

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



**Caracterización biológica del carcinoma vesical : Expresión
de p53, EGF-R, y oncogen retrovívrico erbB-2NEU**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Concepción Merino Sánchez

Directores

Luis Resel Estévez

Jesús Moreno Sierra.

Madrid 2004

ISBN: 978-84-8466-968-5

© María Concepción Merino Sánchez, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**"CARACTERIZACION BIOLÓGICA DEL CARCINOMA VESICAL:
EXPRESION DE p53, EGF-R Y ONCOGEN RETROVIRICO erbB-2/NEU".**

CONCEPCION MERINO SANCHEZ

Madrid, 1995

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. LUIS RESEL ESTEVEZ, CATEDRATICO DE UROLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, COMO DIRECTOR Y EL DR. D. JESUS MORENO SIERRA COMO CO-DIRECTOR

INFORMAN: Que visto el trabajo titulado: "CARACTERIZACION BIOLOGICA DE CARCINOMA VESICAL: EXPRESION DE p53, EGF-R Y ONCOGEN RETROVIRICO erbB-2/NEU", realizado por Dña. MARIA CONCEPCION MERINO SANCHEZ, reúne todos los requisitos necesarios para su lectura pública y optar al Grado de Doctor.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

Fdo.: Juan J. Picazo
(12-V-95) (fecha y firma)
D.N.I.: 2.476.920

Co-Director

Fd. Jesús Moreno Sierra
D.N.I.: 1102822-H

El Director de la Tesis

Fdo.: Luis Resel Estevez
(fecha y firma) (12-V-95)
D.N.I.: 439922-R

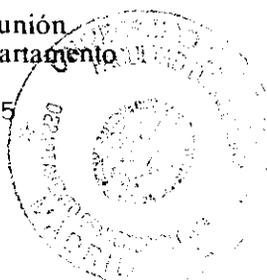
INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

D. JUAN J. PICAZO DE LA GARCA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMA: Reunido el Consejo de Departamento, acuerda por unanimidad que el trabajo titulado: "CARACTERIZACION BIOLOGICA DE CARCINOMA VESICAL: EXPRESION DE p53, EGF-R Y ONCOGEN RETROVIRICO erbB-2/NEU" presentado por Dña. MARIA CONCEPCION MERINO SANCHEZ, es adecuado para ser leído y defendido como Tesis Doctoral ante un Tribunal y, de esta manera, poder optar al Grado de Doctor.

Fecha reunión
Consejo Departamento

16-5-1995



El Director del Departamento

Fdo.: Juan J. Picazo de la Garza
(fecha y firma)

INTRODUCCION

1. Problemática del cáncer de vejiga	1
2. Carcinogénesis	4
3. Descubrimiento de los oncogenes retrovíricos	7
4. Oncogenes y genes supresores	11
5. Mecanismos de activación de los oncogenes	15
6. Productos de los oncogenes y sus funciones	20
7. Oncogénesis multisequencial	21
8. Oncogenes y cáncer de vejiga:	
._ Oncogén erbB-2/NEU	23
._ Oncogenes RAS	27
._ Oncogén erbB-1 (EGF-R)	33
._ Oncogenes nucleares	37
HIPOTESIS	45
OBJETIVOS	48
MATERIAL Y METODO	49
1. Pacientes	50
2. Método	52
3. Análisis Estadístico	64

RESULTADOS	67
1. Datos Epidemiológicos	67
2. Características Morfológicas de los tumores	68
3. Características Anotomopatológicas de los tumores	72
4. Determinación de Oncogenes en tejido vesical	75
5. Relación de los oncogenes con las características morfológicas de los tumores	87
6. Relación de los oncogenes con las características anatomopatológicas de los tumores	92
7. Evolución postoperatoria de los pacientes afectos por cáncer. Influencia de los datos analizados en el diagnóstico: Supervivencia y Recurrencia	104
DISCUSION	124
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFIA	155

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pag.
1: <i>Noción de gen cancerígeno</i>	6
2: <i>Equilibrio tisular: genes supresores/inductores</i>	12
3: <i>Representación esquemática de los diferentes grupos de oncogenes y su localización celular</i>	14
4: <i>Mecanismos de activación de oncogenes</i>	18
5: <i>Esquema del proceso de transformación neoplásica en el carcinoma de vejiga</i>	22
6: <i>Modelo para la regulación de la proteína ras "p21"</i>	28
7: <i>Población de estudio</i>	50
8: <i>Procesamiento de muestras tisulares</i>	57
9: <i>Distribución de los pacientes con cáncer vesical según el sexo</i>	67
10: <i>Edad media de los pacientes estudiados</i>	68
11: <i>Distribución de los tumores vesicales atendiendo a la uni/multifocalidad tumoral</i>	69
12: <i>Distribución de los tumores vesicales atendiendo al aspecto tumoral</i>	70
13: <i>Asociación aspecto/uni-multifocalidad tumora</i>	71
14: <i>Distribución de los tumores atendiendo a su localización</i>	72
15: <i>Distribución de los tumores en relación al estadio de Jewett-Marshall</i>	73
16: <i>Distribución de los tumores atendiendo al grado de diferenciación de Broders</i>	74
17: <i>Concentración media de EGF-R en el grupo control y de cáncer vesical</i>	76
18: <i>Concentración media de p185(NEU) en el grupo control y de cáncer vesical</i>	78
19: <i>Expresión de p53 en los carcinomas vesicales</i>	80
20: <i>Concentración media de EGF-R(fmol/mg prot) en relación con el aspecto tumoral</i>	83

Fig.	Pag.
21: <i>Concentración media de NEU(HNU/mg prot) en relación con el aspecto tumoral</i>	84
22: <i>Expresión de p53 en relación con el aspecto tumoral</i>	85
23: <i>Concentración media de EGF-R en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral</i>	89
24: <i>Concentración media de p185(NEU) en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral</i>	90
25: <i>Expresión de p53 en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral</i>	91
26: <i>Concentración media de EGF-R atendiendo al grado de infiltración tumoral</i>	95
27: <i>Concentración media de p185(NEU) atendiendo al grado de infiltración tumoral</i>	96
28: <i>Expresión de p53 en relación al grado de infiltración tumoral</i>	97
29: <i>Concentración media de EGF-R en relación al grado de diferenciación de Broders</i>	101
30: <i>Concentración media de p185(NEU) en relación al grado de diferenciación de Broders</i>	102
31: <i>Expresión de p53 en relación al grado de diferenciación de Broders</i>	103
32: <i>Curva de Supervivencia/edad</i>	106
33: <i>Curva de Supervivencia/sexo</i>	106
34: <i>Curva de Supervivencia/aspecto tumoral</i>	107
35: <i>Curva de Supervivencia/uni-multifocalidad tumoral</i>	107
36: <i>Curva de Supervivencia/grado de infiltración</i>	109
37: <i>Curva de Supervivencia/grado de diferenciación de Broders</i>	109
38: <i>Curva de Supervivencia/expresión de EGF-R</i>	111
39: <i>Curva de Supervivencia/expresión de NEU</i>	112
40: <i>Curva de Supervivencia/expresión de p53</i>	113
41: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Edad</i>	115
42: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Sexo</i>	115

Fig.	Pag.
43: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Aspecto tumoral</i>	116
44: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Uni-Multifocalidad tumoral . .</i>	116
45: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Estadio Tumoral</i>	118
46: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Grado de Diferenciación de Broders</i>	118
47: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Expresión de NEU</i>	120
48: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Expresión de EGF-R</i>	121
49: <i>Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Expresión de p53</i>	122

INDICE DE TABLAS

TABLA	Pag.
I: <i>Oncogenes retrovíricos</i>	10
II: <i>Alteración de proto-oncogenes en tumores urogenitales</i>	12
III: <i>Edad media de los pacientes estudiados</i>	19
IV: <i>Concentración de EGF-R en los grupos control y de cáncer vesical</i>	75
V: <i>Concentración de p185(NEU) en los grupos de estudio</i>	77
VI: <i>Expresión de p53 en los grupos control y de cáncer vesical</i>	79
VII: <i>Concentración de EGF-R (Fmol/mg de prot) en relación con el aspecto tumoral</i>	81
VIII: <i>Concentración de NEU(HNU/mg de prot) en relación con el aspecto tumoral</i>	82
IX: <i>Expresión de p53 atendiendo al aspecto tumoral</i>	82
X: <i>Concentración de EGF-R en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral</i>	86
XI: <i>Concentración de NEU en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral</i>	87
XII: <i>Expresión de p53 en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral</i>	88
XIII: <i>Concentración de EGF-R en relación con el estadio de Jewett-Marshall</i>	92
XIV: <i>Concentración de p185(NEU) en relación con el estadio de Jewett-Marshall</i>	93
XV: <i>Expresión de p53 en relación con el estadio de Jewett-Marshall</i>	94
XVI: <i>Concentración de EGF-R en relación al grado de diferenciación de Broders</i>	98
XVII: <i>Concentración de p185(NEU) en relación al grado de diferenciación de Broders</i>	99
XVIII: <i>Expresión de p53 en relación al grado de diferenciación de Broders</i>	100

INTRODUCCION

1.- PROBLEMATICA DEL CANCER DE VEJIGA

Las neoplasias vesicales constituyen hoy en día un grave problema, con una gran repercusión clínica y terapéutica, a pesar de los importantes logros obtenidos en el conocimiento de ciertos aspectos de su biología^(1,2,3,4).

EL cáncer vesical representa aproximadamente el 2% de todas las neoplasias y constituye un problema de ámbito mundial. La "American Cancer Society" estimó en 47.100 el número de nuevos casos de cáncer vesical diagnosticados en 1990 en EE.UU, y la muerte de 10.200 americanos como consecuencia de la enfermedad⁽⁵⁾. Las tasas observadas en los registros de población españoles(19-23 x 100.000 varones y 1,3-3,8 x 100.000 mujeres para el período 1980-1983), se sitúan en una franja intermedia/alta entre las de los países europeos⁽⁶⁾.

La tendencia actual en España es hacia un aumento de la incidencia de cáncer de vejiga. El Libro Blanco de la Oncología en España, calculó una tasa media de incidencia de 11,66 x 100.000 para el período 1975-1979, con un incremento anual del 7,43% de dicha tasa⁽⁷⁾.

El carcinoma vesical es más frecuente en el hombre que en la mujer, en una proporción de 2 a 5, según diferentes estudios. Ocupa en el varón el cuarto lugar en cuanto a incidencia tumoral, si bien su posición pasa al 9º lugar cuando se estiman las muertes que produce, lo que indica que la mayoría pueden ser curados. En la mujer su incidencia es menor ocupando el lugar 8º de todos los tumores, y estando en la posición número 12 en cuanto a letalidad.

Las tasas de incidencia y mortalidad en el varón se han incrementado en todo el

mundo. Es evidente que dos de los principales factores de riesgo (tabaquismo y factores laborales carcinógenos) tienen mucha mayor prevalencia en el sexo masculino⁽⁸⁾. Es probable que en un futuro próximo declinen estas tasas en concordancia con la disminución progresiva del número de fumadores.

En cuanto a sus posibilidades globales de curación, los datos basados en una serie de registros de población de EE.UU., muestran un aumento de las supervivencias a los 5 años, que ha pasado del 61% en los casos diagnosticados entre 1970-1973, al 77% en los casos diagnosticados entre 1979 y 1984⁽⁹⁾.

La incidencia del cáncer vesical aumenta con la edad, siendo más frecuente en personas mayores de 60 años y poco común antes de los 40 años⁽¹⁰⁾.

En España, se observa un claro predominio entre los 65-80 años⁽¹¹⁾. Además hay que destacar que en pacientes jóvenes la mayoría de los tumores son de bajo grado, papilares no invasivos, con menos riesgo de recurrencias que otros similares en pacientes de edad más avanzada⁽¹²⁾.

El carcinoma de células transicionales, que representa aproximadamente el 90-95% de las neoplasias vesicales, tiene una historia natural que oscila desde indolente a muy agresivo. Y es importante predecir la conducta del tumor por varios motivos: 1º para administrar un tratamiento racional; 2º para efectuar un seguimiento lógico y adecuado; y, 3º para proporcionar una información real al paciente y a los familiares.

Es un hecho comprobado que entre el 70% y 80% de los tumores

vesicales son superficiales en el momento del diagnóstico, de ellos el 80% permanecen como tales durante toda su evolución. En general, estos tumores tienen buen pronóstico en cuanto a supervivencia; el 80% de los pacientes sobreviven a los cinco años y sólo un 10% llegan a morir por tumor⁽¹³⁾.

Sin embargo, entre un 60% y un 80% de los pacientes presentarán al menos una recidiva local; de tal forma, que existe una relación directa entre frecuencia de recidivas, posibilidades de progresión y reducción en la supervivencia, aunque por el momento no está definida cualitativamente ni está cuantificada^(14,15).

Aproximadamente entre el 10-20% de los tumores superficiales papilares evolucionan hacia carcinomas invasivos. Así, aunque podríamos establecer una clara separación entre tumores superficiales e infiltrantes con valor pronóstico y terapéutico diferentes, nunca podremos afirmar que un tumor superficial no sea en realidad una fase precoz en la evolución de un tumor agresivo e infiltrante. Este hecho hace que la búsqueda de criterios capaces de definir precozmente el potencial biológico del tumor sea una necesidad.

En los últimos años se han desarrollado importantes avances en el conocimiento de la biología del cáncer vesical. Una de las líneas prioritarias de la investigación uro-oncológica ha sido identificar factores de valor pronóstico y descubrir rasgos característicos relacionados directamente con la enfermedad neoplásica capaces de ofrecer una información objetiva y cuantificable sobre la evolución y respuesta al tratamiento de los carcinomas vesicales de células transicionales. La información así obtenida nos proporcionaría las bases para un mejor manejo de estos tumores, orientándonos en la adopción de una actitud

terapéutica inicial, en el seguimiento postoperatorio y en la detección de recidivas tumorales.

Los avances conseguidos en el conocimiento de las bases moleculares de la carcinogénesis han permitido identificar una serie de genes directamente relacionados con la regulación tanto del crecimiento celular normal y neoplásico como con los fenómenos de diferenciación-desdiferenciación celulares. Estos genes han sido denominados *oncogenes*.

