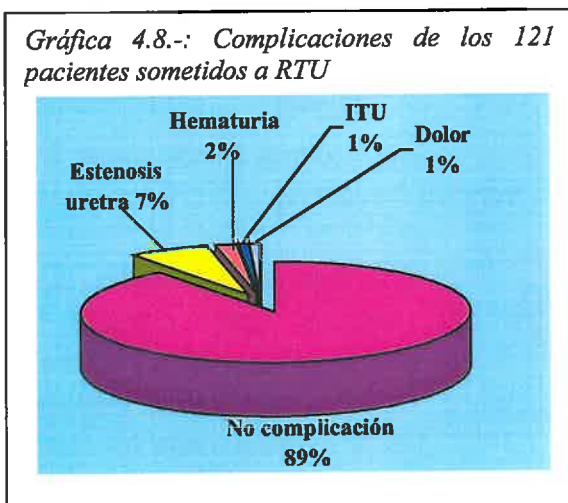
4.1.5.a.- Cirugía

Los 141 pacientes estudiados se han sometido en 162 ocasiones a tratamiento quirúrgico, 151 mediante resección transuretral (RTU) o biopsias frías (Bx frías) de mucosa vesical y 11 mediante cistectomía radical (*Tabla 4.5*). De importancia fundamental es que en la serie de pacientes aquí incluida, la eficacia y la seguridad de la cirugía se han mantenido dentro de niveles de excelencia. La morbilidad asociada a la cirugía se resume a continuación en las gráficas 4.8 y 4.9:

Tabla 4.5.-: Distribución de tratamiento endoscópico en el tiempo de estudio

Nº RTU-Bx FRIAS/ TIEMPO SGTO	Nº PACIENTES	TOTAL
0	20 (11 rev + 9 cistec)	0
1	101	101
2	12	24
3	6	18
4	2	8
	141	151

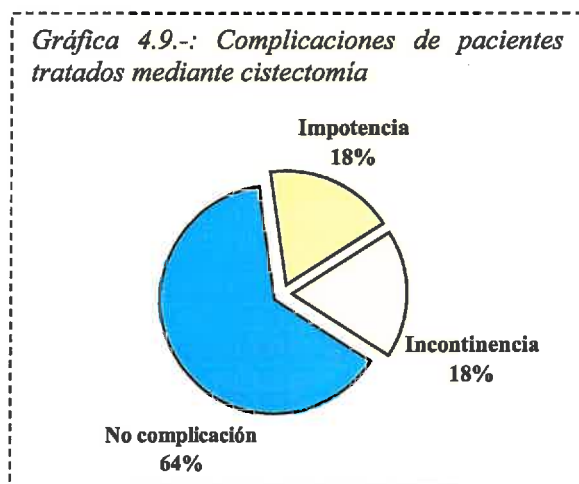
Gráfica 4.8.-: Complicaciones de los 121 pacientes sometidos a RTU



121 pacientes se sometieron a RTU y sólo 12 (11%) presentaron efectos adversos:

- 8 estenosis de uretra (7%),
- 2 Hematurias (2%),
- 1 Infección urinaria (1%),
- 1 dolor hipogástrico (1%).

Gráfica 4.9.-: Complicaciones de pacientes tratados mediante cistectomía



11 pacientes se sometieron a cistectomía y 2 de ellos a RTU. 4 (36%) consultaron aquejándose de:

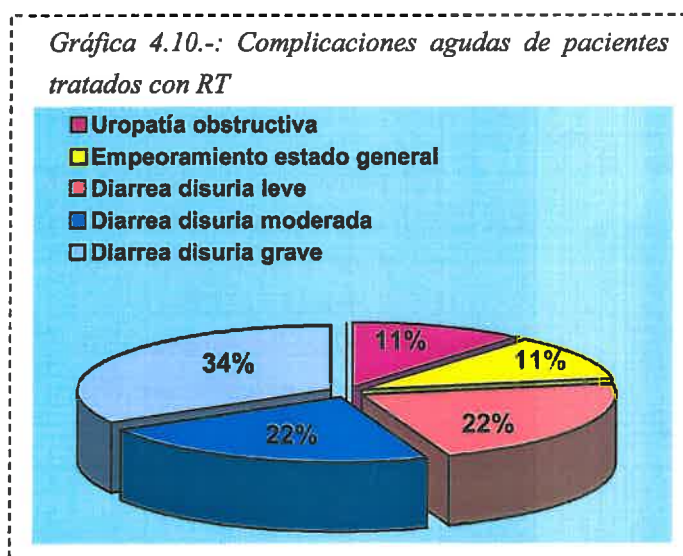
- 2 impotencias
- 2 incontinencias leves

4.1.5.b.- Radioterapia

Un total de 27 pacientes recibieron tratamiento con radioterapia en dosis que oscilaron entre 50-66 Gy en la región pélvica, cuando la finalidad era curativa, y fue de 30 Gy cuando la terapéutica se decidió con fines paliativos. En catorce ocasiones la radioterapia fue postoperatoria y en dos casos se decidió efectuar irradiación previa a la cistectomía. Dos pacientes se trataron con intención paliativa y en nueve casos los enfermos habían sido sometidos a esta radioterapia con anterioridad a la entrada en nuestro protocolo de estudio.

De estos 27 pacientes, 18 (67%) no tuvieron complicaciones relevantes en el intervalo de los 6 primeros meses que siguieron a la irradiación (efectos secundarios agudos de la radioterapia). Los 9 restantes (33%) presentaron sintomatología diversa que, en porcentajes, se recoge en la gráfica 4.10. Los datos referidos a número de pacientes son los siguientes:

Gráfica 4.10.-: Complicaciones agudas de pacientes tratados con RT

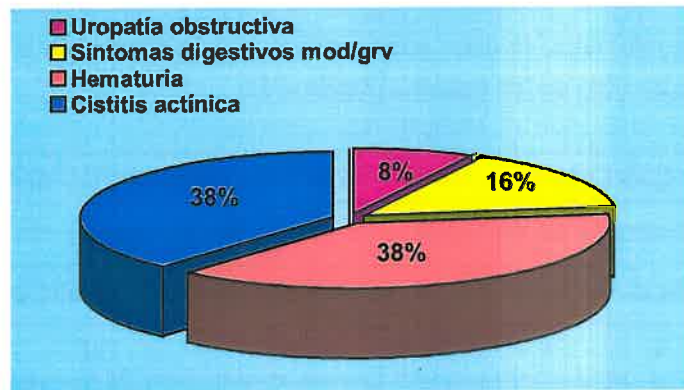


- Uropatía obstructiva: 1 (11%)
- Deterioro del estado general: 1 (11%)
- Diarrea, disuria, leve: 2 (22%)
- Diarrea, disuria, moderada: 2 (22%)
- Diarrea, disuria, grave: 3 (34%)

Las complicaciones crónicas (efectos que aparecen para tiempos que superan el intervalo de 6 meses una vez finalizada la RT) se presentaron en 13 de los

27 pacientes tratados (48%) y se distribuyen como se refleja en la gráfica 4.11.

Gráfica 4.11.-: *Complicaciones crónicas de pacientes tratados con RT*



- Uropatía obstructiva: 1 (8%)
- Síntomas digestivos moderados o graves: 2 (16%)
- Cistitis actínica: 5 (38%)
- Hematuria: 5 (38%)

Debe hacerse notar que sólo en cuatro de los nueve casos en los que se desencadenaron efectos agudos consecutivos a la

radioterapia aparecieron, a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad, otros efectos secundarios radioinducidos de presentación tardía. Por ello puede decirse que la mayor parte de los efectos tardíos derivados de la irradiación, por cáncer vesical, no están precedidos de efectos tóxicos precoces, y este dato parece indicar la independencia de una y otra forma de morbilidad asociadas a la radioterapia.

4.1.5.c.- *Quimioterapia:*

4.1.5.c.1.- *Quimioterapia endovesical*

El tratamiento con RTU se complementó en 62 pacientes con quimioterapia endovesical. En 54 de ellos, se utilizó mitomicina, en 4, BCG y 4 se trataron con intrón, epirrubicina o novantrone. Los efectos secundarios recogidos en las historias de los pacientes aparecen en bajo número, puesto que este dato sólo se encuentra en 4 casos de los 62 tratados.

- 2 de estos casos se objetivaron tras tratamiento con mitomicina, lo que supone el 4% de los tratados con esta sustancia. En un paciente apareció hematuria y en otro, la reacción adversa fue una reacción cutánea.
- Otros 2 casos de complicaciones ocurrieron tras tratamiento con BCG; es decir en el 50% de los pacientes tratados con esta sustancia se desarrolló un efecto tóxico en forma de fiebre y/o síndrome miccional.

Este dato, aun teniendo en cuenta el bajo número de casos que en este trabajo se incluye puede aportar alguna luz a las diferencias de toxicidad existentes entre el quimioterápico y el agente inmunomodulador (*Tabla 4.6.*).

4.1.5.c.2.- Quimioterapia sistémica

Hasta 13 de los pacientes estudiados se trataron, tras cirugía, con quimioterapia sistémica, 12 con MVAC y en 1 caso el tratamiento elegido consistió en cinco ciclos con taxol/CDDP. Como complicación relevante, se debe señalar que en dos pacientes se produjo depresión leucocida, lo que supone un 15% de los tratados (Tabla 4.6).

Tabla 4.6.-: Tratamiento con Quimioterapia efectos secundarios y ratio de los mismos

	Quimioterapia endovesical			Quimioterapia sistémica
	Mitomicina	BCG	Interferón/Epirrubicina	MVAC/Taxol/CDDP5
Pacientes	54	4	4	13
Efectos 2º	2	2	0	2
% Efectos 2º	4%	50%	0%	15%

4.1.6.- Anatomía patológica de los casos de cáncer vesical incluidos en este estudio

La Tabla 4.7 resume la distribución de los casos perteneciente a la serie de pacientes incluidos en este trabajo. En su elaboración se ha tenido en consideración los siguientes parámetros: estadio, grado y tipo histológico. Como se desprende del análisis de la tabla, la situación más frecuente es el diagnóstico de tumores vesicales de grado II, superficiales, con estadio que en la clasificación TNM suele ser T₁N₀M₀, y en la clasificación de Jewett-Strong-Marshall de estadio A; las piezas tumorales presentan datos histológicos de invasión vascular en una proporción relativamente baja y los tumores pueden ser, con la misma frecuencia, únicos o de presentación multifocal. En el 96% de los 141 pacientes el diagnóstico de tumor vesical correspondió a tumores de epitelio transicional o uroteliales.

Tabla 4.7.-: Estadio y grado histológico de los 141 pacientes diagnosticados de cáncer vesical

Grado	T		N		M		Invasión vascular	Multifocalidad	JSM		Tipo				
	1	2	0	1	0	1			A	B					
I	32	1	93	0	113	0	127	Sí	42	Sí	64	A	93	CCT	135
II	71	2	37	1	7	1	9	No	93	No	65	B	37	CCE	1
III	37	3	8	2	1	x	5	x	6	x	12	C	4	CA	3
IV	1	4	3	x	20							D	7	AD	1
														SV	1

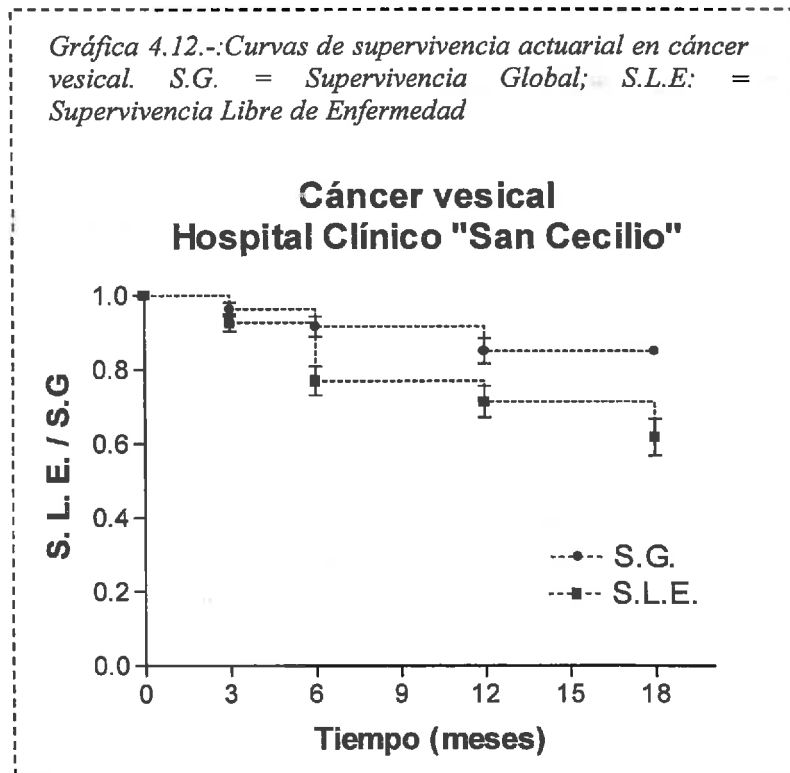
T, N, M: Clasificación Tumor-Nódulos linfáticos-Metástasis; JSM: Sistema de estadiaje tumoral de Jewett Strong Marshall. CCT: carcinoma de células transicionales; CCE: carcinoma de células escamosas. CA: Carcinoma anaplásico de células pequeñas. SV: Sarcoma Vesical. AD: Adenocarcinoma. x: no especificado

4.1.7.- Seguimiento y supervivencia

Siguiendo el protocolo habitual, los pacientes incluidos en este estudio se han sometido a seguimiento clinicopatológico regular y ocasionalmente analítico, durante un periodo que alcanza, en aproximadamente la mitad de los casos, los 18 meses tras la toma de la primera muestra de suero y/o tumor vesical. Las revisiones clínicas fueron a los 3, 6, 12 y 18 meses. Se dispone así de la información evolutiva de 27 pacientes a los 3 meses; de 23 a los 6 meses; de 33 al año y de 52 a los 18 meses de su entrada en el estudio y que en la tabla 4.8 se clasifican atendiendo a tres categorías clínicas: libre de tumor, recidiva y éxitus. Por diferentes motivos, seis pacientes no se han sometido a revisiones. Gracias a esta estratificación, se ha podido evaluar estadísticamente la supervivencia global (S.G) y la supervivencia libre de enfermedad (S.L.E) de los enfermos recogidos en esta serie, valorando como punto final del estudio la situación de los mismos a lo largo de un periodo tiempo de seguimiento comprendido entre 0 y 18 meses. Los datos de S.G y S.L.E se han analizado en función de diferentes variables que pueden verse implicadas en la evolución del cáncer de vejiga; entre ellas se ha estudiado: a) el grado de diferenciación; b) el grado de infiltración del tumor en la pared vesical (T); c) la multifocalidad; d) la invasión vascular; e) la modalidad terapéutica (RTU sola *vs* RTU + QT endovesical en tumores superficiales; y cistectomía radical *vs* RT). En todos los casos se ha aplicado el procedimiento de cálculo de supervivencia actuarial mediante el método de Kaplan-Meier. Para valorar si las diferencias encontradas entre las curvas de supervivencia poseen, o carecen de, significación estadística se ha utilizado el test log-rank.

<i>Tabla 4.8.-: Distribución de los enfermos según la evolución de la enfermedad desde el diagnóstico</i>					
	3 meses	6 meses	12 meses	18 meses	Total
Libre	9	6	23	45	83
Recidiva	14	14	9	7	44
Exitus	4	3	1	0	8
Total	27	23	33	52	135
<i>6 pacientes no acudieron a revisiones</i>					

Procediendo de la forma indicada anteriormente, se han calculado los porcentajes de supervivencia global y de supervivencia libre de enfermedad, correspondientes a los enfermos tratados entre 1999 y 2001 en el Hospital Clínico "San Cecilio" de Granada. Los resultados obtenidos se presentan en el gráfico 4.12.



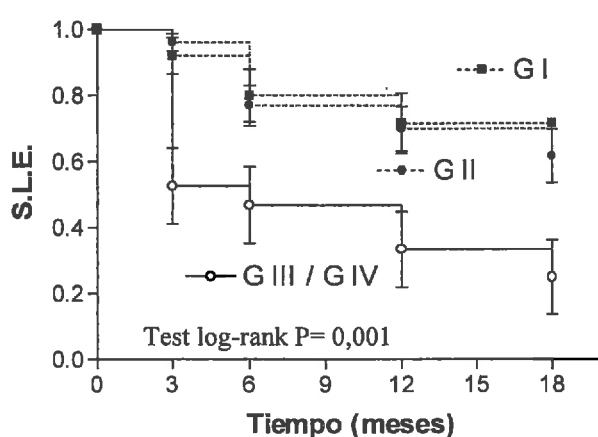
El análisis de esas curvas deja ver con claridad la importancia del cáncer vesical, globalmente considerado. En efecto, sin estratificar los pacientes por estadios de presentación de la enfermedad, es decir, utilizando los datos crudos, la supervivencia global a los 18 meses del diagnóstico de la misma es del orden del 85% (0.85 ± 0.03). Aun más, dentro del grupo de pacientes que sobreviven muchos de ellos lo hacen tras padecer procesos de recidiva o de progresión distal de la enfermedad. La probabilidad de sobrevivir sin enfermedad un tiempo de 18 meses tras el tratamiento inicial en la serie estudiada está entorno al 62% (0.62 ± 0.05) de los paciente inicialmente incluidos en el estudio. Estas cifras indican que los índices de recurrencias tumorales, incluso los índices de mortalidad por cáncer vesical, son ciertamente elevados a pesar del avance de los procedimientos de diagnóstico y de la terapéutica. Esto demuestra con claridad la relevancia de la enfermedad y plantea la necesidad de profundizar en los mecanismos que la inician, la desencadenan y la hacen progresar y ello con el fin de avanzar en el conocimiento de la biología tumoral y aportar nuevos datos que permitan el desarrollo de procedimientos terapéuticos más eficaces y eficientes.

Los apartados que a continuación se presentan, muestran el análisis univariante de los datos de supervivencia en función de las distintas variables que, de manera tradicional, se consideran como determinantes del pronóstico.

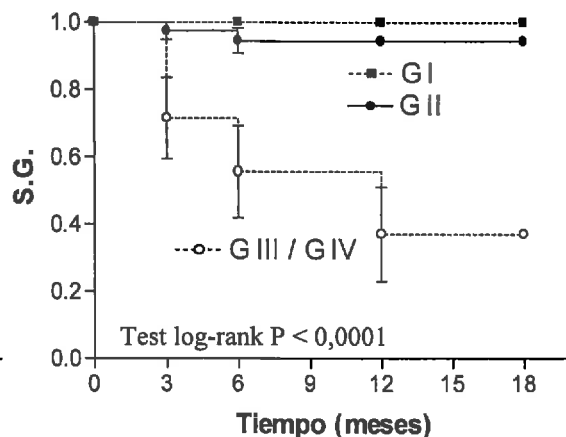
4.1.7.a.- Supervivencia y grado de diferenciación celular "G"

Los datos de la estimación de las probabilidades de supervivencia global y de supervivencia libre de enfermedad en función del grado de diferenciación tumoral aparecen recogidos en las gráficas 4.13 y 4.14.

Gráfica 4.13.-: Influencia del grado de diferenciación tumoral sobre la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad



Gráfica 4.14.-: Influencia del grado de diferenciación tumoral sobre la probabilidad de supervivencia global

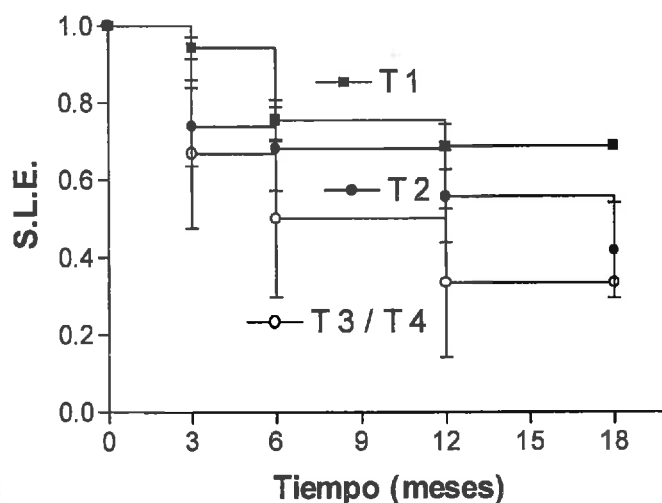


Del estudio de las mismas se puede deducir que la S.L.E en los pacientes clasificados como GI es del 72% \pm 0,09; y que esta cifra disminuye ligeramente cuando el grado de diferenciación es GII (S.L.E = 62% \pm 0,08) y con claridad cuando se estudia el subgrupo de pacientes calificados como de grado GIII (S.L.E = 25% \pm 0,11). Las comparaciones entre las curvas utilizando el test log-rank nos proporciona unos valores de χ^2 de 0,27 (1 g.l) con una P = 0,602 indicativos de la falta de significación estadística para las diferencias que se encuentran entre los grupos GI y GII. Al comparar los valores estimados de probabilidad de supervivencia de los grupos GI, GII y GIII se obtiene un valor para $\chi^2 = 13,52$ (2 g.l) con una P = 0,001 que es estadísticamente significativo. Este resultado confirma la relación de mal pronóstico que es habitualmente considerada para los tumores vesicales más indiferenciados. El análisis pormenorizado de los datos de supervivencia global (gráfica 4.14) nos permite decir que a los 18 meses del tratamiento de la enfermedad, los pacientes con GI tienen una supervivencia global máxima (100%), los que tienen GII sobreviven en un proporción cercana

al 95%; mientras que a los 18 meses sólo viven el $37\% \pm 0,14$ de los pacientes cuyos tumores fueron clasificados como GIII. De nuevo, al comparar la S.G de los pacientes con GI respecto a los GII no apreciamos diferencias significativas ($\chi^2 = 0,783$; (2 g.l) con $P = 0,376$). La comparación estadística entre las curvas de prosecución de vida de estos tres subgrupos de pacientes GI, GII y GIII es demostrativa de la existencia de una relación muy estrecha entre grado de diferenciación tumoral y probabilidad de supervivencia global. Los valores de los estadísticos correspondientes son: χ^2 de 26,7 (2 g.l) y $P < 0,0001$.

4.1.7.b.- Supervivencia y grado de infiltración en la pared vesical "T"

Gráfica 4.15.-: Influencia de la penetración del tumor en la pared vesical sobre la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad



Test log-rank $P = 0,0541$
 Test log-rank $T_1 - T_2 P = 0,0476$

También se han aplicado los tests estadísticos a la infiltración tumoral (T) de los pacientes para evaluar cómo puede esta variable actuar sobre la supervivencia libre de enfermedad (Gráfica 4.15). De ese modo, se puede observar que la supervivencia libre de enfermedad a los 18 meses del inicio del estudio para los pacientes con T_1 es del $69\% \pm 0,06$. En los pacientes con T_2 es del $42\% \pm 0,12$ y para los que presentan T_{3-4} es del $33\% \pm 0,12$.

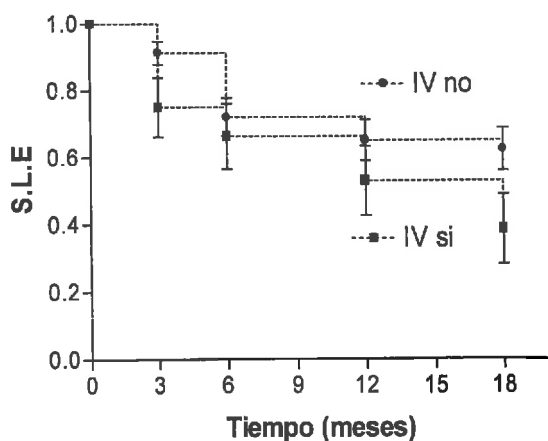
La comparación de las tres categorías entre sí mediante el test log-rank, no alcanza el grado de significación estadística, aunque los valores de los estadísticos obtenidos, están muy cerca del límite de significación: χ^2 de 5,8 y una $P = 0,0541$. La razón de la ausencia de significación estadística probablemente se enlace con el bajo número de pacientes incluidos en esta serie, especialmente en el grupo de tumores avanzados T_3 y T_4 . Por otra parte, y de manera intuitiva, la comparación entre las curvas de supervivencia dibujadas en la gráfica 4.15 revela la relación manifiesta entre el pronóstico y el grado de penetración del tumor en la pared vesical, algo que, por otra parte, está firmemente establecido. Que este es un hallazgo habitual es algo que se refuerza cuando se comparan entre sí los casos que, pertenecientes a esta serie, han sido calificados como T_1 y T_2 . En esta comparación encontramos que la supervivencia libre de enfermedad a 18 es de 0.69 ± 0.06 para el grupo de tumores T_1 y de 0.42 ± 0.12 ; para los tumores de mayor penetración T_2 . Las diferencias entre ambas curvas de

supervivencia valoradas de acuerdo con el test log-rank es significativa siendo los valores de los estadísticos correspondientes $\chi^2 = 3.922$ y $P = 0.0476$.

4.1.7.c.- Supervivencia e invasión vascular

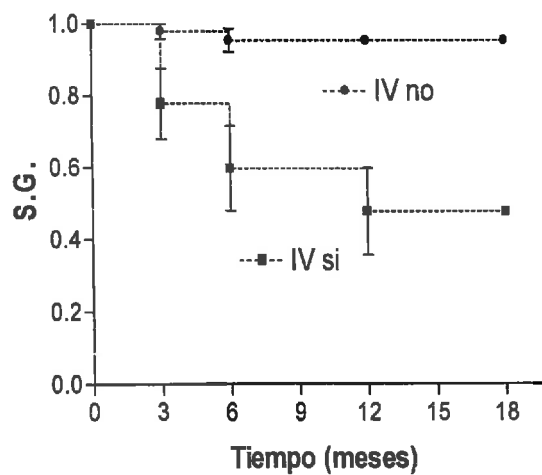
Al estudiar la asociación entre la existencia o no de invasión vascular tumoral (característica biológica que va asociada al grado de infiltración del tumor) y supervivencia a los 18 meses del inicio del estudio, no resulta sorprendente encontrar hallazgos similares a los referidos en el apartado anterior, de manera que existe una alta tendencia a la significación estadística en la S.L.E y una significativa diferencia en la S.G de los pacientes que presentan invasión vascular respecto de los que no la presentan. Estos resultados se muestran en las gráficas 4.16 y 4.17.

Gráfica 4.16.-: Influencia de la invasión vascular sobre la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad.



Test log-rank $P > 0,05$

Gráfica 4.17.-: Influencia de la invasión vascular sobre la probabilidad de supervivencia global



Test log-rank $P < 0,0001$

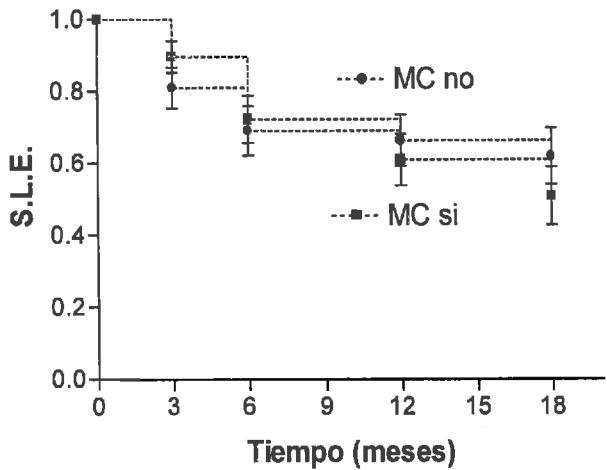
Concretamente, según los datos obtenidos, el $39\% \pm 0,1$ de los pacientes que presentaron invasión vascular (IV) estaban libres de enfermedad a los 18 meses del diagnóstico y tratamiento del proceso primitivo; a diferencia de esto, el $62\% \pm 0,06$ de los pacientes en los que la IV no se objetivaba, estaban libres de enfermedad. El test log-rank muestra una χ^2 de 3,36 con una $P > 0,05$ que, aunque muy próxima al nivel, indica que las diferencias carecen de significación estadística.

En relación a la supervivencia global el $48\% \pm 0,12$ de los pacientes que presentan invasión vascular (IV) sobreviven a los 18 meses del estudio; mientras que sobreviven el $95\% \pm 0,03$ de los que no tienen IV. En este caso el test log-rank ofrece unos valores de $\chi^2 = 19,4$ al que corresponde una $P < 0,0001$. Es decir que la invasión vascular objetivada en el espécimen tumoral, y cuando se trata de valorar la probabilidad de supervivencia de los

enfermos afectos de cáncer vesical es un factor de importancia cierta a la hora de establecer el pronóstico de la enfermedad.

4.1.7.d.- Supervivencia y multifocalidad

Gráfica 4.18.-: Influencia de la multifocalidad sobre la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad.



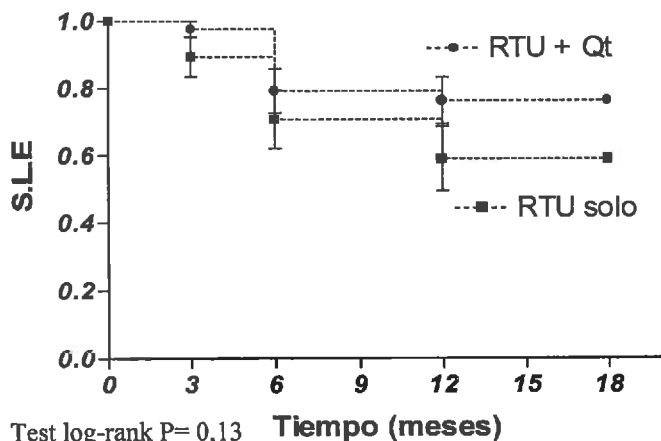
Test log-rank P= 0,65

Otro dato anatómico de importancia fundamental, es la forma de presentación única o múltiple del tumor en la pared vesical. En relación a este tema (Gráfica 4.18), se ha podido comprobar, mediante el análisis estadístico de los datos correspondientes a esta serie de enfermos, que la multifocalidad parece tener escasa relevancia sobre la probabilidad de S.L.E. estimada a los 18 meses del inicio del estudio. Así, el 51% ± 0,8 de los

pacientes con multifocalidad están libres de enfermedad a los 18 meses, mientras que también están libres de sintomatología por enfermedad tumoral el 62% ± 0,8 de los pacientes en los que el tumor fue clasificado como unifocal. Al aplicar el test log-rank para valorar las diferencias hemos obtenido un valor de $\chi^2 = 0,202$ que corresponde a un valor de P = 0,65 (no significativa).

4.1.7.e.- Supervivencia y Tratamiento en tumores superficiales

Gráfica 4.19.-: Influencia del tratamiento de tumores vesicales superficiales (RTU o RTU+QT endovesical) sobre la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad



Test log-rank P= 0,13

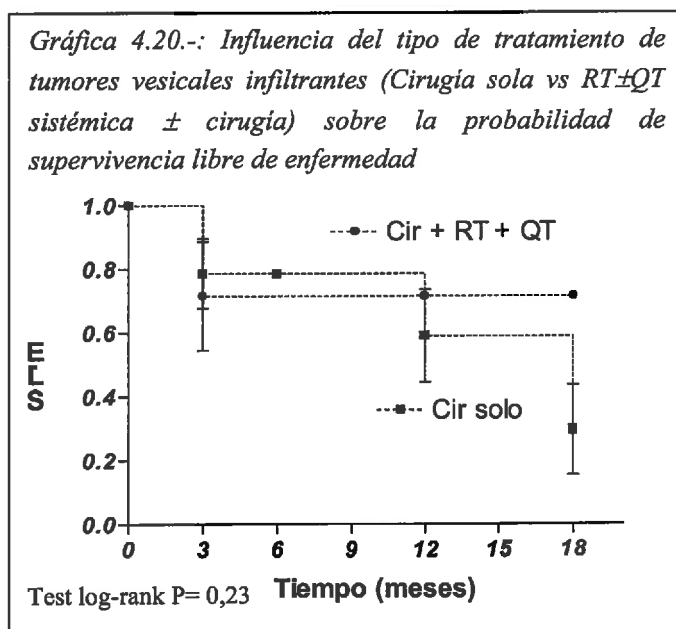
Ha parecido interesante evaluar y comparar el grado de repercusión que pueden tener, sobre la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con cáncer vesical, diferentes pautas terapéuticas para los tumores vesicales superficiales como son la RTU sola y la RTU seguida de quimioterapia endovesical. (Gráfica 4.19).

Del análisis de estos datos de estimación de la probabilidad sabemos que el

76% \pm 0,07 de los pacientes con T₁ que han sido tratados con RTU y quimioterapia endovesical están libres de enfermedad a los 18 meses. El 59% \pm 0,10 de los pacientes con T₁ tratados con RTU sola están libres de enfermedad a los 18 meses. Sin embargo al comparar globalmente ambas curvas de supervivencia resulta que el valor de χ^2 es 2,283 y la P = 0,13; resultado que demuestra que aunque las diferencias existen, éstas no alcanzan un valor que estadísticamente resulte significativo; es decir, que el tratamiento complementario de quimioterapia endovesical utilizado no influye en la serie de pacientes analizada en este trabajo y, quizás por el escaso número de pacientes incluidos en ella, en la evolución de los mismos y que las estimaciones de probabilidad de S.L.E son aparentemente iguales.

4.1.7.f.- Supervivencia y Tratamiento en tumores infiltrantes

También ha parecido interesante, en la serie de pacientes que en este trabajo se incluyen, comparar el grado de repercusión que, sobre la supervivencia libre de enfermedad evaluada a los 18 meses, ejercen las diferentes pautas terapéuticas habitualmente recomendadas para los tumores vesicales infiltrantes. En este caso, la comparación se realiza entre el subgrupo de enfermos tratados con Cirugía exclusiva y el subgrupo de pacientes en los que además de cirugía se empleó Radioterapia seguida o no de quimioterapia sistémica.



Esta comparación tiene como dificultad importante el hecho de que los grupos que se comparan son asimétricos en número. Y es probable que esa limitación es causa de que las diferencias que se observan en la gráfica 4.20 no se correspondan con los resultados del test empleado para comprobar la significación estadística de las mismas. En términos muy particulares, al hacer referencia exclusivamente a la serie aquí analizada, puede decirse que el 30% \pm 0,14 de los pacientes con tumores infiltrantes tratados con

cirugía exclusiva se encuentran libres de enfermedad a los 18 meses del tratamiento, mientras que la S.L.E, también a los 18 meses, alcanza el 71% de los pacientes que son tratados con cirugía y radioterapia/quimioterapia combinadas. Aunque estas diferencias parecen importantes, la aplicación del test log-rank demuestra (χ^2 de 1,42; P = 0,23) la ausencia de significación estadística de las mismas.

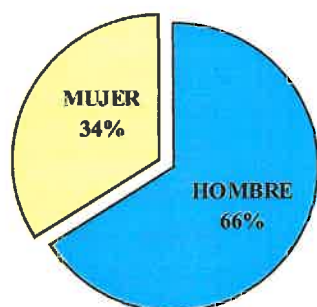
4.2.-CARACTERÍSTICAS DE LOS CONTROLES

4.2.1.- Datos personales

Para lo que constituye el núcleo esencial de este trabajo, el estudio de las alteraciones epigenéticas del cáncer vesical y la demostración de las mismas en el suero de los pacientes estudiados, se han tenido que realizar el mismo tipo de determinaciones analíticas sobre muestras procedentes de un grupo de personas que, voluntariamente y tras el pertinente informe del objetivo del trabajo, han permitido que les tomemos una muestra de sangre o de tejido. En este grupo, denominado Grupo Control, se han incluido 31 sujetos completamente sanos y 13 pacientes afectados de enfermedad urinaria no tumoral, siendo de estos últimos, las muestras tisulares que se han obtenido para control analítico de metilación de los promotores de genes ensayados. En los párrafos que siguen, en forma de gráficos, se resumen las características generales del grupo control.

4.2.1.a.- Sexo (Gráfica 4.21)

Gráfica 4.21.-: Distribución de los 44 controles por sexo

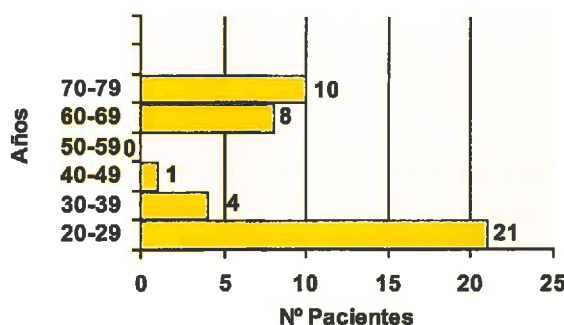


- Hombres: 29 (66%)
- Mujeres: 15 (34%)

4.2.1.b.- Edad (Gráfica 4.22)

- Media: 45,6 ± 21,2 años
- Moda: 29,0 años
- Mínimo: 22,0 años
- Máximo: 78,0 años

Gráfica 4.22.-: Distribución de los controles por edad



La gráfica 4.22 es demostrativa de una distribución de personas bimodal con un grupo mayoritario de individuos de edades comprendidas entre los 20 y los 50 años y un segundo grupo de los controles de mayor edad. La explicación es sencilla: este segundo grupo de personas incluidas como control corresponde a los pacientes que fueron quirúrgicamente intervenidas por patología urinaria benigna y de las cuales pudimos disponer de un trozo de tejido vesical.

4.2.1.c.- Tabaquismo

De los 44 controles, son fumadores aproximadamente la mitad (*Gráfica 4.23*). Sin embargo, como ya se ha mencionado, sólo se ha profundizado en el estudio del hábito tabáquico de los 13 controles con patología vesical benigna (*Gráfica 4.24 y en la tabla 4.9*).

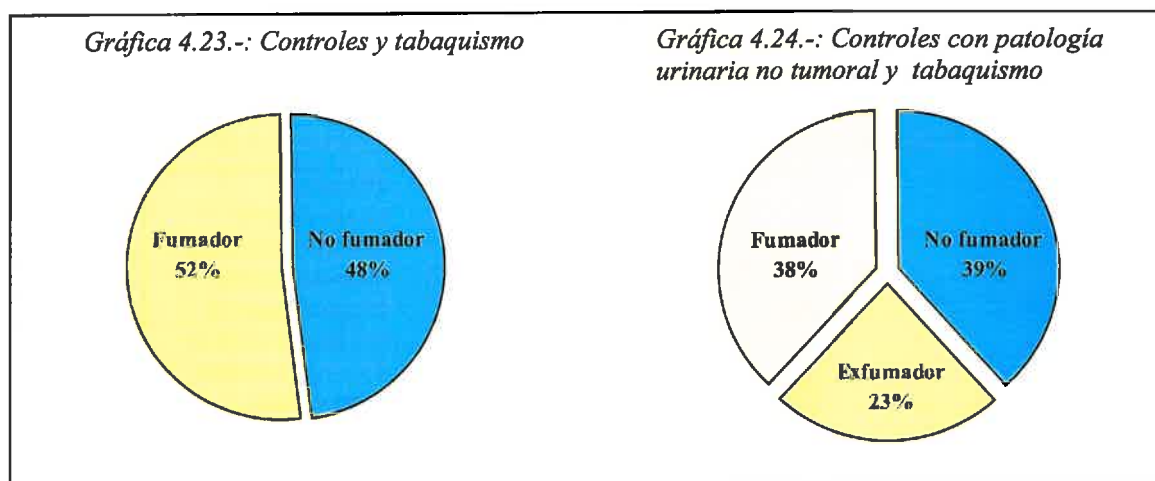


Tabla 4.9.-: Distribución de la cantidad de paquetes/día consumida por los fumadores activos y años desde el abandono del hábito tabáquico

Controles con enfermedad benigna vesical: Fumadores activos			Controles con enfermedad benigna vesical: Exfumadores		
< 1 paquete/día	1-2 paquetes/día	> 2 paquetes/día	≤ 5 años	6-10 años	> 10 años
1	2	2	1	1	1
5			3		

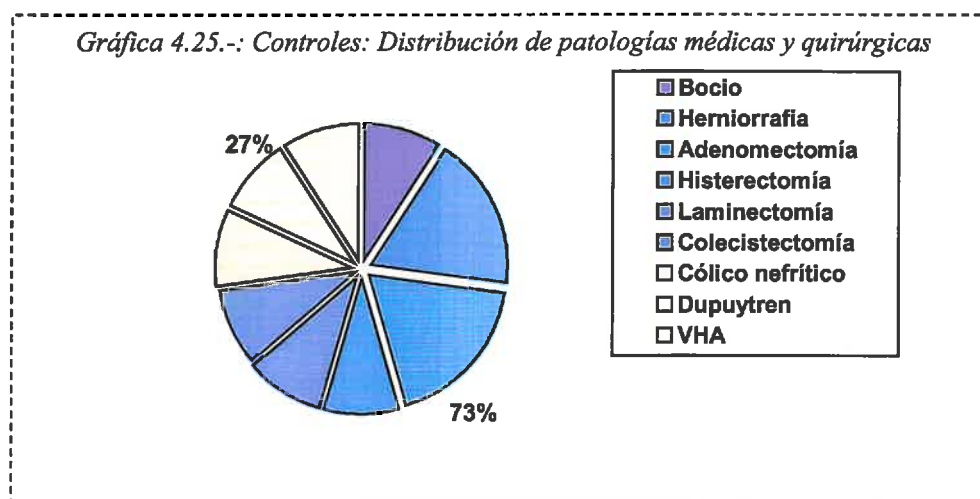
4.2.2.- Antecedentes personales

A continuación, se resumen los datos correspondientes al grupo de enfermos con enfermedad urinaria no tumoral.

4.2.2.a.- *Patologías anteriores*

Los 13 pacientes con patología vesical benigna presentan antecedentes médicos de interés en poco más de la mitad de los casos (54%). En esos 7 casos se describen 11 patologías (*Gráfica. 4.25*) siendo:

- 8 de tipo quirúrgico (73%): 2 adenomectomías prostáticas, 2 herniorrafias, 1 bocio, 1 colecistectomía, 1 histerectomía, 1 laminectomía.
- 3 de tipo médico (27%): 1 cólico nefrítico de repetición, 1 enfermedad de Dupuytren, 1 infección hepática aguda VHA.



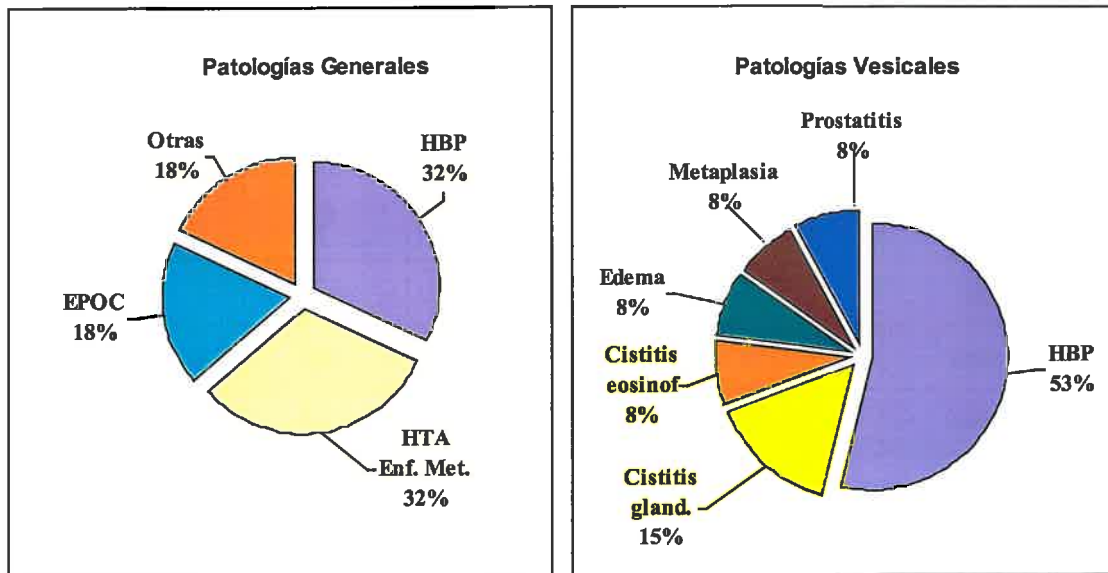
4.2.2.b.- *Patologías concomitantes*

Los 13 controles con patología urinaria baja benigna suelen presentar, de modo concomitante, los procesos prevalentes para su edad. Hay 4 casos que no presentaron patología concomitante alguna. Los 9 pacientes restantes registraron hasta 22 patologías (*Gráfica 4.26*) destacando:

- 7 casos: hipertensión arterial (HTA)/enfermedades metabólicas (DMNID Dislipemias, hiperuricemia...).
- 7 casos: hiperplasia prostática benigna (HBP).
- 4 casos: enfermedad bronquial crónica (EPOC).
- 4 casos: otras patologías.

Por otro lado, las patologías urológicas benignas descritas en este grupo fueron 7 HBP (53%), 2 cistitis glandulares (15%), 1 prostatitis crónica (8%), 1 edema inflamatorio vesical (8%), 1 metaplasia escamosa (8%) y 1 cistitis eosinófila (8%) (Gráfica 4.26).

Gráfica 4.26.-: Distribución de patologías generales y vesicales concomitantes en controles con patología vesical benigna.



4.2.3.- Parámetros analíticos

En los dos subgrupos de controles tanto la concentración de proteínas como la de ADN sérico oscilaron en un rango bastante amplio sin ser las diferencias en ambos estadísticamente significativa (Tabla 4.10).

Tabla 4.10.-: Análisis estadístico de las proteínas y ADN sérico en los controles

	PROTEÍNAS (g/dL)			ADN (ng/mL)		
	Valor global	Control Sano	P. Enfermedad Urinaria Benigna	Valor global	Control Sano	P. Enfermedad Urinaria Benigna
Media	7,3	7,5	6,7	15,9	14,0	20,0
Desviación estándar	0,9	0,9	0,9	10,8	8,3	14,2
Moda	8,4	8,4	-	21,2	21,2	3,2
Mínimo	4,6	4,9	4,6	0,4	0,6	0,4
Máximo	8,5	8,5	7,9	46,6	26,1	46,6

Otros parámetros analíticos determinados en los pacientes afectados de enfermedad urinaria benigna se muestran en la tabla 4.11, en donde no se incluye el PSA que fue normal excepto en un caso, en el cual se efectuó una biopsia que fue negativa:

Tabla 4.11.-: Análisis estadístico de las cifras de creatinina sérica y hemoglobina

	<i>Hemoglobina (g/dL)</i>		<i>Creatinina sérica (mg/dL)</i>	
	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento
<i>Media</i>	15,4	15,1	1,1	1
<i>Desviación estándar</i>	1,8	1,1	0,2	0,2
<i>Moda</i>	15,6	14,6	1,2	1,1
<i>Mínimo</i>	13,2	13,7	0,9	0,7
<i>Máximo</i>	20,2	18,2	1,4	1,4

4.2.4.- Síntomas urinarios

Las tablas 4.12 y 4.13 muestran los valores de los síntomas urinarios clasificados según la puntuación modificada de Madsen e Iversen. En la clínica de los controles con enfermedad vesical benigna, destaca la presentación de la enfermedad con hematuria. Los síntomas restantes se manifiestan sobretodo en los pacientes que padecen prostatismo.

Tabla 4.12.-: Distribución de pacientes según la puntuación modificada de Madsen e Iversen para síntomas clínicos vesicales

	<i>HEMATURIA</i>		<i>POLAQUIURIA</i>		<i>NICTURIA</i>	
	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento
<i>0</i>	3	12	1	2	2	3
<i>1</i>	3	1	8	10	7	10
<i>2</i>	7	0	4	1	4	0
<i>3</i>	0	0	0	0	0	0
	13	13	13	13	13	13

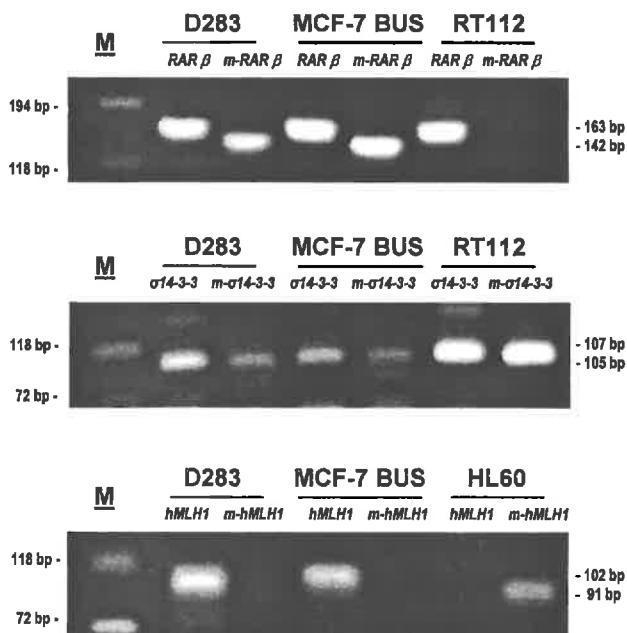
Tabla 4.13.-: Distribución de pacientes según la puntuación modificada de Madsen e Iversen para síntomas clínicos vesicales

	URGENCIA		DISURIA		TENESMO VESICAL	
	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento	Diagnóstico	Postratamiento
0	10	12	12	12	13	13
1	2	1	1	1	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
	13	13	13	13	13	13

4.3.- DETERMINACIÓN EN SUERO DEL PROMOTOR DE *p16^{INK4a}* INACTIVADO POR METILACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE VEJIGA.

4.3.1.- Epigenotipo del ADN de líneas celulares tumorales

Figura 4.1.-: Amplificación de los fragmentos correspondientes al ensayo MSP para RAR-β, σ 14-3-3 y hMLH1 en las líneas celulares D283, MCF-7 BUS, RT112 Y HL60



En la puesta a punto de la identificación por MSP del estado de metilación de los promotores de *p16^{INK4a}*, *hMLH1*, *ciclina D2*, *σ 14-3-3*, *RAR-β* (receptor de ácido retinoico) y *Twist*, se utilizó ADN procedente de líneas celulares tumorales extraído y modificado según las condiciones descritas en el apartado de material y métodos. La tabla 4.14 resume los resultados obtenidos para cada gen en estos modelos, así como sus respectivos índices de metilación (IM); mientras que en la figura 4.1 se muestra la amplificación de los fragmentos correspondientes al ensayo MSP para *RAR-β*, *σ 14-3-3* y *hMLH1* en las líneas celulares D283, MCF-7 BUS, RT112 Y HL60.

Tabla 4.14.-: Epigenotipo e IM del ADN de líneas celulares tumorales

	<i>14-3-3 σ</i>		<i>ciclina D2</i>		<i>p16^{INK4a}</i>		<i>RAR β</i>		<i>Twist</i>		<i>hMLH1</i>		<i>IM</i>
	u	m	u	m	u	m	u	m	u	m	u	m	
D283	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	0,5
EVSA-T	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	0,67
HL60	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	0,5
MCF-7 BB	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	0,33
MCF-7 BUS	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	0,33
MCF-7 GS	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	0,33
MDA-MB-231	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	0,83
RT112	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	0,83
Sultan	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	0,83
T47D B8	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	0,33

u: (unmethylated) no metilado en el promotor
m: metilado en el promotor

El objetivo de utilizar líneas celulares tumorales establecidas es disponer de un patrón de control positivo o negativo de los genes que se analizan en esta memoria de tesis doctoral. De acuerdo con estos datos, la metilación de promotores en genes de células procedentes de cáncer humano es un fenómeno frecuente pero altamente variable de una línea celular a otra. Los valores numéricos correspondientes al IM, parámetro semicuantitativo arbitrario pero razonable, que se resumen en la tabla 4.14 oscilan entre los valores máximo de 0,83 (para las líneas celulares MDA-MB-231 y Sultan) y mínimo de 0,33 para las líneas MCF-7 y T47D B8).

4.3.2.- Sensibilidad del ensayo MSP

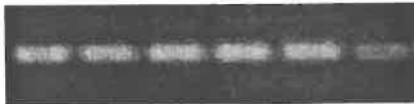
Cuando el ensayo MSP se realizó con ADN procedente de líneas celulares establecidas, de biopsias de tumor, de biopsias de tejido vesical o de linfocitos, era fácil poder partir de 1-2 μg que es la concentración óptima para la modificación bisulfítica del mismo. La

Figura 4.2.-: Resultado de MSP con distintas concentraciones de:

1. ADN de linfocitos para $p16^{INK4a}$ no metilado en su promotor.
2. ADN de la línea celular HS-Sultan para $p16^{INK4a}$ metilado en su promotor

MSP: p16 partiendo de ADN de linfocitos

1.0 0.50 0.25 0.10 0.05 0.02 µg



MSP: m-p16 partiendo de ADN de HS-Sultan

1.0 0.50 0.25 0.10 0.05 0.02 µg



figura 4.2 muestra el resultado obtenido al determinar la presencia del promotor de $p16^{INK4a}$ no metilado (en linfocitos) y metilado (en la línea celular HS-Sultan) en disoluciones de ADN de distinta concentración de partida. Sin embargo, la concentración de ADN de partida era mucho menor en el caso de las muestras de suero, tanto en el grupo control como en el grupo de enfermos. En la figura 4.3 se muestra el resultado obtenido al determinar la presencia del promotor de $p16^{INK4a}$ no metilado partiendo de distintos volúmenes de ADN, y por tanto, con distinta concentración de partida.

Los resultados que las imágenes fotográficas tomadas por transiluminación de los geles, demuestran con claridad la capacidad del procedimiento de PCR específica de metilación para detectar cantidades mínimas del promotor de $p16^{INK4a}$ tanto en su forma normal como en la hipermetilada. En efecto, en ambas situaciones niveles del orden de 0.02 µg/mL se ponen de manifiesto con toda facilidad. Esto garantiza que, la existencia en el suero de los pacientes de cantidades de ese orden de magnitud, permitirá su detección analítica. Así, la macromolécula elegida, el promotor de $p16^{INK4a}$, para la realización de esta investigación cumple el primer requisito que cabría ser exigido a un marcador tumoral. Existe un test para detectarlo y el procedimiento permite la identificación precisa de cantidades mínimas de la sustancia siendo su sensibilidad analítica del orden de la décima del microgramo.

Figura 4.3.-: Resultado de MSP con distintos volúmenes de ADN de origen sérico para p16 no metilado en su promotor

MSP: ADN de suero de un Control

100 50 25 10 µL ADN

p16 m-p16 p16 m-p16 p16 m-p16 p16 m-p16



4.3.3.- Determinación del estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en el suero de enfermos afectos de cáncer vesical

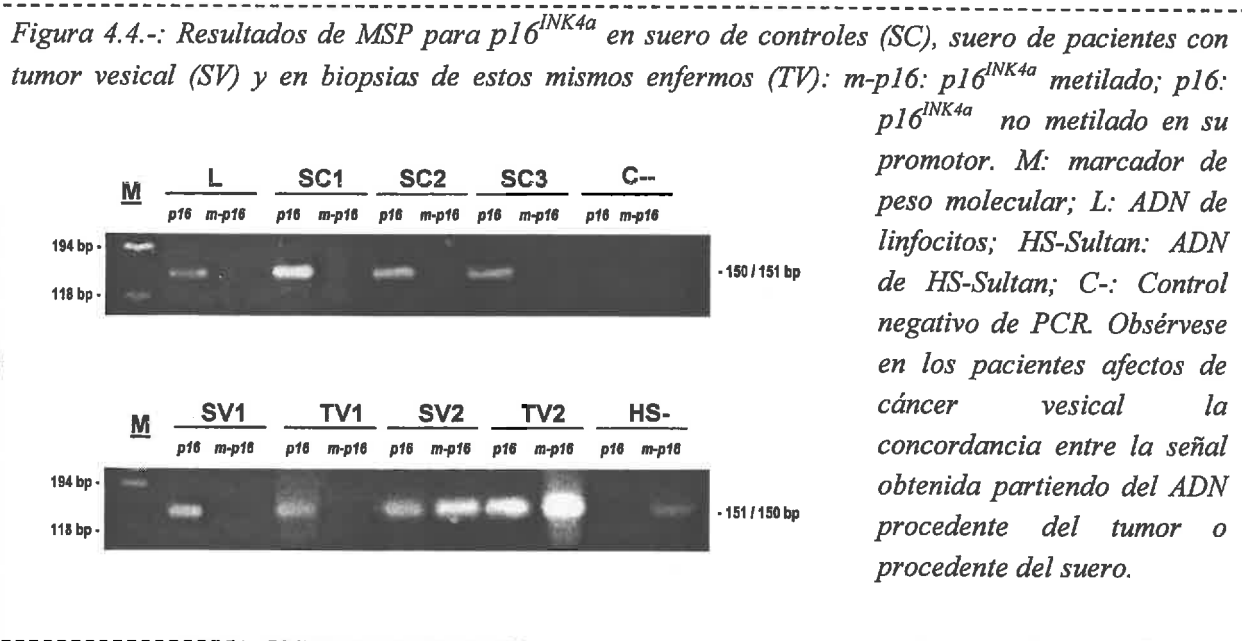
Para realizar esta parte del trabajo experimental se ha dispuesto de 137 muestras de sueros de 137 pacientes con diagnóstico de cáncer vesical presente en el momento de la toma de la muestra. En la tabla 4.15. se clasifican los 137 pacientes en función de las características anatomopatológicas del tumor vesical una vez efectuado el diagnóstico anatomopatológico.

La figura 4.4 muestra el resultado de la determinación de $p16^{INK4a}$ partiendo de ADN de suero de controles y de sueros y biopsias tumorales de pacientes afectos de cáncer vesical.

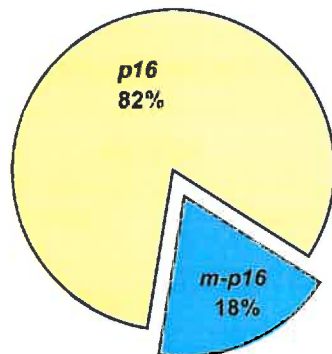
Tabla 4.15.-: Grado histológico y estadio de 137 tumores de pacientes con cáncer vesical

Grado	T		N		M		Invasión vascular		Multifocalidad		JSM		Tipo	
	I	II	I	II	I	II	No	Sí	No	Sí	A	B	CCT	CCE
I	32	1	87								A	87	CCT	126
II	64	2	36	0	106	0	120	No	86	No	57	B	35	CCE
III	35	3	7	1-2	7	1-2	10	Sí	41	Sí	73	C	4	CA
IV	1	4	2	x	24	x	7	x	10	x	7	D	6	AC
x	5	x	5									x	5	x

T, N, M: Clasificación Tumor-Nódulos linfáticos-Metástasis; JSM: Sistema de estadiaje tumoral de Jewet Strong Marshall. CCT: carcinoma de células transicionales; CCE: carcinoma de células escamosas. CA: Carcinoma anaplásico de células pequeñas. AC: Adenocarcinoma. x: no especificado



Gráfica 4.27.-: Proporción de sueros de pacientes con metilación de p16



Cuando se determinó el estatus de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en el suero de los pacientes con cáncer vesical, se encontró metilado en 25 de 137 sueros analizados. Esto constituye un 18,3%. Sin embargo, el alelo no metilado se detectó en el 100% de las muestras, lo cual es un resultado lógico puesto que la existencia de la forma no metilada en el suero de los pacientes, debe considerarse como un producto procedente de los procesos de renovación celular normales y de la lisis de células que tales procesos conllevan. (Gráfica 4.27).

El siguiente paso fue analizar la posible asociación entre la inactivación de este gen por metilación, su presencia en el suero de los pacientes con cáncer, y las características del grupo de estudio.

4.3.3.a.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y edad

En la tabla 4.16 se clasifican a los pacientes en función del estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$, edad y sexo. Del análisis de la tabla se deduce con toda facilidad la ausencia de relación entre el estado de metilación del promotor y la edad del paciente. Que la metilación aberrante de ciertos genes, presentes en tejidos epiteliales, ocurre de manera espontánea con el envejecimiento de las personas, es un dato que conviene tener en cuenta y que ha sido demostrado por distintos autores (Habuchi y cols, 2001). Este fenómeno, al menos en la serie de pacientes recogida en este trabajo, carece de relevancia en cáncer vesical,

Tabla 4.16.-: $p16^{INK4a}$: Distribución de los casos en función de la edad y el sexo

No metilado		Metilado	
<u>SEXO:</u> Hombres: 90 Mujeres: 22 Relación: 4:1	<u>EDAD:</u> Media: 69,3 ± 12,7 Moda 74,0 Mínimo: 29,0 Máximo: 92,0	<u>SEXO:</u> Hombres: 22 Mujeres: 3 Relación: 7:1	<u>EDAD:</u> Media: 69,9 ± 8,9 Moda: 74,0 Mínimo: 47,0 Máximo: 83,0
112		25	
137			

4.3.3.b.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y tabaquismo

En la tabla 4.17 se clasifican a los pacientes en función del estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ y el hábito tabáquico.

Tabla 4.17.-: $p16^{INK4a}$: Distribución de los casos en función del tabaquismo			
<i>No metilado</i>		<i>Metilado</i>	
<u>No fumadores:</u>	<u>Fumadores:</u>	<u>No fumadores:</u>	<u>Fumadores:</u>
38	74 38 exfumadores	10	15 9 exfumadores
112 (Relación No:Sí: 1:1,9)		25 (Relación No:Sí: 1:1,5)	
137			

El análisis de los datos anteriores, agrupándolos en una tabla de contingencia y aplicando el test exacto de Fisher revela que la metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en pacientes afectos de cáncer vesical es independiente del hábito de fumar ($P = 0,644$, diferencias no significativas).

4.3.3.c.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y características anatomopatológicas

4.3.3.c.1.- Tipo de tumor

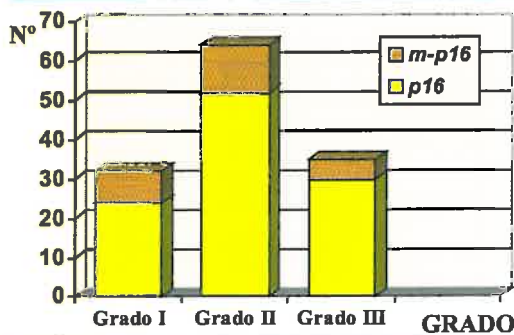
La metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en suero fue positiva en 25 casos:

- 24 tumores de urotelio.
- En un caso no se obtuvo dato correspondiente al tipo de tumor.

Del mismo modo la metilación no se detectó en los 112 casos restantes:

- 102 tumores de urotelio.
- 1 Adenocarcinoma bien diferenciado que afecta muscular.
- 1 Carcinoma anaplásico de células pequeñas afecta muscular neuroendocrino.
- 1 Carcinoma escamoso de alto grado con invasión muscular profunda. Próstata y vesículas seminales no afectas. Adenopatías negativas.
- En 7 tumores no se obtuvieron datos.

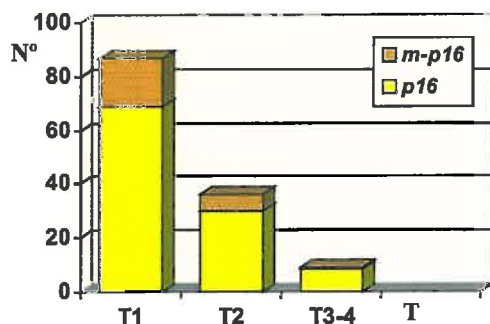
4.3.3.c.2.- Grado

Gráfica 4.28.-: Distribución de $m-p16^{INK4a}$ según el grado tumoral

La metilación de $p16^{INK4a}$ fue positiva en las muestras séricas en las muestras procedentes de 8 de los 32 pacientes que fueron clasificados como grado I (25,0%); en 12 de los 64 casos donde el diagnóstico fue de grado II (18,8%) y en 5 de los 35 en los que la situación fue valorada como grado III (14,3%). De 6 pacientes no se obtuvieron datos. La gráfica 4.28 muestra esta distribución.

De estos datos se deduce que la metilación del promotor de $p16^{INK4a}$, en el suero procedentes de pacientes con cáncer vesical, considerada aisladamente no está relacionada con el grado de diferenciación del tumor ($\chi^2 = 0,842$, 2 g.l.; $P = 0,656$).

4.3.3.c.3.- T

Gráfica 4.29.-: Distribución de $m-p16^{INK4a}$ sérica según el T tumoral

En 18 de los 87 pacientes que fueron catalogados como T₁ (20,7%), en 6 de los 36 T₂ (16,7%) y en 1 de los 9 cuyo tumor se clasificó como perteneciente a la clase T₃₋₄ (11,1%), se encontró el promotor del gen $p16^{INK4a}$ en su forma aberrantemente metilada (Gráfica 4.29). De 5 pacientes no se obtuvieron datos.

Los datos recogidos en la estratificación de los pacientes en función del grado de penetración tumoral y el estatus metilado/no-metilado del promotor de $p16^{INK4a}$ han sido analizados mediante el criterio χ^2 y de su estudio se puede deducir que entre ambos caracteres cualitativos no existe ningún tipo de relación que pueda describirse como estadísticamente significativa. ($\chi^2 = 0,818$, 2 g.l.; $P = 0,664$).

4.3.3.c.4.- N y M

Las tablas 4.18 y 4.19 muestran los resultados obtenidos al comparar el estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ con N y M respectivamente.

El análisis de los datos recogidos en las tablas 4.18 y 4.19 pone de manifiesto la ausencia de relación estadísticamente significativa entre la presencia de $p16^{INK4a}$ aberrante

metilado en el suero de pacientes afectos de cáncer vesical y la extensión de la enfermedad tanto a nivel locorregional como distal.

Los parámetros estadísticos son: $\chi^2 = 1,772$, 2 g.l., P = 0,411, para la invasión del tumor en los linfáticos locorregionales y $\chi^2 = 0,598$, 2 g.l., P = 0,742 para la presencia de metástasis distal.

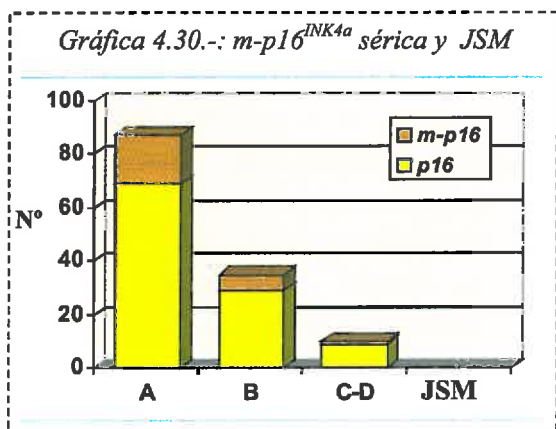
Tabla 4.18.-: m-p16^{INK4a} y N

	N _{m-p16} / N _{no m-p16}	%
0	21 / 85	19,8
1-2	0 / 7	0
X	4 / 20	20
Total	25 / 112	

Tabla 4.19.-: m-p16^{INK4a} y M

	M _{m-p16} / M _{no m-p16}	%
0	23/97	19,2
1-2	1/9	10
X	1/6	16,6
Total	25/112	

4.3.3.c.5.- Estadio JSM



La utilización de esta clasificación ha permitido identificar que 18 de los 87 pacientes pertenecientes al estadio A (20,7%) presentaron p16^{INK4a} metilado aberrantemente, en 6 de los 35 calificados como estadio B (17,1%) y en 1 de los 10 clasificados como C-D (10,0%) (Gráfica 4.30). De 5 pacientes no se obtuvieron datos.

El estudio de posible relación entre estatus del promotor de p16^{INK4a} y el estadio tumoral de acuerdo con la clasificación de

JSM ofreció los resultados siguientes: $\chi^2 = 0,324$; 2 g.l.; P = 0,858; que son demostrativos de la ausencia de relación estadística entre las variables cualitativas comparadas.

4.3.3.c.6.- Invasión vascular y Multicentricidad

Las tablas 4.20 y 4.21 muestran los resultados obtenidos al comparar el estado de metilación del promotor de p16^{INK4a} con la invasión vascular observada (IV) y la multifocalidad (Mf).

Estos resultados (tabla 4.20 y tabla 4.21) son sorprendentes. Resultaría lógico pensar que la invasión vascular favorecería la transferencia de ADN desde el tumor a la sangre de los pacientes y que, por ello, sería más probable su detección. El resultado estadístico parece descartar esta hipótesis, aunque debe tenerse en cuenta que estamos simplificando el problema

al estudiar exclusivamente el valor de $p16^{INK4a}$ en relación con el proceso tumoral, proceso que sin duda alguna es enormemente más complejo. Esta limitación de nuestro estudio podría explicar la negatividad del resultado.

	IV _{m-p16} / IV _{no m-p16}	%
NO	18 / 68	20,9
SI	6 / 35	14,6
X	1 / 9	11,1
Total	25 / 112	

	Mf _{m-p16} / Mf _{no m-p16}	%
NO	16 / 41	28,1
SI	8 / 65	11,0
X	1 / 6	-
Total	25 / 112	

En relación a la multicentricidad también parecería lógico formular una hipótesis de asociación entre tumor multicéntrico y presencia de metilación aberrante. La paradoja aquí es que el análisis estadístico de nuestros datos pone de manifiesto que es más frecuente la metilación de $p16^{INK4a}$ cuando el tumor es unifocal que cuando el tumor parece haberse originado simultáneamente en distintas localizaciones ($\chi^2 = 6,23$; 1 g.l.; $P = 0,0126$).

4.3.3.c.7.- Localización

A	Cuello vesical
B	Trígono
C	Fondo
D	Cúpula
E	Pared lateral derecha
F	Pared lateral izquierda
G	Uretra prostática
H	Uréter izquierdo
I	Uréter derecho
J	Perimeático izquierdo
K	Perimeático derecho

En la tabla 4.23 se describen las localizaciones de los tumores encontrados; para simplificar se han codificado en letras (Tabla 4.22).

Al analizar estos resultados se observa que en el grupo de los pacientes que presentaron metilación en $p16^{INK4a}$, la afectación era en la zona perimeática derecha (K); concretamente en 9 de 25 localizaciones (36%) siendo en 7 casos de localización única (78%).

Tabla 4.23.-: p16^{INK4a} y Localización del tumor

<i>Metilado</i>				<i>No metilado</i>
2 AB	2 AD	3 CD	4 F	1 A
3 ABCDE	1 ADJ	3 CDE	2 FJ	1 ABCDEF
1 ABCDK	4 AF	1 CDEF	2 FK	2 B
6 ABCE	1 AFC	1 CE	1 GH	1 BK
1 ABDE	1 AFHEI	1 CE	9 J	1 CDE
1 ABE	2 AJ	6 CEF	1 K	1 DE
1 ABEF	5 B	4 CF	2 desconocidos	1 DF
1 ABEFG	2 BCDF	1 CJ		1 E
1 ABFH	1 BCE	1 CK		1 EJ
1 ACD	1 BCEF	1 D		2 F
1 ACDE	1 BCF	1 DF		1 FJ
2 ACE	1 BD	9 E		1 IK
2 ACEF	1 BE	1 EF		2 J
2 ACEI	4 C	1 EJ		7 K
				2 Desconocidos

4.3.3.d.- Metilación en el promotor de p16^{INK4a} determinado en suero y parámetros analíticos en el momento del diagnóstico

Los valores no presentan apenas variación en lo que a ADN, proteínas y creatinina se refiere en ambos grupos (Tabla 4.24).

Tabla 4.24.-: p16^{INK4a} y Parámetros Analíticos

	<i>No metilado</i>		<i>Metilado</i>	
	<i>Media</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. Est.</i>
PROTEÍNAS	6,2	1,4	6,4	1,2
DNA	16,5	18,3	16,7	20,2
CREATININA	1,2	0,4	1,2	0,5

Presentar estos resultados de una manera conjunta tiene como objetivo esencial comprobar que las dos poblaciones de pacientes definidas por la presencia o la ausencia de metilación en el promotor del gen p16^{INK4a} son perfectamente iguales en el resto de los parámetros analíticos que de manera estándar se incluyen en el estudio analítico básico realizado en este trabajo.

4.3.3.e.-: Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en suero y síntomas urinarios en el momento del diagnóstico

Tampoco existen diferencias clínicas entre la sintomatología clínica que afecta a los pacientes cualquiera que sea el estado de metilación de $p16^{INK4a}$. Esto aparece resumido en la tabla 4.25. En ella se puede observar, como por otra parte es sobradamente conocido, que la forma típica de presentación clínica del cáncer vesical es la hematuria.

Tabla 4.25.-: $p16^{INK4a}$ y Síntomas Urinarios

	No metilado				Metilado			
	0	1	2-3	X	0	1	2-3	X
Hematuria	8	12	89	3	2	3	19	1
Polaquiuria	51	53	5	3	9	11	4	1
Nicturia	53	43	13	3	10	10	4	1
Urgencia	93	12	4	3	20	3	1	1
Disuria	96	12	1	3	20	2	2	1
Tenesmo Vesical	99	10	0	3	22	2	0	1
Incontinencia	97	6	0	9	23	0	1	1

4.4.- DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ EN LA PIEZA TUMORAL DE ENFERMOS AFECTOS DE CÁNCER VESICAL

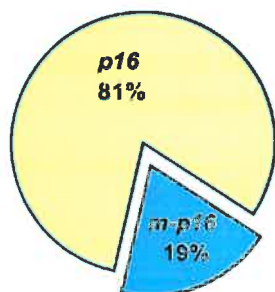
Para realizar esta parte de la memoria de tesis doctoral se dispuso de 83 biopsias de 83 pacientes con cáncer vesical. En la tabla 4.26 se clasifican estos pacientes en función de las características anatomopatológicas del tumor vesical en el momento del diagnóstico.

Tabla 4.26.-: Grado histológico y estadio de 83 tumores de pacientes con cáncer vesical

Grado		T		N		M		IV		Mf		JSM		Tipo	
I	16	1	51	0	61	0	73	No	51	No	39	A	51	CCT CA	82 1
II	39	2	25	1-2	5	1-2	6	Sí	32	Sí	43	B	25		
III	27	3	4	x	17	x	4			x	1	C	1		
IV	1	4	3									D	6		

T, N, M: Clasificación Tumor-Nódulos linfáticos-Metástasis; JSM: Sistema de estadiaje tumoral de Jewet Strong Marshall. CCT: carcinoma de células transicionales; CA: Carcinoma anaplásico de células pequeñas. x: no especificado.

Gráfica 4.31.-: Proporción de biopsias de pacientes con metilación de $p16^{INK4a}$



Cuando se determinó el estatus de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en las biopsias de los pacientes con cáncer vesical, se encontró metilado en 16 de las 83 biopsias analizadas. Esto constituye un 19,3% (Gráfica 4.31). Sin embargo, el alelo no metilado se detectó de nuevo en el 100% de las muestras. El siguiente paso fue analizar la posible asociación entre la inactivación de este gen por metilación en el tumor y las características anatomopatológicas del mismo.

4.4.1.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en tumor y características anatomopatológicas.

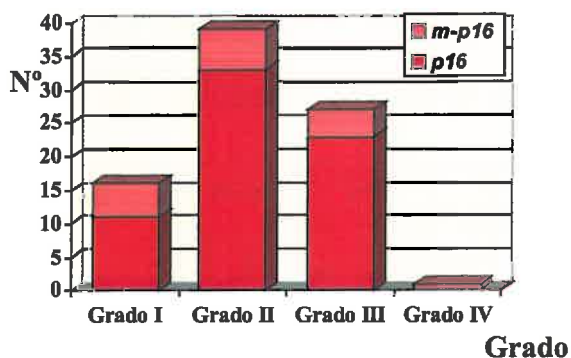
4.4.1.a.-Tipo de tumor

La metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en biopsia fue positiva en 16 tumores, todos ellos de extrínseco urotelial. En los 67 tumores restantes no se detectó la metilación siendo:

- 66 carcinomas de células transicionales.
- 1 carcinoma anaplásico de células pequeñas afecta muscular neuroendocrino.

4.4.1.b.- Grado

Gráfica 4.32.-: Distribución de $m-p16^{INK4a}$ según el grado tumoral



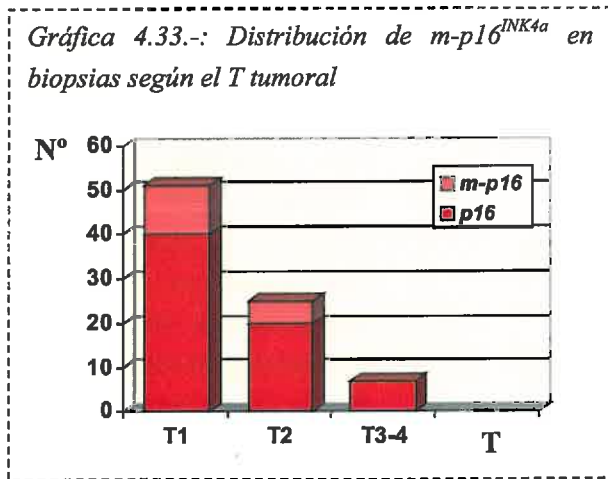
La metilación de $p16^{INK4a}$ fue positiva en la biopsia tumoral de 5 de 16 pacientes clasificados como grado I (31,3%); en 6 de los 39 con tumores grado II (15,4%), en 4 de los 27 en los que el grado de diferenciación fue catalogado como G III (14,8%) y en 1 de 1 grado IV (100%). La gráfica 4.32 muestra esta distribución.

El estudio estadístico de estas cifras permite realizar dos tipos de aproximaciones a la biología del cáncer

vesical: i) la metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ es un acontecimiento que debe ocurrir en las primeras etapas de la carcinogénesis, puesto que aparece metilado en los estados bien y moderadamente bien diferenciados. Los grados III y IV de diferenciación, quizás por el bajo

número de casos en ellos incluidos no presentan el promotor de $p16^{INK4a}$ aberrantemente metilado con mayor frecuencia que la que se ha encontrado en los casos de menor grado de diferenciación. Los valores de los estadísticos correspondientes a la tabla de contingencia que relaciona estas dos variables cualitativas son: $\chi^2 = 3,105$; 3 g.l.; $P = 0,376$, que indican la inexistencia de asociación o dependencia entre las variables aquí estudiadas.

4.4.1.c.- T (Gráfica 4.33)



En este apartado se resumen los resultados del estudio de asociación o independencia entre el grado de penetración del tumor en la pared vesical y la metilación de $p16^{INK4a}$ valorada en el espécimen tumoral. De acuerdo con los resultados del análisis, se ha podido observar metilación aberrante de $p16^{INK4a}$ en 11 de los 51 pacientes cuyo tumor fue T1 (21,6%), en 5 de los 25 T2 (20,0%) y en 0 de los 7 clasificados como T3-4 (0,0%).

Estos hallazgos obligan a descartar la hipótesis de que a mayor grado de infiltración tumoral, y mayor gravedad de la enfermedad, más frecuente debe ser la hipermetilación de $p16^{INK4a}$. Teniendo en cuenta los datos anteriores, el análisis de los mismos mediante una tabla de contingencia y aplicando el criterio de χ^2 , es posible demostrar que entre la penetración tumoral y el estado de metilación en $p16^{INK4a}$ en la muestra del tumor, $\chi^2 = 1,995$, 2 g.l., y $P = 0,369$; no existe ningún tipo de relación estadísticamente significativa.

4.4.1.d.- N y M

Las tablas 4.27 y 4.28 muestran los resultados obtenidos al comparar el estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en el espécimen tumoral con los indicadores de invasión nodal N y de metástasis distal, respectivamente.