Los estudios realizados sobre la expresión de oncogenes en distintas neoplasias (pulmón, mama...) han aportado datos de gran importancia y han establecido nuevos factores pronósticos en las mismas. El análisis de distintos proto-oncogenes en los tumores vesicales de células transicionales, y su relación con las características clínicas y anatomo-patológicas de los mismos mejorará el conocimiento de las propiedades biológicas básicas de las células neoplásicas, y puede aportar información relevante acerca del diagnóstico, evolución y factores pronósticos de estos tumores.

2.- CARCINOGENESIS

Desde las primeras observaciones publicadas hace ya más de dos siglos, la mayor parte de los datos disponibles acerca de las causas del cáncer han apuntado hacia un origen ambiental, impulsando con gran fuerza las investigaciones en el campo de la carcinogénesis química. Sin embargo, a pesar de sus grandes logros, con el esclarecimiento de multitud de aspectos y matices

experimentales, se ha establecido una hipótesis multisequencial.

Hace tan sólo dos décadas se desconocía aún el mecanismo íntimo de la cancerización, aunque se le sospechaba relacionado con el efecto mutagénico de los carcinógenos sobre el material genético^(16,17).

En estos momentos parece claro que cualquiera que sea la causa inicial (carcinógenos víricos, físicos o químicos), para que una célula normal se convierta en cancerosa y transmita a sus descendientes las características tumorales, el cambio tiene que estar marcado de algún modo en su material genético. Esto implica que, si bien los agentes desencadenantes de cáncer pueden ser múltiples, todos ellos actúan sobre un sustrato genético común dentro de la célula. Esto conduce al paradigma genético que domina hoy por hoy la investigación básica sobre el cáncer: " *el material genético es el blanco central de la carcinogénesis y las células cancerosas contienen lesiones genéticas que son las responsables últimas del fenotipo tumoral*"⁽¹⁸⁾.

Los acontecimientos que llevan al desarrollo y propagación del fenotipo maligno son complejos, múltiples e interactivos. Estos hechos tienen lugar de forma secuencial y desarrollan aberraciones fenotípicas progresivas que conllevan la adquisición de la posibilidad de la proliferación desordenada, la invasión de tejidos adyacentes y la capacidad de metastatización.

El cáncer puede ser causado por un daño genético que conlleve la expresión o función biológica anormal de genes, lo cual se sustenta por los siguientes hechos: existe una predisposición hereditaria a padecer cáncer, se han detectado alteraciones cromosómicas en las células cancerosas y se han descubierto una serie de genes (proto-oncogenes) cuya mutación produce

crecimiento neoplásico. La activación de los proto-oncogenes y la delección de genes supresores puede tener lugar conjuntamente con la producción de hormonas peptídicas por las células premalignas o malignas. Algunas de las cuales podrían actuar como factores de crecimiento paracrinos o autocrinos, y otras ocasionarían efectos sistémicos (síndromes paraneoplásicos)⁽¹⁹⁾.

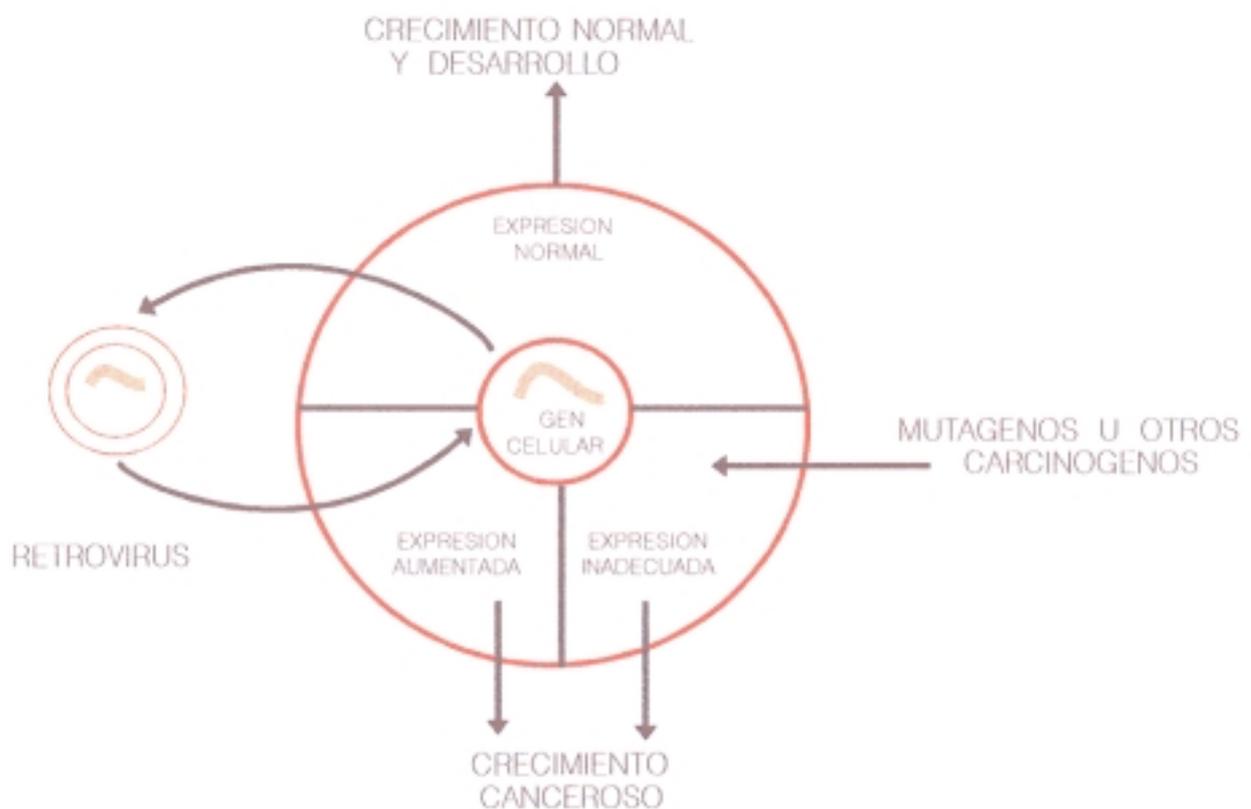


FIG.1: Noción de gen cancerígeno.

Los avances producidos en la década de los setenta en los campos de la ingeniería genética y la biología molecular de retrovirus sentaron las bases sobre las que se han podido producir los espectaculares descubrimientos sobre la biología molecular del cáncer que se han empezado a materializar a partir de la década de los ochenta hasta nuestros días⁽²⁰⁾.

3.- DESCUBRIMIENTO DE LOS ONCOGENES RETROVIRICOS

La investigación biológica básica sobre el cáncer se remonta a los comienzos de nuestro siglo, cuando en 1911 Francis Peyton Rous descubrió un virus causante de sarcomas en aves. El virus, perteneciente a la familia de los retrovirus, fue denominado Rous Sarcoma Virus(RSV) y permitió el estudio en el laboratorio del fenómeno de la transformación celular^(18,21,22). Sin embargo no fue hasta la década de los 70 cuando se consiguió identificar el gen v-src, constituyente del genoma del RSV, como el agente causante de la transformación. Posteriormente, y gracias al desarrollo de las técnicas de manejo del material genético, se pudo comprobar que existía una versión normal, no activada del gen v-src en todas las células de pollo y se le denominó c-src⁽²³⁾.

La similitud funcional entre ambas versiones quedó provada cuando el equipo de Hanafusa consiguió que un mutante de RSV, parcialmente defectivo en el gen v-src y por tanto incapaz de transformar células, recuperara su capacidad transformante por recombinación con el c-src presente en las células normales⁽²⁴⁾. Establecida la semejanza estructural y funcional de las versiones c- y v- de oncogenes, parecía razonable considerar que estas últimas se habían originado de las primeras, y así se propuso denominar *proto-oncogenes* a las versiones celulares^(25,26).

Homólogos del gen c-src se encontraron en numerosas especies animales, incluido el hombre, con un alto nivel de conservación. Este resultado indicaba que se trataba de un gen de gran importancia en la regulación de la proliferación celular.

Por extensión, se vio luego que prácticamente todos los oncogenes víricos tienen un homólogo celular⁽²⁷⁻³³⁾ del cual habrían aparentemente derivado⁽³⁴⁾, al ser sus homologías, tanto a nivel de nucleótidos^(27,29,30,35,36) como de productos codificados^(37,38) muy significativas y conseguirse experimentalmente, por transducción, la producción de oncogenes retrovíricos a partir de cultivos celulares^(39,40) y animales⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾.

Para distinguir las distintas versiones de un mismo oncogén se acordó anteponerles letras, así el c-src es la versión celular y el v-src la versión presente en el RSV.

Se han elaborado modelos de los mecanismos por los que ciertos retrovirus han incorporado proto-oncogenes que, como consecuencia de su instalación en el genoma vírico y de los eventuales procesos de recombinación y otras alteraciones que ello conlleve, han adquirido capacidad transformante⁽⁴⁶⁾. No se trata pues de que las versiones celulares de oncogenes pertenezcan a virus endógenos, como proponían Huebner y Todaro, sino de genes celulares que en su momento fueron capturados por retrovirus e incorporados a su genoma.

La posibilidad de transformar in vitro células normales en tumorales por incorporación de DNA libre extraído de células tumorales y las técnicas de ingeniería genética, permitieron clonar oncogenes dominantes procedentes de tumores. Así, del DNA de células de carcinoma de vejiga humano se clonó el oncogén denominado c-Ha-ras⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

Hay que recordar que hasta entonces sólo se habían clonado oncogenes virales. Los grupos dirigidos por Robert A. Weinberg, Mariano Barbacid y Michael Weigler usaron el c-Ha-ras como sonda para detectar su correspondiente

proto-oncogén en el genoma de células humanas normales mediante técnicas de hibridación de DNA; cuando ambos genes se compararon, se observó que tenían idéntica secuencia de bases excepto una mutación puntual (una guanina del proto-oncogén está sustituida por timina en el oncogén); por consiguiente se estableció que una simple mutación puntual puede conferir capacidad transformante a un gen⁽⁵⁰⁾.

Durante los últimos 20 años se han descubierto una gran variedad de retrovirus capaces de inducir tumores en una gama de animales experimentales y que son portadores de genes adquiridos de la células huésped activados por diferentes tipos de alteraciones. (TABLA I).

<i>Oncogén</i>	<i>Retrovirus, Tumor y especie de origen</i>	<i>Localización celular</i>	<i>Función bioquímica</i>
v-fms	Sarcoma felino	Transmembrana	Receptor factor crecimiento
v-kit	sarcoma felino	Transmembrana	Receptor factor crecimiento
v-ros	sarcoma aviario	Transmembrana	Receptor factor crecimiento
v-erbB	v.eritroblastosis aviaria	Transmembrana	Receptor factor crecimiento
v-Ha-ras	sarcoma murino	Membrana interna	Transductor (Proteína G)
v-Ra-ras	sarcoma murino	Membrana interna	Transductor(Proteína G)
v-Ki-ras	sarcoma murino	Membrana interna	Transductor(Proteína G)
v-src	sarcoma aviario	Membrana interna	Proteína tirosina quinasa
v-yes	sarcoma aviario	Membrana interna	Proteína tirosina quinasa
v-abl	leucemia murina	Membrana interna	Proteína tirosina quinasa
v-fgr	sarcoma felino	Membrana interna	Proteína tirosina quinasa
v-mos	sarcoma murino	Citoplasma	Proteína serina/treonina quinasa
v-raf	sarcoma murino	Citoplasma	Proteína serina/treonina quinasa
v-mil	sarcoma aviario	Citoplasma	Proteína serina/treonina quinasa
v-sis	sarcoma del simio	Citoplasma	Homólogo cadena B PDGF
v-erbA	v.eritroblastosis aviaria	Núcleo	Receptor hormona tiroidea
v-fos	sarcoma murino	Núcleo	Regulador transcripción
v-jun	sarcoma aviario	Núcleo	Regulador transcripción
v-myc	v.mielocitomatosis aviaria	Núcleo	Regulador transcripción
v-myb	v.mieloblastosis aviaria	Núcleo	Regulador transcripción
v-eyb	mieloblastosis aviaria	Núcleo	Regulador transcripción
v-ski	carcinoma aviario	Núcleo	Regulador transcripción
v-rel	v.reticuloendoteliosis	Núcleo	Regulador transcripción

TABLA I: *Oncogenes Retrovíricos.*

4.- ONCOGENES Y GENES SUPRESORES

Un tumor maligno es un conglomerado de células cancerosas, descendientes todas ellas de una célula "fundadora". Tal célula ancestral era antes normal, y desempeñaba su función regular en algún tejido. Pero sufrió un cambio crítico y, como resultado del mismo, empezó a dividirse y proliferar en respuesta a alguna orden interna, haciendo caso omiso a los estímulos externos que normalmente regulan el crecimiento celular. Esta única célula generará los miles de millones de células, igualmente alteradas, que constituyen la masa tumoral. Para saber cuál es el factor determinante del desarrollo de un cáncer debemos conocer qué alteraciones ha sufrido la célula fundadora.

El blanco central de la carcinogénesis son los genes celulares, secuencias de DNA que contienen la información necesaria para la síntesis de una proteína. Serán alterados por la acción de diferentes mutágenos o carcinógenos (compuestos químicos, radiaciones, virus...).

Las lesiones genéticas encontradas en las células cancerosas son de dos tipos: dominantes y recesivas. El blanco de las alteraciones dominantes son los protooncogenes. Las alteraciones de tipo recesivo tienen como diana los así denominados oncogenes recesivos, anti-oncogenes o genes supresores del crecimiento. Esta nomenclatura de tipo operativo es un tanto desafortunada, ya que refleja solamente el modo en que estos genes han sido descubiertos, pero no indica nada acerca de su función celular normal⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Los proto-oncogenes constituyen un grupo de genes del genoma celular implicados en el control de la reproducción, crecimiento y diferenciación

Introducción

celulares⁽⁵⁴⁾. Los proto-oncogenes codifican la transcripción de moléculas de mRNA que son traducidos a proteínas. Las proteínas pueden ser factores de crecimiento, receptores de factores de diferenciación y crecimiento, factores transductores de señales y factores de transcripción nuclear⁽⁵⁵⁾. El paso de proto-oncogén a oncogén activado se produce mediante una serie de alteraciones genéticas tales como mutaciones puntuales, traslocaciones, deleciones y amplificación génica⁽⁵⁶⁾.

Los genes denominados genes recesivos o genes supresores pertenecen a un grupo de genes cuyos productos están involucrados de forma diversa en la regulación negativa de la proliferación celular. La pérdida en la célula de uno de estos genes supone la proliferación de forma incontrolada de la misma⁽⁵⁷⁾.

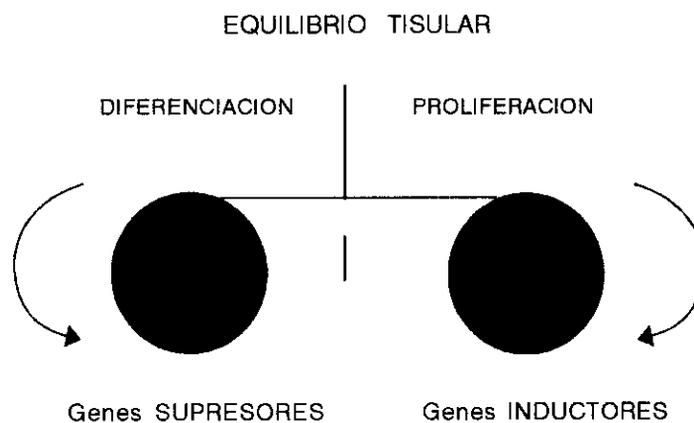


FIG.2: En los tejidos normales se mantiene una tasa demográfica celular en la que la supervivencia de las células, su diferenciación funcional, su muerte y su proliferación, se mantiene en un equilibrio dinámico. Este equilibrio es el resultado de acciones contrapuestas. Unas inducen proliferación, otras la suprimen. En la transformación cancerosa, el equilibrio se rompe.

Introducción

Por tanto existen dos mecanismos de mutación hacia la proliferación celular incontrolada. El primero consiste en convertir en hiperactivo un gen estimulador; este tipo de mutación tiene un efecto dominante (es suficiente con que el cambio afecte a una de las dos copias del gen en la célula; el gen alterado se denomina *oncogén* (siendo el alelo normal un *proto-oncogen*). El segundo consiste en inactivar un gen inhibidor: este tipo de mutación tiene un efecto recesivo, para que la célula quede libre de la inhibición es necesario que las dos copias del gen en la célula estén inactivadas o delecionadas; al gen perdido se le llama, *gen supresor de tumores*.

El descubrimiento de los mecanismos íntimos que inducen la transformación de una célula normal en una célula cancerosa, ha abierto nuevas expectativas con respecto al desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. El problema básico para el uso de los oncogenes como marcadores en el diagnóstico del cáncer, no es tanto de aspecto técnico como práctico. Es necesario establecer el valor clínico de la información referente a la presencia de oncogenes en pacientes con cáncer. Ensayos clínicos multicéntricos deben ser realizados en los que la activación del oncogén pueda correlacionarse con los parámetros clínicos y con la respuesta de los tumores a diferentes protocolos terapéuticos⁽⁵⁸⁾.

Por tanto, se puede argumentar que el problema de descifrar el proceso neoplásico es algo que está haciéndose cada vez menos complejo y, por ende, más alcanzable.

Actualmente se conocen unos 60 proto-oncogenes y oncogenes, su localización cromosómica, localización celular, tipo proteico y función. (FIG.3).

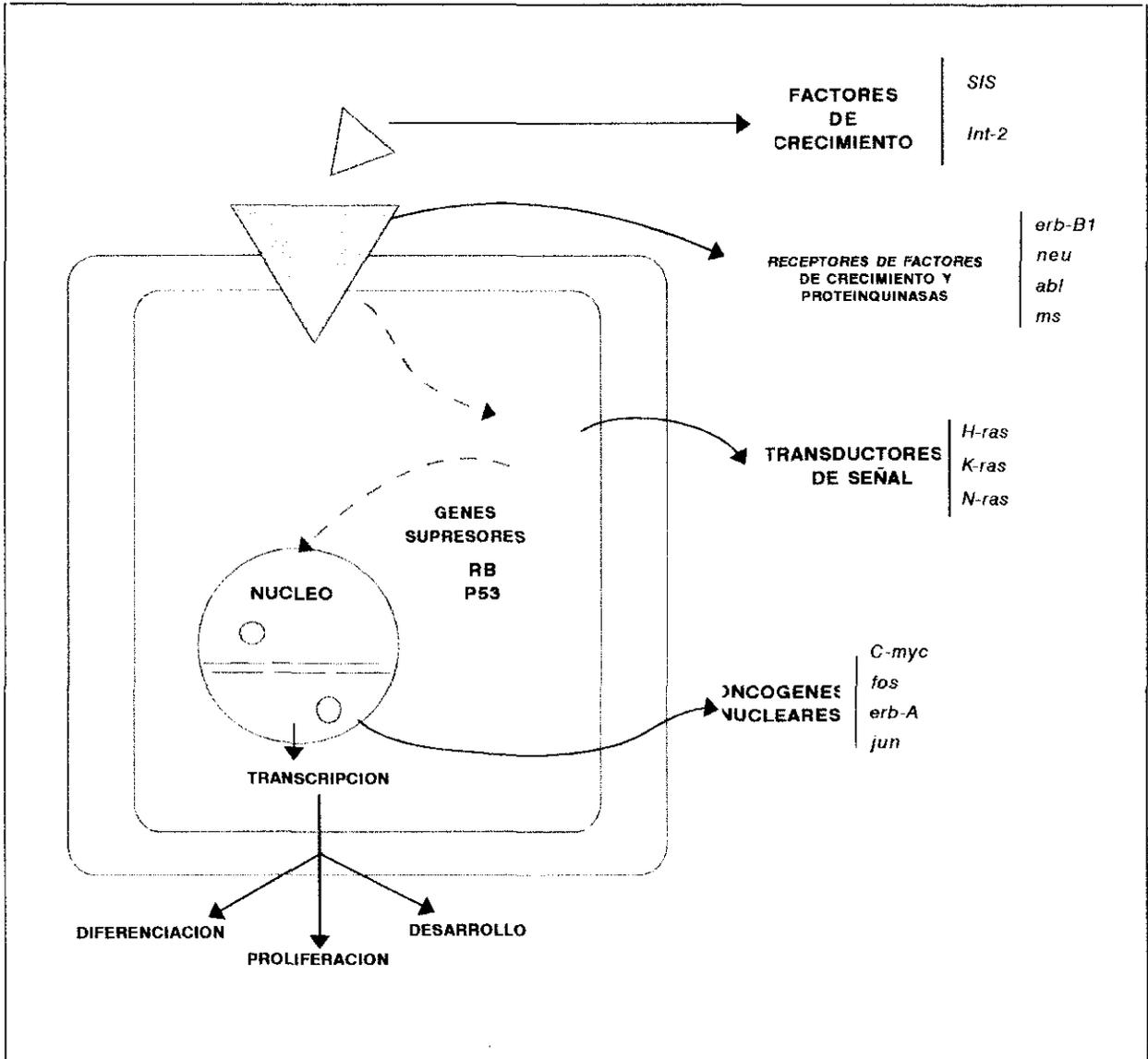


FIG.3: Representación esquemática de los diferentes grupos de oncogenes y su localización en la célula.

5.- MECANISMOS DE ACTIVACION DE LOS ONCOGENES

Hasta ahora se han descubierto unos 60 proto-oncogenes cada uno de los cuales se puede transformar en un oncogén. El gen puede resultar alterado por una mutación puntual, a través de una translocación cromosómica, o por inserción de un elemento genético móvil como es un retrovirus. El cambio puede ocurrir en la región que codifica para la proteína, de forma que se produzca un producto hiperactivo, o puede ocurrir en regiones adyacentes de control, de forma que simplemente el gen resulta sobreexpresado. Los principales mecanismos de activación de los oncogenes se detallan a continuación:

A.-Transducción retroviral.

Este mecanismo tiene su origen durante el proceso de recombinación genética o transducción por el que el virus adquiere el gen celular normal, convirtiéndolo así en un oncogén⁽⁵⁹⁾. Existen dos caminos por los cuales un proto-oncogén se puede convertir en un oncogén por incorporación en un retrovirus: la secuencia del gen puede estar alterada o troncada de manera que codifique para una proteína con una actividad anormal, o bien el gen puede quedar bajo el control de promotores potentes y activadores del genoma viral de forma que su producto se sintetice en exceso o en circunstancias no apropiadas; a menudo se producen ambos efectos a la vez. Los retrovirus también pueden ejercer efectos oncogénicos similares por otro sistema que no implica recoger genes de la célula huésped y transportarlos de célula a célula: simplemente, las copias de DNA del RNA viral se pueden insertar en el genoma de la célula huésped en lugares cercanos a proto-oncogenes, o incluso dentro de ellos. La alteración genética resultante se denomina *mutagénesis por inserción*, y el genoma alterado es heredado por toda la progenie de la célula. La inserción puede activar el gen celular en cuestión provocando simplemente su hiperexpresión, sin más, o puede además mutarlo.

B. - Traslocaciones.

Las traslocaciones de oncogenes se encuentran de manera muy frecuente en ciertas enfermedades malignas hematológicas⁽⁶⁰⁻⁶³⁾. En linfomas de células B, incluyendo el linfoma de Burkitt, el oncogén c-myc, que normalmente está situado en los brazos largos del cromosoma 8 humano, aparece con alta frecuencia translocado a otros cromosomas donde están los genes de las inmunoglobulinas generalmente al cromosoma 14, y en menor número de casos a los cromosomas 2 ó 22⁽⁶⁴⁾. La translocación es recíproca, pues parte de las secuencias de nucleótidos correspondientes a genes de las inmunoglobulinas situados en el cromosoma 14 son translocados al cromosoma 8. Como resultado de la translocación se incrementa la expresión del gen myc, al verse sometido a la misma regulación que el gen del anticuerpo. Así, durante la respuesta inmunológica a un antígeno, tales genes se transcriben muy activamente. Una traslocación que afecta al proto-oncogén c-myc se ha encontrado en el carcinoma hereditario de células renales⁽⁶⁵⁾.

C. - Multiplicación(amplificación).

En este mecanismo lo que sucede es que en virtud de una alta replicación, dentro de una célula puede llegar a haber muchas copias de un protooncogén, secuencialmente repetidas a lo largo de un cromosoma, o como partículas extra-cromosómicas dispersas. El resultado es la hiperexpresión del proto-oncogén afectado⁽⁶⁶⁾. En tumores uroteliales se ha encontrado amplificación del oncogén c-k-ras, así como de otros proto-oncogenes de la familia ras⁽⁶⁷⁾.

D. - Mutación puntual.

Las mutaciones puntuales sustituyen una base de DNA por otra. Así, si un protooncogén de una célula normal sufre una mutación puntual por acción de

radiaciones o un carcinógeno químico, la mutación puede hacer que cambie la información que determina la síntesis de una proteína. La proteína alterada puede inducir uno o más de los cambios asociados con el crecimiento canceroso. Es un modo de activación tan efectivo que ha permitido descubrir oncogenes por transfección, es decir, por transferencia de genes entre células de mamíferos en cultivos *in vitro*, por medio de su DNA^(68,69). Esto condujo al hallazgo de los primeros oncogenes "autóctonos" de tumores humanos, en líneas celulares procedentes de carcinomas de vejiga y pulmón. Los oncogenes celulares resultaron ser homólogos de los oncogenes retrovíricos v-Ha-ras y v-Ki-ras y, asombrosamente, su única diferencia con el proto-oncogen normal radicaba en la base de un solo nucleótido, una guanina en el pro-oncogen cambiada por timina en el oncogén activo. Una mutación puntual en un gen normal de aproximadamente 5.000 nucleótidos lo convertía en carcinogénico, y no por un aumento del nivel de expresión, sino por dar lugar a una proteína mutada en un solo aminoácido, valina en lugar de glicina, en la posición 12^(70,71).

La Tabla II resume los mecanismos de activación de oncogenes que han sido descritos en distintos tumores urológicos.

Los genes c-Ha-ras mutados han sido tipificados en tejido de carcinoma vesical⁽⁷²⁾ y en otros muchos tipos de tumor. Este oncogén es en efecto uno de los más frecuentemente identificados, como gen transformante.

Otros miembros de la familia de oncogenes ras han sido identificados como proto-oncogenes activados en tumores urogenitales. El proto-oncogén N-ras se encontró como gen transformante en líneas celulares de teratocarcinoma⁽⁷³⁾.