Tabla 4.27.-: $m-p16^{INK4a}$ y N

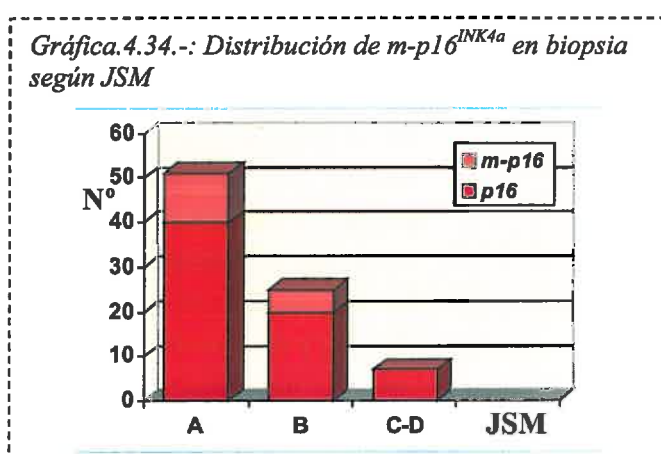
	N $m-p16$ / N $no\ m-p16$	%
0	12 / 49	21,1
1-2	0 / 5	0
X	4 / 13	30,7
Total	16 / 67	

Tabla 4.28.-: $m-p16^{INK4a}$ y M

	M $m-p16$ / M $no\ m-p16$	%
0	14 / 59	19,2
1-2	0 / 6	0
X	2 / 2	100
Total	16 / 67	

Procediendo de manera análoga a la descrita en el párrafo anterior, se observa que ni la progresión locorregional de la enfermedad estimada por la invasión de linfáticos, ni la extensión distal del cáncer vesical parecen guardar relación estadísticamente significativa con el estado de metilación de $p16^{INK4a}$. En efecto, los parámetros: $\chi^2 = 1,398$ (2 g.l.), $P = 0,497$; para la invasión de linfáticos y $\chi^2 = 3,860$, 2 g.l., $P = 0,145$ para la estratificación en función de la presencia de metástasis, son concluyentes al respecto.

4.4.1.d.- JSM



Los resultados resumidos en este apartado corroboran los expuestos con anterioridad y refuerzan la ausencia de relación, estadísticamente cierta, entre las características anatomopatológicas del tumor y el estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ valorado en la muestra tumoral. En efecto, la metilación aberrante de $p16^{INK4a}$ se ha encontrado en 11 de los 51 pacientes A (27,6%), en 5 de los 25

B (20,0%) y en ninguno de los 7 C-D (0,0%) (Gráfica 4.34).

Los valores de los estadísticos $\chi^2 = 1,811$ (2 g.l) y de $P = 0,404$, sugieren la independencia estadística entre el estadio de la enfermedad tumoral vesical estratificado mediante el criterio de JSM y el estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$.

4.4.1.e.- Invasión vascular y Multicentricidad

Las tablas 4.29 y 4.30 muestran los resultados obtenidos al comparar el estado de metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ con la invasión vascular observada (IV) y la multifocalidad (Mf).

	IV m-p16 / IV no m-p16	%
NO	11 / 40	21,6
SI	5 / 27	15,6
Total	16 / 67	

	Mf m-p16 / Mf no m-p16	%
NO	10 / 29	25,6
SI	5 / 38	11,6
Total	25 / 112	

Dos parámetros de probado interés en el estudio de los factores pronósticos del cáncer vesical son, sin lugar a dudas, los datos histológicos de invasión vascular y de multicentricidad. Las tablas 4.29 y 4.30 muestran la relación de dichos datos observables en la pieza tumoral con el estado de metilación del gen encontrado en el tumor. Del análisis de los mismos puede concluirse que ni la invasión vascular, $\chi^2 = 0,446$ (1 g.l), $P = 0,504$, ni la multicentricidad, $\chi^2 = 2,687$ (1 g.l), $P = 0,101$, se asocian significativamente con el estado de metilación de $p16^{INK4a}$ cuando éste se investiga como un fenómeno biológico aislado dentro de la pieza tumoral.

4.1.f.- Localización

Las localizaciones de los tumores se han simplificado en la tabla 4.31 habiéndose ceñido al código de letras anteriormente expuesto en la tabla 4.22.

De nuevo, resulta llamativo que en el grupo de los pacientes que presentaron $p16^{INK4a}$ metilado, la afectación en la zona perimeática derecha (K) también es frecuente, concretamente, $p16^{INK4a}$ estaba inactivado por metilación en 5 de 16 localizaciones (31%) siendo en 3 de los 5 casos de localización única (60%).

En el grupo de no metilados las localizaciones más habituales son, de mayor a menor: Pared lateral derecha, cuello, fondo, trígono y pared lateral izquierda (E, A, C, B y F) sin que ninguna de ellas destaque significativamente.

No metilado			Metilado	
2 AB	1 BCE	1 JAD	1 AF	
2 ABCDE	2 C	1 K	1 C	
4 ABCE	1 CDE	1 KBCDA	1 CD	
1 ABCEF	2 CE	1 BCF	1 CDE	
1 ABDE	2 CEF	1 Desconocido	1 DE	
1 ABE	2 CF		1 DF	
1 ABEF	1 D		2 E	
1 ABEFG	4 E		2 F	
1 ABFH	1 EB		1 IK	
1 ACD	1 EFBC		3 K	
2 ACE	3 F		1 KB	
1 ACEF	1 FE		1 Desconocido	
2 AD	1 FJ			
1 AE	1 FK			
2 AF	1 IE			
1 AK	1 IEAC			
4 B	6 J			
1 BCDF	2 JA			

4.4.2.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en tumor y parámetros analíticos en el momento del diagnóstico

Al igual que el apartado 4.3.3.d., no se encontró relación estadística alguna entre la presencia del gen inactivado por metilación y los valores analíticos en el momento del diagnóstico.

4.4.3.- Metilación en el promotor de $p16^{INK4a}$ determinado en tumor y síntomas urinarios en el momento del diagnóstico

Al igual que el apartado 4.3.3.e., no se encontró relación estadística alguna entre la presencia del gen inactivado por metilación y los síntomas urinarios que presentaba el enfermo en el momento del diagnóstico.

4.5.- RELACIÓN ENTRE EL ESTATUS DE METILACIÓN EN EL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ DETERMINADO EN SUERO Y EN EL TUMOR DE UN MISMO PACIENTE AFECTO DE CÁNCER VESICAL

Con el fin de buscar un significado clínico a la presencia en el tumor y, en ocasiones, en la sangre periférica de pacientes afectados de cáncer vesical, del gen $p16^{INK4a}$ aberrantemente metilado en su región promotora, se ha sometido a comparación los resultados obtenidos en los dos tipos de muestras analizadas cuando ambas pertenecen al mismo paciente. En este caso se dispuso de 69 sueros y 69 biopsias tumorales correspondientes a 69 enfermos. En la Tabla 4.32 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.32.-: Correlación entre la metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ en el tumor y el suero de 69 enfermos de cáncer vesical

		Tumor	
		$p16$	$m-p16$
Suero	$p16$	69	5
	$m-p16$	0	11
		69	16

$m-p16$: $p16^{INK4a}$ metilado

$p16$: $p16^{INK4a}$ no metilado

Test de Fisher de dos colas: $p < 0,0001$

En las 69 biopsias se obtuvo la señal del promotor no metilado y en 16 de las 69 muestras estudiadas se encontró, además, la señal del promotor de $p16^{INK4a}$ aberrantemente metilado. En las 69 muestras séricas se detectó el alelo no metilado y, además, en 11 de ellas se detectó también la presencia del promotor metilado. El promotor metilado de $p16^{INK4a}$ nunca se detectó en el suero si no se detectó también en el tumor y en 5 casos se detectó en tumor pero no en la muestra sérica. Estos podrían ser considerados falsos negativos. Las características de los pacientes en los que se observó esta anomalía se resumen en la Tabla 4.33.

Tabla 4.33.-: Características anatomopatológicas de los pacientes con m- $p16^{INK4a}$ en el tumor pero no detectable en suero.

Grado	T	N	M	JSM	IV	Mf	Localización	Tipo
1	1	0	0	A	No	Si	AF	U.P. afecta corion
2	1	0	0	A	No	No	E	U. afecta corion
2	1	0	0	A	No	No	F	U.P superficial
2	1	0	0	A	No	No	C	U.P. afecta corion
4	2B	-	-	B2	SI	NO	CD	U.P. afecta muscular

Al revisar los parámetros analíticos, urinarios y anatomopatológicos correspondientes a estos cinco pacientes, no se encontró ningún dato especial que explicara el por qué el alelo metilado no se detecta en suero y sí en el tumor.

En resumen, en 64 de los 69 pacientes se obtuvo el mismo resultado tanto al analizar la biopsia tumoral como la muestra sérica. Por ello, esta alteración epigenética del tumor puede evaluarse en el suero al menos en el 70% de los casos. Además, la presencia de $p16^{INK4a}$ hipermetilado en el suero de los pacientes afectados de cáncer puede relacionarse con el diagnóstico de cáncer vesical, ya que al aplicar el test de Fisher se encuentra una fuerte asociación estadística ($p < 0,0001$) entre la señal detectada en el suero y en la biopsia tumoral (Tabla 4.32).

4.6.- DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE $p16^{INK4a}$ EN EL SUERO Y BIOPSIAS DE VEJIGA DE LOS CONTROLES

Para realizar esta parte del trabajo se dispuso de 31 muestras de suero procedentes de personas sanas y de 14 muestras de 13 personas afectas de patología urinaria benigna. Este conjunto de muestras constituye el Grupo Control. También se analizó el estado de metilación de $p16^{INK4a}$ en dos muestras tisulares procedentes de dos biopsias de vejiga tomadas por causa benigna. Las características clínicas de este grupo pueden consultarse en el apartado 4.2.

- En todas las muestras de suero, las 45, se detectó la presencia del promotor de $p16^{INK4a}$ no metilado.
- En ninguno de los 31 controles sanos se amplificó el promotor de $p16^{INK4a}$ hipermetilado.
- Sorprendentemente, se amplificó el promotor metilado en uno de los pacientes afectados de enfermedad urinaria no tumoral. Este paciente fue diagnosticado de cistitis glandular con moderados fenómenos proliferativos. En este caso en particular, la metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ se detectó también en la biopsia obtenida.

4.6.1.- Utilidad como marcador tumoral sérico del promotor de $p16^{INK4a}$ en el diagnóstico de los pacientes afectados de cáncer vesical

Comparando la presencia de $p16^{INK4a}$ metilado en su promotor en el suero de los pacientes de cáncer vesical y en los controles, se puede calcular la fuerza de esta asociación (P) y la odds ratio además del valor predictivo positivo, la sensibilidad y la especificidad del promotor de $p16^{INK4a}$ aberrantemente metilado. Estos parámetros referentes al ensayo tienen enorme importancia en la valoración de esta sustancia como posible marcador tumoral. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.34.

Tabla 4.34-: m- $p16^{INK4a}$ en suero: pacientes afectados cáncer vesical vs. controles

		Pacientes	Controles*	
m-p16	Sí	25	1	26
	No	112	44	156
		137	45	182

m-p16: $p16^{INK4a}$ metilado

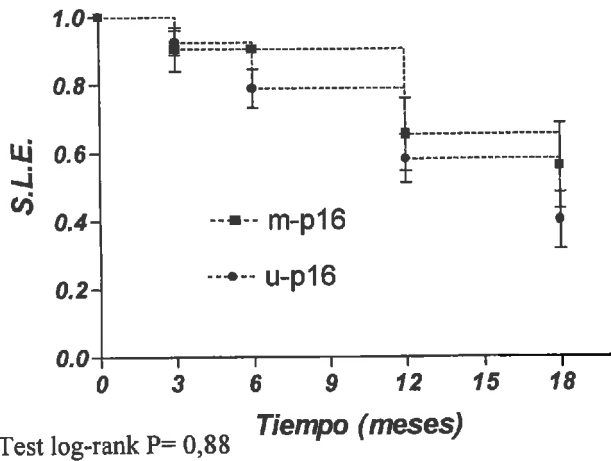
* El grupo control se constituye por 31 pacientes sanos y 13 con patología urológica benigna

- Test de Fisher: $p = 0,006$
- Odds Ratio = 9,821 (intervalo de confianza: 1,29 – 74,74).
- Sensibilidad: 0,18
- Especificidad: 0,98
- Valor predictivo positivo: 0,96

Estos resultados sugieren la posible utilidad de la detección sérica del promotor de $p16^{INK4a}$ como marcador tumoral para el diagnóstico del cáncer vesical.

4.6.2.- Utilidad como marcador tumoral sérico del promotor de $p16^{INK4a}$ en el seguimiento de los pacientes afectos de cáncer vesical.

Gráfica 4.35.-: Influencia de la metilación del promotor $p16^{INK4a}$ sérica sobre la probabilidad de S.L.E en cáncer vesical



Al comparar los valores obtenidos de las curvas de supervivencia libre de enfermedad a los 18 meses para $p16^{INK4a}$ sérica, se aprecia que la metilación aberrante de $p16^{INK4a}$ sérica no predice la evolución de la enfermedad, al menos en lo que a la S.L.E se refiere (Gráfica 4.35). La comparación entre curvas mediante el test log-rank muestra una $\chi^2 = 0,02$ (1 g.l) con una $P = 0,88$ lo que prueba la ausencia de diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.35.-: Promotor de $p16^{INK4a}$ no metilado y recidivas

Paciente	Enfermedad	
	Recidiva	Exitus
19	Recidiva	18 meses
20	Recidiva	3 meses
24	Recidiva	18 meses
39	Recidiva	12 meses. Exitus 18 meses
44	Recidiva	1 mes. Exitus 12 meses.
45	Recidiva	6 meses. Exitus 12 meses.
60	Recidiva	6 meses
90	Recidiva	12 meses
93	Recidiva	6 y 12 meses
96	Recidiva	6 y 12 meses
97	Recidiva	1, 2, 3 y 6 meses. Exitus.
112	Recidiva	6 meses
123	Recidiva	3 meses
139	Recidiva	10 meses
152	Recidiva	4 meses. Exitus.
165	Recidiva	12 meses
172	Recidiva	6 meses
185	Recidiva	6 meses

Tal y como se expresó en el apartado de "Material y Métodos", un total de 65 pacientes de los 141 que componen dicho grupo (46%), han tenido más de una muestra de suero a lo largo del tiempo de estudio. De hecho, existe un total de 41 pacientes que no dieron positivo a metilación de $p16^{INK4a}$ de los que, en su seguimiento clínico a lo largo de 18 meses, 18 de ellos recidivaron y 23 estuvieron libres de enfermedad durante dicho seguimiento. Las tablas 4.35 y 4.36 muestran la disposición de los mismos.

Tabla 4.36.-:Promotor de $p16^{INK4a}$ no metilado y libre de tumor

Paciente	Enfermedad	
3	Libre	18 meses
6	Libre	18 meses
10	Libre	18 meses
28	Libre	12 meses
36	Libre	18 meses
59	Libre	18 meses
64	Libre	18 meses
72	Libre	18 meses
89	Libre	18 meses
114	Libre	18 meses
169	Libre	18 meses
170	Libre	18 meses
175	Libre	12 meses
177	Libre	18 meses
183	Libre	12 meses
195	Libre	12 meses
203	Libre	12 meses
205	Libre	12 meses
207	Libre	12 meses
213	Libre	12 meses
221	Libre	12 meses
251	Libre	6 meses
278	Libre	3 meses

Por otra parte, en 22 de los pacientes en los que se detectó metilado el promotor de $p16^{INK4a}$ en el suero, se obtuvieron muestras adicionales que se hicieron coincidir con las revisiones habituales de estos pacientes que permiten el seguimiento de su enfermedad a lo largo del tiempo. El estado de los pacientes se repartió por igual, 11 libres de enfermedad y otros 11 en situación de recidiva tumoral durante ese periodo de seguimiento que se muestra en la tabla 4.37.

Tabla 4.37.-: Metilación del promotor de $p16^{INK4a}$ y evolución

<i>Paciente</i>	<i>Enfermedad</i>	
7	Libre	18 meses
13	Recidiva	12 meses
27	Libre	18 meses
30	Recidiva	18 meses
37	Libre	18 meses
58	Libre	18 meses
63	Libre	12 meses
68	Libre	18 meses
71	Libre	18 meses
74	Recidiva	12 meses (18 m. seguimiento.)
75	Recidiva	6 meses (12 m. éxitus)
88	Recidiva	8 meses
94	Recidiva	18 meses
103	Libre	12 meses
104	Recidiva	18 meses
111	Recidiva	3 meses
115	Libre	12 meses
119	Recidiva	3 y 9 meses
127	Recidiva	12 meses
138	Recidiva	3 meses
201	Libre	12 meses
226	Libre	9 meses
Total: 11 libres de enfermedad y 11 recidivas		

4.7. PERFIL EPIGENÉTICO DE LA PATOLOGÍA VESICAL TUMORAL

Los resultados recogidos en apartados anteriores, la lectura de los trabajos científicos que, en relación con este tema han ido apareciendo durante este tiempo, y su estudio a lo largo del tiempo de realización de este trabajo, pusieron de manifiesto las posibilidades de diagnóstico que se abrían con el estudio de los genes hipermetilados tanto en el tumor, como en el suero de los pacientes afectados de cáncer vesical; también ayudaron a entender las limitaciones del proyecto inicial. En efecto, los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo nos llevaron a plantear la segunda hipótesis del mismo y que aquí repetimos: *“El estudio del estado de metilación de genes importantes en biología tumoral debe permitir la definición del perfil epigenético característico del cáncer vesical y este conocimiento puede*

posibilitar el diagnóstico precoz del proceso neoplásico y aportar nuevos datos capaces de orientar la terapéutica”.

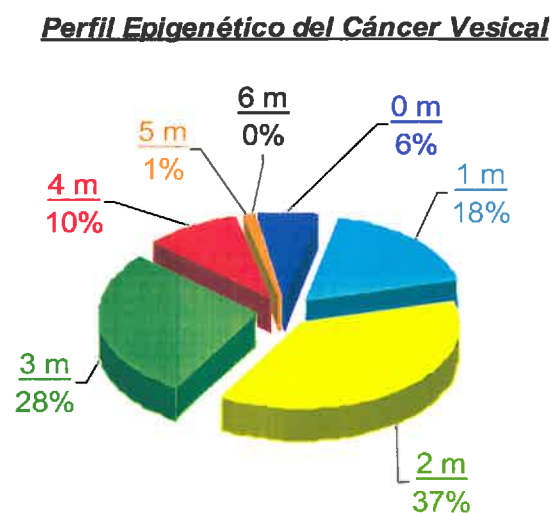
Para avanzar en la constatación experimental de esta hipótesis se decidió investigar en el tumor el estado de metilación de los promotores de otros cinco genes: *hMLH1*, *σ 14-3-3*, *RAR β*, *ciclina D2* y *Twist*, para lo que se dispuso de 113 biopsias tumorales de pacientes afectos de cáncer vesical, recogidas tras el consentimiento informado de los pacientes durante el tiempo de realización de este estudio. También dispusimos de las 2 biopsias de sujetos afectos de enfermedad urinaria benigna.

4.7.1. Perfil epigenético del cáncer vesical

El 93,81% de los tumores de los 113 analizados presentaron al menos metilado uno de los seis genes incluidos en este estudio (*gráfica 4.36*). Así:

- 7 no presentó ningún gen hipermetilado (6,19%)
- 20 sólo un promotor metilado (17,7%)
- 42, dos alelos metilados de distintos genes (37,17%)
- 32, tres (28,32%)
- 11 fueron positivos para cuatro (9,73%)
- 1 sólo para cinco (0,88%)
- Ninguno presentó metilado los seis promotores analizados.

Gráfica 4.36.-: Distribución de los tumores vesicales en función del número de genes metilados en su promotor



Para determinar la tasa total de metilación en muestras individuales, se calculó el índice de metilación (IM) para cada uno de ellos (Tabla 4.38).

Tabla 4.38.-: Índice de Metilación en Tumores Vesicales

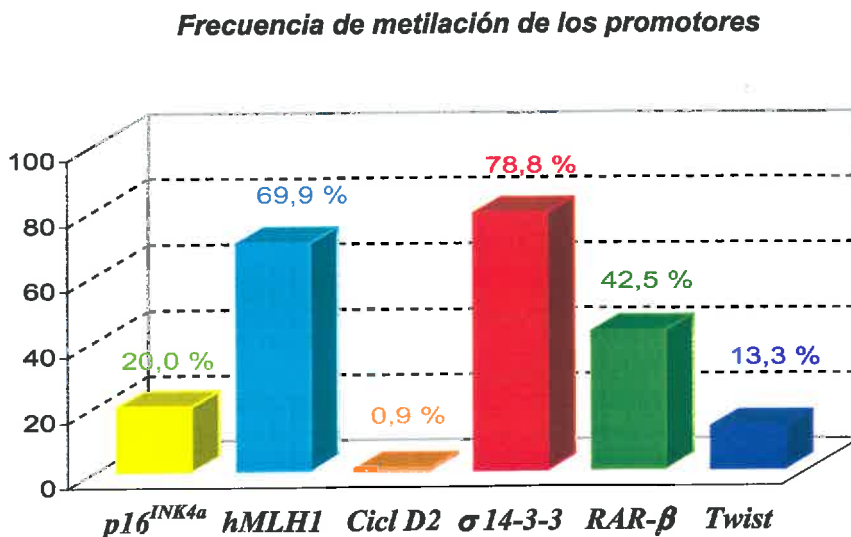
		<i>IM = N° metilaciones / N° genes determinados</i>									
		0,00	0,17	0,20	0,33	0,40	0,50	0,60	0,67	0,80	0,83
N° tumores		7	13	7	24	18	23	9	9	2	1
%		6,19	11,50	6,19	21,24	15,93	20,35	7,96	7,96	1,77	0,88

Tumores con un alto IM podrían tener una patogénesis diferente a aquellos con bajo IM. Así, pacientes cuyos tumores se caracterizan por presentar genes inactivados por metilación podrían ser candidatos a protocolos clínicos con antitumorales que bloqueen la metilación.

4.7.2.- Frecuencia de metilación de los promotores evaluados en los tumores de cáncer vesical

El gen que con mayor frecuencia se encontró metilado en su promotor fue el σ 14-3-3 (78,8 %) seguido de *hMLH1* (69,9 %), *RAR- β* (42,5 %), *p16^{INK4a}* (20,0 %), *Twist* (13,3 %), mientras que el promotor de *ciclina D2* sólo se encontró metilado en una de las muestras de tumor analizadas. La gráfica 4.37 muestra la frecuencia de metilación de cada promotor

Gráfica 4.37.-: Frecuencia de metilación de los promotores de *p16^{INK4a}*, *hMLH1*, *ciclina D2*, σ 14-3-3, *RAR- β* y *Twist* evaluados en los tumores de cáncer vesical



Las combinaciones más usuales encontradas de genes inactivados por metilación en su promotor se muestran en la Tabla 4.39:

Tabla 4.39.-: Combinación de promotores inactivados por metilación en 113 tumores vesicales analizados

	Nº Tumores	%
$\sigma 14-3-3 + hMLH1$	27	25,47
$\sigma 14-3-3 + hMLH1 + RAR \beta$	23	21,70
$\sigma 14-3-3$	13	12,26
$\sigma 14-3-3 + hMLH1 + RAR \beta + p16^{INK4a}$	7	6,60
$hMLH1 + RAR \beta$	5	4,72
$hMLH1$	5	4,72
$\sigma 14-3-3 + RAR \beta$	4	3,77
$\sigma 14-3-3 + hMLH1 + RAR \beta + Twist$	3	2,83
$\sigma 14-3-3 + hMLH1 + p16^{INK4a}$	2	1,89
$\sigma 14-3-3 + hMLH1 + Twist$	2	1,89
$\sigma 14-3-3 + RAR \beta + Twist$	2	1,89
$\sigma 14-3-3 + p16^{INK4a}$	2	1,89
$p16^{INK4a}$	2	1,89
$\sigma 14-3-3 + hMLH1 + RAR \beta + Twist + ciclina D2$	1	0,94
$\sigma 14-3-3 + hMLH1 + p16^{INK4a} + Twist$	1	0,94
$\sigma 14-3-3 + RAR \beta + p16^{INK4a}$	1	0,94
$hMLH1 + RAR \beta + Twist$	1	0,94
$hMLH1 + p16^{INK4a} + Twist$	1	0,94
$\sigma 14-3-3 + Twist$	1	0,94
$hMLH1 + Twist$	1	0,94
$p16^{INK4a} + Twist$	1	0,94
$RAR \beta$	1	0,94
<i>Ninguno</i>	7	6,6
Total	113	100

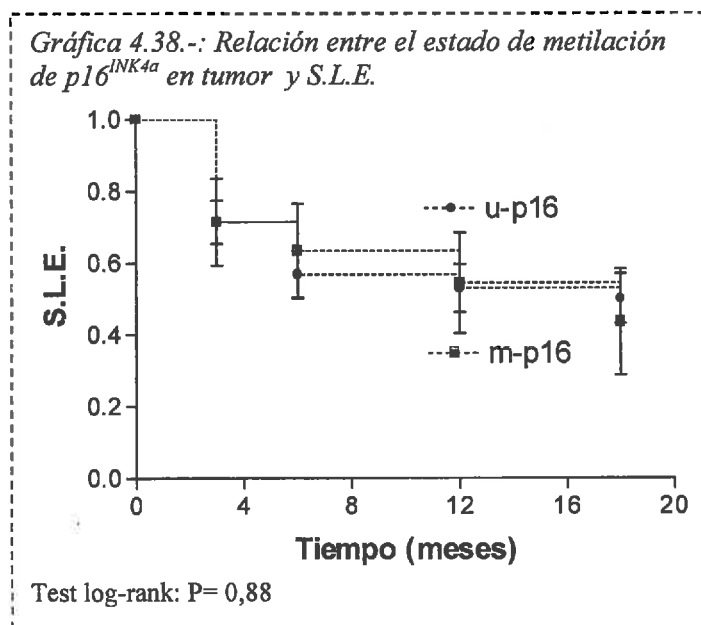
4.7.3.- Asociación entre patrón de metilación y parámetros anatomopatológicos

Entre el índice de metilación y las categorías T y G no existe dependencia. En efecto, comparando la variable cualitativa que define la profundidad de la invasión del tumor en la pared vesical T (T₁ a T₃) con el valor de IM (IM ≤ 0,5, IM > 0,5) se obtiene un valor de $\chi^2 = 0,528$; 2 g.l.; P = 0,77. El mismo tipo de análisis efectuado entre el grado de diferenciación (GI a GIII) y el índice de metilación demuestra también la independencia de ambas variables ($\chi^2 = 1,327$, 2 g.l., P = 0,52).

4.7.4.- Asociación entre genes metilados en tumor y recidiva

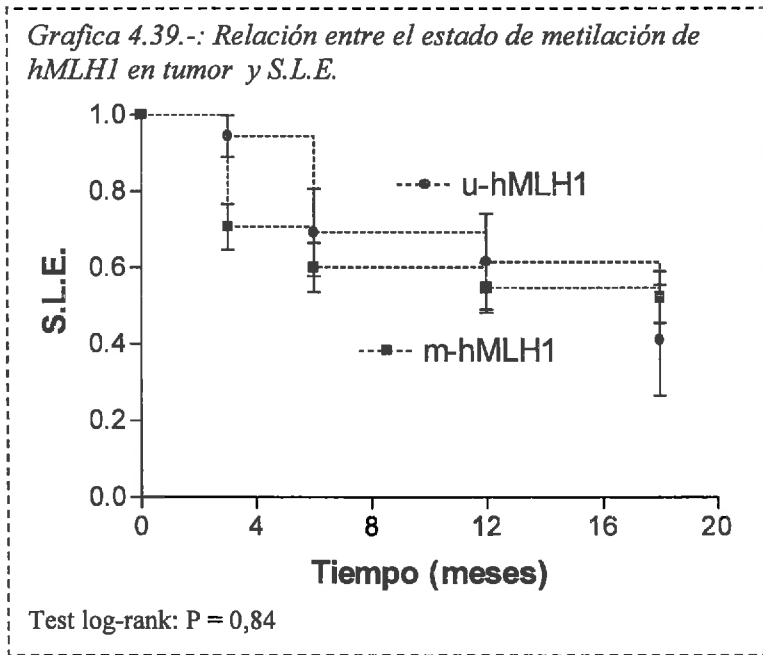
En este apartado hemos realizado el análisis univariante de la influencia de cada uno de los genes metilados sobre la supervivencia libre de enfermedad (riesgo de recidiva) a los 18 meses de iniciar el estudio. Para ello se dispuso de 80 muestras que pertenecían a tumor vesical diagnosticado anatomopatológicamente. Se ha comprobado el escaso valor discriminativo del gen *Ciclina D-2* (La escasez de valores positivos ha llevado a no realizar siquiera el estudio estadístico) y una tendencia a la recidiva en todos los genes metilados estudiados salvo el ya mencionado y que es mayor en los genes *RAR-β* y *σ14-3-3* aunque ningún test estadístico ha sido positivo.

4.7.4.a.- *p16^{INK4a}* y probabilidad de recidiva



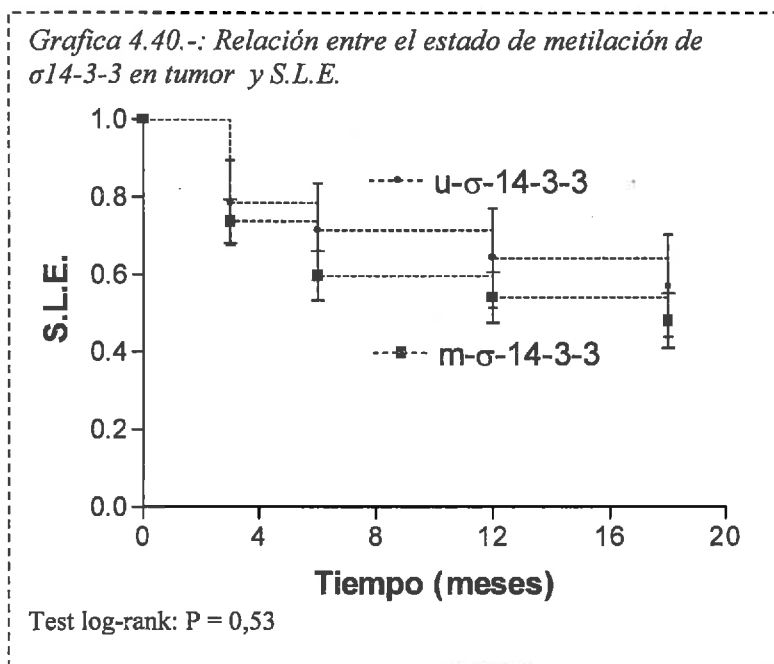
Al evaluar la relación entre metilación de *p16^{INK4a}* en biopsia tumoral y el riesgo de recidiva mediante construcción de curvas de Kaplan-Meier y comparación de dichas curvas mediante el estadístico χ^2 aplicando el test de log-rank, se aprecia una $\chi^2 = 0,02$ (1 g.l) y una P = 0,88 no significativa por lo que no se encuentra dependencia entre ambas variables (Gráfica 4.38).

4.7.4.b.- hMLH1 y probabilidad de recidiva



Al estudiar la relación existente entre metilación de hMLH1 en biopsia tumoral y la probabilidad de recidiva mediante construcción de curvas de Kaplan-Meier y comparación de dichas curvas mediante el estadístico χ^2 aplicando el test de log-rank, se aprecia una $\chi^2 = 0,04$ (1 g.l) y una P = 0,84 que no es significativa por lo que no encontramos dependencia entre ambas variables (Gráfica 4.39).

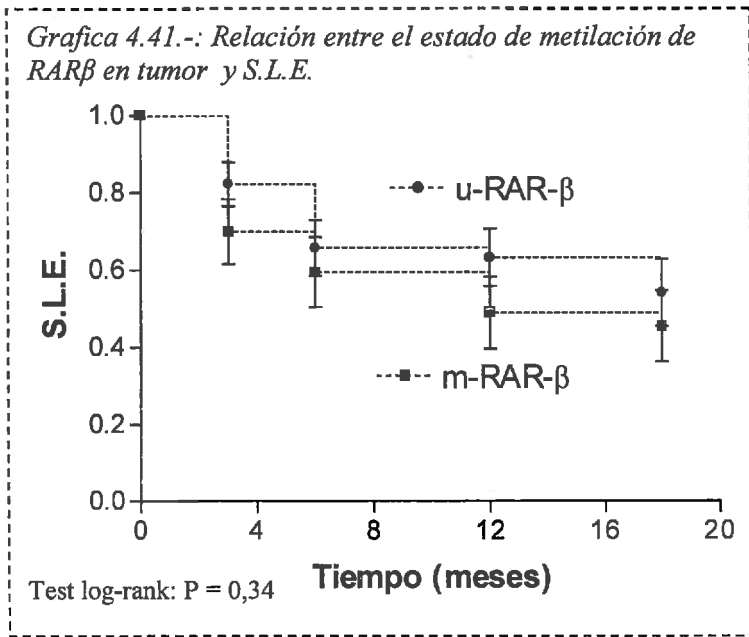
4.7.4.c.- $\sigma 14-3-3$ y probabilidad de recidiva



Al estudiar la relación existente entre metilación de $\sigma 14-3-3$ en biopsia tumoral y la probabilidad de recidiva mediante construcción de curvas de Kaplan-Meier y comparación de dichas curvas mediante el estadístico χ^2 aplicando el test de log-rank, se aprecia una $\chi^2 = 0,396$ (1 g.l) y P = 0,53 que no es significativa y, por lo tanto, sin dependencia entre ambas variables (Gráfica 4.40).

En este caso la tendencia a la significación resulta más acentuada e intuitiva, pues el $57\% \pm 0,13$ de los pacientes no metilados están sin recidiva a los 18 meses frente al $48\% \pm 0,07$ de los metilados. Posiblemente un mayor número de casos podría llevar a valores de significación estadística.

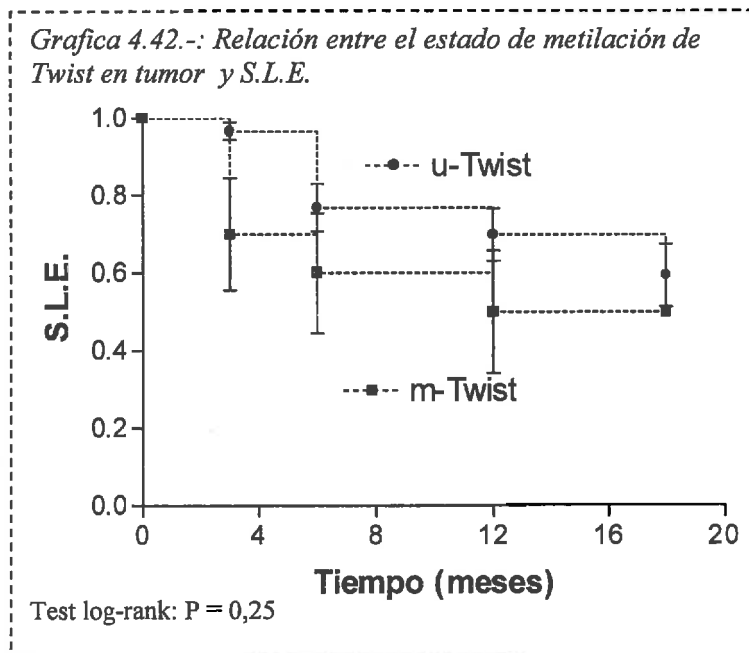
4.7.4.d.- RAR-β y probabilidad de recidiva



Al estudiar la relación existente entre metilación de RARβ en biopsia tumoral y la probabilidad de recidiva mediante construcción de curvas de Kaplan-Meier y comparación de dichas curvas mediante el estadístico χ^2 aplicando el test de log-rank, se obtiene $\chi^2 = 0,918$ (1 g.l) y una P = 0,34. que no es significativa por lo que no se encuentra dependencia entre las variables (Gráfica 4.41).

Como en el caso anterior, la tendencia a la significación resulta más acentuada e intuitiva y posiblemente un mayor número de casos podría llevarnos a valores de significación estadística.

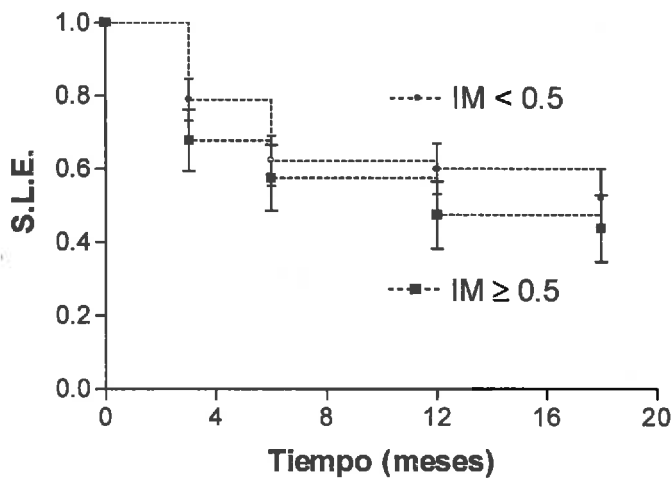
4.7.4.e.- Twist y probabilidad de recidiva



Por último, al estudiar la relación existente entre metilación de Twist en el tumor y la probabilidad de recidiva mediante la construcción de curvas de Kaplan-Meier (Gráfica 4.42) y su comparación mediante el estadístico χ^2 aplicando el test de log-rank, se aprecia una $\chi^2 = 1,32$ (1 g.l) y una P = 0,25 que no es significativa por lo que no se encuentra dependencia entre ambas variables.

4.7.5.- Asociación entre índice de metilación (IM) y probabilidad de recidiva

Gráfica 4.43.-: Influencia del índice de metilación sobre la probabilidad de S.L.E a los 18 meses en cáncer vesical



Test log-rank $P=0,364$

Si al analizar la relación entre $p16^{INK4a}$ aberrante metilado sérico y el riesgo de recidiva en 18 meses (S.L.E) no existía ninguna relación estadística, al efectuar el estudio de comparación de las curvas de supervivencia con el IM de tres o más genes metilados ($IM \geq 0,50$) (Gráfica 4.43), se observa una $\chi^2 = 0,825$ (1 g.l) con una $P = 0,364$ que tampoco son datos estadísticamente significativos.

A los 18 meses están sin enfermedad el $52\% \pm 0,08$ de los pacientes con un $IM < 0,50$; frente al $44\% \pm 0,09$ de los que tienen un $IM > 0,50$. No obstante, existe una tendencia a la significación. Tal vez este mismo estudio con otros genes que tengan mayor capacidad discriminativa y con mayor número de muestras pueda llevar a la significación estadística y eso supondría que la metilación aberrante de varios genes aumentaría el riesgo de recidiva tumoral y que, por tanto, la metilación aberrante de cierto número de genes debería considerarse como un factor que ensombrece el pronóstico de la enfermedad tumoral vesical como demuestran Tada y cols. (2002).

4.7.6.- Evaluación del perfil epigenético de la patología vesical tumoral en el tumor primario y en las recidivas

En 13 de los pacientes afectos de cáncer vesical se analizó el perfil epigenético del cáncer vesical en más de una ocasión como consecuencia de la aparición de recidivas. A continuación se muestra el perfil obtenido para cada uno de ellos (Tabla 4.40).

Tabla 4.40.-: Evaluación del perfil epigenético de la patología vesical tumoral en el tumor primario y en las recidivas.

<i>Promotores metilados</i>								
<i>Paciente</i>	<i>Meses</i>	<i>p16^{INK4a}</i>	<i>hMLH1</i>	<i>cicl. D2</i>	<i>σ14-3-3</i>	<i>RAR β</i>	<i>Twist</i>	<i>IM</i>
123	0	-	+	-	+	+	+	0,67
	1	-	+	-	+	+	-	0,50
20	0	-	nd	-	nd	-	-	0,00
	2	-	+	-	+	-	-	0,33
111	0	-	+	-	+	-	-	0,33
	4	-	+	-	+	-	-	0,33
119	0	-	+	+	+	+	+	0,83
	2	-	-	-	+	+	-	0,33
	7	nd	+	-	+	-	-	0,40
	11	-	-	-	+	-	-	0,17
138	0	+	+	-	+	+	-	0,67
	3	nd	+	-	+	+	+	0,80
97	0	-	+	-	+	-	-	0,33
	1	-	+	-	+	-	-	0,33
	3	-	-	-	+	+	+	0,50
	4	-	+	-	+	+	-	0,50
139	0	-	+	-	+	+	-	0,50
	10	-	-	-	+	-	-	0,17
93	0	-	-	-	-	-	-	0,00
	10	-	+	-	+	-	-	0,33
96	0	+	+	-	+	-	+	0,67
	8	nd	-	-	+	-	-	0,20
	13	-	-	-	-	-	-	0,00
28	0	-	+	-	+	+	-	0,50
	1	-	+	-	+	+	-	0,50
117	0	-	-	-	+	+	-	0,33
	1	-	+	-	+	+	-	0,50
165	0	nd	+	-	+	-	-	0,40
	1	nd	+	-	+	-	-	0,40
	9	-	-	-	-	-	-	0,00
13	0	-	+	-	+	+	-	0,50
	8	-	+	-	-	+	+	0,50

nd: no determinado

Del estudio del patrón de metilación encontrado en las recidivas sucesivas que padecen los enfermos recogidos en la tabla anterior, parece desprenderse que las características del tumor, al menos en lo que a metilación se refiere, permanecen constantes. Este hallazgo está en concordancia con un posible origen multicéntrico simultáneo del tumor en el que desde el principio y a lo largo del tiempo, las características histológicas y moleculares son idénticas.

4.8. SENSIBILIDAD A LA RADIACIÓN IONIZANTE DE LOS PACIENTES AFECTOS DE CÁNCER VESICAL.

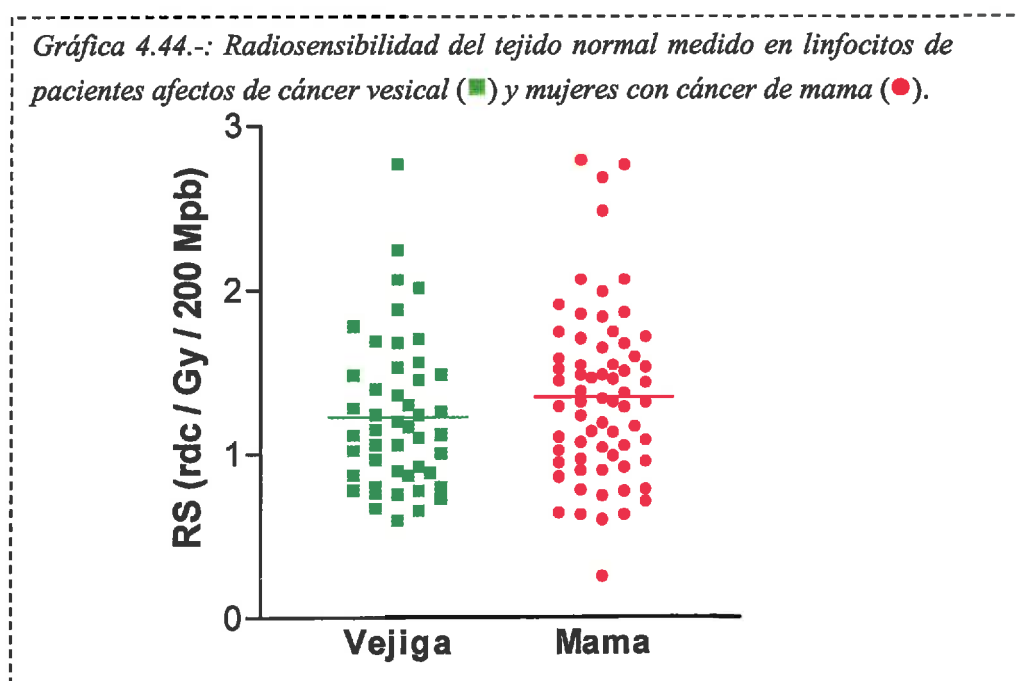
4.8.1.- Radiosensibilidad tumoral

La sensibilidad del tumor frente a la radiación ionizante se midió mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE) tal y como se describe en material y métodos. El parámetro de radiosensibilidad elegido fue: ADN extraído/ADN total. Este experimento se realizó sobre 29 biopsias adecuadamente tratadas para ello.

4.8.2.- Radiosensibilidad del tejido sano (linfocitos).

La sensibilidad del tumor frente a la radiación ionizante se midió mediante PFGE tal y como se describe en material y métodos. El parámetro de radiosensibilidad elegido fue: $rdc/Gy/200\text{ Mpb}$ (Núñez et al., 1998).

Este experimento se realizó sobre 47 muestras de linfocitos de pacientes afectados de cáncer vesical y 67 muestras de linfocitos de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama. La representación gráfica de los valores obtenidos se muestra en la gráfica 4.44.



4.8.3.- Correlación entre la radiosensibilidad tumoral y la radiosensibilidad del tejido sano en un mismo paciente

El siguiente paso fue ver si existía alguna relación entre la radiosensibilidad del tejido sano y del tumor de un mismo enfermo. La gráfica 4.45 muestra los resultados obtenidos. Al

ajustar los valores obtenidos a una regresión lineal se obtuvieron los siguientes parámetros:

Pendiente:

$0,193 \pm 0,136$ (i.c. $-0,088 - 0,474$)

Intersección en Y: $0,103 \pm 0,195$

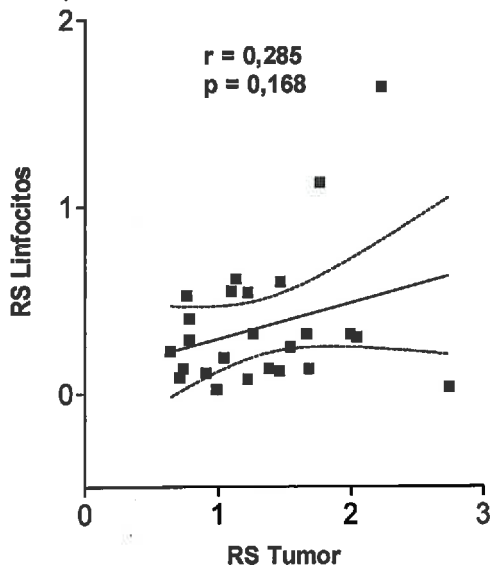
Intersección en X: $-0,532$

$r = 0,285$

$p = 0,168$

Tanto de la gráfica 4.45, como de los parámetros obtenidos en el ajuste lineal, se puede deducir que no existe relación alguna entre la radiosensibilidad que muestra el tumor y el tejido sano de un mismo paciente.

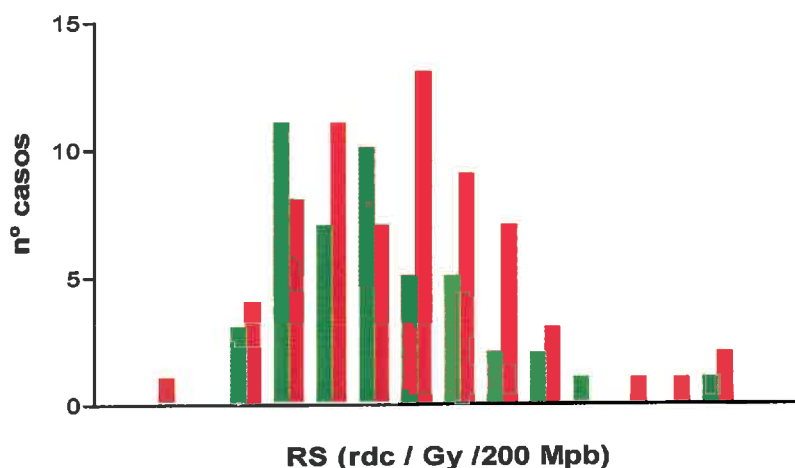
Gráfica 4.45.-: Relación entre la radiosensibilidad tumoral y la radiosensibilidad del tejido sano.



4.8.4.- Comparación entre la radiosensibilidad del tejido sano de pacientes con neoplasias de distinto origen

La gráfica 4.46 muestra los valores de radiosensibilidad medidos en linfocitos de pacientes afectados de cáncer vesical y de cáncer de mama.

Gráfica 4.46.-: Distribución de la radiosensibilidad de linfocitos de pacientes afectados de cáncer vesical (■) y de cáncer de mama (■).



Por lo que se aprecia en la gráfica 4.46, se puede observar que la distribución de los valores de la radiosensibilidad de los dos grupos de pacientes, enfermos/as con cáncer vesical y enfermas con cáncer de mama es asimétrica.

Del estudio de la distribución de frecuencia de los valores de radiosensibilidad de linfocitos procedentes de pacientes con cáncer vesical y de mujeres afectas de cáncer de mama, es fácil igualmente concluir que ambas distribuciones son coincidentes y asimétricas. En efecto, la comparación entre los valores medios de radiosensibilidad entre los linfocitos de uno y otro grupo de pacientes con cáncer, mediante el uso del test de Wilcoxon, permiten decir que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,3$). También es claro que en ambos grupos de pacientes existen valores de radiosensibilidad que se sitúan en el extremo de la derecha de la gráfica y que teóricamente deben de corresponder a las muestras de máxima sensibilidad molecular. Que este valor *in vitro* sea indicativo de una mayor radiosensibilidad *in vivo* es sobre lo que existe algún indicio, al menos en los que a cáncer de mama se refiere pero que necesita de mayor estudio para poder confirmar la realidad, y de ello la validez en oncología radioterápica de tal asociación (Núñez y cols., 1998; Ruiz de Almodóvar y cols., 2002; López y cols, 2002).

De los distintos modelos matemáticos de distribuciones teóricas que pueden ajustarse a los datos experimentales de que se disponen, es probable que el que más fielmente refleja la distribución experimental es la distribución log-normal (Guirado y cols., 2003). En el intento de separar los pacientes que responden a la radioterapia a través de manifestaciones de daño en los tejidos sanos compatibles con la tolerancia tisular, de aquellos otros que muestran efectos colaterales anormalmente severos se puede definir un valor de corte de manera que dicho valor separe el área bajo la curva en dos porciones de diferente peso constituidas cada una de ellas por el 95% y el 5% de los pacientes, respectivamente. Dicho valor para el conjunto de pacientes afectas de cáncer de mama ha resultado ser de 3,20 rdc/Gy/unidad de ADN y para ninguno de los pacientes de cáncer vesical aquí recogidos se han encontrado valores de radiosensibilidad *in vitro* que superen tal nivel de corte. Esto no excluye que reacciones tóxicas de mayor o menor grado hayan sido observadas durante el tratamiento de los pacientes con radioterapia. Si entre los valores más altos de radiosensibilidad molecular y la importancia de los efectos colaterales observados existen algún tipo de relación es algo que con los datos incluidos en este estudio no puede confirmarse ni descartarse. Esto puede ser esencialmente debido al bajo número de pacientes sometidos a irradiación en los que el test de radiosensibilidad fue realizado con anterioridad al inicio de la radioterapia.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1.- INTRODUCCIÓN

Es sabido que, aproximadamente, el 80% de los cánceres de vejiga son lesiones superficiales, confinadas a la mucosa o que invaden la lámina propia. A pesar de que el pronóstico, en general, es favorable, este tipo de tumores tiene una enorme propensión a recidivar, y más del 70% de las personas que los padecen manifiestan una segunda lesión dentro del periodo de dos años que siguen al diagnóstico y tratamiento inicial (Heney y cols., 1993). Basándose en la experiencia general, se podría decir que ante un paciente individual afecto de cáncer vesical, el pronóstico de la evolución de su enfermedad se establece en base a cierta combinación de factores que, siendo todos ellos, en forma independiente, determinantes de la probabilidad de recurrencia local del tumor, facilitan la elaboración de una hipótesis de pronóstico que le pueda ser fácilmente transmitida. Entre esos factores están, sin lugar a dudas, los siguientes: a) el tamaño del tumor; b) el número de tumores en el momento del diagnóstico (la Multicentricidad); c) el grado de diferenciación; d) la penetración de la lesión en la pared vesical y e) el antecedente de recidiva previa cuando se trata de prever el curso evolutivo de pacientes que previamente han recidivado (Kaasinen y cols., 2002). Además, la progresión de la lesión tumoral desde la invasión muscular hacia estadios más avanzados de la enfermedad, parece estar determinada por el grado de diferenciación del tumor y se sabe que las neoplasias que invaden la lámina propia tienen peor pronóstico que los tumores papilares.

Todo lo anterior alcanza su máximo sentido por cuanto en base a estas experiencias y a los datos que se recogen en el estudio de la persona y de su enfermedad, se decide qué tratamiento debe ser administrado a cada enfermo. En este sentido, la European Organization for Research on Cancer Research (EORTC) (van der Meijden, 1992), recomienda que cuando se suponga

- i) bajo riesgo de recidiva, la resección transuretral del tumor sea seguida de una instilación endovesical única de epirrubicina o mitomicina C realizada en un tiempo que no exceda la 6 horas de la RTU;
- ii) riesgo intermedio de recidiva, a la RTU siga la instilación de epirrubicina o BCG aunque no está claro cual es la mejor opción;

- iii) alto riesgo de recidiva tumoral, a la cirugía se añada las instilaciones endovesicales repetidas de agentes quimioterápicos, o el tratamiento intravesical con Bacilo Calmette-Guerin (BCG);
- iv) en contraste, la terapia con BCG en pacientes cuyo riesgo de recidivar sea bajo puede ser un tratamiento excesivo.

Los ensayos clínicos que, sobre este importante problema, se están realizando pretenden esencialmente reducir la incidencia de recidivas a través del uso eficaz de la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia y la radioterapia combinadas adecuadamente (van der Meijden y cols., 2001; Muren y cols., 2001; Kaasinen y cols., 2002).

Está sobradamente documentado que la denominación de cáncer vesical engloba a un grupo muy heterogéneo de enfermedades, cuyos resultados terapéuticos aplicados en su tratamiento son extremadamente variables. Y está claro que tumores del mismo tipo histológico, y en la misma situación clínico-patológica, que reciben idéntico tratamiento pueden comportarse evolutivamente de manera completamente distinta. Este hecho y los enormes avances del conocimiento en la biología molecular del cáncer, hacen pensar que, a través de la genómica, la proteómica, o mediante técnicas de análisis cuantitativo de imagen, se puede llegar a conocer mejor la biología de los procesos neoplásicos y avanzar en modelos que permitan el tratamiento del cáncer de forma individualizada. Parece claro, por tanto, que para conseguir el enfoque racional de todas las cuestiones médicas que corresponden al urólogo, y que es necesario transmitir con certeza al paciente, se necesita de nuevos indicadores de pronóstico que, basados en las características biológicas, y en la valoración histopatológica y molecular del tumor, proporcionen más información para predecir la recurrencia, la progresión y quizás la respuesta a la terapéutica. Para ello es imprescindible que:

- a) se desarrollen nuevos marcadores tumorales que conduzcan al cambio de los criterios convencionales, clínicos y anatomopatológicos, de clasificación del cáncer;
- b) pueda avanzarse en la detección precoz de las enfermedades neoplásicas y
- c) sea posible la individualización terapéutica de manera que para cada individuo se busque la mayor eficacia para el control tumoral con el mínimo riesgo de inducir efectos colaterales indeseables.

Estos nuevos marcadores biológicos podrían revelar y expresar en términos cuantitativos el desarrollo de acontecimientos celulares bioquímicos, genéticos o epigenéticos que estén en la base de los procesos de promoción y progresión de las enfermedades tumorales. Se piensa que

podrían ser suficientemente sensibles como para identificar a los pacientes en riesgo de padecer cáncer, permitir la aproximación al pronóstico de la enfermedad, valorar la respuesta a la terapéutica y ayudar en el seguimiento evolutivo de los enfermos (Lair, 2003).

Bajo el término de “Marcador Tumoral” (MT) se incluyen un conjunto de sustancias de naturaleza bioquímica que se relacionan con la presencia de un tumor. En teoría, estas sustancias deben ser de utilidad para el diagnóstico del cáncer asintomático y en base a ellas se podrían establecer programas eficaces de diagnóstico precoz. Sin embargo, en la práctica clínica actual, los marcadores tumorales no se utilizan en diagnóstico sino, más bien, como pruebas de laboratorio que: 1) poseen cierta utilidad en la confirmación de la presencia de un proceso neoplásico maligno, 2) facilitan el estudio de la extensión de la enfermedad, 3) permiten valorar la respuesta al tratamiento, o 4) pueden indicar la presencia de enfermedad en forma de recidiva loco-regional o de metástasis distal durante el periodo de seguimiento.

El marcador tumoral ideal debería poseer las siguientes cualidades:

- a) Ser producido exclusivamente por el tumor sin que, tal sustancia, existiese en individuos sanos ni en pacientes afectados de enfermedades benignas.
- b) Existir en cantidades suficientes para que su cuantificación en los fluidos biológicos permitiese descubrir la presencia de pequeños volúmenes tumorales.
- c) Estar directamente relacionado con el volumen y la extensión del tumor; de este modo la obtención de valores seriados a lo largo del tratamiento del proceso reflejarían con precisión el curso clínico de la enfermedad y la desaparición del marcador sería indicativa de curación.
- d) Poseer valores de sensibilidad, especificidad y valor de predicción positivo cercanos al 100%; es decir, el MT debe indicar con certeza los casos verdaderamente positivos siendo mínimos los casos en los que la indicación sea falsamente negativa o falsamente positiva.

Es cierto que ninguno de los marcadores existentes en la actualidad cumplen la totalidad de los requisitos que anteriormente se han, enumerado aun cuando hay muchos de ellos que aportan información de indudable utilidad en clínica oncológica: el antígeno específico prostático (PSA) en cáncer de próstata (Corey y Corey, 1998; McCarthy, 1998), la tiroglobulina en cáncer diferenciado de tiroides (Ruiz García y cols., 1991; Baudin y cols., 2003) o el antígeno carcinoma embrionario (CEA) en cáncer de colon (Sharkey y cols., 2003).

5.1.1.- Marcadores tumorales séricos y cáncer genito-urinario

El estadiaje de rutina de los tumores urológicos depende fundamentalmente de los hallazgos histopatológicos del material tumoral primario o metastático, incluidos los márgenes quirúrgicos, y de los radiológicos. Además, existen marcadores tumorales séricos útiles en el diagnóstico inicial y seguimiento de los tumores de próstata y testículo, aunque sus aplicaciones clínicas se ven limitadas por una carencia de especificidad. El antígeno prostático específico (PSA) es actualmente uno de los marcadores tumorales convencionales de indudable utilidad, sin embargo su validez en propósitos de diagnóstico precoz del cáncer próstata, no ha sido inequívoca y universalmente aceptada (McCarthy, 1998; Potosky y cols., 2001).

Los métodos de estudio de las enfermedades neoplásicas, basados en la detección de ácidos nucleicos en fluidos biológicos, han recibido en los últimos años un enorme impulso desde la investigación básica a las aplicaciones clínicas. El primer trabajo en el que se describió que, en el suero de los pacientes con cáncer, era posible demostrar la presencia de elevados niveles de ADN fue publicado en 1977 (León y cols., 1977). La demostración de que parte de ese ADN puede corresponder a macromoléculas de ácidos nucleicos liberadas desde el proceso neoplásico fue publicada casi veinte años más tarde (Vasioukhin y cols., 1994; Jahr y cols., 2001).

La búsqueda de las aplicaciones clínicas de la determinación de ácidos nucleicos en sangre de pacientes con cáncer se inicia hace varios años (Smith y cols., 1991; Moreno y cols., 1992; Sidransky, 1997) y recibe un enorme impulso cuando, sobre a ese objetivo, se incorporan los métodos de amplificación basados en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR o RT-PCR) y mediante ellos se consigue detectar específicamente la presencia de moléculas de ARNm características del proceso neoplásico y ausentes en la sangre de personas sin patología tumoral (Corey y Corey, 1998).

Por otra parte, de especial interés son las sugerencias de que, entre los resultados del análisis y la masa tumoral, parece haber cierta relación de proporcionalidad (Straub y cols., 2001) aunque este hallazgo no es concluyente. En efecto, hay disparidad en las cifras publicadas para la sensibilidad de los ensayos, con tasas de detección que oscilan entre el 25% y el 100% de los casos que corresponden a pacientes con cáncer de próstata metastásico y entre el 0% y el 72% en los grupos de enfermos en los que el tumor se diagnostica en sus primeros estadios y que son, por ello, potencialmente curables (Corey y Corey, 1998; Ghossein y cols., 1999). Todavía más problemática resulta la baja especificidad de las técnicas, como se aprecia en los valores que han publicado un número significativo de grupos de trabajo (Henke y cols., 1996; Corey y Corey, 1998; Kaneda y cols., 1998; Jung y cols., 1999; Champelovier y cols., 1999; Ko y cols., 2000; Retz y cols., 2001).

Es bien cierto que los errores afectan tanto a la fracción de verdaderos positivos como a la fracción de verdaderos negativos y que ningún test diagnóstico puede ser considerado perfecto. Los términos de "sensibilidad" y "especificidad" adquieren su significado médico preciso cuando

se refieren a los resultados de tests analíticos que son aplicables a estudios de cribado poblacional mediante los que se intenta identificar a los sujetos afectados de determinada patología (o en riesgo de padecerla). Aquí la sensibilidad del marcador tumoral se refiere a la proporción de casos (individuos con enfermedad) en los cuales el test de diagnóstico arroja un resultado positivo, mientras que la especificidad se refiere a la fracción de sujetos control (personas sin enfermedad) en las que el test de diagnóstico ofrece un resultado negativo.

En los procedimientos de diagnóstico aplicados a la oncología, el parámetro que cuantifica la sensibilidad clínica del marcador tumoral (MT) está determinado por: i) la prevalencia del marcador en el seno del tumor; ii) la transferencia del marcador desde el proceso neoplásico hasta el fluido biológico en el que puede ser valorado y iii) el límite de concentración que es detectable por el procedimiento analítico. Falsos negativos pueden, entonces, ocurrir cuando el marcador no exista en el tumor, cuando no se secreta a los fluidos extracelulares o cuando existiendo, y secretándose, la concentración del mismo en el medio accesible al diagnóstico no alcance el umbral de detección intrínseco del test.

La especificidad de un test analítico encaminado al diagnóstico del cáncer es también una función de, entre otros, los siguientes factores: i) la producción del marcador tumoral en células distintas a la propias de la neoplasia; ii) la presencia en los fluidos biológicos de moléculas que reaccionen de manera cruzada con la que se pretende investigar; iii) la importancia de contaminaciones evitables o inevitables; iv) la síntesis del marcador tumoral en focos de enfermedades no cancerosas (infecciones o inflamación, por ejemplo) que puedan operar como factores de confusión (Chelly y cols., 1989; Smith y cols., 1995) y v) el hecho de que las moléculas elegidas sean más órgano-específicas que tumor-específicas. Todos estos problemas de especificidad afectan a los marcadores clásicamente utilizados y limitan las aplicaciones de proteínas como el PSA o la tiroglobulina (Moreno y cols., 1997; Polascik y cols., 1999, Ruiz de Almodóvar y cols., 1994b) indudablemente útiles en cáncer de próstata y cáncer de tiroides respectivamente.

5.1.2.- Marcadores tumorales basados en la cuantificación de ADN

Debido a las limitaciones derivadas de la falta de sensibilidad y de especificidad de los métodos de detección basados en el radioinmuno o el enzimoimmuno ensayo, estas técnicas están siendo progresivamente sustituidas por métodos basados en técnicas de biología molecular, y sus aportaciones parecen ser cada vez más valiosas. En patología vesical existen cierto número de trabajos que, a nivel de desarrollo, han descrito los métodos y las posibilidades de utilización de ARN o ADN como indicadores de la existencia del tumor. También existen algunos trabajos clínicos aplicados al diagnóstico o al pronóstico de la enfermedad tumoral vesical (De la Taille y cols., 1999; Clements y cols., 1999).

Contrastando con los marcadores tumorales moleculares basados en la detección de ARN, los marcadores tumorales moleculares basados en ADN parecen caracterizarse por su importante

especificidad tumoral. Tienen potencialmente validez para, sobre su presencia o ausencia, construir sistemas de clasificación de los tumores (Steiner y Sidransky, 1996; Model y cols., 2001), y esto es debido a su papel como elementos definidores del pronóstico (Mulcahy y cols., 1998; Taback y cols., 2001) y de las decisiones terapéuticas. Ejemplos de esta situación son las pacientes con cáncer de mama con tumores positivos para el receptor del gen *HER-2/neu* (Riou y cols., 2001; Lyon y cols., 2001).

En relación con el diagnóstico de cáncer de vejiga, las alteraciones del ADN, estudiadas en la orina de los pacientes, se vienen utilizando desde hace 10 años como herramientas para la detección molecular del tumor vesical primario (Mao y cols., 1996) y el recurrente (Sidransky y cols., 1991; Hruban y cols., 1994; Steiner y cols., 1997; Mourah y cols., 1998). Recientemente, se ha visto que el ADN tumoral derivado de carcinoma celular renal también es susceptible de ser hallado en muestras de orina (Eisenberger y cols., 1999).

Ya en 1948 Mandel y Metais detectaron ADN celular libre en suero sanguíneo. Aunque se ha sabido durante más de 20 años que los pacientes con cáncer, incluidos los de la esfera urogenital, presentaban un importante incremento de ADN en suero (León y cols., 1977; Shapiro y cols., 1983), no ha sido hasta 1989 (Stroun y cols.) y 1994 (Sorenson y cols.; y Vasioukhin y cols.) cuando se ha podido identificar que cierta cantidad del ADN sérico de los pacientes con cáncer procede del proceso tumoral (Sidransky, 1997; Anker y cols., 1999). Considerando que en personas sanas (sujetos control) existe un cantidad plasmática de ADN comprendida entre 10-30 ng/mL (Steinman, 1975; León y cols., 1977; Chen y cols., 1996) y que en los pacientes con cáncer estas cifras pueden oscilar entre 20 y 1200 ng/mL, parece claro que la situación de enfermedad se asocia a un incremento en los niveles de ADN sérico (León y cols., 1977; Shapiro y cols., 1983; Jahr y cols., 2001). En este sentido se ha demostrado que la fracción de ADN tumoral incluida dentro de la cantidad de ADN circulante en la sangre (procedente de células benignas) de los pacientes con cáncer puede oscilar entre el 3% y el 93% (Jahr y cols., 2001). El incremento de ADN circulante en el plasma de pacientes con cáncer urológico fue un hallazgo descrito por primera vez en 1998 (Goessl y cols.) y desde entonces, nuevos avances han permitido validar este hecho y conocer mejor el significado biológico de esta alteración, cuando se encuentra en muestras de plasma, suero u orina procedentes de pacientes con cáncer urológico.

5.1.3.- Alteraciones de ADN y métodos de detección

Aplicando técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) es posible investigar, en fluidos biológicos, la presencia de ADN y las posibles anomalías de esta macromolécula que se asocian a las enfermedades neoplásicas. Así hoy, en cáncer urológico, es posible estudiar en cualquier muestra que contenga ADN:

1. La presencia de mutaciones genéticas (Jerónimo y cols., 2001a).
2. Las alteraciones de microsatélites de ADN (Weber y May, 1989; Karlin y Burge, 1995)

3. La metilación de las citosinas en la región correspondiente al promotor de numerosos genes.

Los cambios en la metilación del ADN parecen constituir una anomalía particularmente frecuente en cualquier tipo de cáncer. El dinucleótido autocomplementario CpG habitualmente lleva en la posición 5 de la citosina el residuo metilo (CH_3 -; originando la base modificada 5-mC). Esto ocurre en las células de tejidos normales de todos los mamíferos; a diferencia de lo anterior, cuando los dinucleótidos CpG se agrupan en regiones de ≈ 1 kilobase, frecuentemente en la proximidad de las secuencias génicas reguladoras de la transcripción, adquieren un significado funcional especial. Dentro del genoma, a estas regiones se las denomina islas CpG (Bird, 1986). La patogénesis del cáncer se acompaña de forma típica por una generalizada reducción en la metilación del dinucleótido CpG, con un incremento de la metilación de los dinucleótidos CpG presentes en las islas CpG de ciertos genes críticos (Jones y Baylin, 2002). La hipermetilación de las islas CpG provoca la inhibición de la transcripción génica, silenciando a los genes de forma eficaz, de un modo similar al silenciamiento que se origina por delección génica o a través de una mutación genética inactivadora. Estas alteraciones moleculares proporcionan alguna manera de ventaja selectiva a las células tumorales que facilita el desarrollo del proceso neoplásico.

El proceso de metilación de promotores de genes ocurre en las células del tumor, pero no en las de los tejidos sanos que rodean al proceso y esta singularidad es su ventaja como marcador tumoral molecular asociado al cáncer. Por otra parte, la investigación de cambios del patrón de metilación, en genes específicos, puede realizarse mediante técnicas de PCR que son aplicables en la mayoría de los casos de cáncer (y esto distingue las alteraciones epigenéticas de otras anomalías en el ADN de las células somáticas pertenecientes al tumor como puede ser la presencia de mutaciones o de delecciones).

En muchos tejidos, y en los tumores, el silenciamiento génico se ha asociado a metilación de las islas CpG (CGI) localizadas en los promotores de los genes y/o de sus correspondientes secuencias en las regiones reguladoras (Bird, 1986; Toyota y cols., 1999b); sin embargo muchos trabajos de investigación continúan centrándose en la identificación de cuales de las islas CpG son importantes, dada la relevancia de los cambios epigenéticos en la consistencia de determinados patrones de tipo específico que pudieran ser identificados (Costello y cols., 2000). El aumento de la fijación de grupos metilo en la citosinas de las islas CpG (Bird 1992), dentro de los límites de la región promotora del gen se denomina hipermetilación del promotor y constituye un cambio epigenético que puede ser reversible en las células tumorales (Schulz, 1998; Ramchandani y cols., 1999; Jones y Laird, 1999; Baylin y Herman, 2000).

Consecuencia de la hipermetilación es el bloqueo de la expresión génica que puede evidenciarse tanto a nivel de ARN como mediante la expresión de proteínas. El fenómeno puede evidenciarse tanto por técnicas de biología molecular, cualitativas, semicuantitativas y más recientemente cuantitativas, como por medio del estudio de pérdidas de tinción intracelular puestas de relieve mediante inmunohistoquímica (Singal y cols., 2001; Lin y cols., 2001). Desde

hace algunos años se sabe que la hipermetilación en el genoma y, específicamente, en los promotores de expresión génica puede detectarse mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR específica para metilación (MSP) (Herman y cols., 1996; Esteller y cols., 1999b).

Para poner de manifiesto la presencia de genes hipermetilados circulantes en la sangre de los pacientes se requiere una relación de ADN tumoral respecto a ADN sérico de al menos del 0,1-0,001% (Herman y cols., 1996; Goessl y cols., 2000).

5.1.4.- Marcadores tumorales derivados del estudio del ADN circulante en pacientes afectos de cáncer urológico

El diagnóstico positivo del cáncer basándose en los métodos de medida del ADN en plasma/suero y/o orina de los pacientes ha sido descrita en enfermos con cáncer renal (Goessl y cols., 1998), de próstata (Prasad y cols., 1998), y de mama (Evron y cols., 2001a), entre otras localizaciones tumorales.

Los trabajos iniciales han dado origen a investigaciones más extensas encaminadas al diagnóstico, o mejor, a su confirmación, del cáncer urológico, ya sea mediante el análisis de células tumorales exfoliadas de muestras de orina (Steiner y cols., 1999), ya mediante la identificación bioquímica del ADN. Inicialmente dichos estudios se centraron en descubrir mutaciones de los genes *p53* y *H-ras* como dianas del análisis por secuenciación del ADN extraído de la muestra. Sin embargo, problemas derivados de la prevalencia de estas alteraciones en cáncer vesical (Sidransky y cols., 1991; Fitzgerald y cols., 1995) y de la laboriosa preparación, han dado paso a nuevos métodos basados en el estudio de mutaciones en el ADN mitocondrial y en el análisis de múltiples marcadores a través de los microsatélites de ADN, sustituyendo a las técnicas dirigidas al despistaje de mutaciones en el ADN genómico que es posible separar de muestras de orina (Mao y cols., 1996).

Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN polimórfico, frecuentemente constituidas por repeticiones de dinucleótidos CA. Las alteraciones de los microsatélites aparecen como pérdidas de la heterocigosidad (LOH) o como productos de PCR adicionales, proceso al que se denomina inestabilidad de microsatélites. La detección de inestabilidad de microsatélites requiere que la relación entre el ADN procedente del tumor y el procedente de las células normales (contaminante) sea superior al 0,5% (Chen y cols., 1996). Friederich y cols. (2000) han desarrollado el análisis sencillo con microsatélites marcadores de sedimentos urinarios en gel de agarosa obteniendo, sin embargo, una sensibilidad total sólo del 34%. En el futuro, deberán alcanzarse tasas de sensibilidad suficientes con un grupo limitado de marcadores capaces de detectar alteraciones de metilación en genes promotores de pacientes con cáncer vesical como proponen Chan y cols. (2001). Utting y cols. (2000) refieren que el análisis con microsatélites de sobrenadante de células libres en orina podría identificar más casos de cáncer

que el análisis de sedimento urinario. Tal vez en el sobrenadante urinario el porcentaje de ADN tumoral comparado con el ADN normal del urotelio benigno contaminante es tan elevado que la pérdida de heterocigosidad (LOH) se convierte en la alteración de ADN más detectable. Las diferencias entre los hallazgos en sobrenadante urinario y células sedimentadas, podrían indicar alguna forma desconocida de liberación del ADN desde las células uroteliales malignas que provoca un enriquecimiento de ADN tumoral en el sobrenadante urinario. Alternativamente, el ADN de células no tumorales podría estar mejor protegido frente a la biodegradación que el ADN de células no tumorales (Anker, 2000).

Una limitación de estas técnicas se produce en relación a la calidad de la muestra sobre la que se aplican. En efecto, cuando en las muestras existe una baja cantidad de ADN, el estudio puede ser impreciso por lo que origina un alto número de resultados falsos positivos. De acuerdo con los datos recogidos por Goessl referentes a las aplicaciones de los procedimientos de estudio del ADN circulante al cáncer urológico (Goessl y cols., 2002) y dependiendo de cuál sea la técnica empleada para estudiar las alteraciones del ADN, las tasas de sensibilidad pueden oscilar entre el 27 y el 100%, mientras que la especificidad ha demostrado ser muy alta. Utting y cols. (2000) y von Knobloch y cols. (2001) fueron capaces de detectar ADN tumoral circulante en el suero/plasma del 60-85% de pacientes con cáncer vesical. No existía correlación entre estadio tumoral y la detección tumoral de ADN en plasma/suero. El valor clínico de dichos trabajos para detectar tumores vesicales de forma precoz, podría ser limitado con respecto a los métodos diagnósticos actuales (uretroscopia) (Hartmann y cols., 1999; Zaak y cols., 2001), estando aún sin determinar su utilidad como marcador para el seguimiento clínico.

5.2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN NUESTRA SERIE

El urotelio es un tejido epitelial especializado que protege a los tejidos subepiteliales de las toxinas químicas, ya sean endógenas o exógenas, y de las infecciones bacterianas. En respuesta a la exposición a agentes nocivos y dependiendo de factores imprecisamente definidos, como puede ser la susceptibilidad genética y los aspectos nutricionales de cada individuo, sobre el tejido epitelial se pueden desarrollar fenómenos de hiperplasia, metaplasia o cambios premalignos. En el interior del tejido las citoquinas y los factores de crecimiento regulan la respuesta del urotelio a través de mecanismos de base genética o epigenética.

5.2.1.- Etiología

Junto con el cáncer de pulmón, el cáncer vesical ha sido uno de los problemas neoplásicos, que afectan a los seres humanos, que más precozmente se estudió desde un punto de vista epidemiológico (Rehn, 1895). En este sentido se sabe, desde hace más de cuatro décadas, que los dos factores que principalmente influyen sobre la patogénesis del cáncer vesical son el

hábito de fumar (Lee y Droller, 2000) y la exposición ocupacional a las arilaminas (Messing y Catalona, 1998). Uno u otro de estos factores parece estar incluido en al menos la mitad de los cánceres de vejiga que se diagnostican en la actualidad en los países desarrollados. Aun cuando los resultados de otras muchas investigaciones epidemiológicas han sido publicados y otros factores que podrían adicionalmente contribuir al conocimiento de la etiología del cáncer vesical han sido identificados, la consistencia de estos estudios está por demostrar y la investigación en este terreno se ha desplazado hacia la búsqueda de otros factores de riesgo que pudieran ayudar a entender la susceptibilidad individual de los pacientes a las acciones tóxicas de los agentes que parecen estar en relación con el desarrollo tumoral. Esto, que en definitiva es una aproximación molecular al estudio del problema, debería hacerse corresponder con los estudios de genética y epigenética molecular en el tumor para caracterizar el fenotipo de malignidad desde un punto de vista histopatológico y molecular (Ross y cols., 1996).

5.2.1.a.- Género

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que el cáncer vesical es un proceso que incide en mayor proporción en personas de género masculino, que en las de género femenino. La relación encontrada en el mismo es de 6,4/1 y este hallazgo, que es general y aceptado en nuestro país, se ha explicado por las diferencias, hoy día no tan claras, entre los hábitos y las ocupaciones características de hombres y mujeres, a las que estas se han incorporado más tardíamente que en países como los EEUU (Sánchez de la Muela y cols., 1991). Además, se ha sugerido que los cambios hormonales relacionados con el embarazo podrían ejercer cierto papel protector (Cantor y cols., 1992). En la misma dirección apuntan otros estudios que confieren, a la vitamina A, al beta-caroteno y a otros carotenoides, cierto papel como agentes quimiopreventivos de las transformaciones neoplásicas que ocurren en los tejidos epiteliales. (Peto y cols., 1981; Paganini-Hill y cols., 1987).

5.2.1.b.- Tabaquismo

En este trabajo se ha recogido de manera específica si el paciente es fumador, no fumador o ex-fumador. Los resultados obtenidos revelan que, también en nuestro medio, la incidencia de cáncer vesical es mayor entre los fumadores que entre los no fumadores en una relación que es del orden de 1,4/1 y de 2,6/1, si se incluyen los ex-fumadores dentro del grupo de personas expuestas a los efectos tóxicos de los carcinógenos presentes en el tabaco. El trabajo de Mommsen en 1982 fue el primero en el que se propuso que determinadas anomalías genéticas podrían estar en la base del incremento del riesgo de incidencia de cáncer vesical cuando las personas están expuestas a agentes tóxicos (Mommsen y cols., 1982). La hipótesis actual postula que los carcinógenos se excretan a través del riñón y que en las condiciones de acidez de la orina se liberan y pueden formar aductos con los lugares nucleofílicos del ADN perteneciente a las

células de la mucosa. Las modificaciones del ADN y la reparación equivocada de las lesiones producidas pueden dar origen a mutaciones que activen oncogenes o anulen la función de los genes tumor supresor, etapas que se consideran cruciales en el proceso de cambio desde las células normales a las que fenotípicamente pertenecen a tumor (Kaderlink y Kadlubar, 1995). De manera alternativa los carcinógenos pueden ser inactivados y excretados sin que produzcan ningún tipo de daño mediante la actuación de enzimas incluidas en las rutas de detoxificación, entre ellas las glutatión-transferasas (Borrad y cols., 1990) y las N-acetil transferasas (Lee y Droller, 2000). Una perspectiva más actual es la que sugiere que el riesgo de las personas expuestas a carcinógenos puede ser modulado por las variaciones moleculares existentes en los genes que codifican los enzimas detoxificantes de la acción de las arilaminas (Ross y cols., 1996).