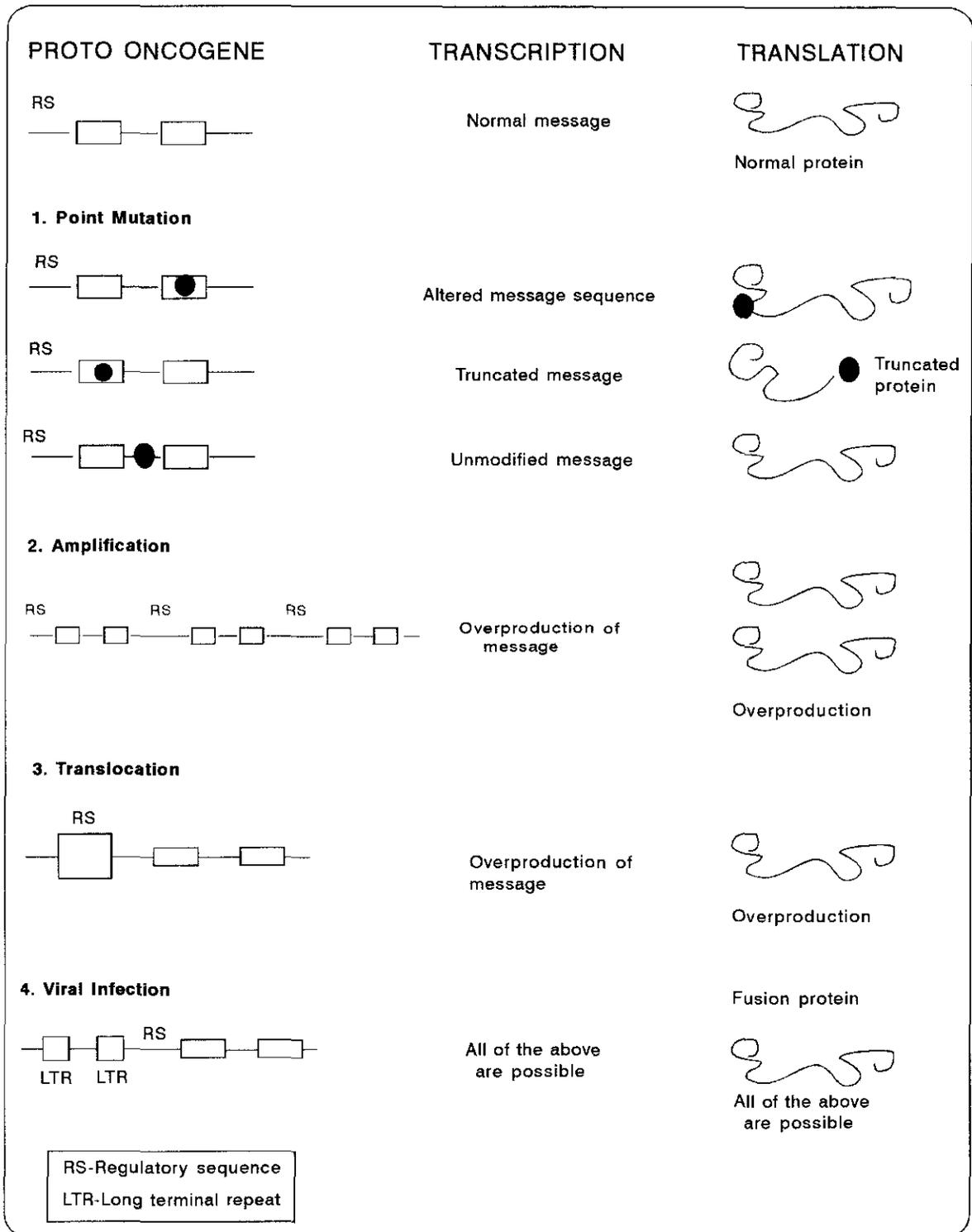


FIG. 4: Mecanismos de activación de oncogenes

PROTO-ONCOGENES ALTERADOS EN TUMORES UROGENITALES

Alteración	Oncogen	Cáncer	Referencia
Mutación	<i>c-Has-ras</i>	Líneas celulares de carcinoma de vejiga	Krontiris and Cooper
	<i>c-Has-ras</i>	Tejido de carcinoma vesical	Fujita et al.
	<i>N-ras</i>	Líneas celulares de teratocarcinoma	Cooper et al.
	<i>c-Kl-ras</i>	Adenocarcinoma de próstata	Peehl et al.
Translocación	<i>c-myc</i>	Carcinoma renal hereditario	Drabkin et al.
Amplificación	<i>c-Kl-ras</i>	Tumor urotelial	Fujita et al.
	<i>c-fms</i>	Carcinoma renal	Slalom et al.
	<i>c-myc</i>	Adenocarcinoma de próstata	Fleming et al.
	<i>c-myc</i>	Seminoma	Sikora et al.
Delección		Tumor de Wilms	Koufos et al.

TABLA II: *Alteración de proto-oncogenes en tumores urogenitales.*

6.- PRODUCTOS DE LOS ONCOGENES Y SUS FUNCIONES

Como otros genes, los oncogenes determinan proteínas, moléculas fundamentales en el mantenimiento de la estructura de las células, que catalizan, además, sus reacciones bioquímicas, estableciendo su forma y función. Las proteínas determinadas por los oncogenes desarrollan funciones anormales y provocan la transformación de una célula normal en cancerosa. Tras intensas investigaciones sabemos ya que las proteínas "transformantes" presentan una serie de características funcionales comunes, lo que sugiere que no son muchos los mecanismos que originan el cáncer y que quizá lleguen a conocerse algún día⁽⁷⁴⁾.

Los productos proteicos de los oncogenes, también denominados oncoproteínas, desempeñan papeles claves en el control de la proliferación y diferenciación celulares.

Dependiendo del mecanismo de activación de los oncogenes que se haya producido, las proteínas se verán alteradas de una forma u otra. La estructura y función de una proteína vienen determinadas por el orden de sus aminoácidos, de forma que el cambio de uno solo de ellos puede acarrear consecuencias importantes. La mutación presente en el gen ras altera uno de los aminoácidos del producto genético, convirtiéndolo la proteína normal en oncogénica. En otras ocasiones la activación puede deberse a un efecto de "dosis". En comparación con las correspondientes células normales, algunas proteínas oncogénicas se encuentran en cantidades muy altas en las células transformadas. Ello puede deberse a un fallo en la regulación génica o a que hay muchas copias del gen correspondiente. En células transformadas por virus, la proteína oncogénica se fabrica en grandes cantidades porque el oncogén funciona como un gen vírico activo⁽⁷⁵⁾.

7.- ONCOGENESIS MULTISECUENCIAL

Existe abundante información que demuestra que el cáncer es un proceso de eventos múltiples acumulativos. El análisis realizado en diversos sistemas tumorales (colon, pulmón, mama) ha confirmado que las distintas neoplasias son el resultado de la acumulación progresiva de lesiones de tipo dominante y recesivo en alguno o varios de los genes identificados. La potencia de un solo oncogén es extraordinariamente limitada. Por consiguiente, aunque la activación de algún oncogén sea el primer acontecimiento que desencadene el proceso carcinogénico, no basta ella sólo para provocar la aparición de un tumor maligno^(76,77). Las pruebas existentes hasta ahora sugieren que los tumores pueden iniciarse mediante la activación de un oncogén, pero la progresión del tumor implica la adquisición de más oncogenes. El número de alteraciones necesario se desconoce, si bien un estudio basado en procesos estadísticos apuntan hacia un mínimo de cinco etapas tanto en hombres como roedores⁽⁷⁸⁾. Existen probablemente algunos cuya activación contribuye a la invasión y la metástasis⁽⁷⁹⁾.

La célula cancerosa, que adquiere ventaja proliferativa desarrollando oncogenes que estimulan el crecimiento celular, puede incrementar su capacidad de multiplicación deshaciéndose de los genes que hasta ese momento limitaban su crecimiento.

La historia natural del cáncer de colon es un ejemplo muy demostrativo de la carcinogénesis multisecuencial⁽⁸⁰⁾. Durante los últimos años se ha ido descubriendo un evidente paralelismo entre las etapas clínico-evolutivas y la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, la mayor parte por delección, en los cromosomas 5, 17, y 18 y una sola por activación, la de un oncogén K-ras. Algo similar sucede en el carcinoma de vejiga. La figura 5 refleja el esquema del

proceso de transformación celular neoplásica, propuesto por algunos autores, para el carcinoma de vejiga⁽⁸¹⁾.

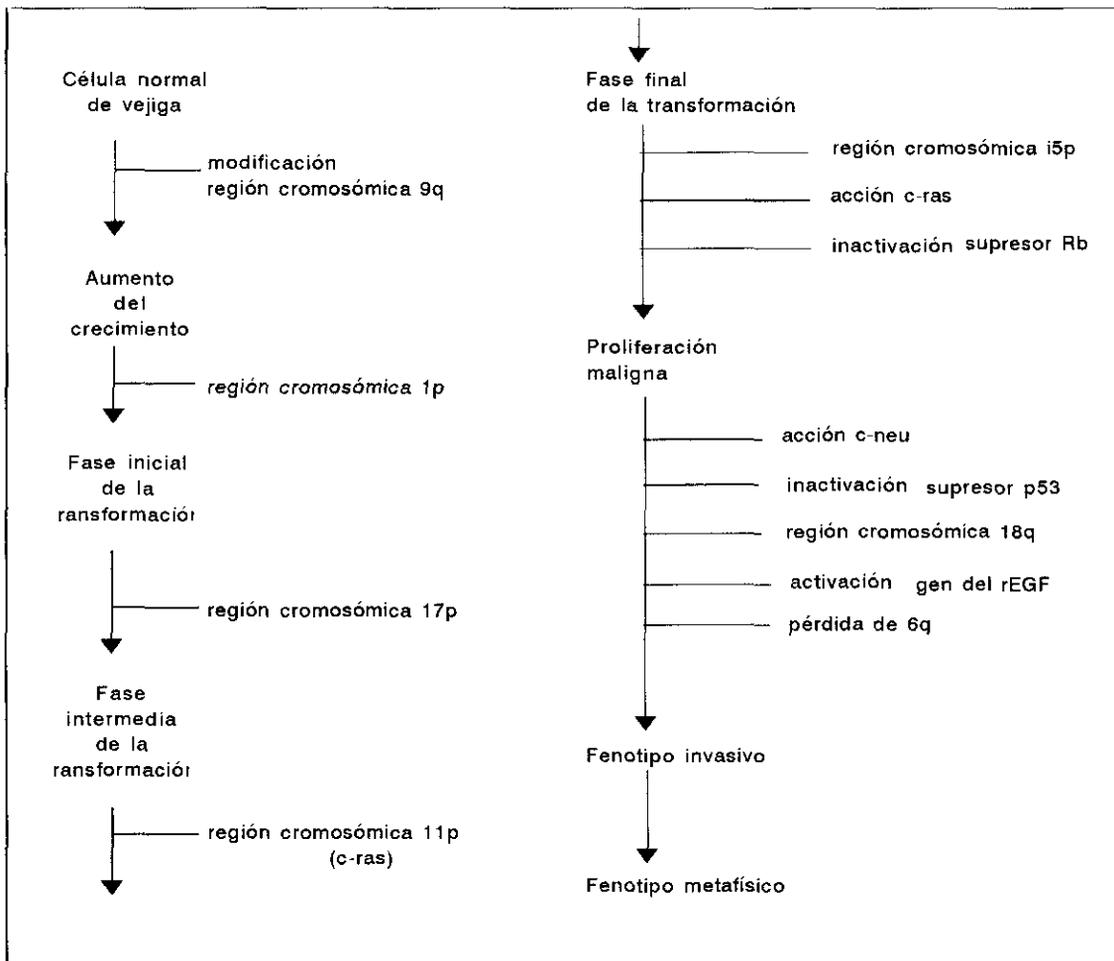


FIG.5: Esquema del proceso de transformación neoplásica en el carcinoma de vejiga.

El conocimiento detallado de la correlación entre esta progresión de errores genéticos y los estadios clínicos de la enfermedad está empezando a poder ser utilizado desde el punto de vista del diagnóstico y pronóstico clínicos.

El esclarecimiento de todos los mecanismos que controlan la proliferación celular normal junto con la regulación de dichos mecanismos durante los procesos de diferenciación y desarrollo de organismos superiores es uno de los mayores desafíos que tiene ante sí la investigación básica sobre el cáncer.

8.- ONCOGENES Y CANCER DE VEJIGA

*** ONCOGEN *erbB-2/NEU***

El oncogén *erbB-2* es un gen relacionado con el gen del receptor del EGF y por tanto con los oncogenes retrovíricos y celulares *erbB*. Estudios moleculares y bioquímicos han demostrado que el protooncogén humano *erbB-2* está localizado en el brazo largo del cromosoma 17 y codifica una proteína transmembrana de 185.000 daltons que posee actividad tirosina quinasa⁽⁸²⁾. Esta proteína es probablemente un receptor de la superficie celular para un factor de crecimiento. La identificación inicial de este gen como un oncogén se llevó a cabo en líneas celulares de neuroblastomas de rata derivadas de un tumor inducido por el carcinógeno químico N-nitroso-metilurea⁽⁸²⁾. En todos los casos examinados, la activación del oncogén tuvo lugar mediante una mutación puntual dentro del dominio transmembrana. Esta mutación activadora causa la sustitución de un aminoácido hidrofílico (valina) por un aminoácido hidrofóbico (ácido glutámico).

En tumores humanos, la activación del protooncogén *erbB-2* no parece

estar mediada por mutaciones puntuales. En estos tumores el potencial oncogénico no se debe a una mutación con actividad constitutiva, sino a una hiperexpresión del receptor c-erbB-2 original, como ocurre en diversos adenocarcinomas humanos y líneas celulares derivadas, especialmente de mama, ovario y pulmón^(83,84,85,86).

Masui et al.⁽⁸⁷⁾ estudiaron en el carcinoma de células transicionales de vejiga de rata inducido con diversos productos químicos la existencia de mutaciones puntiformes del ADN que codifica el dominio intramembránico de la proteína p185(NEU). Sus resultados indicaron que dicha mutación no existía y que, por lo tanto, no es el mecanismo de activación en el cáncer vesical.

El mecanismo por el cual la expresión elevada del oncogén *erbB-2* incrementa la posibilidad de desarrollo de carcinomas de humanos es desconocido. La identificación del ligando de este receptor ayudará al entendimiento de su papel fisiológico. Estudios preliminares indican que la contribución del oncogén *erbB-2* al desarrollo neoplásico en humanos requiere un nivel determinado de expresión por encima del cual ejerce un efecto neoplásico⁽⁸⁸⁾. La expresión del gen *erbB-2* bajo el control regulador del virus SV40 no induce transformación maligna. Sin embargo, cuando estas secuencias son reemplazadas por elementos reguladores más potentes como los presentes en retrovirus, se puede observar la transformación eficiente de fibroblastos de roedores. La comparación de los niveles de expresión del producto del oncogén *erbB-2* en estas células indican que aquellas células transformadas contienen aproximadamente de 3 a 5 veces el nivel de expresión de dicha proteína con respecto a fibroblastos no transformados. Estas observaciones ponen de manifiesto que la determinación del papel que el gen *erbB-2* pueda tener en tumores humanos requerirá una cuantificación muy precisa de sus niveles de expresión.

El producto del protooncogén *erbB-2* es expresado en niveles elevados en urotelio, túbulo distal y proximal, epitelio gastrointestinal y epitelio bronquial del feto(89). Aunque esta proteína raramente es expresada en tejidos normales del adulto excepto túbulo renal(89) el oncogén *c-erbB-2* es con frecuencia amplificado y sobreexpresado en ciertos tumores como carcinoma gástrico⁽⁹⁰⁾, mama⁽⁹¹⁾, ovario⁽⁹¹⁾ y carcinoma de vejiga⁽⁹²⁻⁹⁷⁾.

Es interesante anotar que la amplificación del oncogén *erbB-2* se correlaciona con la progresión maligna de estos tumores. Se ha propuesto que la amplificación del oncogén *erbB-2* tiene más valor para predecir el desarrollo agresivo de los tumores de mama, que los métodos diagnósticos utilizados hasta ahora, tales como niveles de receptores de progesterona y estrógenos. Además en tumores vesicales la expresión de este producto se correlacionaba bien con el grado y estadio de la neoplasia^(93,98).

Recientemente se realizaron estudios en células obtenidas de lavados vesicales encontrando amplificación del oncogén *erbB-2* en células neoplásicas de tumores grado II y grado III⁽⁹⁴⁾.

La evolución del oncogén *c-erbB-2* en pacientes con carcinoma vesical ha sido también estudiada, se ha encontrado que dicho oncogén tiene significado pronóstico con la recurrencia y progresión. De forma resumida los autores refieren que la cuantificación de la proteína p185 en tumores vesicales de células transicionales puede ser utilizada para identificar subgrupos de riesgo con mal pronóstico.

Como se ha indicado con anterioridad el producto del gen *erbB-2* es un receptor de transmembrana fácilmente accesible desde fuera de la célula. Así

pues, es concebible que su expresión elevada en cánceres humanos pueda ser modulada con anticuerpos específicos. De hecho, la transformación maligna de fibroblastos de roedores inducida por el oncogén mutado de rata *erbB-2* pudo ser revertida por un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio externo del producto de este gen⁽⁹⁹⁾. Así pues *erbB-2* es el oncogén más accesible, y quizás el primero contra el cual se puede intentar realizar una terapéutica sistemática básica sobre oncogenes.

* ONCOGENES RAS

Los genes *ras* constituyen una familia génica que se encuentra en todos los organismos⁽¹⁰⁰⁾. En la actualidad se conocen tres genes *ras* que se han designado *H-ras*, *K-ras*, *N-ras*. La evidencia de que estos genes celulares podían llegar a ser activados como oncogenes, se manifestó por primera vez por la trasducción de dos genes *ras* de mamíferos, el *H-ras* y *K-ras* en las estirpes Harvey y Kirsten del virus del sarcoma murino. Los genes *ras* han acaparado gran interés, puesto que en 1982 se identificaron como los alelos transformantes de una gran parte de los tumores humanos⁽¹⁰⁰⁾. Los oncogenes *ras* también se ha encontrado en un alto porcentaje de tumores animales inducidos por carcinógenos químicos y físicos⁽¹⁰¹⁾.

Los tres genes *ras* codifican proteínas estructural y funcionalmente muy parecidas de 21 Kd, por lo que se las conoce genéricamente como proteínas p21 y, más recientemente proteínas *ras*⁽¹⁰⁰⁾.

Las proteínas *p21-ras* tiene como propiedad bioquímica más característica su habilidad por unir e hidrolizar GTP. El ciclo de las proteínas *ras* se puede representar en su forma activa por el complejo p21-*ras*/GTP y la forma inactiva por el complejo p21-*ras*/GDP. La inactivación de la proteína se produce como consecuencia de la actividad GTPasa intrínseca. Se piensa que las proteínas *ras* se encuentran en la célula en equilibrio entre un estado inactivo y un estado activo. En situación normal y en ausencia de estímulo, la proteína estaría en estado inactivo, caracterizado por una conformación que permite la fijación de GDP. Al ser estimulada, intercambia GDP por GTP lo que se traduce en un cambio de la conformación molecular que la convierte en activa. Este cambio conformacional permitiría que las proteínas interaccionasen con moléculas efectoras, para así dar comienzo a la transducción de señales mitogénicas. Una vez que

la interacción entre las proteínas ras activadas y las moléculas efectoras se ha producido, éstas volverían inmediatamente a la forma no activada, por conversión del GTP en GDP, a expensas de su función GTPasa intrínseca. Si la duración de la interacción con la molécula efectora es más larga que la del estímulo original o se efectúa sobre varias moléculas efectoras en sucesión, antes de la inactivación completa, la amplificación de la señal está garantizada. Si se estabiliza en la forma activa, se produce una señalización continua capaz de transformar. Recientemente se ha identificado un factor denominado GAP (GTPase Activating Protein), capaz de acelerar la reacción GTPasa intrínseca de proteínas ras normales del orden 100-200 veces. Este factor carece de efecto estimulante de la GTPasa de proteínas mutadas. El factor GAP podría ser tanto un represor de la actividad de *p21-ras* como su efector., o un componente esencial para la interacción con el efector^(101,102).(FIG. 6).

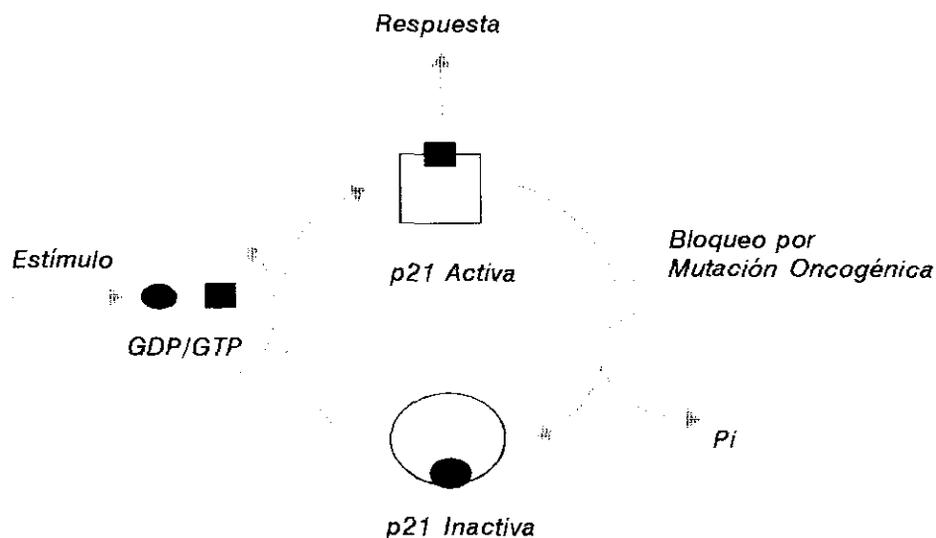


FIG.6: Modelo para la regulación de la proteína ras "p21".

Los genes *ras* pueden adquirir propiedades transformantes por mecanismos cuantitativos y cualitativos. La mayor parte de los oncogenes *ras* deben su carácter transformante a una única mutación puntual dentro de sus secuencias codificantes⁽¹⁰³⁻¹⁰⁴⁾. Sin embargo, una expresión alta (20 a 100 veces) de genes *ras* no mutados, puede también inducir ciertas manifestaciones neoplásicas. En términos generales las propiedades neoplásicas inducidas por alta expresión de los genes *ras* son más limitadas que las propiedades neoplásicas inducidas por niveles normales de expresión de sus alelos mutados. Hasta el momento se conocen siete mutaciones puntuales en los protooncogenes *ras* que confieren esta capacidad oncogénica a sus productos. Proteínas normales *ras* contienen glicina en la posición 12, un residuo que parece ser necesario para su función normal. La sustitución de la glicina en la posición 12 por cualquier otro aminoácido, da como resultado la activación oncogénica de las moléculas *ras*.

Puesto que las proteínas *ras* están en equilibrio entre la forma inactiva (que une GDP) y la activa (que une GTP), las mutaciones que conduzcan a la estabilización de las proteínas *ras* en su estado activo determinarán un flujo continuo de señales mitogénicas que darán lugar a la transformación maligna. Este modelo también tiene en cuenta que la alta expresión de proteínas normales *ras* puede conducir a la transformación maligna. Puesto que la transformación maligna requiere la presencia de una cierta cantidad de proteína activada *ras*, una expresión elevada de proteínas normales *ras* puede crear en la célula la concentración necesaria de proteínas *ras* en estado activo para producir la transformación neoplásica sin que necesariamente se altere el equilibrio entre su estado activo e inactivo.

Los oncogenes *ras* se ha encontrado en una gran variedad de cánceres humanos. Se han identificado en carcinomas de vejiga, mama, colon, riñón,

hígado, pulmón, ovario, páncreas y estómago⁽¹⁰⁵⁾. Como media, los oncogenes *ras* están presentes en un 10 al 15% de los procesos malignos humanos. Sin embargo, la relativa incidencia de los oncogenes *ras* varía mucho. Mientras que los oncogenes *ras* se han encontrado raramente en ciertos procesos malignos comunes tales como carcinomas de mama, se han identificado en el 40% de los carcinomas de colon. En términos generales se puede afirmar que los oncogenes *ras* son los genes transformantes más frecuentemente encontrados en el cáncer humano.

No obstante es posible que la incidencia de la activación oncogénica *ras* en las neoplasias humanas no se haya valorado en su justa medida. En los últimos años el desarrollo reciente de metodologías mucho más sofisticadas sugiere que en determinadas neoplasias los oncogenes *ras* son más abundantes de lo que anteriormente se había sospechado. Una de estas nuevas metodologías de diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Con esta metodología se ha podido establecer que aproximadamente el 40% de los carcinomas de colon humanos llevan los oncogenes K-*ras* activados por existencia de mutaciones puntuales únicas dentro de su codón 12.

Pulciani et al.⁽¹⁰⁶⁾ demostraron que el ADN aislado de la línea T24, procedente de carcinoma de vejiga humano, y otras líneas de diversos tumores, producía por transfección la transformación de los fibroblastos murinos NIH/3T3 y que las células transformadas eran tumorigénicas en los ratones atómicos. El fenotipo maligno se heredaba durante varios ciclos celulares in vitro. El análisis por Southern blot demostró que el responsable de la transformación era un solo fragmento del ADN de NIH/3T3 que contenía el oncogén de T24, *c-H-ras*.

Se ha encontrado amplificación de *c-Ki-ras* en muy pocas líneas celulares

procedentes de cánceres uroteliales. Más frecuente es la expresión aumentada de *c-Ha-ras* en células de carcinomas y lesiones precancerosas de vejiga⁽¹⁰⁷⁾.

En las muestras de los cánceres urológicos se han encontrado mutaciones de *c-ras* con poca frecuencia, entre 3 y 10%. Se ha registrado una mutación del codón 12 de *c-Ha-ras* en diversas líneas celulares in vitro procedentes de carcinoma de vejiga, como las líneas T24^(108,109) y EJ⁽¹¹⁰⁾. Mediante transfección se encontró en 2 de 38 carcinomas de vejiga oncogenes *c-Ha-ras* con una mutación de una base del codón 61, que incorporaban arginina en un caso y leucina en otro, en lugar de glutamina⁽⁶⁷⁾.

Jones et al.⁽¹¹¹⁾ provocaron carcinomas vesicales en 344 ratas Fischer mediante N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina. Se observó que en el 20% de los casos la transformación neoplásica se asoció a mutación de una base del codón 61 del oncogén *c-Ha-ras*; las pruebas tumorigénicas en ratones desnudos (atímicos) fueron positivas y la transferencia genética a células 3T3 provocó su transformación. Sin embargo, en otras de las líneas se produjo la transformación por la actividad del proto-oncogén *c-Ha-ras* normal, cuando se sumaba a la alteración existente en otros oncogenes.

Otro proceso que se ha encontrado asociado a los cánceres uroteliales es la elisión de *c-Ha-ras*. A veces está elidida la región cromosómica 11p, donde está el locus de *c-Ha-ras*, hecho hallado en el 45% de las líneas celulares de carcinoma de vejiga⁽¹¹²⁾. Las elisiones pueden dejara al alelo de la cromátida no elidida en condiciones de ser derreprimido y sobreexpresado.

Amplificaciones del *c-Ha-ras* se han observado en un 5% de estos tumores, no comprobándose relación con el pronóstico, mientras que deleciones

de su locus pudieron constatarse en el 16%, y mutaciones en un 10%. En animales este oncogén se asocia a progresiones tumorales, mientras que estudios inmunohistoquímicos han demostrado una negatividad para el epitelio normal, negatividad o discreta positividad en las lesiones hiperplásicas o papilomas y una intensa tinción en displasias y carcinomas, teniendo, en estos últimos, un papel en los estadios iniciales y correlacionándose inversamente con el grado y diferenciación^(113,114).

*** ONCOGEN *erbB-1*(EGF-R)**

El proto-oncogén *c-erbB-1* dirige la producción de un receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Los tumores se consideran hoy día como una caricatura de los procesos normales de crecimiento y renovación celular en los que subyace una expresión disregulada de genes implicados de forma relevante en el desarrollo celular⁽¹¹⁵⁾.

Se denomina factor de crecimiento, de forma genérica a cualquier sustancia que posee una acción estimulante o inhibidora sobre el crecimiento celular⁽¹¹⁶⁾. Los factores de crecimiento constituyen un sistema de señales que organizan y coordinan el crecimiento y la diferenciación celulares⁽¹¹⁷⁾.

Estas sustancias, son pues mediadores fisiológicos y también patológicos del crecimiento y reparación celulares, que toman parte tanto en la embriogénesis como en los procesos de cicatrización y, de carcinogénesis^(117,118).

Una de las constantes que las células tumorales exhiben en los cultivos de líneas celulares es la disminución de sus requerimientos nutricionales dependientes del medio de cultivo; se sugiere pues, que ellas mismas son capaces de sintetizar determinadas sustancias que son necesarias para su crecimiento. Dichas observaciones fueron las que llevaron al estudio y descubrimiento de los múltiples factores de crecimiento que se conocen en la actualidad⁽¹¹⁹⁾.

El *Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)* fue aislado por primera vez en 1962 por Cohen de la glándula submaxilar del ratón⁽¹²⁰⁾. El equivalente humano del *EGF* lo detectó y aisló en orina Gregory al aislar la urogastrona, cuya

composición química era en extremo parecida a la del *EGF* murino. Gregory concluye en su trabajo que la urogastrona y el *EGF* eran una misma cosa⁽¹²¹⁾.

El *EGF*, un polipéptido de 53 aminoácidos, es detectable en plasma normal y prácticamente en todos los fluidos biológicos (orina, sudor, leche...) y es expresado por multitud de tipos celulares en diversos órganos y tejidos como cerebro, médula adrenal, riñón, glándula salivar, glándulas gástricas y duodenales⁽¹²²⁾ y en el árbol respiratorio y sus glándulas⁽¹²³⁾.

Estas sustancias, en su mayoría de vida media corta y niveles séricos basales muy bajos, ejercen su acción de forma autocrina, paracrina, yuxtacrina, endocrina e intracrina^(115,116).

Sus múltiples acciones son mediadas a través de su receptor, el *EGF-R*. Este receptor es una glicoproteína de 170kDa perteneciente a la familia de receptores tirosinquinasa, que se localiza en todas las membranas celulares. Su secuencia completa fue obtenida en 1974 a partir de su gen codificador que se encuentra en el cromosoma 7⁽¹¹⁶⁾.