Resumiendo, parece cierto que el cáncer vesical esté en relación con la acción tóxica de carcinógenos químicos y es posible que:

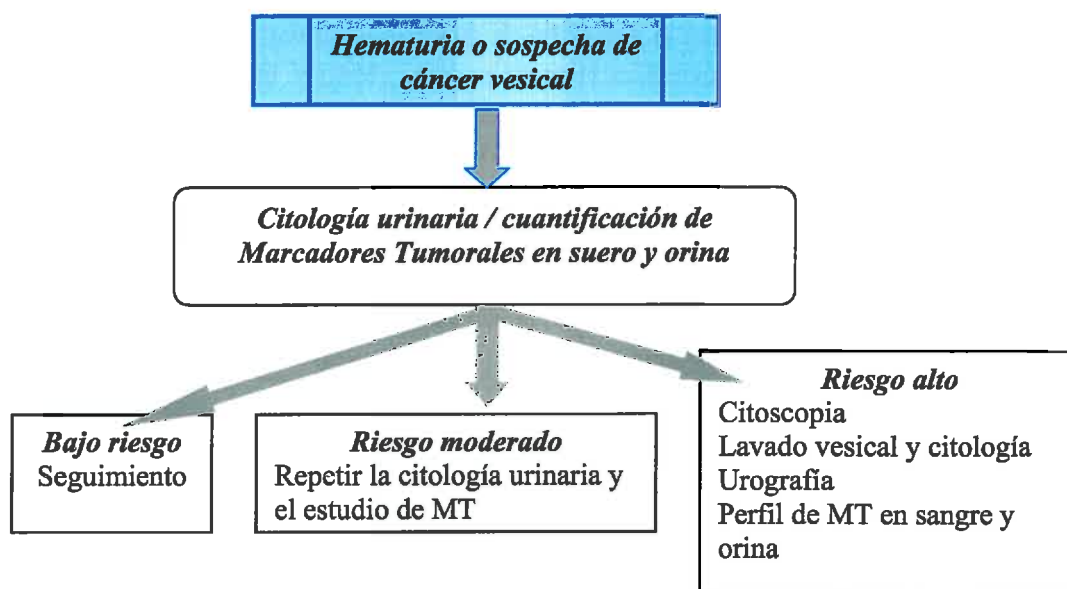
- i) existan diferencias genéticas entre las personas que dan origen a diferencias en el metabolismo de los carcinógenos existentes en el tabaco y, de ello, a la alteración de la importancia del factor “tabaquismo” en relación con el cáncer vesical;
- ii) otros agentes exógenos o endógenos, como la vitamina A o las hormonas, pueden modificar la susceptibilidad de los individuos expuestos a carcinógenos a través de la cancelación de sus efectos.
- iii) La investigación epidemiológica permita encontrar otros factores que sean de importancia en la etiología del cáncer urológico.

5.2.2.- Sintomatología clínica

Los datos referentes a la sintomatología clínica que refieren los pacientes antes del tratamiento y los que manifiesta una vez que el tratamiento prescrito haya sido instaurado, revelan que el síntoma dominante en la serie de enfermos aquí recogidos fue la hematuria. La hematuria, franca o microscópica, es el síntoma cardinal del cáncer de vejiga y, según los datos obtenidos, fue el que alertó al 91% de los pacientes. Esta cifra coincide con la mayor parte de las series publicadas (Catalona, 1994).

Ante la presencia de hematuria, o sospecha clínica de cáncer vesical, conviene hacer en primer lugar una citología urinaria y, en base a los datos que aquí se presentan, realizar simultáneamente un estudio de marcadores tumorales en una muestra de sangre periférica. Consecuencia de estas dos pruebas debe definirse el perfil de riesgo que corresponde al paciente

que, de una manera provisional y como antecedente del trabajo con el que se pretende continuar lo que aquí se presenta, puede estructurarse en tres grupos a los que se podría denominar de bajo riesgo; riesgo medio y alto riesgo. Esto, en forma de diagrama de flujo, e incluyendo la posible conducta diagnóstica a seguir se esquematiza en el diagrama siguiente:



Los hallazgos de la citología, la urografía intravenosa y de la cistoscopia deben confirmar o descartar la posibilidad de existencia de un cáncer vesical. El estudio de marcadores tumorales basados en el análisis epigenético y genético sobre muestras de suero y orina y realizados también en el espécimen tomado por biopsia, deben ser tomados con toda cautela hasta que un estudio prospectivo posterior a este, y la bibliografía relacionada con el tema permitan seleccionar los más adecuados y proporcionen algún tipo de información sobre el pronóstico de la enfermedad. Ya en ese sentido, algunos trabajos han mostrado claramente que el análisis de orina basado en ADN es superior a la citología de orina y que en algunos pacientes puede predecir recurrencia tumoral antes que la uretrocistoscopia (método de diagnóstico clínico patrón) (Steiner y cols., 1997; van Rhijn y cols., 2001).

Otro dato interesante de resaltar es que tras el tratamiento de los pacientes, que en este protocolo de estudio han sido incluidos, si bien como es lógico la hematuria desaparece en la práctica totalidad de los casos, y en el seguimiento evolutivo vuelve a ser el síntoma clínico dominante de recurrencia tumoral, el resto de las molestias que refieren los pacientes (polaquiuria, nicturia, urgencia, disuria y tenesmo vesical) permanecen sin cambios apreciables, cuando los pacientes acuden a la primera revisión tras su correspondiente tratamiento, respecto a la sintomatología que manifestaban en el momento del diagnóstico. En la valoración de la

sintomatología clínica se ha seguido la valoración propuesta por Madsen e Iversen y los valores numéricos resultantes se han resumido en la Tabla 4.4.

5.2.3.- Diagnóstico, tratamiento y sus complicaciones

La evaluación histopatológica del espécimen tumoral obtenido por biopsia o resección transuretral, se ha utilizado como la referencia patrón (estándar) para decidir el tratamiento adyuvante y, en este caso, para valorar la relación entre los datos derivados del examen anatomopatológico, y el estado de metilación del promotor de *p16^{INK4a}* y la validez de este parámetro como marcador tumoral del cáncer vesical.

En base a los hallazgos clinicopatológicos y siguiendo el protocolo establecido en el Servicio de Urología del Hospital Clínico “San Cecilio”, los pacientes fueron sometidos al tratamiento pertinente. En este punto conviene efectuar una reflexión:

Patológicamente, el diagnóstico de cáncer vesical se categoriza por la profundidad de su invasividad en los tejidos de la pared vesical, por su patrón de crecimiento: papilar /no-papilar y por su grado. Aunque la reproducibilidad del sistema de clasificación en grados definido por la Organización Mundial de la Salud (Grado I a III) es muy alta en sus extremos, hay un gran grupo de cánceres Grado II con un potencial biológico muy heterogéneo. El Grado es el factor que determina el riesgo de invasión muscular, especialmente en los tumores T₁. La profundidad de la invasión es, quizás, el factor pronóstico de mayor importancia. Son muchos los investigadores que han demostrado la existencia de diferencias significativas en el pronóstico (probabilidad de recurrencia tumoral y probabilidad de supervivencia global) entre pacientes con tumores no invasivos, tumores confinados a la lámina propia y tumores invasores del músculo (Herr, 1992). No obstante pueden existir discrepancias en la valoración histológica del grado y de la invasión; y de la sobrevaloración (sobrestadaje) o infravaloración (infraestadaje) de los hallazgos pueden surgir planteamientos terapéuticos inadecuados que los hagan ineficaces o excesivos. Hoy parece claro que nuevos conocimientos a nivel del estudio del genoma (y/o del proteoma) de los tumores, deberán permitir el descubrimiento y las aplicaciones de nuevos sistemas de clasificación de los tumores que disminuyan tanto los fracasos terapéuticos, como la aparición de efectos indeseables como consecuencia de las diferencias individuales respecto a la tolerancia de los tratamientos complementarios. Dado que es sobradamente conocido que fracaso y tolerancia son dos variables de enorme importancia en el tratamiento del cáncer vesical y que esto se reproduce con absoluta constancia en todas las series de pacientes sometidos a tratamiento; los datos que en esta memoria se han recogido son explícitos al respecto. En efecto:

1. La resección transuretral se acompañó de unas complicaciones indeseadas, que aun cuando mínimas, deben quedar reflejadas (el 11% de los pacientes tratados presentaron algún tipo de complicación).

2. Un total de 27 pacientes recibieron tratamiento adyuvante con radioterapia y la tercera parte de ellos (9/27) manifestaron síntomas que se relacionaron con los efectos tóxicos agudos producidos por la radiación.
3. En casi la mitad de los enfermos tratados con radiación (48%), se presentaron complicaciones tardías que pueden estar relacionadas con la superación del umbral de tolerancia a la radioterapia.
4. No hemos podido demostrar que, en los pacientes sometidos a radioterapia adyuvante, los efectos tóxicos agudos y los efectos tardíos estén relacionadas entre sí. Dicho de otra forma: no parecen que los efectos tardíos sean consecuencia de la aparición de toxicidad aguda ni de su intensidad (44%).

Es conocido que la radioterapia ocasiona efectos secundarios sobre los tejidos sanos incluidos en el volumen de tratamiento de variable intensidad, desde insignificantes o mínimos hasta enormemente severos que obligan a la suspensión del tratamiento. Este hecho limita la dosis de radiación que puede ser prescrita con seguridad en la mayor parte de las localizaciones tumorales. Las dos estrategias mediante las que se pretende resolver esta limitación son: a) Los procedimientos de la radioterapia conformacional mediante los cuales se ajusta, tanto como se puede, la dosis prescrita y su distribución al espacio definido como volumen del tumor preservando así los tejidos sanos del daño radioinducido y b) los métodos que buscan el conocimiento de la radiosensibilidad de los tumores y de los tejidos sanos de los pacientes antes de que sean sometidos a irradiación.

Recientemente, en el área de la oncología radioterápica se han presentados diversos modelos matemáticos para calcular la probabilidad de curación de los tumores y la probabilidad de inducir complicaciones en los tejidos normales que rodean al tumor (Muren y cols., 2001; Guirado y Ruiz de Almodóvar, 2003); sin embargo, aunque estos modelos pretenden la optimización y la evaluación de la planificación terapéutica la utilización del modelo como elemento definitorio de la toma de decisiones clínicas sigue siendo muy controvertida (Ruiz de Almodóvar y cols., 2002.), especialmente por la inexistencia de datos clínicos valorables. De cualquier manera, puede afirmarse que hoy no es posible predecir la respuesta de los tejidos normales a la radiación y que las complicaciones no pueden ser absolutamente evitables. Ello impide que la radioterapia sea una ciencia exacta (Brahme, 2001) y que su contribución al tratamiento del cáncer, en general, y del cáncer vesical, en particular, proporcione sólo una mejora parcial, pero real, de los índices de supervivencia y de supervivencia libre de enfermedad.

5. La respuesta a la quimioterapia adyuvante, es otro factor que introduce una enorme variabilidad en la respuesta clínica que es posible observar, la cual es

variable cuando se utiliza la modalidad endovesical y también cuando se diseña un régimen de quimioterapia sistémica.

6. Así mismo, el empleo de quimioterapia sistémica tras el tratamiento quirúrgico de los pacientes con cáncer vesical plantea problemas de decisión médica y está agravado por la incidencia, no despreciable, de riesgos colaterales.

Y predecir cuáles y cuántos son los pacientes que pueden beneficiarse de un determinado régimen de quimioterapia, decidir cuál es el fármaco, o la combinación de fármacos, que, en cada individuo, debe emplearse, es algo que sólo puede resolverse mediante programas de investigación básica y clínica adecuadamente diseñados.

5.2.4.- Seguimiento, supervivencia y supervivencia libre de enfermedad

Desde un punto de vista operacional, el cáncer de vejiga se supone constituido por un conjunto de enfermedades que pueden ser divididas en tres categorías: superficial, invasivo (de la pared vesical) y metastásico. Las distintas presentaciones del tumor difieren en su comportamiento clínico y este hecho debe ser tenido en cuenta cuando se intenta establecer el pronóstico o el tratamiento de la enfermedad.

Delante de un tumor superficial el objetivo es prevenir las recurrencias y evitar que la enfermedad progrese hacia un estadio incurable.

Para la investigación clínicoterapéutica de la respuesta de los pacientes con tumores vesicales que invaden el músculo, la Organización Europea de Radioterapia Oncológica (Radiation Therapy Oncology Group, -RTOG-) ha establecido una serie de protocolos que, bajo la intención de conseguir el aumento de los porcentajes de curación de la enfermedad, pretenden:

- a) identificar los pacientes que necesitan de la cistectomía radical para ser curados;
- b) reconocer quiénes pueden ser curados sin recurrir a la cirugía radical y
- c) descubrir quiénes están en riesgo de desarrollar metástasis distales

La estrategia básica desde 1985 ha sido combinar una agresiva, pero segura, resección transuretral del tumor, seguida de quimioterapia concurrente utilizando cisplatino y radioterapia externa. Los pacientes que así son tratados pueden:

1. manifestar una respuesta completa objetivable mediante cistoscopia y re-biopsia del tejido situado en el lugar que ocupaba el tumor, o
2. responder incompletamente en cuyo caso, a estos pacientes, se les propone la realización inmediata de una cistectomía radical.

De acuerdo con lo anterior, queda claro que como objetivo secundario, en todos los protocolos de la RTOG, se pretende preservar la vejiga y su función. De manera adicional, mediante los ensayos clínicos ya completados o en curso, se pretende evaluar la tolerancia de los pacientes respecto a los nuevos regimenes de quimioterapia sistémica y la eficacia de los mismos para prevenir el desarrollo subsiguiente de enfermedad metastásica distal. Que esta aproximación a la terapéutica es eficaz, se demuestra mediante la lectura de los datos recopilados por Shipley y cols., (2003) y que se resumen a continuación en la tabla 5.1.

Tabla 5.1.-:Resultados de los ensayos clínicos cooperativos realizados sobre pacientes con cáncer vesical (T2-T4a) candidatos a cistectomía

<i>Protocolo</i>	<i>Referencia</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Pacientes</i>	<i>S (5 años)</i>
RTOG, 1998	Shipley y cols., 1998	RTUTV ± MCV, CP + RT	123	49%
SWOG, 2001	Hussain y cols., 2001	RTUTV, CP, 5FU, +RT	25	45%
Italian	Sternberg y cols., 2001	Cistectomía ± MVAC	303	49%

RTOG: Radiation Therapy Oncology Group; SWOG: Southwest Oncology Group; RTUTV: Resección transuretral de tumor vesical; MCV: Metotrexato, Cisplatino, Vinblastina; CP: cisplatino; RT: Radioterapia; 5-FU: 5 fluoruracilo, MVAC: Metotrexato, Vinblastina, Adriamicina, Cisplatino.

El primer comentario que surge de la tabla anterior es que el tratamiento del cáncer vesical invasor proporciona un promedio de éxitos que se sitúa en torno al 50% de los pacientes tratados. El segundo comentario surge de la comparación entre tratamientos y se debe subrayar que la combinación cirugía parcial + quimioterapia + radioterapia, ofrece unos resultados que son prácticamente análogos a los que proporciona la cistectomía radical. Si los índices de supervivencia son análogos, las ventajas de la conservación de la función vesical indudables, y los efectos secundarios de la modalidad terapéutica que hace uso de una triple combinación de acciones, tolerables, la elección de una u otra modalidad terapéutica es un acto médico de importancia fundamental.

Los datos pertenecientes a esta memoria no son comparables a los de las series que anteriormente se han comentado. Y no lo son tanto por el tiempo de seguimiento de los pacientes aquí incluidos, que es insuficiente, como por el limitado número de casos que han sido estudiados. No obstante, es interesante comprobar que los resultados obtenidos para el tratamiento de los tumores invasores de la pared vesical, mediante la asociación de cirugía (Cistectomía o RTU) + quimioterapia sistémica + radioterapia externa, son demostrativos de que viven libres de enfermedad 18 meses tras el tratamiento, tres de cada cuatro de los enfermos así tratados (véase Gráfica 4.20).

Es de aceptación generalizada que ciertas variables, y determinadas características de los pacientes, influyen de manera decisiva sobre el resultado terapéutico en todos los tipos de cáncer. También, en cáncer vesical superficial la variabilidad de determinados factores es

determinante de la curación, la recurrencia, la invasión y la metástasis. La identificación precisa de estos factores proporciona elementos que orientan decisivamente la elección del tratamiento. Un problema que debe ser considerado es que frecuentemente los factores de pronóstico correlacionan unos con otros y esto ha llevado a examinar con detalle su relativa importancia. Procediendo así, se ha sugerido que los pacientes afectados de tumores superficiales pueden ser agrupados en tres clases caracterizadas por diferente pronóstico (Kurth y cols., 1995). Para el estudio de la probabilidad de permanecer libre de enfermedad, o sobrevivir cierto tiempo al cáncer vesical, los factores que habitualmente son tomados en consideración son: edad, sexo, tamaño del mayor tumor, número de tumores, categoría T, Grado (G), recurrencia anterior y localización tumoral. Todas las variables anteriormente reseñadas se ponen en relación con el tiempo que transcurre desde el tratamiento de la enfermedad primitiva. En estos estudios la variable independiente es el tiempo de observación, mientras que la dependiente es la supervivencia libre de enfermedad (S.L.E) o la supervivencia global (S.G), según sea el caso. La aplicación del método requiere la estratificación de los pacientes en grupos definidos por alguna característica personal o particular de su tumor (por ejemplo, el género o el grado de diferenciación). El peso relativo de cada uno de los factores sobre la función de S.G o de S.L.E se puede estudiar aplicando el modelo de regresión de Cox para riesgos proporcionales y, tras el estudio y ajuste estadístico, es posible definir cuáles son los parámetros de influencia relevante sobre la probabilidad de recurrencia, o de muerte. Y con el fin de entender, de manera más completa, la historia evolutiva de las enfermedades neoplásicas se pueden establecer determinados grupos de pronóstico. Esta estrategia podría permitir la modulación de la agresividad del tratamiento a emplear en función del coeficiente de riesgo que individualmente se asigna a cada paciente (Ruiz de Almodóvar y cols., 1994; Kurth y cols., 1995).

Para el cáncer vesical categoría Ta/T₁ los factores que primordialmente intervienen en el pronóstico son:

- a) Rapidez con la que aparece la recurrencia (tasa de recurrencia: < 1 año, 1-3 años, > 3 años)
- b) Grado (G I, II, III) y
- c) Tamaño del tumor (< 1,5 cm, 1,5-3 cm, > 3 cm).

A partir de los datos de supervivencia y supervivencia libre de enfermedad y de los coeficientes de riesgo encontrados, Kurth y colaboradores (1995) han definido tres grupos: 1) Bajo, 2) Moderado y 3) Alto riesgo de recurrencia y de muerte por enfermedad tumoral. De acuerdo con sus ideas para el Grupo 1 (bajo G, pequeño tamaño y recurrencia tardía o ausente a los tres años) la probabilidad de S.L.E a los 6 años se sitúa en torno al 93%; para el Grupo 2 (G II, cualquier T (Ta/T₁), recurrencia anterior positiva a t < 3 años) la probabilidad de S.L.E a 6 años alcanza el 82,5%; y para el Grupo 3 (GIII, cualquier T, Recurrencia positiva) la probabilidad

de S.L.E sólo es del 35,5%, mientras que la probabilidad de muerte por enfermedad tumoral alcanza al 40% de los pacientes que reúnen las características del Grupo 3 de riesgo.

Los resultados de esta memoria son demostrativos de la importancia que sobre el pronóstico de S.L.E y de S.G ejercen:

5.2.4.a.- Grado de diferenciación del tumor

En efecto, aproximadamente el 65% de los pacientes con grado GI o GII permanecen libres enfermedad a los 18 meses del diagnóstico y tratamiento inicial del tumor vesical. En contraposición sólo 1 de cada 4 de los enfermos cuyo tumor fue clasificado como GIII, permanece a ese tiempo libre de enfermedad. La influencia de este parámetro sobre la probabilidad de muerte por enfermedad es también manifiesta (véanse las Gráficas 4.13 y 4.14). Recordemos aquí que, según los datos obtenidos, la estimación de probabilidad de supervivencia global para pacientes con tumores de Grado III es de sólo el 37% de los enfermos inicialmente incluidos en la serie de estudio.

5.2.4.b.- Invasión "T" del tumor en la pared vesical

Las estimaciones de probabilidad de supervivencia libre de enfermedad para los enfermos recogidos en este trabajo oscilan entre el 69% para los tumores T₁ y el 33% para los T₃. Tras realizar un análisis estadístico univariante se ha podido demostrar que estas diferencias son significativas lo que confirman otros muchos hallazgos análogos publicados con anterioridad (Parmar y cols., 1989). Sin embargo, el criterio T ha sido sometido a crítica por cuanto en análisis de regresión múltiple, no parece ser un factor de pronóstico independiente de G y su inclusión dentro del modelo de Cox no mejora la separación entre los diferentes grupos de pronóstico (Kurth y cols., 1995). Se ha indicado que la sobrestimación del carácter T puede ser la causa que explique la falta de coherencia de los datos encontrados en la literatura médica cuando se comparan trabajos de distintos autores (Osterlink y cols., 1993).

5.2.4.c.- Invasión vascular

El análisis de relación entre la probabilidad de supervivencia y de supervivencia libre de enfermedad y la presencia/ausencia de la invasión vascular, evidenciable en el espécimen procedente de biopsia, ofrece, en la serie aquí estudiada, resultados contradictorios. Así, mientras que las diferencias para la estimación de S.L.E no alcanzan el umbral ($P < 0.05$) que se acepta como límite de significación estadística, el valor que ofrece la comparación de los datos de supervivencia global es claramente significativo. No existiendo ninguna razón que explique el por qué de la inconsistencia, por contradictorios, de uno y otro hallazgo, nos inclinamos a pensar

que la IV puede ser dependiente del grado de penetración del tumor en la pared vesical, y del grado de diferenciación y, que por ello, el hallazgo aquí descrito debe carecer de relevancia. Y tanto más, por cuanto la invasión vascular no es un parámetro que haya despertado la atención de los investigadores que se han ocupado de este tema a lo largo del tiempo (Bane y cols., 1996).

5.2.4.d.- Multicentricidad

Con los resultados de este trabajo no puede confirmarse el papel que, como determinante de pronóstico de S.L.E, en pacientes con cáncer vesical superficial, se ha atribuido a la presentación del tumor en forma múltiple o en forma de lesión única que debe ser objetivada en el primer examen cistoscópico. Ahora bien, se debe decir que la significación estadística atribuible a la multicentricidad se ha encontrado al definir dos grupos constituidos por pacientes con 6 o menos tumores frente a un grupo de enfermos que presentaban 7 o más lesiones en el momento del diagnóstico inicial (Kurth et al, 1995). Desgraciadamente, en los datos de este trabajo no se ha recogido la multicentricidad tumoral con la precisión suficiente como para poder contrastar la influencia de este parámetro sobre el pronóstico de recurrencia tumoral. No obstante, conviene hacer notar que la S.L.E es inferior en el grupo de pacientes con tumor multicéntrico (véase Grafica 4.18) aunque las diferencias carecen de significación estadística.

5.2.4.e.- Tratamiento

En relación al tratamiento, cuyos resultados se han comentado parcialmente en un apartado anterior, cabe destacar que:

- i) la S.L.E es superior en el grupo de enfermos tratados con la combinación Cirugía + Quimioterapia + Radioterapia frente a la S.L.E encontrada en el grupo de personas en las que el tratamiento contempló medidas quirúrgicas exclusivas, y
- ii) la S.L.E es también superior en el grupo de pacientes tratados con RTU + Quimioterapia endovesical, respecto a la encontrada como estimación de probabilidad de S.L.E en el grupo en el que sólo se hizo RTU,
- iii) a pesar de ello, la comparación estadística de las correspondientes curvas, de supervivencia utilizando el test log-rank, demuestra que tales diferencias, a un cuando claras, no alcanzan la significación estadística deseada para pronunciarse acerca de la superioridad de un tratamiento sobre otro.

- iv) de cualquier forma, no siendo este el objetivo esencial del trabajo que se presenta como memoria de Tesis Doctoral, parece prudente proceder a dejar este tema aquí, enunciando simplemente los resultados encontrados y no profundizando más en su discusión.

5.3.- VALORACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *p16^{INK4a}* COMO MARCADOR TUMORAL EN CÁNCER VESICAL

5.3.1.- Marcadores moleculares para el estudio del cáncer

En la actualidad, y después de varias décadas dedicadas al estudio de los patrones de expresión de determinados genes y de las anomalías que en ellos es frecuente encontrar, la hipótesis de trabajo prevalentemente utilizada para explicar la génesis tumoral, postula que la acumulación de determinadas alteraciones genéticas y epigenéticas actúa sinérgicamente sobre la dinámica celular y conduce a la progresión del tumor (Volgstein y cols., 1988; Linehan y cols., 1997). El resultado final es que las células del tumor poseen ventajas selectivas de manera que en su crecimiento pueden crear las condiciones necesarias para que se produzca la incontrolable diseminación de la enfermedad. Además, desde hace sólo unos años, se postula que el cáncer es una enfermedad epigenética, al menos en el mismo nivel en que una enfermedad tumoral maligna puede ser considerada una enfermedad genética. (Esteller y Herman, 2002a). De hecho, los cambios epigenéticos, particularmente los cambios en el estado de metilación del ADN, son excelentes candidatos para explicar cómo ciertos factores medioambientales pueden incrementar el riesgo de cáncer. La delicada organización de la cromatina y los estados de metilación de la misma que son responsables de la homeostasis de la expresión de proteínas en las células normales, cambian de tal manera en el cáncer que a nivel molecular las células neoplásicas pueden llegar a ser totalmente irreconocibles. El genoma de las células transformadas adquiere simultáneamente dos modificaciones sustanciales: en primer lugar una global hipometilación genómica y en segundo una densa hipermetilación a nivel de las islas CpG que se encuentran en las regiones reguladoras de numerosos genes. Estas asimetrías en la distribución de los grupos metilo contrastan fuertemente con el nivel de metilación que es posible encontrar en las células normales. Estas dramáticas alteraciones pueden conducir a inestabilidad cromosómica, activación de secuencias parásitas endógenas del ADN, a la pérdida de la actividad genómica heredable (imprinting) y a fenómenos de expresión ilegítima, aneuploidia, mutaciones. También pueden contribuir al silenciamiento de los genes tumor-supresor. La metilación de la citosina ocurre después de la síntesis de ADN, a través de un proceso enzimático de transferencia de un grupo metilo desde el donante de metilo: S-adenosil-metionina al carbono situado en posición 5 en la citosina. La reacción enzimática se cataliza por un conjunto de enzimas denominados DNA metil transferasas (DNMTs). El principal motivo de reconocimiento de las DNMTs es el dinucleótido

5'-CpG-3'. El dinucleótido CpG es el único cuya representación en el genoma está claramente por debajo de la que, en términos estadísticos, debería corresponderle y se explica este hecho por la elevada frecuencia con la que ocurren las mutaciones transicionales desde metil-citosina a la timidina. Además, los dinucleótidos CpG están distribuidos de una manera no aleatoria en el genoma: en su mayor extensión las secuencias de ADN son deficientes en dinucleótidos CpG y mayoritariamente esta asociación se encuentra localizada en forma de clusters localizados en regiones concretas del genoma a las que se denomina islas CpG. Los dinucleótidos CpG no están metilados en las células normales salvo en aquellos genes que contienen la información que selectivamente se expresa desde el alelo materno o paterno del genoma (imprinting) y en los genes del cromosoma X inactivo. Ahora sabemos que algunos genes, no regulados por imprinting, también pueden contener grupos CpG metilados y esto podría ser un mecanismo que permitiera regular la expresión del gen (Futsher y cols., 2002). Por otra parte, la mayor parte de las citosinas metiladas se encuentran localizadas lejos de las islas CpG y de manera especial en las secuencias repetitivas (Poder y cols., 1997). La metilación de algunas islas de CpG en tejidos normales aumenta con la edad (Issa y cols., 1994; Ahuja y cols., 1998), pero el contenido total en citosinas metiladas disminuye. Hallazgos absolutamente contrapuestos y más pronunciados se encuentran en las células tumorales. Se han demostrado, recientemente, cambios específicos en el patrón de metilación de las células de los tumores humanos tanto en la hipermetilación de las islas CpG como en la hipometilación generalizada del ADN genómico (Jones y Baylin, 2002; Jones y Laird, 1999; Esteller, 2002b). En los últimos dos años se ha producido un enorme avance en el conocimiento de las consecuencias funcionales de la metilación del ADN y de la interacción de este acontecimiento con la conformación de la cromatina y la actividad de la maquinaria celular responsable de la transcripción del ADN, también se ha avanzado algo en cuáles son las razones que provocan el cambio del patrón de metilación en las células del cáncer aunque la parte fundamental de este proceso continúa siendo un enigma (Di Croce y cols., 2002). Desde un punto de vista clínico, los cambios en el patrón de metilación del ADN pueden ser un objetivo sobre el que enfocar el desarrollo de fármacos antineoplásicos. En efecto, el estado de metilación del ADN es potencialmente modulable; por ello se cree que la normalización del epigenotipo es más fácil de conseguir que la restauración del genoma alterado en las células de los procesos neoplásicos (Karpf y Jones, 2002). Sin embargo la gran fortaleza de los estudios de metilación del ADN en oncología clínica parece estar situada en el área del diagnóstico y de la detección precoz del cáncer (Laird, 2003).

Parece evidente que la detección del cáncer en estadios precoces es una posibilidad que, teóricamente, ofrecen las nuevas metodologías analíticas aplicadas al ADN. Estas técnicas, al tomar como material para el análisis muestras séricas o urinarias, se pueden considerar como mínimamente invasivas, y entre los resultados que es previsible obtener, se pueden incluir el diagnóstico oncológico en estadios tumorales no invasivos o mínimamente invasores.

Es sobradamente conocido que el diagnóstico precoz aumenta las probabilidades de curación y facilita la aplicación de terapias efectivas, con un escaso coste económico y de

morbimortalidad asociada al tratamiento de los pacientes afectos de enfermedades neoplásicas. En este sentido, se ha comunicado (Anker y cols., 1999; Botezatu y cols., 2000; Serdyuk y cols., 2001), que es posible detectar la presencia de ADN de procedencia tumoral, en la orina de los pacientes, incluso en casos de cáncer no urológico. Esto demuestra que moléculas pequeñas de ADN pueden atravesar la barrera renal y ser excretadas a la orina. Si este hallazgo se confirma en series de pacientes más extensas, los análisis de orina en busca de ADN tumoral podrían convertirse en una herramienta válida para el despistaje de muchas patologías tumorales. Para ello, es necesario saber cuáles son las alteraciones en el ADN que, en la muestra, deben ser buscadas para identificar el origen de la anomalía.

La utilización de fragmentos de ADN como marcador tumoral se fundamenta en que, aun estando presente en menor número de copias por célula que el ARNm, el ADN es una molécula muy estable (Sidransky, 1997). Una alternativa de interés es el estudio del ADN mitocondrial (ADNmt) puesto que el número de copias, por célula, que de esta molécula existen, es del orden de 20-2000 (Fliss y cols., 2000; Marusic, 2001). Esto también pueden proporcionar ventajas analíticas en situaciones forenses complejas (Marusic, 2001). Sin embargo, nuestro conocimiento actual es muy limitado por cuanto las mutaciones del ADN mitocondrial son escasamente frecuentes tanto en cáncer urológico (Jerónimo y cols., 2001a), como en los tumores no urológicos (Hibi y cols., 2001; Liu y cols., 2001). Otra idea que puede permitir el avance de nuestros conocimientos es, además del análisis de ADNmt, la detección de ADN viral en pacientes afectos de cáncer como biomarcador sérico de su proceso neoplásico (Lo y cols., 2000; Pornthanakasem y cols., 2001). Sin embargo, a excepción del ADN del papiloma virus humano (VPH) en un subgrupo de pacientes con cáncer de pene (Bezerra y cols., 2001; Rubin y cols., 2001), los tumores urológicos no parecen estar asociados con infecciones víricas por lo que esta línea de investigación parece de menor interés en urología.

5.3.2.- *p16^{INK4a}* sérico como marcador tumoral vesical

Todo lo anterior ha llevado a la realización de esta memoria, de la que forma parte el trabajo publicado en *European Urology* en su número de diciembre de 2002 por Valenzuela y cols. (Anexo I). En dicho manuscrito se plantea el objetivo de evaluar el papel que la hipermetilación del promotor de *p16^{INK4a}* juega en la carcinogénesis vesical. Como derivado del tumor, el ADN puede detectarse en el suero sanguíneo de pacientes con cáncer. Se ha estudiado si esta anomalía podría servir como marcador plasmático de la presencia de enfermedad en un grupo bien diseñado de pacientes con cáncer vesical.

En el cáncer vesical existe una conexión etiológica con diferentes tipos de alteraciones genéticas y epigenéticas (Revisadas por Reznikoff y cols., 2000; y Dalbagni y cols., 1993). Dichos cambios epigenéticos, concretamente la hipermetilación aberrante del promotor que se asocia con silenciamiento genético, afectan virtualmente a todos los pasos en la progresión del tumor (Jones y Baylin, 2002). Como se ha observado en otros tumores, esos cambios en la

metilación de genes promotores específicos podrían también detectarse gracias a análisis de ADN de fluidos corporales, como el suero sanguíneo (Belinsky y cols., 1998; Wong y cols., 1999; Silva y cols., 1999b; Sánchez-Céspedes y cols., 2000), utilizando técnicas altamente sensibles. Esto podría proporcionar nuevos métodos para obtener marcadores tumorales e información pronóstica.

Uno de los actuales desafíos de los clínicos, es la identificación de pacientes con alto riesgo de presentar recurrencia o metástasis. Los marcadores biológicos pueden cuantificar acontecimientos celulares bioquímicos, genéticos o epigenéticos; estos marcadores podrían ser, potencialmente, más sensibles para la predicción y monitorización de las neoplasias que los métodos histopatológicos convencionales. El silenciamiento génico se ha asociado a metilación de los CGI localizados en los promotores y en las regiones reguladoras 5' (Bird, 1986; Toyota y cols., 1999); sin embargo muchos trabajos continúan realizándose para identificar cuáles de las islas CpG son importantes y analizar si esos cambios epigenéticos muestran un patrón de tipo específico (Costello y cols., 2000).

Este estudio se realizó para evaluar la frecuencia y la relevancia clínica potencial de la detección en suero de pacientes con tumores vesicales primarios del promotor hipermetilado de *p16^{INK4a}*. Los resultados obtenidos muestran que existe una estrecha relación estadística entre metilación de *p16^{INK4a}* en tumor y suero en muestras del mismo paciente y además su identificación en suero está fuertemente relacionada con la metilación aberrante de *p16^{INK4a}* en el tumor y con el diagnóstico del cáncer. Se examinó el ADN extraído del suero de pacientes y controles. Ninguno de los controles sanos presentó el alelo metilado y sólo 1 de los 13 pacientes de patologías urológicas benignas presentó dicha alteración. En ese caso, la aberración se detectó tanto en la muestra sérica como en la de tejido vesical. Este paciente está bajo seguimiento clínico. Una posible explicación a este fenómeno puede ser que la hipermetilación de *p16^{INK4a}* podría ser un paso inicial en la evolución que lleva a las lesiones premalignas hacia la neoplasia. Algo similar se ha descrito en cáncer gástrico (Toyota y cols., 1999) y carcinoma de colon (González-Zulueta y cols., 1995).

De un lado, se ha detectado *p16^{INK4a}* hipermetilado en suero de 25 de 137 pacientes con cáncer vesical. También se ha estudiado *p16^{INK4a}* hipermetilado en suero en otros tipos de neoplasias como el cáncer hepatocelular (Wong y cols., 1999), mama (Silva y cols., 1999b), cabeza y cuello (Sánchez-Céspedes y cols., 2000) y pulmón (Esteller y cols., 1999b) pero, por la bibliografía consultada, es la primera vez que esta alteración se describe en suero de pacientes con cáncer vesical. El porcentaje que se ha obtenido (18,3%), es semejante al observado en los estudios de mama y cabeza-cuello, pero es inferior al descrito para hígado o pulmón. También es una tasa similar a la descrita por Chan y cols. (2002) usando muestras de orina para el análisis.

Por otro lado, la detección de metilación del promotor de *p16^{INK4a}* en pieza tumoral ha sido evaluado en cáncer hepatocelular (Wong y cols., 1999), mama (Silva y cols., 1999b), cabeza

y cuello (Sánchez-Céspedes y cols., 2000) y pulmón (Esteller y cols., 1999b). Incluso la hipermetilación de ADN de múltiples genes ha sido analizada en la leucemia mieloide aguda (Melky y cols., 1999), cáncer gástrico (Esteller y cols., 1999), cáncer vesical (Salem y cols., 2000). El perfil de la hipermetilación génica en el cáncer humano, ha sido revisada recientemente (Esteller y cols., 2001a). Como en los estudios mencionados, el tamaño tumoral, la extensión o el grado de diferenciación no parecen tener relación con la aparición de $p16^{INK4a}$ metilado en suero de pacientes con cáncer vesical. Datos publicados por otros autores ofrecen resultados mezclados. Chan y cols. (2002) no encuentra asociación entre el estado de metilación y el grado de diferenciación o el grado de invasión tumoral. Esteller y cols. (2000c) hallaron que la metilación de cuatro genes (*CDH1*, *RASSF1A*, *APC* y *CDH13*) se correlacionaba con varios parámetros de mal pronóstico, pero no con otros como *FHIT* o *GSTP1*. Sin embargo, Silva y cols. (1999) expusieron que la presencia de ADN tumoral metilado en suero, se correlaciona significativamente con parámetros patológicos de mal pronóstico en cáncer de mama. Todos estos datos concernientes a la extensión de la enfermedad tumoral, la presencia de ADN plasmático, las características tumorales, no ofrecen una explicación concluyente. Esto puede sugerir que otras características desconocidas biológicas de las células tumorales podrían relacionarse con estos fenómenos. Un posible factor de confusión puede ser la presencia de metilación edad-dependiente en epitelio normal, lo que sustenta la idea de que la hipermetilación de las islas CpG es un acontecimiento precoz en el desarrollo del CCT.

En cualquier caso, los cambios en el patrón de metilación pueden preceder a la inestabilidad genética dentro del CGI de este gen (Belinsky y cols., 1998). Los hallazgos de este trabajo ligan la metilación aberrante de $p16^{INK4a}$ a la presencia de cáncer vesical y esto sugiere el uso potencial de este cambio epigenético como un marcador biológico para identificar a personas con alto riesgo de padecer o que ya padecen la enfermedad. En la serie estudiada, el 68,75% de los pacientes que presentaron esta alteración en el tumor, también la presentaron en suero. La discrepancia entre tumor y suero en aquellos cinco pacientes antes descritos podría ser el resultado de la carencia o bloqueo de la incorporación del ADN libre del tumor desde las células tumorales hacia la sangre o de un posible incremento del nivel de degradación del ADN por nucleasas.

Los marcadores biológicos uroteliales usados tanto en plasma como en secreciones tisulares, se irán haciendo progresivamente más importantes para el tratamiento, pronóstico de invasión, metástasis y recurrencia. Para optimizar los resultados será esencial confeccionar un esquema de marcadores séricos capaces de detectar los cambios moleculares en el ADN plasmático para cada tumor de los ADN normales metilados y no metilados procedentes de linfocitos u otras células. Por ejemplo, se ha descrito el silenciamiento epigenético en genes de tumores diferentes para acrecentar la sensibilidad a algunos fármacos (Maruyama y cols., 2001) o tumores con un alto grado de metilación pueden ser idóneos para tratamiento con inhibidores de la metilación (Toyoya y cols., 2000). Además, la alteración en la estructura de la cromatina por

desacetilación de histonas y la metilación de ADN, se han relacionado a desarrollo de cáncer y a mayor resistencia al tratamiento. Podría intentarse mejorar la respuesta clínica de algunos pacientes de cáncer vesical pero no en aquellos sin genes promotores metilados en sus tumores. Eso, además, podría conllevar una personalización del tratamiento. En cualquier modo, si el pretratamiento con células cancerosas con 5-aza-2'-deoxicitidina (Inhibidor de la metiltransferasa) sensibiliza las células frente a la quimioterapia o la radioterapia incrementando fenómenos antiproliferativos, necróticos o de apoptosis celular debería investigarse con mayor profundidad.