La activación del *EGF-R*, conlleva la puesta en marcha de una compleja serie de reacciones intracelulares en las que están implicados diferentes mediadores, que culminan con la replicación del DNA y división celular.

El papel del *EGF* en la transformación tumoral puede llevarse a cabo a través de mecanismos diferentes:

1.- Aumento de su expresión mediante amplificación génica, incremento de la transcripción o disminución de su metabolismo.

2.- Estimulación autocrina.

3.- Alteraciones estructurales del receptor o activación del mismo por productos proteicos endógenos.

Estructuralmente el *EGF-R* se relaciona con el producto proteico codificado por el oncogén *v-erbB-1*, y con el del *c-erbB-2/NEU*, la proteína p185.

El *v-erbB-1*, oncogén del virus de la eritroblastosis aviar, que produce eritroblastosis y sarcomas en las aves infectadas, codifica una proteína muy parecida al *EGF-R*, difiriendo en que carece de casi todo el dominio externo⁽¹²⁴⁾.

El *EGF-R* ha sido identificado en células de diversos tumores humanos o líneas celulares tumorales. Los receptores han sido estudiados por varios métodos que incluyen tinción inmunohistoquímica del receptor, RIA, o análisis de DNA o RNA.

Hoy por hoy existen indicios de la implicación del *EGF* y de su receptor en diversos tipos tumorales. Niveles incrementados del *EGF-R* han sido encontrados en carcinoma de mama^(125,126), gliomas^(127,128), cáncer de pulmón⁽¹²⁹⁾, tumores del tracto genital femenino^(130,131) y cáncer de vejiga^(132,133).

El *EGF* es excretado en orina en altas concentraciones en forma activa biológicamente^(134,135). Estudios preliminares indican que la distribución de *EGF-R* en urotelio de células malignas y premalignas es superior que en urotelio normal⁽¹³⁶⁾. Por otra parte, al menos in vitro, las células de urotelio normal son más refractarias al potencial efecto tumorigénico de *EGF* como estimulación del crecimiento e inducción de actividad de la ornitina decarboxilasa que las células

de TCC. Varias líneas de experimentación indican que el *EGF* juega un papel importante en el desarrollo y crecimiento de TCC. Se ha informado que las concentraciones de *EGF-R* se correlacionan con la agresividad biológica del tumor⁽¹³⁵⁾.

El análisis del contenido de *EGF-R* por medio de inmunohistoquímica ha sugerido que la positividad de *EGF-R* puede estar asociada con factores de peor pronóstico, como alto grado tumoral, y alto estadio^(126,134).

Esto permitiría clasificar los tumores vesicales malignos en diferentes categorías pronósticas mediante la determinación del *EGF-R* en muestras de tejido tumoral.

*** ONCOGENES NUCLEARES**

El grupo de oncogenes nucleares se caracteriza por constituir auténticos factores de transcripción. Su papel consiste en regular la expresión de una batería de genes involucrados directamente en la regulación de la proliferación o diferenciación celular.

Entre los más estudiados se encuentran la familia de oncogenes *myc* (*C-myc*, *N-myc* y *L-myc*).

Los proto-oncogenes *C-myc*, *L-myc* y *N-myc*, son los homólogos celulares de *v-myc*, el oncogén transducido por el virus MC29 de la mielocitomatosis aviar y otros tres retrovirus aviarios, cuya acción transformante induce una velocidad de proliferación casi doble que la inducida por retrovirus portadores de otros oncogenes y se acompaña de inmortalización⁽¹³⁷⁾.

El gen *C-myc* está altamente conservado durante la evolución puesto que ha sido encontrado en los genomas de humanos, roedores, pollos y peces. Hay aproximadamente una conservación en términos de aminoácidos del 90% entre los genes del ratón y del hombre.

El protooncogén humano *c-myc* codifica dos proteínas de 64 mil y 67 mil daltons⁽¹³⁸⁾. Estas moléculas están fosforiladas, tienen un alto contenido en prolina y están localizadas en el núcleo⁽¹³⁹⁾. La proteína P67 tiene la misma secuencia de aminoácidos que la proteína P64 excepto por la presencia de 15 aminoácidos adicionales en su amino terminal. No se sabe hasta el momento si las proteínas P67 y P64 *c-myc* tienen diferentes propiedades biológicas.

Las proteínas *c-myc* tienen una vida media muy corta (20-30 minutos) lo cual es apropiado para un gen que juegue un papel regulador en la proliferación celular⁽¹³⁸⁾.

Desde los primeros estudios se conoce la importante participación de *c-myc* en la mitogénesis y diferenciación celular, como gen de respuesta primaria ante los estímulos que activan la entrada en ciclo de las células en reposo proliferativo⁽¹⁴⁰⁾. En estas circunstancias se produce siempre un rápido y transitorio aumento de su expresión que dura unas pocas horas y desciende pronto a lo largo de ese ciclo y de los sucesivos, en tanto no se vuelva a la situación de reposo proliferativo⁽¹⁴¹⁾. La expresión de *myc* es necesaria y suficiente para la proliferación.

La activación oncogénica de los genes de la familia *myc* puede producirse por tres mecanismos aparentemente diferentes. El primer mecanismo, es el que ocurre en la transducción retrovímica y en la mutagénesis por inserción. En ellas el proto-oncogén queda truncado, sin sus regiones reguladoras ni los sitios de iniciación normal de la transcripción y, además, bajo el control directo de los promotores e intensificadores víricos.

En el segundo mecanismo, la hiperexpresión se debe a una multiplicación repetitiva o amplificación génica, descubierta inicialmente en *N-myc* en el neuroblastoma y detectada posteriormente en otros tumores y en otros miembros de la familia. Constituye un factor pronóstico de primer orden en el neuroblastoma^(142,143).

En el tercer mecanismo, la hiperexpresión se debe a una translocación cromosómica, fenómeno constante en los plasmocitomas e inmunocitomas

murinos y en el linfoma de Burkitt humano(340,341). En éste la traslocación constante y característica $t(8;14)(q24;q32)$ implica un intercambio mutuo entre la región distal de la rama larga del cromosoma 8, que lleva todo o parte del proto-oncogén *c-myc* y la equivalente del cromosoma 14^(139,144).

Se ha observado una expresión aberrante de este gen en numerosas neoplasias humanas, líneas celulares y tumores inducidos en animales transgénicos. Se ha evidenciado una alta expresión en lesiones neoplásicas de cabeza y cuello, colon⁽¹⁴⁵⁾ y cervix⁽¹⁴⁶⁾.

Estudios simultaneando la valoración del anticuerpo por inmunofluorescencia y la del contenido de ADN mediante citometría de flujo⁽¹⁴⁷⁾ demuestran un mayor contenido de esta proteína en relación con el incremento en la síntesis de ADN, observándose incluso una mayor expresión en la mucosa normal respecto a la tumoral lo que permite a estos autores sugerir la posibilidad de que una disminución en la síntesis de esta proteína intervenga en la patogenia del cáncer. Asimismo también se ha sugerido la posibilidad de que un aumento en la expresión de *c-myc* por parte de las células del estroma conlleve un mejor pronóstico.

Son escasos los trabajos realizados acerca del comportamiento de los oncogenes *c-myc* en tumores urológicos.

El oncogén *c-myc* se ha encontrado amplificado en el adenocarcinoma de próstata y en la hiperplasia benigna de la próstata⁽¹⁴⁸⁾. En el tumor de Wilms se encontró sobreexpresado el oncogén *N-myc*⁽¹⁴⁹⁾. En lo que respecta a tumores vesicales se ha encontrado una correlación entre la expresión de *c-myc* y la recurrencia o invasión en una serie de tumores vesicales superficiales. Al mismo

tiempo se ha sugerido que el nivel de metilación del oncogén *c-myc* puede correlacionarse con el estadio y grado tumoral en las neoplasias vesicales⁽¹⁵⁰⁾.

GENES SUPRESORES

En los últimos años se ha descubierto la existencia no sólo de genes "dominantes" capaces de inducir la transformación celular al alterarse su expresión, sino también de genes cuyos productos están involucrados de forma diversa en la regulación negativa de la proliferación celular y cuya alteración conlleva a la transformación celular por falta del mismo o a su supresión. Representantes de este grupo son: el gen del retinoblastoma, y el gen que codifica la proteína p53.

*** Gen supresor p53**

El gen supresor *p53*, localizado en la región p13 del cromosoma 17⁽¹⁵¹⁾, codifica la expresión de una fosfoproteína de 53 kDa; p53 fue primero considerado un marcador tumoral, posteriormente un oncogén^(152,153) y, finalmente, un gen supresor^(154,155,156). La expresión de la proteína p53 hizo su aparición en la literatura científica en 1979⁽¹⁵⁷⁾. En principio llamó la atención por aparecer abundantemente en las células tumorales y en relación con la infección de las células por el virus SV40. Por ello se interpretó, inicialmente, como un antígeno tumoral o la expresión de un oncogén.

En 1982 Crawford y cols. basándose en la aparición espontánea de anticuerpos anti-p53 en pacientes con cáncer de mama adelantaron que la relación

entre el exceso de esta proteína en las células neoplásicas y la malignidad, debería buscarse, tanto en su simple sobreexpresión, como en la alteración de su estructura molecular, o en la alteración de su presentación⁽¹⁵⁸⁾. Pronto se supo que la proteína *p53* de las células tumorales era más estable que la que aparece en las células normales. Rotter y cols. aportaron la evidencia de que, en las células de la leucemia L12, el carácter maligno se asocia igualmente a la ausencia de *p53* como a la presencia de una *p53* aberrante.

Como en el caso de los demás genes supresores, su inhibición, elisión o mutación favorece la carcinogénesis. La proteína del gen *p53* nativo detiene el ciclo celular al final de la fase G1 e impide la entrada en la fase S, por acción sobre el complejo de iniciación de la replicación del DNA o por activación sobre los genes de paso de G1 a S. La falta de *p53* favorece el mantenimiento indefinido del ciclo celular.

El *p53* con mutación puntual produce una proteína que no puede entrar al núcleo y se queda en el citoplasma⁽¹⁵⁹⁾ y tiene actividad cancerígena⁽¹⁶⁰⁾, convirtiendo en cierta manera el gen supresor en oncogén. Cuando coexiste un aumento de la expresión del gen *p53* nativo con proteína de un gen *p53* mutado, se elimina la actividad transformadora de esta última^(161,154).

Ha sido demostrada la cooperación entre la falta de *p53* o de su mutación y la acción de oncogenes *ras* en el proceso de carcinogénesis^(162,163).

Al igual que *c-myc* y *c-myb*, el *p53* mantiene indefinidamente a la célula transformada^(164,165). Se ha comprobado que la vida media de la proteína *p53* es más larga en células transformadas con respecto a las normales y que determina

dos clones de DNA que codifican *p53* pueden immortalizar líneas celulares en cultivos⁽¹⁶⁶⁾.

Con técnicas de secuenciación, se han estudiado los distintos codones del gen *p53* en los que ocurren estas mutaciones. Cada mutación daría lugar a una proteína alterada; algunas de estas alteraciones consisten solamente en una pérdida de su funcionamiento habitual mientras que otras se ha comprobado que adquieren capacidad transformante sobre determinadas líneas celulares. La mayor parte de las mutaciones están situadas entre los residuos aminoácidos 130 a 290; principalmente en cuatro regiones de la proteína: los residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286^(167,168). Todas estas alteraciones genotípicas originan variaciones en las oncoproteínas.

Las mutaciones en el gen *p53* parecen ser las alteraciones genéticas más frecuentes en cánceres humanos. Se supone que en la mayor parte de las neoplasias existe una mutación de *p53* y en algunas una supresión funcional o molecular de *p53*.

Los estudios realizados en el carcinoma de colon han encontrado que un 75-80% de los mismos muestra una alteración en ambos alelos para el *p53*; uno por delección y el otro por mutaciones puntuales. Son estas últimas las que dan lugar a la síntesis de la proteína alterada⁽¹⁶⁹⁾. Se han visto alteraciones genéticas similares en cánceres de pulmón, mama, riñón, próstata y vejiga.

En el cáncer de mama se ha encontrado una expresión aumentada de *p53* mutado en el núcleo. La presencia de dicha proteína se correlaciona con la indiferenciación, atipias, número de mitosis y grado histológico del tumor, considerándose un factor de mal pronóstico en los carcinomas de mama.

En los tumores vesicales se ha visto una expresión de *p53* mutante en un 51-54% de los mismos^(170,171). Siendo los tumores infiltrantes los que presentan una mayor positividad en relación con los tumores superficiales⁽¹⁷⁰⁾. Aproximadamente un 60% de los tumores invasivos contienen *p53* mutada y aproximadamente un 90% de los tumores con esta mutación llevan asociada la pérdida de un alelo del cromosoma 17p que contiene el gen *p53*⁽¹⁷²⁾.

Recientemente han sido detectadas mutaciones de *p53* en el DNA de sedimentos y citología de orina de pacientes con cáncer vesical no tratado, esto permitiría el screening en individuos de alto riesgo o como control en el seguimiento de los pacientes tras el tratamiento⁽¹⁷²⁾.

Gen supresor Retinoblastoma (Rb)

Otro ejemplo de gen supresor de la transformación tumoral es el gen relacionado con el retinoblastoma. El gen *Rb* se sitúa en la región q14.11 del cromosoma 13. Codifica una fosfoproteína nuclear, con un PM de 110-116 kDa, comúnmente denominada RB-1 o simplemente Rb. Esta proteína tiene la capacidad de unirse in vitro al DNA. Puesto que los niveles de proteína permanecen estables todo el tiempo, parece que la fosforilización y no la expresión del gen es la forma de regular su función y actividad, indudablemente relacionada con el ciclo celular^(173,174,175).

Durante las fases G0/G1 se encuentra defosforilada y aparece fosforilada durante las fases S-G2-M.

La fosforilización en la transición G1/S alteraría la función de pRB,

colocándola en un estado permisivo para la progresión del ciclo celular.