Los resultados obtenidos sugieren que el promotor de $p16^{INK4a}$ permanece alterado contribuyendo a la carcinogénesis vesical. Los cambios no dan una imagen comprensible de todas las modificaciones posibles que tienen lugar en esta clase de tumor, porque el ensayo utilizado está muy focalizado. Además, se ha descrito que el 89% de los tumores vesicales incrementan la metilación de CGI relacionado con el tejido normal circundante, y que el número de marcadores metilados simultáneamente en tumores individuales se incrementa con su estadio. Este hecho sugiere la existencia de un fenotipo hipermetilador cuyos múltiples CGI independientes persisten simultáneamente metilados en un proceso que se asocia a la progresión tumoral (Toyoya y cols., 2000). Una amplia gama de estudios clínicos, una más profunda investigación y una mejor comprensión de la biología del cáncer, serán los pasos esenciales que permitan desarrollar marcadores tumorales fiables. En ese sentido, un importantísimo artículo de Evron y cols. (2001a) propone una estrategia basada en la detección de cambios en la metilación de un perfil de varios genes que se encontrarían metilados en muestras de líquido procedente del lavado de los ductos mamarios con cáncer de mama, pero no así en las células epiteliales mamarias sanas.

Es importante resaltar que el presente estudio no pretende hacer una evaluación profunda de la significación pronóstica de $p16^{INK4a}$ metilado en cáncer vesical, aunque sí intentar valorar su asociación potencial con la presencia de rasgos tumorales en el momento de la primera cirugía. Sin embargo, estudios más profundos en los que se disponga de un mayor número de pacientes serán necesarios para determinar su exactitud y capacidad de expansión para el diagnóstico. A causa de la prevalencia e incidencia del cáncer vesical, el descubrimiento en suero de marcadores válidos debería tener fuerte impacto en el manejo y supervivencia de los pacientes. La línea de nuestros futuros trabajos (ya en marcha), es la de profundizar en el estudio de la utilidad clínica de la metilación de $p16^{INK4a}$ y de otros promotores génicos en los pacientes de cáncer vesical mediante un diseño prospectivo con un seguimiento a largo plazo. Ese estudio podría proporcionar información definitiva sobre la metilación génica como factor de pronóstico y de seguimiento en el cáncer vesical.

Una copia de ese trabajo se ha incluido al final del capítulo de Discusión (Anexo I). El trabajo mereció en la Revista European Urology el Comentario Editorial que acompaña a la copia de la publicación y cuya traducción resumimos en los párrafos que siguen.

5.3.2.a.- Comentario editorial al artículo:

- Título: Assessing the use of *p16^{INK4a}* promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer.
- Autores: Valenzuela MT, Galisteo R, Zuluaga A, Villalobos M, Núñez MI, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM.
- European Urology 2002; 42:622-630.

El comentario ha sido realizado por el Dr. W Nelson del Departamento de Oncología del Johns Hopkins Research Center de Baltimore. EEUU.

Las células cancerosas humanas contienen típicamente millares de defectos genéticos adquiridos, incluyendo mutaciones, deleciones, amplificaciones, translocaciones, acortamiento de telómeros y metilación alterada de ADN. Muchos de esos cambios genéticos somáticos pueden detectarse con una extraordinaria sensibilidad y especificidad gracias al uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ese motivo, ha habido un gran entusiasmo ante la posibilidad de utilizar ensayos basados en la detección de alteraciones somáticas génicas mediante PCR con el fin de establecer pruebas clínicas útiles para el despistaje, diagnóstico, detección, estadiaje, pronóstico y tratamiento del cáncer. Además, ese entusiasmo se ha incrementado gracias a informes de varios estudios de “prueba de principio” llevados a cabo con éxito (Sidransky, 2002).

La metilación aberrante del ADN parece particularmente atractivo como marcador tumoral molecular asociado al cáncer. El dinucleótido autocomplementario CpG habitualmente lleva ^{5-m}C en las células de mamífero normales, excepto cuando los dinucleótidos CpG se agrupan en regiones de ≈ 1 kilobase, frecuentemente acompañando a las regiones génicas reguladoras de la transcripción, en los genomas llamadas islas CpG (Bird, 1986). La patogénesis del cáncer se acompaña de forma estereotipada por una generalizada reducción en la metilación del dinucleótido CpG, con un incremento de la metilación de los dinucleótidos CpG presentes en las islas CpG de ciertos genes críticos (Jones y Baylin, 2002). La hipermetilación de las islas CpG provoca la inhibición de la transcripción génica, silenciando a los genes de forma eficaz, de un modo similar a la deleción génica o a una mutación genética inactivadora, lo que proporciona alguna manera de ventaja selectiva durante el desarrollo del cáncer. La mayor ventaja, como marcador tumoral molecular asociado al cáncer, de la hipermetilación de islas CpG es que da lugar a cambios en genes específicos que, muy a menudo, son muy semejantes entre caso y caso; lo que permite el uso de un simple ensayo basado en la PCR para la mayoría de los casos de cáncer (Esto la distingue de otras normalidades somáticas genómicas como las mutaciones y deleciones). Por ejemplo, la casi totalidad de los cánceres prostáticos presentan hipermetilación de islas CpG del gen *GSTP1*; hasta ahora los ensayos basados en PCR desarrollados pueden

detectar el marcador biológico tumoral en más del 90% de los casos (Lin y cols., 2001; Lee y cols., 1997; Jerónimo y cols., 2001b). Se han desarrollado dos estrategias con PCR para detectar secuencias anómalas de metilación de islas CpG presentes en células tumorales. La primera supone un tratamiento con endonucleasa de restricción que corta selectivamente la secuencia que reconoce sólo si no contiene 5-mCpG , seguida de amplificación por PCR utilizando primers dirigidos al gen que interese. Si el dinucleótido CpG en el lugar de reconocimiento del enzima de restricción no contiene 5-mCpG , como sería de esperar en todo islote CpG presente en genomas de células normales, la secuencia diana se destruye y no aparecen productos tras la PCR. Sólo si en el lugar de reconocimiento del enzima de restricción existe 5-mCpG podría persistir la secuencia diana al tratamiento del enzima de restricción produciéndose el producto esperado en la ampliación con PCR (Lee y cols., 1997). Esta aproximación se encuentra, no obstante, limitada por la aparición de falsos positivos en el ensayo que aparecen como resultado de una deficiente destrucción de las dianas de las islas CpG normales por los enzimas de restricción. La segunda estrategia, actualmente más utilizada que la anterior, se denomina PCR específica para metilación (MSP), lleva a cabo una modificación con bisulfito del ADN genómico seguida de PCR (Herman y cols., 1996). Como consecuencia de este procedimiento, en los productos de la PCR, la C se transforma en T, mientras la 5-mC sigue siendo C, esto transforma una diferencia en el ADN metilado en una diferencia en la secuencia de ADN. Con primers de PCR convenientes, las secuencias de islas CpG hipermetiladas pueden distinguirse rápidamente de las secuencias de islas CpG no metiladas. Esta técnica queda limitada levemente en su sensibilidad, ya que la reacción de modificación con bisulfito tiende a dañar el ADN, lo que ocasionalmente genera una amplificación de ADN insuficiente.

En el trabajo, publicado por los autores se describe el uso de MSP para la detección de secuencias de islas CpG de $p16^{\text{INK4a}}$ anómalas hipermetiladas en suero de pacientes con cáncer vesical. Probablemente, lo esencial del trabajo se encuentre en el hecho de disponer, en el mismo momento, de dos muestras, una de suero y otra de tumor, de los 69 pacientes de cáncer vesical incluidos en el estudio. Aunque sólo en 16 de las 69 muestras tumorales (23%) se encontró la presencia de islas CpG de $p16^{\text{INK4a}}$ hipermetiladas, detectables por MSP, en 11 de esos 16 casos (68,75%) también se pudo detectar la presencia de $p16^{\text{INK4a}}$ hipermetilado en la muestra de ADN extraído del suero. Por otra parte, los 53 pacientes restantes, no presentaron islas CpG de $p16^{\text{INK4a}}$ hipermetiladas ni en el ADN del suero ni en el del tumor. Sólo en 1 de 13 pacientes urológicos no tumorales aparecieron islas CpG de $p16^{\text{INK4a}}$ hipermetiladas en el ADN sérico mientras que en ningún caso se detectó esta alteración en los 31 controles sanos. Estas observaciones sugieren que la prueba sérica en busca de secuencias anómalas de islas CpG podría ser satisfactoria en la detección de cáncer vesical en el 80-90% de los casos, si las dianas génicas son adecuadas.

¿Como podría afectar a la práctica urológica el uso de la detección mediante MSP de islas anómalas de CpG hipermetiladas como marcador tumoral? En tumores de riñón, próstata y urotelio, el ADN de las células tumorales puede aparecer en sangre, suero o plasma, nódulos

linfáticos, en orina, fluido prostático o en el eyaculado. Cada tipo de tumor podría tener un diferente patrón de hipermetilación de islas CpG, quizás permitiendo tanto un diagnóstico como una detección sensible (Esteller y cols., 2001a). Las diferencias en los perfiles de hipermetilación de CpG podrían también anticipar el pronóstico terapéutico para tumores específicos. Para una profunda evaluación de estos nuevos marcadores tumorales, se necesitará un catálogo más completo con los cambios genéticos somáticos de hipermetilación de las islas CpG del ADN de tumores urológicos, profundizar y refinar en la detección de dichos cambios y una mayor crítica analítica del valor predictivo y los tests de utilidad de marcador biológico molecular para validar la práctica clínica. Con la tranquilidad de acceder a un amplio rango de muestras clínicas, potencialmente útiles de tumores urológicos, el campo de la Urología puede liderar y ser pionero en la aplicación clínica de los marcadores biológicos tumorales para todos los cánceres humanos.

5.4.- ESTADO DE METILACIÓN Y CÁNCER VESICAL

La extensa revisión crítica de la bibliografía relacionada con el tema de la hipermetilación de promotores de ciertos genes y su asociación con el diagnóstico del cáncer (en su mayor parte ya referida en apartados anteriores) ha puesto de manifiesto que la metilación de un gen como $p16^{INK4a}$ puede resultar insuficiente para hacer un diagnóstico eficaz en pacientes afectos de cáncer vesical. En otras palabras, apoyándonos en los resultados de este trabajo, la detección de $p16^{INK4a}$ resulta muy específica pero poco sensible. Esta limitación podría corregirse o subsanarse a través de la definición de un mapa o perfil epigenético mediante el que sea posible la evaluación simultánea de múltiples genes que puedan estar hipermetilados en el tumor. De hecho, aunque los mecanismos de la carcinogénesis vesical no están suficientemente esclarecidos, la metilación aberrante de islas CpG no metiladas, situadas dentro de, o próximas a, la región promotora de varios genes se ha asociado con la inactivación de la transcripción de dichos genes y este fenómeno parece estar en relación con el desarrollo de los procesos tumorales. Así, se ha demostrado la metilación aberrante en secuencias correspondientes a los genes: *hMLH1*, *MGMT*, $p16^{INK4a}$, *VHL*, *GSTP-1*, *DAP-Kinasa* y *E-cadherina*, (Herman y cols., 1994; Esteller y cols., 1998). Tada y cols., (2002) han valorado recientemente la frecuencia con que se presentan estas alteraciones epigenéticas en cáncer vesical y la relación que el estado de metilación puede guardar con la recurrencia tumoral. En $p16^{INK4a}$ encuentran la hipermetilación en el 11% de los casos estudiados (valor que comparativamente resulta similar al encontrado en este trabajo). Es muy interesante la observación, que Tada y cols., encuentran al analizar la asociación entre recurrencia y metilación de determinados genes. De su trabajo se deduce que existe un mayor riesgo de recurrencia cuando se demuestra la existencia de hipermetilación en los genes: *hMLH1*, *MGMT*, *VHL* y *DAP-Kinasa*. Además, los estudios de estimación de probabilidad de

supervivencia libre de enfermedad, en los pacientes recogidos en esa serie, son demostrativos de que la presencia, en el tumor, de tres o más genes aberrantemente metilados, se relaciona con una mayor tasa de recurrencia. De todos los genes que analizan, el que se asocia de forma más significativa con el pronóstico de la enfermedad es el *DAP-Kinasa*. En efecto, en situación de hipermetilación de *DAP-Kinasa* demostrable en la muestra del tumor, el 88% de los pacientes que poseen esta alteración presentaron recurrencia a los 24 meses. Este hallazgo se refuerza tras la aplicación de estudio mediante análisis multivariante (o regresión logística de Cox) en el que se demuestra que los factores que determinan el pronóstico de SLE en cáncer vesical son el Grado (G), la penetración del tumor en la pared vesical (T) y la metilación de *DAP-Kinasa*. Este dato, que caracteriza molecularmente el tumor, parece ser el factor pronóstico más importante en el intento de predicción de la recurrencia tumoral. *DAP-Kinasa* es un gen que codifica una proteína que interviene en la ruta de apoptosis y que está en relación con el IFN- γ (Deiss y cols., 1995), TNF- α , Fas y además interviene en las vías apoptóticas controladas por p53 (Raveh y cols., 2001). De los hallazgos descritos en patología vesical podría decirse que las causas de la recurrencia del tumor están asociadas a: i) la pérdida de capacidad apoptótica de las células neoplásicas, ii) el acúmulo de cambios genéticos y epigenéticos en genes tumor supresor y en genes relacionados con la fármacorresistencia, y iii) la capacidad de las células descamadas del tumor primitivo de asentarse en el urotelio vesical.

Comparando la parte más reciente de este trabajo con el publicado por de Tada y cols., puede decirse que en uno y otro trabajo hay coincidencia en dos de los genes analizados *p16^{INK4a}* y *hMLH1* y disparidad en el resto puesto que en esta memoria se ha analizado *Ciclina D2*, *RAR- β* , *Twist* y *σ -14-3-3* mientras que Tada y cols., analizan otros distintos. Es interesante comprobar que cuando en el tumor aparecen tres o más genes metilados, el pronóstico de la enfermedad se ensombrece y este hallazgo, que parece relevante, parece también intuirse en el análisis de la serie de casos que se reproduce en esta memoria. En efecto, del estudio de la S.L.E en la serie evaluada, se puede deducir que es real la existencia de diferencias entre el comportamiento biológico de los tumores vesicales cuando en el tumor existe un patrón de metilación fuertemente alterado. Quizás los datos obtenidos no sean concluyentes debido a que, entre los promotores que se han analizado, se ha incluido el de *Ciclina D2*, cuya alteración en cáncer vesical es infrecuente (de acuerdo con estos datos este hallazgo acontece raramente, siendo su frecuencia del orden del 5%); y, además, no se ha incluido en el estudio el análisis del estado de metilación de *DAP-kinasa*.

Para terminar este apartado, decir que nuestro objetivo es continuar este trabajo. Se intentará, la definición, tan precisa como sea posible, del perfil epigenético del cáncer vesical, para, de esta manera, lograr un acercamiento al conocimiento de cuáles son los pacientes con mayor riesgo de recidiva o progresión tumoral y, en función de esa estimación del riesgo, adecuar el tratamiento a las características biológicas predecibles del tumor de manera que se aporten elementos que hagan posible la mejora de los índices de supervivencia libre de enfermedad y

supervivencia global de los enfermos con cáncer urológico con un menoscabo proporcional mínimo en su calidad de vida.

5.5.- PERSPECTIVAS

No cabe duda alguna de que las nuevas técnicas desarrolladas sobre los avances en el conocimiento de la genómica y la proteómica van a facilitar el avance de la medicina molecular. En este sentido, aun cuando en la práctica clínica no está suficientemente establecida la utilidad de los métodos basados en el estudio del ADN para el diagnóstico del cáncer, puesto que es necesario conocer cuál es el nivel de incertidumbre y las variaciones intra e interexperimentales que pueden afectar a la interpretación de los resultados y a la reproducibilidad de los tests aplicados, es tranquilizador saber que los datos de un análisis multicéntrico simple-ciego en el que se han comparado los resultados del análisis de microsatélites de ADN normal y tumoral de pacientes con cáncer colorrectal, son demostrativos de la existencia de mínimas diferencias interexperimentales (Bocker y cols., 1997). Por otra parte, los resultados de un estudio simple-ciego de análisis de microsatélites, Mao y cols. (1996), y Steiner y cols. (1997), también son concluyentes en el sentido de que el análisis de microsatélites en sedimentos urinarios es reproducible y altamente indicativo de cáncer vesical inicial y recurrente. Además, la aplicación de métodos de análisis de microsatélites semiautomáticos podría reducir errores y sesgos propios del investigador (Wang y cols., 1997). Pese a todo, el análisis de microsatélites soporta un elevado potencial de falsos positivos cuando los fragmentos de ADN para ampliar son pequeños, como sucede en los casos en los que se usa ADN extraído de muestras de plasma/suero (Chen y cols., 1999; Coulet y cols., 2000). Aunque estas líneas de investigación metodológicas son propias de las casas que se dedican al desarrollo de metodologías y de instrumentación y que, por ello, son de mayor relevancia teórica que práctica (von Knobloch y cols., 2001; Silva y Bonilla, 2001), es claro que las investigaciones finales y la validación de las metodologías deben hacerse en series de pacientes tan extensas como sea posible para conocer las utilidades y las limitaciones metodológicas con el máximo de detalle.

Hoy se cree que la determinación cuantitativa derivada de señales de ácidos nucleicos, podría incrementar importantemente la especificidad en las medidas de ARNm de células tumorales circulantes (Straub y cols., 2001; Max y cols., 2001), así como en las del ADN circulante en plasma/suero (Kawakami y cols., 2000; Serdyuk y cols., 2001) en situaciones de enfermedad subclínica. Con la definición apropiada de los valores de corte en varios tejidos (Lo y cols., 1999; Botezatu y cols., 2000) y fluidos corporales (Kawakami y cols., 2000) podría lograrse diferenciar entre grandes acúmulos de ADN en cáncer y escasos acúmulos de alteraciones inespecíficas de ADN en procesos benignos o procedentes de artefactos técnicos

propios de los procesos de amplificación. Además, un acercamiento cuantitativo podría ser más conveniente para orientar las decisiones que afecten a la propuesta terapéutica que debe ser ofrecida al enfermo tanto como tratamiento inicial, como durante el curso evolutivo de su enfermedad.

5.5.1.- Las 'firmas' moleculares de cada tumor serán dianas terapéuticas

Muchas de las aplicaciones clínicas de la biología molecular se centran en el diagnóstico oncológico y, sobre todo, en el seguimiento de los enfermos tratados por enfermedades neoplásicas con el propósito de detectar precozmente la aparición de recidivas, metástasis o de cuantificar la enfermedad residual. Uno de los grandes propósitos del desarrollo de métodos para ser aplicados en patología molecular oncológica es identificar ciertas características que, por su especificidad, puedan ser consideradas como las “firmas” de cada tumor; así se espera conseguir un diagnóstico más precoz de los procesos neoplásicos y efectuar cierta clase de medicina diagnóstica y predictiva que permita predecir el riesgo de padecer cáncer y mejorar la eficacia de los tratamientos oncológicos. Ello significa que, si se identifica que alguna alteración molecular está fuertemente asociada al pronóstico de la enfermedad, se podrían categorizar a las personas en grupos definidos en función del riesgo y a los pacientes en grupos determinados por la agresividad del proceso que les afecta. De esta manera, los parámetros moleculares permitirán la definición del tratamiento adecuado. Al mismo tiempo, la identificación de características moleculares específicas permitirá el conocimiento de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de la fármaco-genómica.

La mayoría de autores que, en el área de conocimiento de la Urología, están investigando las alteraciones del ADN en fluidos corporales lo hacen buscando el diagnóstico inicial de la neoplasia y, hasta ahora, los estudios que han sido publicados se refieren a series con escaso número de pacientes y de controles. Así, cuando los datos se refieran a grupos más extensos de casos y controles (en los que se incluyan sanos y pacientes con enfermedades benignas (Christensen y cols., 2000) y los trabajos se extiendan e incluyan los estudios al seguimiento de los pacientes (Mulcahy y cols., 1998; Sozzi y cols., 2001), se conocerá realmente el valor clínico de las determinaciones de ácidos nucleicos en sangre periférica como posibles marcadores moleculares de los tumores urológicos. Si –más allá de su papel como marcador tumoral- el ADN tumoral circulante juega un papel en la transferencia génica horizontal (Kidwell, 1993; Yang y Huang, 1996; Szary y Szala, 2001; Bergsmedh y cols., 2001) que se traduzca en algún tipo de “genometástasis” (García-Olmo y cols., 1999 y 2000) y esta provocativa hipótesis se refuerza, la investigación en este campo dará lugar a unas de las más excitantes líneas de desarrollo dentro de la oncología.

El principal reto de la urooncología clínica es el correcto manejo y el control total del cáncer vesical. El diagnóstico correcto de la enfermedad tumoral vesical es trascendente, y la estrategia terapéutica que se emplea depende tanto del estadio clínico, como de la evaluación morfológica de la enfermedad. No obstante, es sobradamente conocido que tumores morfológicamente similares en cualquier estadio en el que estén asignados, sobre todo los tumores precoces superficiales, pueden comportarse de maneras radicalmente distintas. Esta diversidad del comportamiento biológico del cáncer vesical dificulta la capacidad de predecir cómo puede ser la evolución clínica en cada caso particular. Los estudios prospectivos que se efectúen en el futuro con cohortes de pacientes extensas y bien seleccionadas serán necesarios para trazar con firmeza el papel que desempeña la hipermetilación de promotores de genes en la carcinogénesis vesical (Cordón-Cardo y cols., 1997).

El propósito de este trabajo es el de continuar el estudio de relación entre metilación aberrante de genes y cáncer vesical. Mediante esos estudios se espera obtener información de carácter más definitivo y completar lo que los datos, recogidos en esta memoria, sugieren.

Anexo 1

European
Urology

European Urology 42 (2002) 622-30

Assessing the use of *p16^{INK4a}* promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancerM.T. Valenzuela^a, R. Galisteo^b, A. Zuluaga^b, M. Villalobos^a, M.I. Nunez^a, F.J. Oliver^c, J.M. Ruiz de Almodovar^a *^aUnidad Mixta de Investigaciones Médicas, Departamento de Radiología y Medicina Física, Hospital Universitario San Cecilio, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain^bServicio de Urología, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Hospital Universitario San Cecilia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain^cInstituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18001 Granada, Spain

Accepted 16 August 2002

Abstract

Objective: This study was undertaken to investigate whether hypermethylation in *p16^{INK4a}* gene promoter could serve as plasma biomarker of bladder cancer.**Methods and Patients:** We examined the *p16^{INK4a}* status using methylation-specific PCR in 86 cancer patients and 49 controls (31 healthy people and 18 patients with benign urological diseases).**Results:** The *p16^{INK4a}* methylation was found in 22% of the serum samples and in 26% of the bladder cancer biopsies; one of them with carcinoma in situ. The presence of hypermethylated *p16^{INK4a}* in serum seems to be a product from tumour cells because a strong statistical association was found between both matched DNA signals ($p < 0.0001$). Using the control group, the presence of methylated *p16^{INK4a}* in the serum of individuals with suspicion of bladder cancer was found to be associated with the tumour presence ($p = 0.0009$). Aberrant *p16^{INK4a}* methylation was also observed in one non-cancer patient, which is undergoing further assessment.**Conclusions:** According with our results, methylation of *p16^{INK4a}* promoter may be involved in the bladder cancer genesis and the presence of *p16^{INK4a}* methylated in serum of these patients could be useful in the cancer diagnosis with values of sensitivity, specificity and positive predictive value of 0.226, 0.950 and 0.98, respectively. These figures support the use of methylated *p16^{INK4a}* as a new class of tumour marker in bladder cancer.

© 2002 Published by Elsevier Science B.V.

Keywords: Bladder cancer; *p16^{INK4a}*; Promoter gene methylation; Tumour marker; Gene silencing

1. Introduction

Tumours of the urinary bladder are heterogeneous in respect to their histopathologic and morphologic characteristics and clinical behaviour. Histological grade and clinicopathologic stage are the most significant predictors of clinical prognosis. Up till now, urethrocytoscropy is the golden standard for detection of primary tumours and recurrences. Cytological analysis of urine or barbotage material is another technique for the assessment of changes in bladder mucosa related to tumour growth. However, cytology has a low sensi-

tivity and a poor intra- and interobserver reproducibility. So there is a need for the development of new methods to detect the illness, recurrences or improve follow-up.

Potential biomarkers of disease progression and prognosis include tumour-associated antigens, oncogenes, tumour suppresser genes and cell cycle regulatory proteins. Biological markers might be predictive of recurrence and progression of superficial bladder tumours and must supply additional information to that provided by multiplicity, vascular invasion, tumour size or histological grade. However, so far, any of them seems to have a significant role in the diagnosis, prognosis or follow-up [1,2]. Because of that, new markers have recently been evaluated. Among them, the loss of p21^{wa1} expression has been associated to shorter overall survival in

*Corresponding author. Tel. +34-958-244056; Fax +34-958-249953.

E-mail address: jmrdrar@ugr.es (J.M. Ruiz de Almodovar).



patients with transitional cell carcinoma (TCC) [3] but its clinical relevance remains controversial [4]. Other studies found that low p27 expression was more common in poorly differentiated muscle-invasive bladder cancer [5]. However, further research is essential to develop improved diagnostic biomarkers.

Detailed molecular genetic studies of bladder tumours had led to a working hypothesis of tumorigenesis and progression. It appears that the accumulation, rather than the order, of certain genetic, epigenetic and phenotypic alterations act synergistically and lead to cancer progression [3,5,6]. The main epigenetic modification in human cancer is the methylation of the cytosine nucleotide residue [7,8].

CpG islands (CGI) are short sequences rich in CpG dinucleotide and can be found in the 5' promoter region of about all human genes [9]. Changes in global genomic methylation patterns are among the most consistent findings in the development of human cancers and aberrant methylation of gene promoter regions is associated with transcriptional silencing of tumour suppressor genes and mismatch repair genes in neoplasms [10,11]. Alterations in key genes deregulate cell cycle control at the checkpoints and engender tumour cells with reduced response to apoptosis [12]. This fact may determine the aggressive clinical course of the tumours harbouring various alterations or distinct genotypic patterns [13].

The *p16^{INK4a}* protein belongs to a family of cyclindependent kinases which inhibits the activities of CDK4 or CDK6-cyclin D and CDK2-cyclin E complexes. Inactivation of *p16^{INK4a}* associated with hypermethylation has expanded its role as a tumour suppressor suggesting that this gene is one of the most frequently inactivated in human neoplasms [14,15]. The *p16^{INK4a}* CGI methylation correlates with the loss of expression in several cell lines and primary tumours and in general inactivation is associated with a more aggressive phenotype and worse prognosis [16,17].

Bladder cancer is linked with different types of genetic and epigenetic alterations (reviewed by [6] and [8]). These epigenetic changes, particularly aberrant promoter hypermethylation which is associated with gene silencing, affect virtually every step in tumour progression [19]. And as observed in other cancers these methylation changes in specific gene promoters might be also detected through analyses of DNA from biological fluids as serum [20-23] using highly sensitive techniques. This might provide us new methods to obtain tumour markers and prognostic information.

The present study was undertaken to evaluate the role that hypermethylation in *p16^{INK4a}* promoter play in bladder carcinogenesis. And, because tumour-derived DNA can be detected in plasma and serum of cancer patients, we investigated whether this abnormality could serve as a plasma biomarker of the illness presence in a well-characterised group of bladder cancer patients.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Between January 1999 and May 2001, we have assessed 86 patients with bladder tumours. All patients were diagnosed at Hospital Clínico San Cecilio (Servicio Andaluz de Salud/Universidad de Granada, Granada, Spain).

The surgical treatment was: 82 endoscopic resections and 4 radical cystectomies. None received any antitumoural treatment prior to tumour sampling. All specimens were pathologically graded and staged according to the TNM and JSM classification. Vascular invasion (VI) and multifocality (Mf) were recorded as yes/ no/x (x: not specified in the clinical report) in the data analysis.

Table I summarises patient's features accordingly to histological grade and stage. All the 86 serum samples were obtained prior to surgery to avoid the possible clearance of plasma DNA after removal of the primary tumour. Tumour tissue was obtained only in 53 cases.

As control for testing the status of *p16^{INK4a}* in serum, control samples were obtained from 31 healthy donors and 18 patients with other urological diseases (6 benign prostatic hyperplasia, 1 edema and inflammatory injury, 3 unspecific inflammatory changes, 3 epithelial hyperplasia, 1 squamous metaplasia of bladder, 2 cystitis glandularis, unspecific inflammatory changes plus bladder fibrosis, 1 eosinophilic cystitis). In four of these non-cancer patients a bladder biopsy was also analysed. In all cases, we obtained informed consent. Ethical approval was obtained before starting this work from Research Ethical Committee. Tumour and plasma DNA were extracted and investigations about the molecular status of *p16^{INK4a}* promoter region gene were carried out without knowledge of the histological results.

2.2. DNA extraction from blood and tumour samples

Blood samples were collected in silicone-coated tubes. Blood was centrifuged at 3000 x g for 15 minutes, and serum was carefully transferred into new tubes. The serum was stored at -80 °C until use. DNA from serum samples (2 ml per column) was obtained using QIAamp DNA Kit following blood and body fluid spin protocol (QIAGEN). A final elution volume of 110 µl was established. Tumour pieces were stored at -80 °C until use. DNA from tumours was isolated using standard procedures by treatment

Table I

Histological grade and stage of 86 bladder cancer patients

Grade	T	N	M	VI	Mf	JSM	Typ
I	24	1 57	0 71	0 77	Yes 26	Yes 40	A 57 TCC
II	40	2 21	1 4	1 6	No 55	No 32	B 22 SCC
III	20	3 5	X 10	X 2	X 4	X 13	C 1
IV	1	4 2					D 5

X: not specified; T, N, M: tumour-node-metastasis classification; VI: vascular invasion; MP multifocality; JSM: Jewett Strong Marshall's cancer staging system. TCC: transitional cell carcinoma; one of the TCC was carcinoma in situ and it is not included in the histological grade and stage classification. SCC: squamous cell carcinoma.

with proteinase K, followed by a phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. In all cases, the DNA extracted was quantified espectrophotometrically.

2.3. Methylation-specific PCR (MSP)

DNA methylation pattern in $p16^{INK4a}$ was determined in primary tumours and serum samples by MSP [24]. The ability to amplify identical DNA sequences that differ only in methylation status is the basis of MSP. Reagents required for the bisulfite modification of DNA were supplied in the CpGenome™ DNA Modification Kit (Intergen). The process was performed according to the manufacturer's recommendations.

Modification procedure with 1 µg of DNA is recommended although is not required with CpGenome™ DNA Modification Kit. Sufficient DNA can be recovered to perform MSP when the amount of starting material is as little as 0.001 µg. In brief, 100 µl of plasma DNA or 1 µg of DNA were treated with sodium bisulfite for 16 hours and after purification, 2 µl of bisulfite-modified DNA was used as template in PCR reactions. Primer sets were previously described [20,24]. PCR products were resolved in agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. DNA from normal lymphocytes was used as control for normal alleles and DNA from the human plasmacytoma cell line HS-Sultan that has methylated $p16^{INK4a}$ as positive control for MSP in all the reactions.

2.4. Patient's and control's characteristics

Different variables were obtained from the medical records to characterise the patients: (i) personal data: age (mean age: 69 ± 12 years), sex (12 women and 74 men), job, if smoke and how often, diagnosis dates, family history of the disease, other illnesses; (ii) analytical parameters: haemoglobin, creatinin, proteins, etc.; (iii) urinary symptoms as haematuria with or without associated urinary tract infection; (iv) histopathological characteristics: tumour type, stage, grade, size, invasion of peritumoural blood vessel.

Similar variables were also obtained to characterise the controls: (i) personal data: age (mean age: 64 ± 16 years), sex (15 women and 34 men), job, if smoke and how often, history of urinary tract illnesses (yes: 18; no: 31), other illnesses, family history of the urinary illnesses, etc.; (ii) analytical parameters: haemoglobin, creatinin, proteins, etc.

3. Results

We studied 86 bladder cancer patients for the presence of aberrant methylation of $p16^{INK4a}$ promoter in their serum and in their tumour sample (if possible) using MSP. Thirty-one healthy controls and 18 patients with other urological diseases were also analysed. Fig. 1 shows the results of $p16^{INK4a}$ MSP from serum of controls, bladder cancer biopsies and paired serum samples.

When we examined the serum of the bladder cancer patients, 19 of 86 (22%) were found to have aberrant $p16^{INK4a}$. We explored potential associations between this alteration and clinicopathological variables. Methylated $p16^{INK4a}$ was detected in the serum of 7 of 24 (29%) of grade I patients, 7/40 (18%) grade II and 4/20 (20%) grade III. Also $p16^{INK4a}$ was methylated in 14/57 (25%) of T1 and 4/21 (20%) of T2. Finally 16 of 71 NO and 17 of 77 MO had also methylated $p16^{INK4a}$ in serum. However we have not found any relationship between its presence in serum and the tumour type or the tumour stage, whatever TNM or JSM systems were used. The vascular invasion nor the tumour multifocality seemed related with gene promoter status. VI was recorded as yes, no or "x" (not specified in the clinical report): 4 of 26 with VI(+) showed hypermethylated $p16^{INK4a}$ as 14 of 55 classified as VI(-). Tumour multifocality was also recorded as yes (6 of 40 showed hypermethylated $p16^{INK4a}$), no (9 of 32 showed hypermethylated $p16^{INK4a}$) or not specified "x" (3 of 13 were also methylated). One of the TCC was a carcinoma in situ and it is not included in the histological grade and stage classification.

Table 2 summarises the status of $p16^{INK4a}$ promoter in all the samples analysed. Methylated alleles of

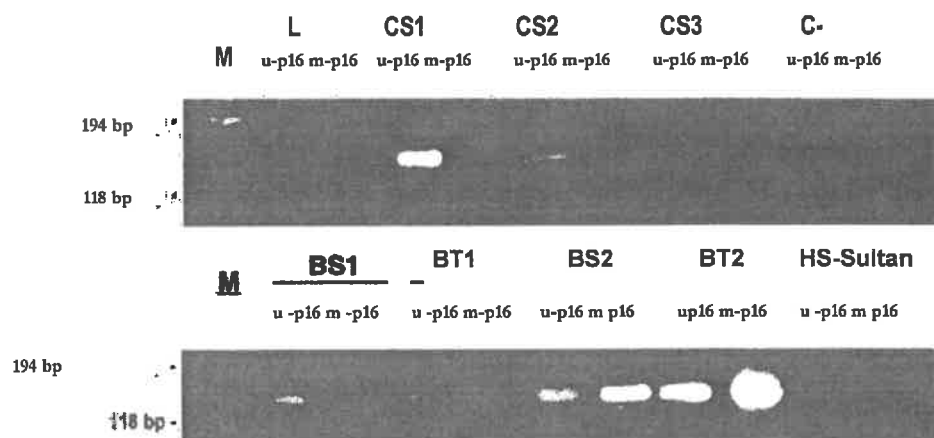


Fig. 1. Results of $p16^{INK4a}$ MSP from serum of controls (CS), bladder cancer serum (BS) and paired bladder tumour biopsies (BT) m-p16: methylated $p16^{INK4a}$; u-p16: unmethylated $p16^{INK4a}$ promoter. M: molecular weight marker; L: DNA from lymphocytes; HS-Sultan: DNA from HS-Sultan; C(-): PCR negative control.

Table 2
Aberrant methylation of *p16^{INK4a}* promoter

Sample type (number)	Methylated <i>p16^{INK4a}</i>	Unmethylated <i>p16^{INK4a}</i>
Healthy people (31 cases) Serum (31)	0	31
Urological benign diseases (18 patients)		
Serum (18)	1	18
Tissue (4)	1	4
Bladder cancer (86 patients)		
Serum (86)	19 (22%)	86 (100%)
Tumour (53)	14 (26%)	53 (100%)

p16^{INK4a} in serum might be releasing from the tumour whereas unmethylated alleles might be consequence of the spontaneous lymphocytes cell death that normally occur as well as the clearance of cell debris from the different body's tissues. The second process happens in both healthy and cancer individuals.

When we determined the status of *p16^{INK4a}* in the tumour pieces, 14 of 53 (26%) were positive for the methylated allele: 6/12 were grade I and 4/26 grade II and 4/14 grade III; 10/38 were T1 and 4/14 were T2. In all 12 of 43 NO and 13 of 46 MO had also methylated *p16^{INK4a}*. Four of 20 with VI(+) and 10 of 31 with VI(-) showed hypermethylated *p16^{INK4a}*. Finally, 4 of 23 Mf(+) and 7 of 20 Mf(-) were also positive for the methylated gene. Because the tumours were not microdissected and contained a variable amount of contaminating normal tissues, unmethylated alleles were simultaneously detected in all these samples (Table 2).

To establish a clinical meaning for the presence of hypermethylated *p16^{INK4a}*, we compared the correlation between its presence or absence in the 53 paired samples (tumour and serum). In all 51 of 53 pairs examined showed an absolute concordance, being either both methylated or unmethylated at the *p16^{INK4a}* promoter region ($p < 0.0001$). Serum DNA methylation was not observed in any of the 39 cases in which there was no methylation in tumour DNA. Only in 2 cases of 14, the methylated alleles could not be detected in serum but in tumour using this methodology. These 14 patients were classified as: 6 grade I, 4 grade II and 4 grade III; and 10 T1 and 4 T2; 4 VI(+), 10 VI(-) and 4 Mf(+), 7 Mf(-) and 3 Mf(x). All of them were NO and MO. Using JSM system, 10 were classified as A and 4 as B. Those two cancer patients in which there was no concordance between his paired samples were classified as: grade I, T1 NO M1 VI(-) Mf(+) and JSM(A); and grade II, T1 NO M1 VI(-) Mf(-) and JSM(A). A review of the patients' clinical parameters did not reveal any distinguishing features from these two patients to those whose serum had detectable aberrant methylation.

Table 3 The *p16^{INK4a}* methylation in tumour correlates with *p16^{INK4a}* methylation in serum

Serum	Tumour		Total
	m-p16	u-p16	
m-p16	12	0	12
u-p16	2	39	41
Total	14	39	53

m-p16: methylated *p16^{INK4a}*; u-p16: unmethylated *p16^{INK4a}*. Two-sided Fisher's exact test $p < 0.0001$.

No *p16^{INK4a}* methylation was found in the serum of the 31 healthy controls or 17 (of 18) patients affected by other urinary illnesses (Fig. 1). Surprisingly MSP detected both methylated and unmethylated *p16^{INK4a}* gene alleles in one cancer-free patient whose biopsy was classified as unspecific inflammatory changes plus bladder fibrosis. In this case the methylated *p16^{INK4a}* was observed in DNA extracted from the bladder biopsy and also from his serum. This patient is undergoing further assessment.

Our study indicates that misregulation of chromatin structure in *p16^{INK4a}* by methylation occurs in bladder tumours and this alteration can be detected also in the serum of the patients in a proportion of 86% of the cases studied. So the presence of methylated *p16^{INK4a}* promoter is a frequent epigenetic change in bladder cancer and can cause improper gene silencing and promote the oncogenesis process. Moreover, the presence of circulating hypermethylated *p16^{INK4a}* seems to be related with the diagnosis of bladder cancer because using the two-sided Fisher's exact test a strong statistical association ($p < 0.0001$) was found between both matched DNA signals found in serum and tissue (Table 3).