La *proteína Rb* hiperfosforilizada, al igual que la unida con oncoproteínas víricas, se encuentra fuera del núcleo, al contrario que la hiposfosforilizada, que se mantiene estrechamente unida con alguna estructura nuclear, de modo que la (hiper)fosforilización en la transición G1/S tendría por objeto liberar esa unión, que debe ser la que impide la progresión del ciclo⁽¹⁷⁶⁾. Esto se apoya en el hecho de que las proteínas *Rb* mutadas aisladas de diversos tumores e inactivas, por tanto, como *oncosupresoras*, han perdido esta situación de anclaje firme en el núcleo⁽¹⁷⁷⁾

En su forma salvaje, parece intervenir en la regulación de la transcripción de otros genes y suprime la expresión de *c-fos* y de *N-myc*. Generalmente, su fallo se produce por *delección completa o parcial*; concretamente se han descrito *delecciones de los exones 21-27*. La proteína codificada por el gen truncado es de unos 95 kDa y falla en su desplazamiento al núcleo, por lo que puede aparecer acumulada en el citoplasma de las células anómalas.

La oncoproteína E7 de los virus del papiloma humano 16 y 18 se une a la proteína *RB-1* formando complejos inactivos; lo mismo ocurre con el antígeno LT de virus SV40 y con el antígeno de adenovirus E1a.

La carencia, malformación o inactivación de la proteína *RB-1* determina la aparición de transformaciones malignas en células de diferentes tejidos.

Se ha descrito la presencia de una proteína *RB* con una *delección de un dominio de 35 aminoácidos* en el carcinoma de vejiga. Se piensa que este fragmento es necesario para que la proteína pueda ejercer su función⁽¹⁷⁸⁾.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

Las neoplasias uroteliales son lesiones tumorales de difícil valoración, debiéndose fundamentalmente este fenómeno a una gran heterogeneidad de sus lesiones, una biología tumoral multiforme y una evolución potencial hacia la invasión desde sus manifestaciones iniciales. Su biología tumoral le confiere una evolución imprevisible que hace difícil efectuar un diagnóstico correcto de forma precoz. Durante las últimas décadas una de las líneas prioritarias de investigación uro-oncológica ha sido identificar factores de valor pronóstico, es decir, descubrir rasgos característicos relacionados directamente con la enfermedad neoplásica, capaces de ofrecer una información objetiva y cuantificable sobre la evolución y respuesta al tratamiento de los carcinomas vesicales de células transicionales. La información así obtenida nos proporcionaría las bases para un mejor manejo de estos tumores, orientándonos en la adopción de una aptitud terapéutica inicial, en el seguimiento postoperatorio y en la detección precoz de recidivas tumorales.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular en los últimos años ha supuesto un poderoso impulso para la investigación oncológica, aportando información sobre las modificaciones genotípicas y fenotípicas acaecidas en las células cancerosas. Nos parece por tanto del máximo interés analizar la expresión de los principales oncogenes implicados en el cáncer vesical y correlacionarlos con diversos parámetros clínicos e histopatológicos para determinar su importancia pronóstica. Pretendemos analizar si estos estudios añaden alguna información acerca de la evolución de los pacientes con carcinoma vesical de células transicionales, pudiendo seleccionar un grupo de pacientes con alto riesgo de desarrollar recidivas tumorales o fallecer por este tipo de neoplasia. En este sentido, la posibilidad de adoptar medidas terapéuticas adicionales podría mejorar el pronóstico de estos enfermos.

Nos parece asimismo interesante emplear sencillas técnicas de laboratorio para la detección de la expresión de oncogenes puesto que, en caso de demostrar valor pronóstico, son fácilmente aplicables a la rutina hospitalaria.

En vista del estado actual de la atención a los pacientes con carcinoma vesical, parece obligago tratar de identificar nuevas líneas de investigación que intenten mejorar la comprensión del comportamiento biológico del tumor, y con ello tratar de modular de la forma más beneficiosa para el paciente dicho comportamiento. Entre ellos, la determinación de expresión de oncogenes puede constituir una ayuda en la atención y el control clínico de los pacientes con cáncer vesical, y contribuir a mejorar su pronóstico. Por otra parte, la ausencia de elementos diagnósticos fiables en su evaluación asociados a la baja sensibilidad que poseían otros métodos diagnósticos más tradicionales indujeron a llevar a cabo estudios exhaustivos a cerca del comportamiento biológico de este tipo de tumores uroteliales.

La identificación temprana de aquellos tumores que presentarán un curso agresivo mejoraría el pronóstico del cáncer vesical al permitir una acción terapéutica adecuada más temprana.

Aproximadamente un 10-20% de T.superficiales papilares evolucionan a carcinoma nodular invasivo. La predicción de esa evolución maligna es uno de los problemas en el manejo de los tumores vesicales.

Los mecanismos celulares que median el comportamiento heterogéneo de los tumores permanece desconocido. A pesar de ello, avances recientes en la biología tumoral han sugerido una serie de marcadores que pueden ayudar a clasificar a los tumores en relación a las diferencias biológicas entre ellos.

Hipótesis

En la propia célula tumoral se encuentran muchas de las características que van a determinar el comportamiento biológico tumoral. De ahí el interés de los estudios realizados sobre el DNA y ciclo celular, oncogenes. Estas variables junto al resto de los factores pronósticos podrían explicar las variaciones en el comportamiento biológico tumoral de forma individualizada y realizar una caracterización biológica de los tumores vesicales.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Iniciar un protocolo de estudio de la biología molecular de los carcinomas vesicales de células transicionales que permita caracterizar biológicamente estos tumores.
2. Determinar las concentraciones de las oncoproteínas p185(neu) y p175 (EGF-R) en tejido neoplásico de carcinomas vesicales de células transicionales y en tejido urotelial sano.
3. Analizar por inmunohistoquímica la expresión de la oncoproteína p53 en tejido neoplásico de carcinomas vesicales de células transicionales y en tejido urotelial sano.
4. Relacionar las oncoproteínas analizadas con las características clínicas y anatomopatológicas de los tumores vesicales.
5. Determinar los factores pronósticos en cuanto a la supervivencia y al tiempo libre de enfermedad utilizando los parámetros clínicos, anatomopatológicos y oncoproteínas estudiadas.

MATERIAL Y METODOS

I.- PACIENTES

I.1.- Período de estudio

Este trabajo se ha realizado, durante el período comprendido entre Enero de 1993 y Enero de 1995, en la Cátedra de Urología del Hospital Universitario San Carlos con la colaboración de los Servicios de Análisis Clínicos y Anatomía Patológica.

I.2.- Población de Estudio

La población objeto de nuestro estudio se compone de 85 pacientes que acudieron al Servicio de Urología del Hospital Universitario de San Carlos, divididos en dos grupos: 1) grupo control (N=20) y, 2) grupo de pacientes con cáncer vesical (N=65).

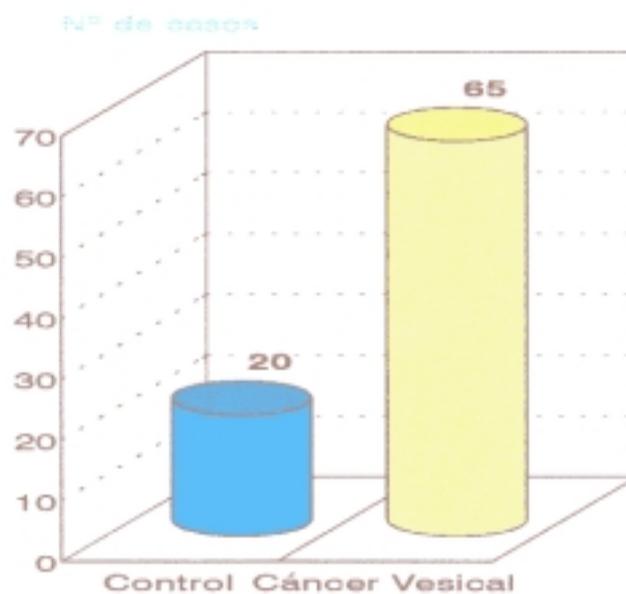


FIG. 7 *Población de estudio*

A) GRUPO CONTROL

El grupo control estuvo constituido por 20 muestras de tejido vesical procedente de pacientes afectados de hiperplasia prostática benigna sometidos a adenomectomía suprapúbica tipo Freyer. Esta técnica quirúrgica precisa de la apertura longitudinal de la vejiga permitiéndonos, de esta forma antes del cierre de la misma tomar una muestra de tejido urotelial histopatológicamente sano.

La edad media de los pacientes "control" fue de 69.7 ± 6.9 con un rango de valores comprendido entre 61 y 90 años.

B) GRUPO DE PACIENTES CON CANCER VESICAL

En este grupo se incluyeron 65 pacientes con cáncer vesical, constando la serie de 54 varones (83%) y 11 mujeres (17%).

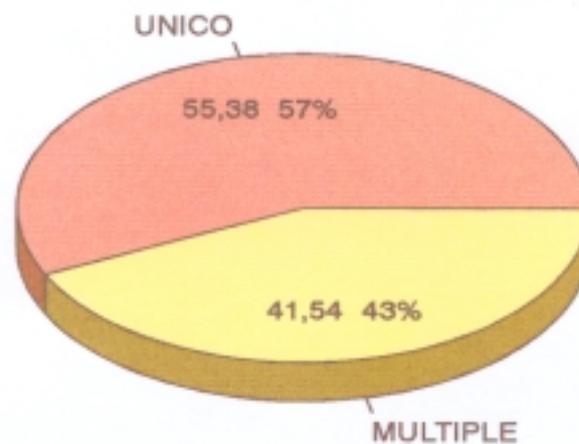


FIG. 11: Distribución de los tumores atendiendo a la uni/multifocalidad tumoral.

Pacientes y Método

La edad media en los varones fué de 69.7 ± 9.71 , con un rango entre 41 y 93 años. En el grupo de mujeres con carcinoma vesical la edad media fue de 64.4 ± 15.9 , siendo el rango de 23-80 años.

	SEXO	MEDIA	DS	MINIMA	MAXIMA
TUMOR VESICAL	HOMBRES	69,7	9,71	41	93
	MUJERES	64,4	15,9	23	80
GRUPO CONTROL	HOMBRES	69,7	6,9	61	90

TABLA III: *Edad media de los pacientes*

II.- METODO

II.1- METODOLOGIA CLINICA

1) Grupo Control

Como ya mencionamos anteriormente el grupo control estuvo compuesto por 20 muestras de tejido urotelial obtenido antes del cierre de las paredes vesicales en pacientes sometidos a adenomectomía tipo Freyer.

2) Grupo con cáncer vesical

El estudio de este grupo de pacientes se llevó a cabo en tres etapas: a) etapa preoperatoria, b) intervención quirúrgica y, c) etapa postoperatoria.

a) Etapa preoperatoria.

Se realizó, sistemáticamente, en todos los pacientes una detallada historia clínica, estudios radiológicos (UIV, TAC), estudios ultrasonográficos, endoscopia urológica, citología urinaria y determinaciones analíticas básicas.

b) Etapa operatoria

Durante el acto quirúrgico (RTU, cistectomía) se procedió a la obtención de una muestra tumoral, que se dividió en dos fragmentos: uno de ellos destinado al estudio histopatológico y el otro para el estudio de oncogenes. El primer fragmento fué fijado inmediatamente en formol al 10% durante 12 horas, incluido

en parafina y teñido según criterio del especialista en Anatomía Patológica. El segundo fragmento se introdujo en un tubo de plástico y, a continuación, se congeló en el mismo quirófano introduciéndolo en un termo con nitrógeno líquido. En ningún caso el tiempo transcurrido entre la extracción de la pieza quirúrgica y la congelación de la muestra sobrepasó los cinco minutos. Una vez transportada la muestra, se procedió a su almacenamiento en un ultracongelador de -80°C , hasta el momento de su procesamiento definitivo.

c) Etapa postoperatoria

Con objeto de analizar la posible influencia pronóstica que pudiera tener el análisis de diferentes oncogenes, se realizó un estudio y seguimiento clínico de los pacientes.

El seguimiento postoperatorio consistió en: visita médica, estudios radiológicos diversos (UIV, TAC, ECO), endoscópicos y pruebas analíticas. La periodicidad de las revisiones fue cada tres meses, durante el primer año y cada seis meses a partir de ese momento.

El seguimiento de nuestro grupo de pacientes se realizó durante una media de 15.06 ± 6.84 meses.

La mortalidad a consecuencia del cáncer vesical durante el periodo de seguimiento fue de 15 pacientes (26.15%).

Durante el período de seguimiento presentaron recidiva de la enfermedad 24 pacientes (36.9%).

II.2- METODOLOGIA ANALITICA

* Estudio histopatológico.

El estudio anatomopatológico fue realizado por dos patólogos de forma independiente. En cada caso se demostró la naturaleza de la muestra: tejido tumoral en los especímenes provenientes de los enfermos con cáncer y tejido urotelial sano en la muestras de los pacientes utilizados como grupo control.

Todas las muestras se fijaron inmediatamente en formol al 10% por un período aproximado de 12 horas y se incluyeron en parafina mediante un sistema automático de inclusión de tejidos en vacío.

Los cortes de aproximadamente 5 micras fueron teñidos con la técnica convencional de Hematoxilina-Eosina.

En cada tumor se estudió el tipo histológico, estadio tumoral y grado de diferenciación. En relación con el grado de diferenciación, los tumores fueron distribuidos según la **Clasificación de Broders**⁽¹⁸⁰⁾ que contempla cuatro grados:

Grado I (bien diferenciado)

Grado II (moderadamente diferenciado)

Grado III (mal diferenciado)

Grado IV (anaplásico).

Los tumores vesicales fueron divididos siguiendo la **Clasificación de Jewett-Marshall**⁽¹⁸¹⁾ que distingue los siguientes estadios:

- * Estadio O= carcinoma in situ
- * Estadio A= invasión de la lámina propia
- * Estadio B₁= invasión de la muscular superficial
- * Estadio B₂= invasión de la muscular profunda
- * Estadio C= invasión de la grasa perivesical
- * Estadio D₁= invasión de órganos vecinos, metástasis ganglionares linfáticas regionales.
- * Estadio D₂= metástasis ganglionares yuxtapanglionares y/o metástasis a distancia.

Por último mencionar que de una forma práctica y para facilitar el manejo estadístico hemos preferido clasificar los tumores vesicales en superficiales e infiltrantes.

* **Procesamiento de las muestras tisulares.**

Para la preparación de las muestras tisulares se siguió el siguiente proceso:

- 1º.- Trituración con un microdismembrador.
- 2º.- Pesado del tejido triturado.