Comparing the presence of hypomethylated *p16^{INK4a}* in the serum of cancer patients against the results found in all controls, we calculated the strength of this association ($p = 0.0009$) and the odds ratio (OR = 13.61, 95% confidence interval: 1.76-105.2, Table 4).

Table 4
The *p16^{INK4a}* in serum: bladder cancer patients vs. controls

<i>p16^{INK4a}</i>	Cancer patients	Controls'	Total
m-p16	19	1	20
u-p16	67	48	115
Total	86	49	135

m-p16: methylated *p16^{INK4a}*; u-p16: unmethylated *p16^{INK4a}*. Two-sided Fisher's exact test $p = 0.0009$; odds ratio = 13.61, 95% confidence interval 1.76-105.20; sensitivity: 0.23, 95% confidence interval 0.13-0.37; specificity: 0.98, 95% confidence interval: 0.88-1.00; positive predictive value: 0.95.

' Control group is formed by 31 healthy people plus 18 patients with urological benign diseases.

Finally, test sensitivity was 23% (sensitivity = 0.23; 95% confidence interval: 0.13-0.37), specificity was 98% (specificity = 0.98; 95% confidence interval: 0.881-1.00) and positive predictive value reached 95%. This results 4 points out the usefulness of the measurement of $p16^{INK4a}$ methylated promoter sequences in the serum as a new class of tumour marker for bladder cancer.

4. Discussion

One of the current challenges to clinicians is to identify patients at high risk for recurrence or metastasis. Biomarkers can quantify biochemical, genetic or epigenetic events in a cell; they would be potentially more sensitive for predicting and monitoring neoplasms than conventional histopathologic methods. Gene silencing has been associated with methylation of CGI located in promoters and 5' regulatory regions [9,25], however much work remains to be done to identify what of the methylated CpG islands are important and if such epigenetic changes show a tumour type-specific pattern [26].

The present study was undertaken to evaluate the frequency and potential clinical relevance of the detection of hypermethylated $p16^{INK4a}$ promoter in the serum of patients with primary bladder tumours. Our results demonstrate that there is a statistically close relationship between methylation of $p16^{INK4a}$ in tumour and in serum matched samples and its identification in serum is strongly related with the aberrant methylation of $p16^{INK4a}$ in tumour and with cancer diagnosis (Table 3). And because one of the cases with hypermethylated promoter was diagnosed as carcinoma in situ, we might suggest that this epigenetic change could play an early and likely critical event in the development of TCC.

We tested the DNA extracted from serum of controls and patients. None of the healthy controls were positive for the methylated allele and only 1 of 18 cancer-free patients affected by other urological diseases was positive. In this case, the aberration was detected in serum and in its matched bladder biopsy. This patient is under follow-up. A possible explanation might be that $p16^{INK4a}$ hypermethylation would be an early step for the evolution of premalignant lesions to neoplasms. Something comparable has been described in gastric cancer [27] and colon carcinomas [28].

On one hand, we have detected hypermethylated $p16^{INK4a}$ in serum of 19 of 86 bladder cancer patients. Hypermethylated $p16^{INK4a}$ in serum has been checked in other types of cancer such as hepatocellular [20],

breast [21], head and neck [22] and non-small cell lung cancer [29] but to our knowledge it is the first time that this alteration is described in serum from bladder cancer patients. The range we have found (26%) is similar to the percentage observed in breast and head and neck but less than in hepatocellular or non-small cell lung cancer. It is also similar to the proportion found by Chan et al. [30] using urine samples for analysis.

On the other hand detection of methylated $p16^{INK4a}$ promoter in tumour piece has been evaluated further in hepatocellular [20], breast [21], non-small cell lung cancer [29] and head and neck [22]. Even DNA hypermethylation of multiple genes has been analysed in acute myeloid leukaemia [31], gastric cancer [29], bladder carcinoma [32] and the gene hypermethylation profile of human cancer has recently been reviewed [33]. As in the mentioned studies, the tumour size, extension or differentiation grade seemed not to be related to the appearance of methylated $p16^{INK4a}$ in the serum of bladder cancer patient. Data published by other authors offer mixed results. No association between methylation status and grading or muscle invasiveness was demonstrated by Chan et al. [30]. Esteller et al. [34] found that methylation of four genes (*CDHI*, *RASSF1A*, *APC*, and *CDH13*) correlated with several parameters of poor prognosis but not others such as *FHIT* or *GSTPI*. However Silva et al. [21] stated that the presence of methylated tumour DNA in serum correlated significantly with pathological parameters associated with a poor prognosis in breast cancer. All this data, concerning the extension of tumour disease, the presence of plasma DNA, the tumour characteristics, do not offer a conclusive explanation. And it suggests that other unexplored biological characteristic of the tumour cells could be related to this phenomenon. One possible confusion factor may be the presence of age-related methylation in normal epithelium which supports the idea that hypermethylation in CpG islands is an early event in the development of TCC.

However, changes in the methylation pattern may precede genetic instability within the CGI of this gene as suggested [23]. Our findings link aberrant methylation of $p16^{INK4a}$ to the presence of bladder cancer and suggest the potential use of this epigenetic change as a biomarker to identify persons at high risk or with bladder neoplasia. In our series 86% of the patient that has this alteration in tumour depicted the same alteration in serum. The dissimilarity between tumour and serum in these two cases could be the result of the lack or blocking of the incorporation of free tumour DNA from tumour cells into the blood or a possible increase in the rate of serial DNA degradation process by nucleases.

Urothelial biomarkers performed either on plasma or tissue sections will become increasingly important for treatment, prognostication of invasion, metastasis and recurrence. To optimise the results, it will be essential to obtain a panel of markers in serum capable of detecting the molecular changes in plasma DNA for each tumour in the background of normally methylated and unmethylated DNAs from lymphocytes or others cells. For example, epigenetic silencing of genes in different tumours has been related to enhanced sensitivity to some drugs [35] or tumours with a high degree of methylation may be appropriate for treatment with methylation inhibitors [36]. Besides alteration in chromatin structure by histone deacetylation and DNA methylation has been related to the development of cancer and the higher resistance to treatment. It might be used to improve the clinical outcome of some bladder cancer patients but not in those with no methylated gene promoters in their tumours. It might also permit the individualisation of treatment. However, if the pretreatment of cancer cells with 5-aza-2'-deoxycytidine (DNA methyltransferase inhibitor) sensitises cells against chemotherapy and radiotherapy enhancing antiproliferative, necrotic and apoptotic cell death must be investigated deeply.

Our results support that $p16^{INK4a}$ promoter becomes altered and contributes to carcinogenesis in bladder cancer. The changes do not give a comprehensive picture of all possible modifications taking place in this tumour class because the assay used is highly focused. Moreover, it has been described that 89% of the bladder cancer have increased methylation of CGI relative to surrounding normal tissue, and that the number of markers concurrently methylated in individual tumours increases with its stage. This fact suggests the existence of a hypermethylator phenotype in which multiple independent CGI become concurrently methylated in a process associated with tumour progression [36].

Large scale of clinical studies, further research and better understanding of the cancer biology are essential steps to develop reliable biomarkers. In this sense, a very

important article by Evron et al. [37] suggests a strategy based on the detection of the change in the methylation pattern of several genes which were found methylated in fluid samples from lavage of mammary ducts of breast cancer patients but unmethylated in healthy mammary epithelial cells.

It is important to emphasise that the present study did not attempt to further evaluate prognostic significance of methylated $p16^{INK4a}$ in bladder cancer but rather attempted to assess their potential association with the presence of tumour features at the time of primary surgery. However, further studies involving a larger number of patients are required to determine their accuracy and widespread applicability for diagnosing. Due to the prevalence and incidence of bladder cancer, the discovery of valid markers in serum could have a strong impact on the management and survival of the patients. The aim of our future study that is now in progress is to assess the clinical usefulness of $p16^{INK4a}$ methylation and other gene promoters in the group of bladder cancer patients using a prospective design with long-term follow-up. This study could provide us with definitive information on the value of this research tool as a prognostic factor and in follow-up in bladder cancer.

Acknowledgements

This work was supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología through the project SAF 2001-3533, and Junta de Andalucía through the project SAS 01/231 to J.M. Ruiz de Almodovar, by the Fondo de Investigaciones Sanitarias through the project FIS 01/1090 to M. Villalobos, and the project FIS 00/94 to ftj. Oliver. M.T. Valenzuela was partially supported by grant from Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer and from June 2000 by Fondo de Investigación Sanitaria (BEFI 00/9371). We gratefully acknowledge the co-operation of urology service staff. We also thank Miss R Aguilar Torres, Mrs. C. Fernández España and Mrs. C. Fernández Guerrero for their excellent technical help.

References

- [1] Konety BR, Getzenberg RH. Urine based markers of urological malignancy. *J Urol* 2001;165:600-11.
- [2] Fradet Y, Lacombe L. Can biological markers predict recurrence and progression of superficial bladder cancer? *Curr Opin Urol* 2000;10:441-5.
- [3] Korkolopoulou P, Christodoulou P, Konstantinidou AE, ThomasTsagli E, Kapralos P, Davaris P. Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on $p27^{Kip1}$. *Hum Pathol* 2000;31:751-0.
- [4] Chow NH, Tzai TS, Cheng HL, Chan SH, Tong YC. The clinical value of $p21^{Waf1/Cip1}$ expression in superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1173-6.
- [5] Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani et al. Loss of $p21^{Waf1}$ expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6:3131-8.
- [6] Reznikoff CA, Sarkar S, Julicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, Newton MA. Genetic alterations and biological pathways

- in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol* 2000;5:191-203.
- [7] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-96.
- [8] Jonel PL, Wolffe AP Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol* 1999;9:339-47.
- [9] Bird AP CpG-rich island and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321:209-13.
- [10] Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPI, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-5.
- [11] Esteller M. Epigenetic lesions causing genetics lesion in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000;36:2294-300.
- [12] Valenzuela MT, Ndfiez MI, Villalobos M, Siles E, McMillan TJ, Pedraza V, et al. A comparison of p53 and p16 expression in human tumor cells treated with hyperthermia or ionizing radiation. *Int J Cancer* 1997;72:307-12.
- [13] Cordon-Cardo C, Zhang Z-F, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu S-X, et al. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder cancer tumours. *Cancer Res* 1997;57:1217-21.
- [14] Nobori T, Miura K, Wu D, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancer. *Nature* 1994;368:753-6.
- [15] Serrano M. The tumor suppressor protein *p16^{INK4a}*. *Exp Cell Res* 1997;237:7-13.
- [16] Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavenee WS, et al. Loss of *p16^{INK4a}* is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res* 1995;55:2713-8.
- [17] Kees UR, Burton PR, Lu C, Baker DL. Homozygous deletion of the *p16/MTS1* gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavorable clinical outcome. *Blood* 1997;89:4161-6.
- [18] Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 1993;342:469-71.
- [19] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
- [20] Wong IHN, Lo YMD, Zhang J, Liew C-T, Ng MHL, Wong N, et al. Detection of aberrant *p16* methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:71-3.
- [21] Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F, et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1999;59:3251-6.
- [22] Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000;60:892-5.
- [23] Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of *p16(INK4a)* is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11891.
- [24] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-G.
- [25] Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999;59:2307-12.
- [26] Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24:132-8.
- [27] Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:5438-42.
- [28] Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, et al. Methylation of the 5' CpG island of the *p16^{CDKN2}* tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-5.
- [29] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70.
- [30] Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:464-70.
- [31] Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999;59:37300.
- [32] Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, et al. Progressive increases in the novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 2000;60:2473.
- [33] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
- [34] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New Engl J Med* 2000;343:1350.
- [35] Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-63.
- [36] Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JPI. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:710-5.
- [37] Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, Rosenthal D, Sacchi N, Gabrielson E, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet* 2001;357:1335.

Editorial Comment

W. Nelson, Department of Oncology, Johns Hopkins Research Center, Baltimore, MD, USA

Human cancer cells typically contain a myriad of acquired genome defects, including gene mutations, gene deletions, gene amplifications, gene translocations, shortened telomeres, and altered DNA methylation. Many of these somatic genome changes can

be detected with remarkable sensitivity and specificity using the polymerase chain reaction (PCR). For this reason, there has been a great enthusiasm about the possibility that PCR-based assays for cancer-associated somatic genome alterations might become clinical tests useful for cancer screening, detection, diagnosis, staging, prognosis, and treatment monitoring. Also, reports of several successful "proof-of-principle" studies have further fuelled this enthusiasm [1].

Changes in DNA methylation appear particularly attractive as cancer-associated molecular biomarkers. The self-complementary dinucleotide CpG usually carries $^5\text{-mC}$ in normal mammalian cells, except when the CpG dinucleotides are clustered into ~ 1 kilobase regions, often encompassing the transcriptional regulatory regions of gene, in the genomes termed "CpG islands". [2] Cancer pathogenesis is stereotypically accompanied by a widespread reduction in CpG dinucleotide methylation, with an increase in the methylation of CpG dinucleotides present in CpG islands of certain critical genes [3]. CpG island hypermethylation causes an inhibition of gene transcription, effectively "silencing" genes, in a manner equivalent to gene deletion or to an inactivating gene mutation, to provide a some sort of selective advantage during cancer development. The major advantage of cancer-associated CpG island hypermethylation changes as molecular biomarkers, distinct from other somatic genome abnormalities, such as mutations and gene deletions, is that the CpG island hypermethylation changes at specific genes are often very similar from case to case, permitting the use of a single PCR-based assay for the majority of cancer cases. For example, almost all human prostate cancers contain hypermethylated GSTPI CpG islands; PCR-based assays thus far developed can detect the molecular biomarker in $>90\%$ of cases [4-6]. Two major PCR strategies have been employed to detect abnormally methylated CpG island sequences present in cancer cells. The first involves treatment with a restriction endonuclease that selectively cuts its recognition sequence only if it does not contain $^5\text{-mCpG}$, followed by PCR amplification using primers targeting the gene of interest. If the CPG dinucleotide at the restriction enzyme recognition site does not contain $^5\text{-mC}$, as might be expected for a CpG island present in a normal cell genome, the target sequence is destroyed and no products appear after PCR. Only if the CpG dinucleotide at the restriction enzyme recognition site contains $^5\text{-mC}$ can the target sequence survive restriction enzyme treatment to produce the expected product after PCR [5]. This approach is limited somewhat by the propensity for the generation of assay "false-positives", arising as a result of inefficient destruction of normal CpG island targets by restriction enzymes. The second and now more commonly-used PCR strategy, termed methylation-specific PCR (MSP), features bisulfite modification of genomic DNA followed by PCR [7]. As a consequence of this procedure, in PCR products, C becomes converted to T, while $^5\text{-mC}$ remains C, thus transforming a difference in DNA methylation into a difference in DNA sequence. With suitable PCR primers, hypermethylated CpG island sequences can readily be

distinguished from unmethylated CpG island sequences. This approach appears limited a little by sensitivity, as the bisulfite modification reaction tends to damage DNA, occasionally resulting in inefficient PCR amplification.

In their paper, Valenzuela et al. report the use of MSP for the detection of abnormally hypermethylated $p16^{\text{INK4a}}$ CpG island sequences in the serum of subjects with bladder cancer. The key finding in their study was that among the 53 subjects with bladder cancer for which DNA was recovered from both the bladder tumour and from a serum specimen, although only 14 (26%) of the bladder tumour DNA specimens exhibited $p16^{\text{INK4a}}$ CpG island hypermethylation detectable by MSP, in 12 of the 14 cases (86%), $p16^{\text{INK4a}}$ CpG island hypermethylation could also be detected in DNA from the serum. The other 39 subjects did not have $p16^{\text{INK4a}}$ CpG island hypermethylation detectable in DNA from either serum or tumour. Otherwise, $p16^{\text{INK4a}}$ CpG island hypermethylation was detected in serum from only 1 of 18 urological patients without bladder cancer, and in 0 of 31 healthy controls. These observations suggest that serum testing for abnormal CpG island sequences might be successful in detecting bladder cancers in as much as 80-90% of cases, if suitable gene targets, represented in more than 26% of bladder cancers, could be identified.

How might the use of abnormal CpG island hypermethylation as a cancer-specific molecular biomarker, detected using MSP or some other approach, affect urological practice? For cancers of the kidney, urothelium, and prostate, cancer cell DNA might appear in serum or plasma, in lymph nodes, in the buffy coat of the blood, in urine, in prostatic fluid, or in the ejaculate. Each of the cancers will likely have a different portfolio of hypermethylated CpG islands, perhaps permitting both sensitive cancer detection and diagnosis [8]. Differences in CpG hypermethylation profiles might also anticipate different treatment prognoses for specific cancers. To fully evaluate and implement tests for these new molecular biomarkers, we will need a more complete catalogue of somatic CpG island hypermethylation changes in genomic DNA from urological cancers, further refinements in the detection of such changes, and more critical analyses of the predictive value and utility of molecular biomarker tests in clinical practice. With the ease of access to a broad range of potentially useful clinical specimens for urological cancers, the field of urology may well lead the way in pioneering the clinical application of cancer molecular biomarkers for all human cancers.

References

- [1] Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:210-9.
- [2] Bird AP CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321:209-13.
- [3] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
- [4] Lin X, Tascilar M, Lee WH, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 2001;159:1815-26.
- [5] Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:443-50.
- [6] Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1747-52.
- [7] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-6.
- [8] Esteller M, Com PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-9.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo y de su comparación con los encontrados en la literatura científica relacionada con el tema, se pueden establecer, entre otras, las siguientes conclusiones:

1. La técnica de detección de ADN, mediante reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación, PCR-MSP, ha permitido poner a punto un procedimiento útil para valorar la presencia, en muestras de pacientes con cáncer vesical, de ADN de procedencia tumoral con una importante tasa de especificidad.
2. Desde el punto de vista epidemiológico y clínico, los resultados obtenidos en este trabajo confirman la clara tendencia del cáncer vesical a presentarse en pacientes de género masculino, y en aquellos pacientes sometidos a factores ambientales agresivos para el urotelio como puede ser el derivado del hábito tabáquico. La forma básica de presentación clínica del cáncer vesical es la hematuria.
3. De la correlación entre presencia, en sangre periférica, del promotor del gen *p16^{INK4a}* aberrantemente metilado y el diagnóstico de enfermedad tumoral vesical, es posible deducir que la metilación de las islas CpG, en la región del promotor, es un cambio epigenético que lleva al silenciamiento del gen y que acontece en la primeras etapas de la carcinogénesis vesical. El estudio del estado de hipermetilación de *p16^{INK4a}* en suero puede ser útil en el diagnóstico de cáncer vesical por su gran especificidad (96%) y valor predictivo positivo (98%) aunque la prueba adolezca de escasa sensibilidad (18%).
4. La alteración de la metilación de C en las islas CpG, en pacientes con sintomatología vesical es predominante en los pacientes de cáncer vesical; no se ha encontrado esta alteración en ninguno de los controles sanos incluidos en el estudio, y en sólo uno de los sujetos incluidos, también como controles, en el grupo de enfermos afectados de patología urinaria benigna se encontró esta alteración epigenética. Mediante el estudio estadístico de los datos, se ha podido demostrar que existe una fuerte asociación entre el epigenotipo de *p16^{INK4a}* encontrado en cada una de las muestras, sérica y tumoral, correspondientes al mismo paciente. Este hallazgo confiere a la determinación de *p16^{INK4a}* hipermetilado el carácter de marcador tumoral.

5. Del seguimiento de los enfermos incluidos en esta serie, en la que la cirugía (mayoritariamente endoscópica) es el elemento terapéutico central, -complementada con otras medidas terapéuticas adyuvantes (quimioterapia endovesical, radioterapia y quimioterapia sistémica)-, hemos podido demostrar que en los tumores infiltrantes el uso de radioterapia aporta cierta mejora en los índices de control y de supervivencia aunque, como consecuencia, en la tercera parte de los pacientes así tratados, se presentaron reacciones adversas agudas y, en casi la mitad de ellos, se manifestó algún grado de toxicidad tardía. Entre efectos agudos y tardíos asociados a la radioterapia no parece existir relación de dependencia.
6. Los estudios encaminados a la estimación de la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad, en pacientes afectados de cáncer vesical, nos sugieren que la S.L.E es mayor en el grupo de pacientes en los que la cirugía se complementa con otras terapias (cirugía + radiación + quimioterapia), que en el grupo de pacientes tratados exclusivamente con cirugía. El hecho de que, en nuestro trabajo, las diferencias encontradas no alcancen significación estadística suficiente, puede ser explicado en base a dos factores: tiempo de observación y número de pacientes que limitan con claridad la validez de las curvas actuariales de supervivencia aquí mostradas.
7. Los resultados sobre pronóstico de la enfermedad tumoral vesical, y variables que puedan ser determinantes del mismo, confirman la importancia que tiene el grado de diferenciación tumoral sobre la probabilidad de S.L.E. Así, de manera estadísticamente significativa, los tumores GIII tienen mucho peor pronóstico que los tumores de menor grado. Estas diferencias carecen de significación cuando se comparan los resultados del seguimiento de los pacientes con tumores GI y GII aunque la tendencia indica mejor pronóstico para los tumores calificados como GI. El estudio de la supervivencia global ($25 \pm 11\%$ a los 18 meses de seguimiento para los tumores GIII frente a $72 \pm 9\%$ para los GI) confirma este hecho. Otra variable de significativa influencia es el nivel de penetración del tumor (T) en la pared vesical. En la serie de enfermos la S.L.E para T₁ a 18 meses fue del 69% y para los T₂ de sólo el 42%. Estas diferencias son estadísticamente significativas.
8. Finalmente, la evaluación del perfil epigenético del cáncer vesical, efectuada en base a los genes *p16^{INK4a}*, *RARβ*, *hMLH1*, *Twist*, *Ciclina D2*, y *14-3-3 σ*, no ha permitido distinguir entre tumores con distinto grado de agresividad, o distinta probabilidad de supervivencia libre de enfermedad. En efecto, a los 18 meses del diagnóstico y tratamiento inicial del cáncer vesical, la S.L.E de los tumores con tres, o más de tres genes con hipermetilación en la región del promotor, es estadísticamente similar a la S.L.E que corresponde a los tumores con menos de tres genes aberrantemente metilados. El estudio de genes más involucrados en

la patogénesis tumoral vesical, como parece ser *DAP-kinasa* u otros que deben ser identificados, pueden modificar esta conclusión general.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Abel PD.:** Follow-up of patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder: Case for a change in policy. *Br J Urol* 1993; 72:125.
- Abou Farah K.M.M., et al:** Value of immunohistochemical lamenin staining in transitional cell carcinoma of the human bladder. *Urol Int* 1993; 50:133.
- Ahlering TE, Kanellos A, Boyd SD, et al:** A comparative study of perioperative complications with Kock pouch urinary diversion in highly irradiated versus non irradiated patients. *J Urol* 1988; 139:1202.
- Ahn SY, Nevaldine B, Hahn PJ:** Direct measurement by pulsed-field gel electrophoresis of induction and rejoining of X-ray-induced double-strand breaks in cultured mouse cells. *Int J Radiat Biol* 1991; 59(3):661-75.
- Ahuja N, Li Q, Mohan AL, et al:** Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res.* 1998; 58(23): 5489-94.
- Algaba F:** Origin of high-grade superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1987; 13: 153
- Althausen AF, Prout GR jr, Daly JJ:** Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol* 1976; 116: 575
- Anderstrom C, Johansson S, Nilsson S:** The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors. *J Urol* 1980; 124:23.
- Angulo JC, López JL, Grignon DJ, et al:** Muscularis mucosa differentiates two populations with different prognosis in stage T₁ bladder cancer. *Urology* 1995; 45:47.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, et al:** Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18:65-73.
- Anker P:** Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. *Ann NY Acad Sci* 2000; 906:5-7.
- Bababian RJ, Jhonson DE, Lamas L, et al:** Metastases from transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology* 1980; 16:142.
- Badalament RA, O'Toole RV, Keyhani-Rofagha S, et al:** Flow cytometric analysis of primary and metastatic bladder cancer. *J Urol* 1990; 143:912.
- Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, et al:** BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 2000; 60: 5329-33.
- Bane BL, Rao JY, Hemstreet GP:** Pathology and staging of bladder cancer. *Seminars in Oncology* 1996; 23: 546-70.
- Barnes RW, Bergman RT, Hadley HT, et al:** Control of bladder tumors by endoscopic surgery. *J Urol* 1967; 97:864.
- Baudin E, Do Cao C, Cailleux AF, et al:** Positive predictive value of serum thyroglobuline levels measured during the first year of follow-up after thyroid hormone withdrawal, in thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 1107-11.

- Baylin SB, y Herman JG:** DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends In Genetic* 2000; 16: 168-74.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al:** Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 687-92.
- Beer M, Jocham D, Beer A, et al:** Adjuvant laser treatment of bladder cancer: 8 years experience with the Nd-YAG laser 1064 nm. *Br J Urol* 1989; 63:476.
- Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al:** Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 29;95(20):11891-6.
- Bennet JK, Wheatley JK and Walton KN:** Nonmetastatic bladder cancer associated with hypercemia, thrombocytosis and leukemoid reaction. *J Urol* 1986; 135: 47.
- Benson RC, Swanson SK, Farrow GM:** Relationship of leukoplakia to urothelial malignancy. *J Urol* 1984;131: 507.
- Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, et al:** Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:6407-11.
- Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, et al:** Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer* 2001; 91:2315-21.
- Bianco T, Chenevix-Trench G, Walsh DC, et al:** Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 147-51.
- Bigey P, Ramchandani S, Theberge J, et al:** Transcriptional regulation of the human DNA Methyltransferase (dnmt1) gene. *Gene.* 2000; 242: 407-18.
- Bird AP:** CpG-rich island and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321:209-13.
- Bird A:** The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; 70: 5-8.
- Blöcher D:** In CHEF electrophoresis a linear induction of dsb corresponds to a nonlinear fraction of extracted DNA with dose. *Int J Radiat Biol* 1990; 57(1):7-12.
- Bloom HJG, Hendry WF, Wallace DM, et al:** Treatment of T₃ bladder cancer: Controlled trial of preoperative radiotherapy and radical cystectomy versus radical radiotherapy. *Br J Urol* 1982; 54:136.
- Bocker T, Diermann J, Friedl W, et al:** Microsatellite instability analysis A multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 1997; 57: 4739-43.
- Borrada P, Coggan M, Jonhston P, et al:** Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: A complex of gene families. *Pharmacol Ther* 1990; 48: 357-69.
- Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, et al:** Genetic analysis of DNA excreted in urine: A new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000; 46:1078-84.
- Brabender J, Usadel H, Danenberg KD, et al:** Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene* 2001; 20:3528-32.
- Brahme A:** Individualizing cancer treatment: biological optimization models in treatment planning and delivery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49(2):327-37.

- Bricker EM:** Bladder substitution after pelvic evisceration. *Surg Clin North Am* 1950; 30:1511.
- Brosman SA:** Experience with bacillus Calmette-Guering in patients with superficial bladder carcinoma. *J Urol* 1982; 128:27.
- Brown DH, Wagner TT, Bahnson RR:** Los interferones y el cáncer de vejiga. Mexico:Ed Mc Graw Hill Interamericana. *Urol Clin North Am* 2000; 27 (1):175-82.
- Cantor KP, Lynch CF, Jonson D:** Bladder cancer, parity, and age at first birth. *Cancer Causes Control.* 1992; 3: 57-62.
- Carter HB, Amberson JB, Bander NH, et al:** Newer diagnostic techniques for bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1987; 14:763.
- Catalona WJ, Hudson MA, Guillen DP, et al:** Risks and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 1987; 137:220.
- Catalona WJ:** Tumores uroteliales del tracto urinario. *Campbell Urología.* 6ª edición. Buenos Aires: Ed Panamericana; 1994; pp 1091-94
- Champelovier P, Mongelard F, Seigneurin D:** CK20 gene expression: Technical limits for the detection of circulating tumor cells. *Anticancer Res* 1999; 19:2073-8.
- Chan MWY, Chan LW, Tang NLS, et al:** Detection of gene promoter methylation in voided urine of urinary bladder cancer patients. *Clin Chem* 2001; 47:365.
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, et al:** Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8:464-70.
- Chan MWY, Chan LW, Tang NL, et al:** Frequent hypermethylation of promoter region of *RASSF1A* in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 104: 611-6.
- Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, et al:** Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2617-21.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al:** Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:1033-5.
- Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, et al:** Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2297-303.
- Chow NH, Tzai TS, Cheng HL, et al:** The clinical value of p21WAF1/CIP1 expression in superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:1173-6.
- Christensen M, Wolf H, Orntoft TF:** Microsatellite alterations in urinary sediments from patients with cystitis and bladder cancer. *Int J Cancer* 2000; 85:614-7.
- Cifuentes L, García de la Peña E, Vela Navarrete R:** Survival rates of patients with bladder tumors. An experience of 1744 cases (1959-1984). *Br J Urol* 1982; 54:267.
- Clements JA, Rohde P, Allen V, et al:** Molecular detection of prostate cells in ejaculate and urethral washings in men with suspected prostate cancer. *J Urol* 1999; 161:1337-43.
- Cohen MB, Waldman FM, Carroll PR, et al:** Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1993; 24:772.

- Cohen O y Kimchi A:** DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell Death Differ* 2001; 8: 6-15.
- Contopoulou CR, Cook VE, Mortimer RK:** Analysis of DNA double strand breakage and repair using orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Yeast* 1987; 3(2):71-6.
- Cook VE y Mortimer RK:** A quantitative model of DNA fragments generated by ionizing radiation, and possible experimental applications. *Radiat Res* 1991; 125(1):102-6.
- Coombs LM, Pigott DA, Eydman DA, et al:** Reduced expression of TGF β is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma. *Br J Cancer* 1993; 67(3):578-84.
- Coon JS, Weinstein RS, Summers JL:** Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1982; 77:692.
- Cordon Cardo C, Reuter VE, Lloyd KO, et al:** Blood group-related antigens in human urothelium: Enhanced expression of Lex and Ley determinants in urothelial carcinoma. *Cancer Res* 1988; 48:4113.
- Cordon Cardo C:** Mutation of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147:545-60.
- Cordon Cardo C, Zhang ZF, Dalgagni G, et al:** Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res* 1997; 57:1217-21.
- Corey E y Corey MJ:** Detection of disseminated prostate cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): Technical and clinical aspects. *Int J Cancer* 1998; 77:655-73.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al:** Aberrant CpG island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; 24:132-8.
- Cote RJ, Esrig D, Groshen S, et al:** p53 an treatment of bladder cancer. *Nature* 1997;385:123-5.
- Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, et al:** Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res* 2000; 60:707-11.
- Crawford ED, Das S, Smith JA:** Preoperative radiation therapy in the treatment of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1987; 14:781.
- Dalbagni G, Presti J, Reuter V, et al:** Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet*. 1993;342: 469-71.
- Dalbagni G y Herr H.W:** Uso actual e interrogantes sobre la terapia intravesical para el cáncer superficial de vejiga. Mexico: Ed Mc Graw Hill Interamericana. *Urol Clin North Am*. 2000; 27 (1):139-49.
- Dalesio O, Shulman CC, Sylvester R, et al :** Prognostics factors in superficial bladder tumors: an estudy of the European Organization for Research on the Treatment of Cancer. Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *J Urol* 1983; 129:730.
- Dammann R, Li C, Yoon JH, et al:** Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-39.
- Dammann R, Yang G, Pfeifer GP:** Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (*RASSF1A*), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61:3105-9.

- Deiss LP**, Feinstein L, Berissi H, et al: Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the γ interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995; 9:15-30.
- De la Taille A**, Olsson CA, Katz AE: Molecular staging of prostate cancer: dream or reality? *Oncology (Huntingt)* 1999; 13:187-94.
- Deng G**, Chen A, Hong J, et al: Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999; 59:2029-33.
- Denovic M**, Bovier R, Sarkissian J, et al: Intravesical instillation of mitomycin c in the prophylactic treatment of recurring superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1983; 55:382.
- Di Croce L**, et al: Methyltransferase recruitment and DNA methylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002; 295:1079-82.
- Dong SM**, Kim HS, Rha SH, et al: Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7:1982-86.
- Dow JA**, di sant'Agnese PA, Cockett ATK: Expression of blood group precursor T antigen as a prognostic marker for human bladder cancer treated by bacillus Calmette-Guerin and Interleukin-2. *J Urol* 1989; 142:978.
- Duque JL y Loughlin KR**: Visión general del tratamiento del cáncer superficial de vejiga: Quimioterapia intravesical. Mexico: Ed Mc Graw Hill Interamericana. *Urol Clin North Am.* 2000; 27 (1):127-37.
- Eads CA**, Danenberg KD, Kawakami K, et al: CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res.* 1999; 59:2302-6.
- Eggert A**, Grotzer MA, Zuzak TJ, et al: Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* 2001; 61: 1314-9.
- Eisenberger CF**, Schoenberg M, Enger C, et al: Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:2028-32.
- El-Bolkainy MN**, Mokhtar NM, et al: The impact of Schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. *Cancer* 1981; 48:2643.
- Engel P**, Amagnostaki L, Braendstrup O: The muscularis mucosae of the human urinary bladder: implications for tumor staging on biopsies. *Scand J Urol Nephrol* 1992; 26:249.
- Esrig D**, Spruck CH, Nichols PW, et al: p53 nucleoprotein expression correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade and stage in bladder cancer. *J Pathol* 1993; 143:1390.
- Esrig D**, Elmajian D, Groshen S, et al: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994;331(19):1259-64.
- Esteller M**, Corn PG, Urena JM, et al: Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58: 4515-8.
- Esteller M**, Hamilton SR, Burger PC, et al: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999a ; 59: 793-7.

- Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al:** Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999b; 59: 67-70.
- Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, et al:** Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000a; 60: 2368-71.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al:** Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl Cancer Inst* 2000b ; 92: 564-9.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al:** Inactivation of the DNA repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New Engl J Med* 2000c; 343:1350-4.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al:** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001a; 61:3225-9.
- Esteller M, Risques RA, Toyota M, et al:** Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001b; 61:4689-92.
- Esteller M y Herman JG:** Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *Journal of Pathology* 2002a; 196:1-7.
- Esteller M:** CpG island hypermethylation and tumor supresor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogen* 2002b; 21: 5427-40.
- Ethan L, Stuart D, Dangoux C, et al:** Intraarterial cisplatin and concurrent radiation for locally advanced bladder cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7:230.
- Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, et al:** Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *The Lancet* 2001a; 357: 1335-6.
- Evron E, Umbricht CB, Korz D, et al:** Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2001b; 61: 2782-7.
- Fairechild W, Spence C, Solomon H, et al:** The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *J Urol* 1979; 122:163.
- Falor WH y Ward-Skinner RM:** The importance of marker chromosomes in superficial transitional cell carcinoma of the bladder: 50 patients followed up till 17 years. *J Urol* 1988; 139:929.
- Fearon ER:** BRCA1 and E-cadherin promoter hypermethylation and gene inactivation in cancer-association or mechanism? *J Nat Cancer Inst* 2000; 92: 515-7.
- Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, et al:** High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(11):6049-54.
- Filmer RB y Spencer JR:** Malignancies in bladder augmentations and intestinal conduits. *J Urol* 1990; 143:671.
- Fisher N, Rübben H, Lutzeyer W, et al.** Intravesikale Chemorezidivprophylaxe superfizialer Blasenkerzynome mit Adriamycin. *Ruttac, Registry for Urinary Tract Tumors RWTH Aachen. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Urologie* 1986; 37:25.

- Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K, et al:** Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:129-33.
- Fitzpatrick JM, West AB, Butler MR, et al:** Superficial bladder tumors (stage pTa, grades 1 and 2): The importance of recurrence pattern following initial resection. *J Urol* 1986; 135:920.
- Flamm J, Donner G, Oberleitner S, et al:** Adjuvant intravesical mitoxantrone after transurethral resection of primary superficial transitional cell carcinoma of the bladder: A prospective randomized study. *Eur J Cancer* 1995; 31A:143.
- Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, et al:** Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and body fluids. *Science* 2000; 287:2017-9.
- Fossa SD, Heilo A, Borner O:** Unexpectedly high serum methotrexate levels in cystectomized bladder cancer patients with an ileal conduit treated with intermediate doses of the drug. *J Urol* 1990; 143:498.
- Fradet Y, Tardif M, Bourget L, et al:** Clinical cancer progression in urinary bladder tumors evaluated by multiparameter flow cytometry with monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1990; 50:432.
- Fradet Y:** Markers of prognosis in superficial bladder cancer. *Semin Urol* 1992; 10:28.
- Fradet Y. y Cordon-Cardo C:** Critical appraisal of tumor markers in bladder cancer. *Semin Urol* 1993; 11:145.
- Fradet Y y Lacombe L:** Can biological markers predict recurrence and progression of superficial bladder cancer? *Curr. Opin. Urol* 2000;10: 441-5.
- Freeman JA, Esrig DE, Stein JP, et al:** Radical cystectomy for high risk patients with superficial bladder cancer in the era of orthotopic urinary reconstruction. *Cancer* 1995; 76:883.
- Friedell GH, Parija CG, Nagy GK, et al:** The pathology of human bladder cancer. *Cancer* 1980; 45:1823.
- Friedrich MG, Erbersdobler A, Schwaibold H, et al:** Detection of loss of heterozygosity in the p53 tumor-suppressor gene with PCR in the urine of patients with bladder cancer. *J Urol* 2000; 163:1039-42.
- Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, et al:** DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Letters* 2000; 149: 125-134.
- Futsher B et al:** Role of DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nature Genet* 2002; 31: 175-179.
- Gabrilove JL, Jakubowski A, Scher H, et al:** Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional cell carcinoma of the urothelium. *N Engl J Med* 1988; 318:1411-4.
- Gamarra MC y Zein T:** Cytologic spectrum of bladder cancer. *Urology* 1984; 23:23.
- Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, et al:** Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomastasis. *Histol Histo-pathol* 1999; 14:1159-64.
- Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, et al:** Horizontal transfer of DNA and the genomastasis hypothesis. *Blood* 2000; 95:724-5.

- Ghoneim** MA y **Awad** HK: Results of treatment in carcinoma of the bilharzial bladder. *J Urol* 1980; 123:850.
- Ghossein** RA, **Bhattacharya** S, **Rosai** J: Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1950-60.
- Gibas** Z y **Sandberg** AA: Chromosomal rearrangements in bladder cancer. *Urology* 1984; 23:3.
- Gil** J, **Fernández** A, **Otero** G: Epidemiología del cáncer de vejiga. Tema monográfico LXIII Congreso Nacional de Urología Junio 1998.
- Goessl** C, **Heicappell** R, **Munker** R, et al: Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58:4728-32.
- Goessl** C, **Krause** H, **Muller** M, et al: Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 2000; 60:5941-5.
- Goessl** C, **Müller** M, **Straub** B, et al: DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *European Urology* 2002; 41, 668-676.
- Goffinet** DR, **Schneider** MJ, **Glatstein** EJ, et al: Bladder cancer: Results of radiation therapy in 348 patients. *Radiology* 1975; 117:149.
- Golijanin** D, **Sherman** Y, **Shapiro** A, **Pode** D: Detection of bladder tumors by immunostaining of the Lewisx antigen in cells from voided urine. *Urology* 1995; 46:173.
- González-Zulueta** M, **Bender** CM, **Yang** AS, et al: Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 1995; 55: 4531-5.
- Gonzalzo** ML, **Hayashida** T, **Bender** CM, et al: The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998; 58: 1245-1252.
- Goodman** GB, **Hislop** TG, **Elwood** JM, et al: Conservation of bladder function in patients with invasive bladder cancer treated by definitive irradiation and selective cystectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; 7:569.
- Gordon** NS, **Sinclair** RA, **Snow** RM: Pelvic lipomatosis with cystitis cystica, cystitis glandularis and adenocarcinoma of the bladder: First reported case. *Aust N Z J Surg* 1990; 60:229.
- Grady** WM, **Rajput** A, **Lutterbaugh** JD, et al: Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 900-2.
- Greven** KM, **Solin** LJ, **Hanks** GE: Prognostic factors in patients with bladder carcinoma treated with definitive irradiation. *Cancer* 1990; 65:908.
- Guirado** D y **Ruiz de Almodóvar** J.M.: Prediction of normal tissue response and individualisation of dose in radiotherapy. *Medical Phys.* en prensa, 2003.
- Haaff** EO, **Dresner** SM, **Ratlif** TL, et al : Two course of intravesical bacillus Calmette-Guerin for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1986; 136:820-4.
- Habuchi** T, **Takahashi** T, **Kakinuma** H, et al: Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene* 2001; 20: 531-7.

- Hardeman** SW, Perry A, Soloway MS: Transitional cell carcinoma of the prostate following intravesical therapy for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1988; 140:289.
- Hartmann** A, Moser K, Kriegmair M, et al: Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 1999; 154:721-7.
- Harving** N, Wolf H, Melsen F: Positive urinary cytology after tumor resection: An indicator for concomitant carcinoma in situ. *J Urol* 1988; 140:495.
- Heney** NM, Ahmed S, Flanagan M, et al: Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J Urol* 1993;130:1083-6.
- Henke** W, Jung M, Jung K, et al: Detection of PSA mRNA in blood by RT-PCR does not exclusively indicate prostatic tumor cells. *Clin Chem* 1996; 42:1499-500.
- Henry** K, Miller J, Mori M, et al: Comparison of transurethral resection to radical therapies for stage B bladder tumors. *J Urol* 1988; 140:964.
- Herman** JG, Latif F, Weng Y, et al: Silencing of the *VHL* tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9700-4.
- Herman** JG, Graff JR, Myohanen S, et al: Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9821-6.
- Hermanek** P, Hutter RVP, Sobin LH, et al: Atlas TNM Guía ilustrada de la clasificación de los tumores malignos. Traducción de la 4 edición inglesa. Ed Springer 1997; 263-326.
- Herr** HW, Badalament RA, Amato DA, et al: Superficial bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: A multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J Urol* 1989a; 141:22-9.
- Herr** HW: Neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 1989b; 5:266.
- Herr** HW: Staging invasive bladder tumors. Review. *J Surg Oncol* 1992; 51:217-20.
- Herr** HW y Scher HI: Neoadjuvant chemotherapy and partial cystectomy for invasive bladder cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12:975.
- Herr** HW: Tumour progression and survival in patients with T1GIII bladder tumours: 15 years outcome. *Br J Urol* 1997; 80:762-5.
- Herr** HW, Bajorin DF, Sher HI, et al: Can p53 help select patients with invasive bladder cancer for bladder preservation? (see comments). *J Urol* 1999; 161:20-22; discussion, 22-23.
- Hibi** K, Nakayama H, Yamazaki T, et al: Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 94:429-31.
- Hiltunen** MO, Alhonen L, Koistinaho J, et al: Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1997;70: 644-8.
- Hoon Kang** GH, Shim YH, Jung HY, et al: CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61:2847-51.
- Hruban** RH, van der Riet P, Erozan YS, et al: Brief report: Molecular biology and the early detection of carcinoma of the bladder-the case of Hubert H. Humphrey. *N Engl J Med* 1994; 330:1276-8.

- Huben RP:** Tumor markers in bladder cancer. *Urology* 1984; 23:10.
- Huland H, Otto U, Droese M, et al:** Long-term mitomycin-C instillation after transurethral resection of superficial bladder carcinoma: Influence of the recurrence, progression and survival. *J Urol* 1984; 132:27.
- Husband JE, Olliff JF, Williams MP, et al:** Bladder cancer: Staging with CT and MR imaging. *Radiology* 1989; 173:435.
- Husmann DA y Spence HM:** Current status of tumor of the bowel following uretrosigmoidoscopy: A review. *J Urol* 1990; 144:607.
- Hussain MH, Glass TR, Forman J, et al:** Combination cisplatin, 5fluorouracil and radiation therapy for locally advanced unresectable or medically unfit bladder cancer cases. A SWOG study. *J Urol* 2001; 165: 56-61.
- Iliakis G:** The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 1991; 13(12):641-8.
- Issa JP, et al:** Methylation of the estrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature Genet* 1994; 7: 536-540.
- Issa JP, Zehnbaauer BA, Civin CI, et al:** The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 1996; 56, 973-7.
- Issa JP, Ahuja N, Toyota M, et al:** Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001; 61: 3573-7.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al:** DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61:1659-65.
- Javadpour N:** Multiple cell markers in bladder cancer: principles and clinical practice. *Urol Clin North Am* 1984; 11:609.
- Jeronimo C, Nomoto S, Cabañero OL, et al:** Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene* 2001a; 20:5195-8.
- Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al:** Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Nat Cancer Inst* 2001b; 93: 1747-52.
- Jewett HJ y Strong GH:** Infiltrating carcinoma of the bladder: Relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of local extensión and metastases. *J Urol* 1946; 55:366.
- Jiménez Cruz JF, Vera Donoso CD, Leiva O, et al:** Intravesical immunoprophylaxis in recurrent superficial bladder cancer (stage T1): Multicenter trial comparing bacille Calmette-Guerin and interferon-alpha. *Urology* 1997; 50:529-35.
- Jin Z, Tamura G, Tsuchiya T, et al:** Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *Br. J Cancer* 2001; 85: 69-73.
- Johnson DE, Wishnow KI, Tenney D:** Are frozen section examinations of ureteral margins required for all patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer?. *Urology* 1989; 33:451.
- Jones PA y Laird PW:** Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21:163-7.
- Jones PA y Baylin SB:** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3:415-28.

- Jung R**, Petersen K, Kruger W, et al: Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer* 1999; 81:870-3.
- Kaasinen E**, Rintala E, Hellström P, et al: Factors explaining recurrence in patients undergoing chemoinmunotherapy regimens for frequently recurring superficial bladder carcinoma. *European Urology* 2002; 42: 167-174.
- Kaneda T**, Hoshi S, Mao H, et al: Detection of urogenital malignant cells in the peripheral blood by nested RT-PCR using keratin 19 mRNA. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1998; 89:33-42.
- Kang JH**, Kim SJ, Noh DY, et al: Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Laboratory investigations* 2001; 81: 573-579.
- Kaderlink KR** y Kadlubar FF: Metabolic polymorphisms and carcinogen adducts formation in human populations. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 108-117.
- Karlin S** y Burge C: Dinucleotide relative abundance extremes: A genomic signature. *Trends Genet* 1995;11: 283-90.
- Karpf AR** y Jones DA: Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogen* 2002; 21: 1048-61.
- Kawakami K**, Brabender J, Lord RV, et al: Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal carcinoma. *Natl Cancer Inst* 2000; 92:1805-11.
- Kern VH**: The grade and pathologic stage of bladder cancer. *Cancer* 1984; 53:1185.
- Kidwell MG**: Lateral transfer in natural populations of eukaryotes. *Ann Rev Genet* 1993; 27:235-56.
- Kiemeny LALM**, Wijes JA, Heijbrock RP, et al: Should random urothelial biopsies be taken from patients with primary superficial bladder cancer? A decision analysis. *Br J Urol* 1994; 73:164.
- Kierman M** y Gafney EF: Brunn's nests and glandular metaplasia: normal urothelial variants in the supramontanal prostatic uretra. *J Urol* 1987; 137:877.
- Klan R**, Loy V, Huland H: Residual tumor discovered in routine second transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1991; 146:316.
- Ko Y**, Grunewald E, Totzke G, et al: High percentage of false-positive results of cytokeratin 19 RT-PCR in blood: A model for the analysis of illegitimate gene expression. *Oncology* 2000; 59:81-8.
- Kock NG**, Ghoneim MA, Lycke KG, et al: Replacement of the bladder by the urethral Kock pouch: Functional results, urodynamics and radiological features. *J Urol* 1989; 141:1111.
- Konety BR** y Getzenberg RH: Urine based markers of urological malignancy. *J. Urol* 2001; 165:600-11.
- Koontz WW**, Prout GRJr, Smith W, et al: The use of intravesical thiotepa in the management of non-invasive carcinoma of the bladder. *J Urol* 1981; 125:307.
- Koraitim M**, Kamal B, Metwally N, et al: Transurethral ultrasonic assessment of bladder carcinoma: Its value and limitations. *J Urol* 1995; 154:375.

- Korkolopoulou P**, Christodoulou P, Konstantinidou AE, et al: Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. *Hum Pathol* 2000; 31: 751-60.
- Korman HJ**, Peabody JO, Cerry JC, et al: Autocrine motility factor receptor as a possible urine marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1996; 155:347-9.
- Koshikava T**, Leyh H, Schenck U: Difficulties in evaluating urinary specimens after local mitomycin therapy of bladder cancer. *Diagn Cytopathol* 1989; 5:117.
- Koss LG**, Esperanza MT, Robbins MA: Mapping cancerous and precancerous bladder changes: A study of the urothelium in ten surgically removed bladders. *JAMA* 1974; 227:281.
- Koss LG**: Tumors of the urinary bladder. In *Atlas of tumor Pathology, Second Series, Fascicle 11*. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1975, p 1.
- Koss LG**, Wersto RP, Simmons DA, et al: Predictive value of DNA measurements in bladder washings: Comparison of flow cytometry, image cytophotometry, and cytology in patients with a past history of urothelial tumors. *Cancer* 1989; 64:916.
- Kubota Y**, Shuin T, Miura T, et al: Treatment of bladder cancer with a combination of hyperthermia, radiation and bleomycin. *Cancer* 1984; 53:199.
- Kurth K**, Vijgh WJ, ten Kate F, et al: Phase ½ study of intravesical epirubicin in patients with carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1991; 146:1508.
- Kurth KH**, Denis L, Bouffloux Ch, et al: Factors affecting recurrente and progresión in superficial bladder tumours. *Eu J Cancer* 1995; 31:1840-6.
- Lair PW**: The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews/Cancer* 2003; 3:253-61.
- Lamm DL**: Intravesical therapy of superficial bladder cancer. *AUA Update* 1983; 2:2.
- Lamm DL**, Blumenstein BA, Crawford ED, et al: A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacillus Calmette-Guering for transitional cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 1991; 325:1205.
- Lamm DL**, Crawford ED, Blumenstein BA, et al: Maintenance BCG immunotherapy of superficial bladder cancer: A randomized prospective Southwest Oncology Group Study. *J Urol* 1992a; 147:247.
- Lamm DL** y Griffith JG: Intravesical Therapy: Does it affect the natural history of superficial bladder cancer? *Seminars in Urology* 1992b; 10:39.
- Lamm DL**, Blumenstein BA, Crawford ED, et al: Randomized intergroup comparison of bacillus Calmette-Guering Immunotherapy and mitomycin C chemotherapy prophylaxis in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* 1995; 1:119.
- Lantz EJ** y Hattery RR: Diagnostic imaging of urothelial cancer. *Urol Clin North Am.* 1984; 11:576.
- Lazarevic B** y Garret R: Inverted papilloma and papillary transitionalcell carcinoma of urinary bladder. *Cancer* 1978; 42:1904.
- Lee WH**, Isaacs WB, Bova GS, et al: CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarmers Prev* 1997; 6:443-50.
- Lee R** y Droller MJ: Evolución natural del cáncer de vejiga. Mexico: Ed Mc Graw Hill Interamericana. *Urol Clin North Am* 2000; 27(1):1-13.

- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37:646-50.
- Leonhardt H y Cardoso MC: DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J Cell Biochem, suppl* 2000; 35: 78-83.
- Liang JT, Chang KJ, Chen JC, et al: Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999; 57: 149-56.
- Liebert M, Washington RW, Wedemeyer G, et al: Loss of $\alpha 6\beta 4$ integrin and collagen VI in bladder cancer. *Am J Pathol* 1994; 144:787.
- Lilien OM y Camey M: 25-year experience with replacement of human bladder (Camey procedure). *J.Urol* 1984; 132:886.
- Lin X, Tascilar M, Lee WH, et al: GSTPI CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTPI expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 2001; 159:1815-26.
- Linehan WM, Cordon-Cardo C, Isaacs W: Molecular biology of genitourinary cancers. In: VT de Vita, S Hellman and SA Rosenberg (eds.), *Principles and Practice of Oncology*. Ed. 5. Philadelphia JB Lippincott co. 1997.
- Linn JF, Lango M, Halachmi S, et al: Microsatellite analysis and telomerase activity in archived tissue and urine samples of bladder cancer patients. *Int J Cancer* 1997; 74:625-9.
- Liu SCS y Liotta LA: Biochemistry of bladder cancer invasion and metastases: Clinical implications. *Urol Clin North Am.* 1992; 19:621.
- Liu VW, Shi HH, Cheung AN, et al: High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61:5998-6001.
- Lo YM, Wong IH, Zhang J, et al: Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1999; 59:3899-903.
- Lo YM, Chan AT, Chan LY, et al: Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. *Cancer Res* 2000; 60:6878-81.
- Loherer PJ, Einhorn LH, Elson PJ, et al: A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: A cooperative group study. *J Clin Oncol* 1992; 10:1066.
- López E, Núñez MI, López E, et al: Breast cancer acute radiotherapy morbidity evaluated by different scoring systems. *Breast Cancer Research and Treatment* 2002; 73: 127-134.
- Lubbert M: *Current Topics in Microbiology and immunology* 2000; 249: 135-164.
- Lyon E, Millson A, Lowery MC, et al: Quantification of HER2/neu gene amplification by competitive PCR using fluorescent melting curve analysis. *Clin Chem* 2001; 47:844-51.
- Madgar I, Goldwasser B, Nativ O, et al: Long-term follow-up of patients less than 30 years old with transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1988; 139:933.
- Madsen P O e Iversen P: A point system for selecting patients for operative candidates. En *"Benign Prostatic Hypertrophy*, ed. Hinman, F., Jr. Chapter 79, pp. 763-765. New York, Berlin: Springer-Verlag. 1983.

- Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, et al:** Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB Journal* 2000; 14:1585-94.
- Malmstron, PU, Busch C, Norlen BJ, et al:** Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma. *Scand J urol Nephrol* 1988; 22:265.
- Mandel P y Metais P:** Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142:241-3.
- Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al:** Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996; 271:659-62.
- Marshall VF:** Symposium on bladder tumors: Current clinical problems regarding bladder tumors. *Cancer* 1956; 9:543.
- Martínez García C:** Aproximación a la epidemiología del cáncer en España. Barcelona: Ed JIMS; 1988:p 19.
- Martínez Piñeiro JA y Muntañola P:** Fluorescence urinary cytology. En *Bladder tumors and other topics in urological oncology*, eds.M. Pavone, P. Smith y F. Edsmy. Nueva York: Plenum Press; 1980: p 72.
- Martínez piñeiro JA, Jiménez León J, Martínez Piñeiro LJr, et al:** Bacillus Calmette-Guering versus doxorubicin versus thiothepa: A randomized prospective study in 202 patients with superficial bladder cancer. *J Urol* 1990; 143:502.
- Martínez Piñeiro JA and Martínez Piñeiro L:** Tumores vesicales. *Tratado de Urología Jimenez Cruz*. Barcelona: Ed J.R. Prous 1993; Vol 2: pp 1151-205.
- Martínez Piñeiro JA:** Tumores vesicales. Ponencia Congreso Nacional de Urología. *Actas Asociación Española de Urología* 3. 1970; 1.
- Marusic A:** DNA lab helps identify missing persons in Croatia and Bosnia and Herzegovina. *Lancet* 2001; 358:1244.
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al:** Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001; 61:8659-63.
- Mathur VK, Krahn HP, Ramse ER,:** Total cystectomy for bladder cancer. *J Urol* 1981; 125:784.
- Matthews PN, Madden N, Bidgood KA, et al:** The clinical pathological features of metastatic superficial papillary bladder cancer. *J Urol* 1984; 132:904.
- Max N, Willhauck M, Wolf K, et al:** Reliability of PCR-based detection of occult tumour cells: Lessons from real-time RT-PCR. *Melanoma Res* 2001; 11:371-8.
- McCarthy M:** PSA screening said to reduce prostate-cancer deaths, or does it? *Lancet* 1998; 351:1563.
- Melky JR, Vincent PC, Clark SJ, et al:** Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999; 59:3730-40.
- Mellon K, Wright C, Kelly P, et al:** Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J Urol* 1995; 153:919.
- Messing EM:** Clinical Implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50:2530.

- Messing EM y Catalona W:** Urothelial tumors of the urinary tract. Campbell's urology, 7th ed. Philadelphia: W.B: Saunders Company; 1998; vol 3: pp2327-94.
- Michel F, Gattegno B, Meyrier A, et al:** Paraneoplastic hypercalcemia associated with bladder carcinoma: Report of two cases. *J Urol*, 1984; 131:753.
- Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, et al:** Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin. Cancer Res* 2000; 6:3131-38.
- Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, et al:** Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47:207-14.
- Miller EB, Eure GR, Schellhammer PF:** Upper tract transitional cell carcinoma following treatment of superficial bladder cancer with BCG. *Urology* 1993; 42:26.
- Miller LS y Johnson DE:** Megavoltaje irradiation for bladder cancer: Alone, postoperative or preoperative. In *Proceedings of the Seventh National Cancer Conference*. Philadelphia: J.B Lippincott; 1973: p 771.
- Model F, Adorjan P, Olek A, et al:** C. Feature selection for DNA methylation-based cancer classification. *Bioinformatics* 2001; 17(Suppl 1):157-64.
- Mommsen S, Sell A, Barford N, et al:** N-acetyl-transferase phenotypes of bladder cancer patients in a low risk population. *Lancet* 1982; 2:1228.
- Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al:** Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52:6110-2.
- Moreno JG, O'Hara SM, Long JP, et al:** Transrectal ultrasound-guided biopsy causes hematogenous dissemination of prostate cells as determined by RT-PCR. *Urology* 1997; 49:515-20.
- Morris SB, Gordon EM, Shera RJ, et al:** Superficial bladder cancer: How long should a tumour-free patient have check cystoscopies?. *Br J Urol* 1995; 75:193.
- Morrison AS:** Early detection: Sensitivity and lead time. In: *Screening in Chronic Disease*, 2nd ed. New York. Oxford University Press. 1992. pp 42-73.
- Mourah S, Cussenot O, Vimont V, et al:** Assessment of microsatellite instability in urine in the detection of transitional-cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer* 1998; 79:629.
- Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al:** A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4:271-5.
- Muren LP, Jebsen N, Gustafsson A, et al:** Can dose-response models predict reliable normal tissue complication probabilities in radical radiotherapy of urinary bladder cancer? The impact of alternative radiation tolerance models and parameters. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2001; 50: 627-637.
- Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, et al:** Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4346-8.
- Neal DE, Sharples L, Smith K, et al:** The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990; 65:1619.
- Nishimura K, Hida S, Nishio Y, et al:** The validity of magnetic resonance imaging (MRI) in the staging of bladder cancer: Comparison with computed tomography (CT) and transurethral ultrasonography (US). *Jpn J Clin Oncol* 1988; 18:217.

- Norming U**, Tribukait B, Nyman CR, et al: Prognostic significance of mucosal aneuploidy in stage Ta/T1 grade 3 carcinoma of the bladder. *J Urol* 1992;148:1420.
- Núñez MI**, Villalobos M, Olea N, et al: Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *Br J Cancer* 1995; 71: 311-6.
- Núñez MI**, Guerrero MR, Lopez E, et al: DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. *Int J Cancer* 1998; 76: 354-61.
- Nuovo GJ**, Plaia TW, Belinsky SA, et al: In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; Oct 26;96(22):12754-9.
- Oda H**, Oda T, Ohoka H, et al: Flow Cytometric evaluation of Tomsen- Friedenreich antigen on transitional cell cancer using monoclonal antibody. *Urol Res* 1990; 18:107.
- Olumi AF**: Análisis crítico de la utilización de la proteína p53 como marcador para el tratamiento del cáncer de vejiga. Mexico: Ed Mc Graw Hill Interamericana. *Urol Clin North Am.* 2000; 27 (1):75-82.
- Orihuela E y Shahon RS**: Influence of blood group type on the natural history of superficial bladder cancer. *J Urol* 1987; 138:758.
- Oosterlink W**, Kurth KH, Schröder FH, et al: A prospective EORTC GU group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 1993; 149: 749-52.
- Paganini-Hill A**, Chao A, Ross P, et al: Vitamin A, β -carotene, and the risk of cancer a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 443-8.
- Parmar MKB**, Freedman LS, Hargreave TB, et al: Prognostic factors for recurrent and follow-up polices in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council subgroup on superficial bladder cancer (urological cancer working party) *J Urol.* 1989; 142: 284-8.
- Parry WL y Hemstreet GP**: Cancer detection by quantitative fluorescence image analysis. *J Urol* 1988; 139:270.
- Peto R**, Doll R, Buckley A, et al: Can dietary beta carotene materially reduce human cancer rates?. *Nature* 1981; 290:201-8.
- Plumb JA**, Strathdee G, Sludden J, et al: Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 2000; 60: 6039-44.
- Poder JA**, Waals CP, Bestor TH: Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; 13: 335-40.
- Polascik TJ**, Wang ZP, Shue M, et al: Influence of sextant prostate needle biopsy or surgery on the detection and harvest of intact circulating prostate cancer cells. *J Urol* 1999; 162: 749-52.
- Pollack A**, Zagar GK, Swanson DA: Muscle invasive bladder cancer treated with external beam radiotherapy: Prognostic factors. *Int J Rad Oncol Biophys* 1994; 30:267.
- Pornthanakasem W**, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, et al: Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer* 2001; 1:2.

- Potosky AL, Feuer EJ, Levin DL:** Impact of screening on incidence and mortality of prostate cancer in the United States. *Epidemiol Rev* 2001; 23:181-6.
- Prasad MA, Trybus TM, Wojno KJ, et al:** Homozygous and frequent deletion of proximal 8p sequences in human prostate cancers: identification of a potential tumor suppressor gene site. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 23:255-62.
- Pritchett TR, Schieff WM, Klatt E, et al:** The potency-sparing radical cystectomy: Does it compromise the completeness of the cancer resection? *J Urol* 1988; 140:1400.
- Prout GR Jr, Koontz WW Jr, Coombs J, et al:** Long-term fate of 90 patients with superficial bladder cancer randomly assigned to receive or not to receive thiotepa. *J Urol* 1983;130:677.
- Prout GR Jr; Lin CV, Benson R Jr, et al:** Photodynamic Therapy with hematoporphyrin derivative in the treatment of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 1987; 317:1251.
- Prout GR, Barton BA, Griffin PP, et al:** Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. *J Urol* 1992;148:1413.
- Radzikowski CZ, Steuden I, Wiedlocha A, et al:** The Tomsen- Friedenreich antigen on human urothelial cell lines detectable by peanut lectin and monoclonal antibody raised against human glycophorin A. *Anticancer Res* 1989; 9:103.
- Raghavan D, Boyer M, Rodgers J, et al:** Initial intravenous cisplatin therapy for invasive bladder cancer: Minimum follow-up of ten years. *Urol Oncol* 1995.
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, et al:** DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6107-12.
- Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, et al:** DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 2001; 3:1-7.
- Rehn L:** Ueberbasen trumuren bei fuchsmarbeitern. *Arch Kind Cir* 1895; 50:588.
- Retz M, Lehmann J, Roder C, et al:** Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients. *Eur Urol* 2001; 39:507-15.
- Reznikoff CA, Sarkar S, Julicher KP, et al:** Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol* 2000; 5:191-203.
- Ricos JV e Iborra I:** Linfadenectomía en el cáncer vesical. En: Estado actual de las linfadenectomías: su valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico, (Eds.). Solson, I.; Iborra, V.; Ricos, J.V.; Mouros, J.L y Dumont, R. Tema monográfico LVI Congreso Nacional de Urología. Madrid: ENE Ediciones; 1991:81.
- Riddle PR, Chisholm GD, Trott PA, et al:** Flat carcinoma in situ of the bladder *Br J Urol* 1976; 47:829.
- Riou G, Mathieu MC, Barrois M, et al:** C-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification is a better indicator of poor prognosis than protein over-expression in operable breast-cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 95:266-70.
- Ross RK, Jones PJ, Yu MC:** Bladder cancer epidemiology and pathogenesis. *Seminars in Oncology* 1996; 23:536-45.
- Rubben H, Lutzeyer W, Fischer N, et al:** Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors. *J Urol* 1988; 139:283.

- Rubin P**, Pavy JJ, et al: Late effects consensus conference: RTOG/EORTC. Scoring system LENT-SOMA *Rad.Oncol* 1995; 35: 5-60.
- Rubin MA**, K1eter B, Zhou M, et al: Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: Evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 2001;159:1211-8.
- Ruiz de Almodóvar JM**, Steel GG, Whitaker SJ, et al: A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 1994a; 65:641-9.
- Ruiz de Almodóvar JM**, Ruiz FJ, Olea N, et al: Risk of death from thyroid cancer. *Radiother Oncol* 1994b;31:207-12.
- Ruiz de Almodóvar, J.M.**; Guirado, D.; Núñez, M.I. et al: Individualisation of radiotherapy in breast cancer patients: Possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2002; 62:327-33.
- Ruiz-Garcia J**, Ruiz de Almodovar JM, Olea N, et al: Thyroglobulin level as a predictive factor of tumoral recurrence in differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med* 1991; 32:395-8.
- Russel KJ**, Laramore GE, Griffin TW, et al: The fast neutron radiotherapy for treatment of carcinoma of the urinary bladder. *Am J Clin Oncol* 1989; 12:301.
- Sager EM**, Talle K, Fossa SD, et al: Contrast-enhanced computed tomography to show perivesical extensión in bladder carcinoma. *Acta Radiol* 1987; 28:307.
- Salem C**, Liang G, Tsai YC, et al: Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 2000; 60:2473-6.
- Sánchez de la Muela P**, Rosell D, Aguera L, et al: Superficial bladder cancer: Survival and prognostic factors. *Eur Urol* 1991; 20:184.
- Sánchez-Céspedes M**, Esteller M, Wu L, et al: Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000; 15: 892-5.
- Schlegel PN y Walsh PC**: Neuroanatomical approach to radical cystoprostatectomy with preservation of sexual function. *J Urol* 1987; 138:1402.
- Schulz WA**: DNA methylation in urological malignancies (Review). *Int J Oncol* 1998; 13:151-67.
- Serdyuk OI**, Botezatu IV, Shelepov VP, et al: Detection of mutant k-ras sequences in the urine of cancer patients. *Bull Exp Biol Med* 2001;131:283-4.
- Seripa D**, Parrella P, Gallucci M, et al: Sensitive detection of transitional cell carcinoma of the bladder by microsatellite analysis of cells exfoliated in urine. *Int J Cancer* 2001; 95:364-9.
- Shapiro B**, Chakrabarty M, Cohn EM, et al: Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51:2116-20.
- Sharkey RM**, McBride WJ, Karakay H, et al: A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody. *Cancer Res* 2003; 63: 354-63.
- Sheinfeld J**, Reuter VE, Melamed MR, et al: Enhanced bladder cancer detection with the Lewis X antigen as a marker of neoplastic transformation. *J Urol* 1990; 143:285.
- Shiple WU**, Kaufman SD, Prout GR Jr: The role of radiation therapy and chemotherapy in the treatment of invasive carcinoma of the urinary bladder. *Semin Oncol* 1988; 15:390.

- Shipley WU**, Winter KA, Kaufman SD, et al: Phase III trial of neoadjuvant chemotherapy in patients with invasive bladder cancer treated with selective bladder preservation by combined radiation therapy and chemotherapy: initial results of RTOG 89-03. *J Clin Oncol* 1998; 16:3576-83.
- Shipley WU**, Kaufman SD, Tester WJ, et al: Overview of bladder cancer trials in the radiation therapy oncology group. *Cancer Supplement* 2003; 97:2115-8.
- Shultz PK**, Herr HW, Zhang ZF, et al: Neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: Prognostic factors for survival of patients treated with MVAC with five year follow-up. *J Clin Oncol* 1994;12:1394.
- Sidransky D**, Von Eschenbach A, Tsai YC, et al: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252:706-9.
- Sidransky D**: Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1997; 278:1054-9.
- Sidransky D**: Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:210-9.
- Silva JM**, Dominguez G, Villanueva MJ, et al: Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br J Cancer* 1999a ; 80:1262-64.
- Silva JM**, Dominguez G, Garcia JM, et al: Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1999b; 59:3251-6.
- Silva JM y Bonilla F**: Correspondence re: Coulet F, et al: Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res* 2001; 61:8595-6.
- Singal R**, van Wert J, Bashambu M: Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:4820-6.
- Skinner DG**: Management of invasive bladder cancer: A meticulous pelvic node dissection can make the difference. *J.Urol* 1982; 128:34.
- Skinner DG y Leiskovsky G**: Contemporary cystectomy with pelvic node dissection compared to preoperative radiation therapy plus cystectomy in management of invasive bladder cancer. *J Urol* 1984; 131:1069.
- Skinner DG**, Daniels JR, Russell CA, et al: The role of adjuvant chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: A prospective comparative trial. *J Urol* 1991; 145:459.
- Smith B**, Selby P, Southgate J, et al: Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338:1227-9.
- Smith JA Jr y Withmore WF Jr**: Regional lymph node metastase from bladder cancer. *J Urol* 1981a; 126:591.
- Smith JA Jr y Withmore WF Jr**: Salvage cystectomy for bladder cancer after failure of definitive irradiation. *J Urol* 1981b; 125:643.
- Smith MR**, Biggar S, Hussain M: Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: Implications for detection of micrometastases. *Cancer Res* 1995; 55:2640-4.
- Sohn M**, Neuerburg J, Teufl F, et al: Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in the staging of the urinary bladder neoplasms. *Urol Int* 1990; 45:142.
- Solé F**, Chéchile G, Algaba F, et al: Biología molecular de los tumores urológicos. Tema monográfico. LX Congreso Nacional de Urología. Madrid: Ene ediciones; 1995.

- Soloway MS:** Intravesical and systemic chemotherapy in the management of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1984; 11:623.
- Soloway MS:** Learning to integrate systemic chemotherapy into a treatment plan for patients with advanced bladder cancer. *J Urol* 1985; 133:440.
- Solsona E, Iborra I, Ricos JV, et al:** Feasibility of transurethral resection for muscle infiltrating carcinoma of the bladder: Prospective Study. *J Urol* 1992; 147:1513.
- Sonneveld P, Kurth KH, Hagemyer A, et al:** Secondary hematologic neoplasm after intravesical chemotherapy for superficial bladder carcinoma. *Cancer* 1990; 65:23.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al:** Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 67-71.
- Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al:** Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 4675-8.
- Spruck CH, Ohneseit PF, González Zulueta M, et al:** Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; 54:784.
- Stamato TD y Denko N:** Asymmetric field inversion gel electrophoresis: a new method for detecting DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 1990; 121(2):196-205.
- Steiner G y Sidransky D:** Molecular differential diagnosis of renal carcinoma: From microscopes to microsatellites. *Am J Pathol* 1996; 149:1791-5.
- Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, et al:** Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med* 1997; 3:621-4.
- Steiner G, Reinschmidt G, Muller SC:** Molecular genetic diagnosis of de novo and recurrent bladder cancer. *Electrophoresis* 1999; 20:280-2.
- Steinman CR:** Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest* 1975; 56:512-5.
- Sternberg CN y Parmar MKB:** Neoagent chemotherapy is not (yet) standard treatment for muscle-invasive bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19(Suppl): 22-26.
- Stockle M, Meyenburg W, Wellek S, et al:** Adjuvant polychemotherapy of nonorgan-confined bladder cancer after radical cystectomy revisited: Long-term results of a controlled prospective study and further clinical experience. *J Urol* 1995; 153:47.
- Straub B, Müller M, Krause H, et al:** Detection of prostate-specific antigen RNA before and after radical retropubic prostatectomy and TUR-P using 'LightCycler' based quantitative real-time PCR. *Urology* 2001; 58:815-20.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, et al:** Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46:318-22.
- Studer UE, Ackermann D, Casanova GA, et al:** Three years experience with an ileal low pressure bladder substitute. *Br J Urol* 1989; 63:43.
- Studer UE, Bacchi M, Biedermann C, et al:** Adjuvant cisplatin chemotherapy following cystectomy for bladder cancer: Results of a prospective randomized trial. *J Urol* 1994; 152:81.
- Sumiyoshi Y, Yokota K, Akeyama M, et al:** Intraarterial doxorubicin chemotherapy in combination with low dose radiotherapy for the treatment of locally advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1994; 152:362.

- Suzuki H, Itoh F, Toyota M, et al:** Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res* 2000; 60: 4353-57.
- Swanson DA, Lilea A, Zagars GK:** Preoperative irradiation and radical cystectomy for stages T2 and T3 squamous cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1990; 143:37.
- Sweeney P, Kursh ED, Resnick MI:** Partial cystectomy. *Urol Clin North Am* 1992; 19:701.
- Szary J y Szala S:** Intra-tumoral administration of naked plasmid DNA encoding mouse endostatin inhibits renal carcinoma growth. *Int J Cancer* 2001; 91:835-9.
- Taback B, Fujiwara Y, Wang HJ, et al:** Prognostic significance of circulating microsatellite markers in the plasma of melanoma patients. *Cancer Res* 2001; 61:5723-6.
- Tada Y, Wada M, Taguchi K, et al:** The association of *Death-associated Protein Kinase* hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res* 2002; 62:4048-53.
- Takagi Y, Takashi M, Koshikawa T, et al:** Immunohistochemical demonstration of cyclin D1 in bladder cancers as an inverse indicator of invasiveness but not an independent prognostic factor. *Int. J. Urol* 2000; 7:366-72.
- Torti FM, Shortliffe LD, Williams RD, et al:** Alpha-interferon in superficial bladder cancer: A Northern California Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1988; 6:476.
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al:** Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999a; 59:2307-12.
- Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, et al:** Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999b ; 59:5438-42. (Discusión)
- Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP:** Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:710-5.
- Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, et al:** Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001; 97: 2823-9.
- Tribukait B:** Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. *World J Urol* 1987; 5:108.
- Trott PA y Edwards L:** Comparison of bladder washings and urine cytology in the diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 1973; 110:664.
- Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, et al:** Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology* 2000; 58:126-36.
- Utting M, Müller G, Wemer W, et al:** Detection of tumor genetic alterations of bladder carcinomas in body fluids depends on sample treatment before DNA isolation. *Ann NY Acad Sci* 2000; 906:67-71.
- Utz DC y Farrow GM:** Carcinoma in situ of the urinary tract. *Urol Clin North Am* 1984; 11:735.
- Valenzuela MT, Galisteo R, Zuluaga A, et al:** Assessing the use of *p16^{INK4a}* promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 2002; 42:622-30.
- van der Meijden AP:** New approaches to intravesical chemo-immunotherapy in superficial bladder cancer. *Prog Clin Biol Res* 1992; 378:95-101.

- van der Meijden AP, Brausi M, Zambon V, et al:** Intravesical instillation of epirubicin, bacillus Calmette-Guerin and bacillus Calmette-Guerin plus isoniazid for intermediate and high risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: a European Organization for Research and Treatment of Cancer genito-urinary group randomized phase III trial. *J Urol* 2001;166: 476-481.
- van der Werf-Messing B:** Proceedings: Carcinoma of the bladder treated by preoperative irradiation followed by cystectomy. The second report. *Cancer* 1973; 32(5):1084-8.
- van der Werf-Messing BHP:** Carcinoma of the urinary bladder treated by interstitial radiotherapy. *Urol Clin North Am* 1984;11:659.
- van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, et al:** Microsatellite analysis-DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: A phase II trial. *Cancer* 2001; 92:768-75.
- Varkarakis MJ, Gaeta J, Moore MH, et al:** Superficial bladder tumor: Aspects of clinical progression. *Urology* 1974; 4:414.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al:** Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774-9.
- Vicente Rodriguez J, Chechile G, Algaba F, et al:** Value of random endoscopic biopsy of the diagnosis of bladder carcinoma in situ. *Eur Urol* 1987; 13:150.
- Vogelzang NJ, Meir JA, Awan AM, et al:** Methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin followed by radiotherapy or surgery for muscle invasive bladder cancer: The University of Chicago experience. *J Urol* 1993;149:753.
- Volgstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al:** Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Eng J Med* 1988; 319:525-32.
- von Knobloch R, Hegele A, Brandt H, et al:** Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent micro-satellite analysis. *Int J Cancer* 2001;94:67-72.
- Waldman FM, Carroll PR, Cohen MB, et al:** 5-Bromodeoxyuridine incorporation and PCNA expression as measures of cell proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol* 1993;6:20.
- Wang Y, Hung SC, Linn JF, et al:** Microsatellite-based cancer detection using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis* 1997;18:1742-9.
- Waples MJ y Messing EM:** The management of Stage T1, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder. En *Mosby-Year book: Advances in Urology*. St. Louis: Lytton, B. Ed; 1992; vol 5: p33.
- Weber JL y May PE:** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44:388-96.
- Wheless LL, Badalament RA, deVere White RW, et al:** Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer: Report of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry* 1993; 14:478.

- Wheless LL, Reeder JR, Han R, et al:** Bladder irrigation specimens assayed by fluorescence in situ hybridization to interphase nuclei. *Cytometry* 1994; 17:319.
- Whitaker SJ:** DNA damage by drugs and radiation: what is important and how is it measured? *Eur J Cancer* 1992; 28(1):273-6.
- Whitaker SJ y McMillan TJ:** Pulsed-field gel electrophoresis in the measurement of DNA double-strand break repair in xrs-6 and CHO cell lines: DNA degradation under some conditions interferes with the assessment of double-strand break rejoining. *Radiat Res* 1992; 130(3):389-92.
- Whitmore WF Jr Batata MA, Hilaris BS, et al:** A comparative study of two preoperative radiation regimens with cystectomy for bladder cancer. *Cancer* 1977; 40:1077.
- Whitmore WF Jr y Batata M:** Status of integrated irradiation and cystectomy for bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1985;11:681.
- Wiener DP, Koss LG, Sablay B, et al:** The prevalence and significance of Brunn's nests, cystitis cystica, and squamous metaplasia in normal bladders. *J Urol* 1979; 122:317.
- Wijkstrom H, Edsmyr F, Lundh B:** The value of preoperative classification according to the TNM system. *Eur Urol* 1984;10:101.
- Wijkstrom H y Tribukait B:** Deoxyribonucleic acid flow cytometry in predicting response to radical radiotherapy of bladder cancer. *J Urol* 1990;144:646.
- Wishnow KI, Levinson AK, Johnson DE, et al:** Stage B (P2/3a/N0) transitional cell carcinoma of the bladder highly curable by radical cystectomy. *Urology* 1992; 39:12.
- Wolf H y Hojgaard K:** Urothelial dysplasia concomitant with bladder tumors as a determinant factor for future new recurrences. *Lancet* 1983; 2:134.
- Wong IH, Lo YM, Zhang J, et al:** Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59:71-3.
- Yanagisawa Y, Akiyama Y, Iida S, et al:** Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000; 85:50-3.
- Yang JP y Huang L:** Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Ther* 1996;3:542-8.
- Yuan Y, Mendez R, Sahin A, Dai JL:** Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:5558-61.
- Zaak D, Frimberger D, Stepp H, et al:** Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection. *J Urol* 2001;166:1665-8.
- Zhang J, Fan Z, Gao Y, et al:** Detecting bladder cancer in the Chinese by microsatellite analysis: ethnic and etiologic considerations. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:45-50.
- Zincke H, Garbeff PJ, Beahrs JR:** Upper urinary tract transitional cell cancer after radical cystectomy for bladder cancer. *J Urol* 1984; 131:50.
- Zlota AR y Schulman CC:** Los marcadores biológicos de los tumores vesicales superficiales y su valor pronóstico. Mexico. Ed Mc Graw Hill Interamericana. *Urol Clin North Am* 2000;27 (1):183-93.
- Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, et al:** 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001;61: 3581-5.