- 3°.- Homogeneización del tejido con potter vidrio teflon en buffer TRIS-HCl a pH 7,4 (TRIS 0,1 M, EDTA 0,015 M, 10% glicerol, 0,01% monotioglicerol). Se homogeniza la suspensión del tejido tres veces durante quince segundos cada vez y se transfiere el homogeneizado con pipeta Pasteur a un tubo de policarbonato para su centrifugación.
- 4°.- Centrifugación a baja velocidad (1500 rpm, 10 minutos, 4°C) obteniéndose un precipitado (pellet) que contiene la fracción nuclear y el sobrenadante (citósol y membranas).
- 5°.- Ultracentrifugación del sobrenadante a 40.000 rpm durante 60 minutos, a 4°C. De esta forma obtenemos un sobrenadante que contiene el citósol y un pellet donde están contenidas las membranas.
- 6°.- Distribución del citósol en alícuotas para la cuantificación de proteínas . Las membranas se guardan resuspendidas en buffer TRIS. Ambos especímenes son congelados a -80°C hasta el momento de ser procesados definitivamente.

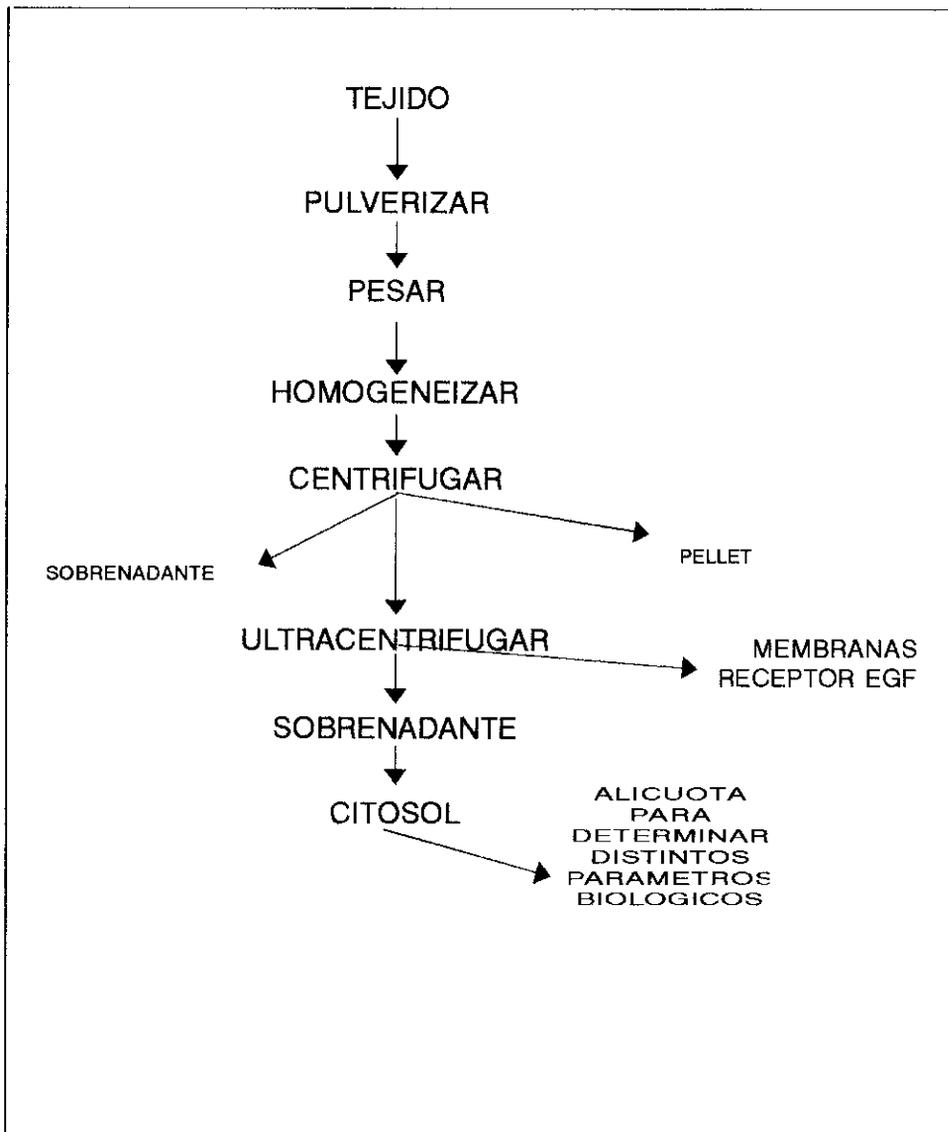


FIG.8: *Procesamiento de muestras tisulares*

*** Cuantificación de proteínas citosólicas y de membrana.**

La determinación de proteínas en el citosol y en membrana se realizó siguiendo el **método cuantitativo de Lowry**⁽¹⁸²⁾. El trabajo se realiza con un contenido proteico comprendido entre 0.3 y 2.5 mg/ml, diluyéndose en buffer TRIS las muestras que excedan estos valores.

*** Determinación de oncoproteína p185/NEU.**

El oncogen NEU codifica una proteína con un Peso Molecular de 185KD conocida como **p185**. La determinación de dicha proteína se realizó mediante un ensayo ELISA (Oncogene Science^R). Por tanto se trata de un inmunoanálisis enzimático tipo "sandwich" que utiliza dos anticuerpos: un anticuerpo monoclonal de ratón, para captura del antígeno y, otro, policlonal de conejo para su detección que reconoce el dominio externo de la p185.

La cantidad de anticuerpo que se ha unido al antígeno se mide con una IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante. Este enzima cataliza la conversión de O-phenyldiamina en un producto coloreado. La lectura se realiza en un espectrofotómetro a 492 nm, siendo la concentración de p185 presente en la muestra directamente proporcional al color desarrollado.

Los coeficientes de variación inter-ensayo para dos concentraciones de 20 y 142 HNU/ml fueron respectivamente de 5%(n=32) y de 3.6%(n=32). Los coeficientes de variación intra-ensayo obtenidos para esas dos muestras han sido de 5.9%(n=8) y 1.5%(n=8) respectivamente. La sensibilidad del método fue de 10 HNU (1 HNU=0.05 fmol/mg de proteína)

La equivalencia de unidades "HNU" (Human Neu Units) y fm (fentomoles) es de 1 HNU=0,5 fm.

*** Determinación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R)**

La cuantificación del EGF-R se llevó a cabo en las membranas que fueron descongeladas y homogeneizadas de nuevo.

La determinación del EFG-R se realizó con un kit de la casa VIENNA LAB^R, que utiliza un método de radioligando. El análisis consiste en la incubación de 75 ul de preparado de membrana con 75 ul de EGF-I125 en presencia y ausencia de un exceso de 200 veces de EGF no marcado de forma que se establezca una competencia. Tras una incubación de dos horas a temperatura ambiente, el EGF libre es separado del complejo EGF-Receptor mediante la adición de un precipitante (gamma-globulina) y centrifugación. El precipitado que contiene el complejo ligado se lleva a un contador de radiación gamma.

El cálculo del contenido de EGF-R se realiza con arreglo a la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ}\text{total de uniones} - N^{\circ}\text{de uniones inespecíficas}}{\text{Contaje total}} \times 1000 = \text{fmol de EGF-R/mg prot tot.}$$

Las muestras se procesaron por duplicado dándose como positivas aquellas que presentaban una diferencia mayor al 90% entre los enlaces totales e inespecíficos.

La sensibilidad del método se determinó utilizando una muestra de placenta diluida en buffer TRIS y manteniendo la concentración de proteína en 2,5 mg/ml con BSA (sero albúmina bovina). La sensibilidad obtenida en nuestro análisis fue de 1.1 fmol/mg de proteínas.

Como "Control" se utilizó una preparación de membranas de placenta humana, con una concentración media de proteína de 228 ± 52.1 fmol/mg de proteína oscilando en un rango de 133 y 402 fmol/mg de proteína.

* Método inmunohistoquímico para la determinación del oncogén p53.

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la identificación de un constituyente de la célula o del tejido *in situ* mediante una reacción inmunológica en la que la molécula a localizar actúa como antígeno en la reacción.

El procedimiento que hemos seguido en este estudio fué el siguiente:

A). PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Se emplearon los tumores incluidos en parafina sobre los que se había realizado el estudio anatomopatológico previo. De cada bloque seleccionado se realizaron cortes de 5 micras de grosor. Inmediatamente antes de iniciar la técnica

fue necesario desparafinarlos e hidratarlos, lo que se realizó de la siguiente forma:

- i) Xilol 15 minutos
- ii) Alcohol 100° 5 minutos
- iii) Alcohol 96° 5 minutos

B) PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

Se realizó mediante el sistema peroxidasa antiperoxidasa (PAP).(REF.- Sternberger, 1970)

1°.- Inhibición de la peroxidasa endógena.

- i) Las preparaciones se incluían en una solución al 0,1% de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) en metanol absoluto, durante treinta minutos.
- ii) Lavado con PBS (Phosphate buffered saline) 0,01 M a pH 7,2 durante 5 minutos.

2°.- Para mejorar la exposición antigénica sometimos el material en una solución de Buffer Citrato 0,01 M, pH 6,0 a dos pases sucesivos de 7 minutos de duración en un microondas a 750 W.

3°.- Anticuerpo primario:

- i) Incubación de los cortes histológicos con el anticuerpo primario durante 16 horas en cámara húmeda a 4°C. Como anticuerpo primario se utilizó

el anticuerpo monoclonal de ratón NCL-p53-D07 (NOVOCASTRA[®]) diluído a 1/50 en TRIS-Albumina.

ii) Como control negativo se empleó suero de ratón normal en PBS con albúmina sérica bovina.

iii) Lavado con PBS, haciendo tres cambios de 5 minutos cada uno.

4º.- Incubación con el anticuerpo puente (inmunoglobulina de cabra antiratón) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Lavado con PBS, de la misma forma que en el paso anterior.

5º.- Complejo pexoxidasa-antiperoxidasa de ratón. Se cubrían las muestras con 50-100 lambdas de este reactivo durante 20 minutos. A continuación se hacían tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

6º.- Sustrato cromógeno. Para visualizar el complejo antígeno-anticuerpo-enzima se utilizó 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB). Se preparaba en el momento de usarla ya que su vida media es corta, disolviendo 5 mg de DAB (Sigma, D-5637[®]) en 10 ml de TRIS 0,2 M. En el momento de revelar se añadian 100 ul de peróxido de hidrógeno al 1%. La reacción de la peroxidasa con el peróxido de hidrógeno convierte a la DAB en un producto insoluble de color pardo-rojizo visible con el microscopio óptico.

i) Se cubría totalmente cada preparación durante 10 minutos con diaminobencidina.

ii) Después se llevaba a cabo el lavado con agua durante 10 minutos.

7º.- Contratación. Se usó hematoxilina

- i) Se incluían en un recipiente con hematoxilina durante 1 minuto.
- ii) Lavado con agua durante 1 minuto.

8º.- Deshidratación y montaje de las preparaciones.

- i). Deshidratación en alcoholes crecientes de 96º y 100º durante 5 minutos en cada uno de ellos.
- ii) Aclarado en xilol.
- iii) Montaje con DPX (Depex Mounting Medium-Prod 36125^R)

C) VALORACION DE LOS RESULTADOS

La tinción inmunohistoquímica se evaluaba por la coloración parduzca observada en el núcleo de las células neoplásicas.

Para realizar una valoración semicuantitativa de los resultados obtenidos se consideraba el porcentaje de células teñidas de la siguiente forma:

- * 0: negativos aquellos casos en los que la presencia de núcleos positivos era inferior al 10%,
- * 1: 10-25% de nucleos teñidos
- * 2: 25-75% de nucleos teñidos
- * 3: >75% de nucleos teñidos

Como controles positivos se utilizaron muestras de positividad conocida, empleando cortes histológicos de un adenocarcinoma de colon.

III. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos en el estudio recibieron tratamiento estadístico mediante el empleo de un ordenador personal COSMO PC compatible.

Diseñamos una base de datos con el programa DBASE III PLUS en la que cada paciente estaba representado por una "ficha" definida por 33 campos, los cuales significaban cada uno de los datos recogidos en cada individuo, asimilados a 33 variables estadísticas de carácter tanto cuantitativo como cualitativo.

Los diferentes parámetros fueron estudiados con el paquete estadístico SPSS y PRESTA.

Previo al análisis estadístico se estudió la bondad de ajuste de cada variable a una distribución normal, con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se emplearon test no paramétricos en aquellas variables que no se ajustaban a una distribución normal.

El análisis estadístico de nuestros resultados ha comprendido dos partes: una primera *descriptiva* y la segunda *comparativa*.

1.- Estadística descriptiva.

En cada variable cuantitativa se determinaron las clásicas medidas de centralización y dispersión: media aritmética, mediana, rango y desviación típica.

Para las variables cualitativas se han obtenido las frecuencias absolutas y relativas porcentuales.

2.- Estadística comparativa.

Se analizaron las diferencias entre los parámetros clínicos y oncoproteínas de los pacientes clasificados por estadios y por las características microscópicas del tumor.

Se aplicaron los siguientes test estadísticos:

*** Prueba de Chi-Cuadrado o prueba exacta de Fisher:** para el estudio de relación o asociación entre variables cualitativas.

*** Prueba de Man-Whitney :** para detectar diferencias significativas entre variables cuantitativas cuando éstas no se ajustaban a una distribución normal.

*** Curva de Kaplan-Meier:** para estudiar la probabilidad de supervivencia así como la probabilidad de mantenerse libre de enfermedad. Las diferencias en ambos parámetros en base a distintas variables fue determinada con el test de Log-Rank⁽¹⁸³⁾.

*** Análisis multivariante: Regresión múltiple de Cox.** En la investigación clínica a menudo nos interesa conocer si un determinado suceso (variable respuesta), como es la aparición de recidiva y/o metástasis o el fallecimiento tras la intervención quirúrgica por una neoplasia determinada, ocurrirá o no y los factores (variables explicativas) que potencialmente pueden influir en la aparición del suceso. El análisis de cada factor por métodos univariantes nos ofrece una idea previa de la importancia que presenta la variable de forma aislada. Para conocer su importancia relativa teniendo en cuenta la posible interrelación con otras variables es preciso examinarlas de un modo simultáneo mediante un

análisis multivariante, el método de regresión de Cox es el más adecuado para conocer la interrelación e importancia relativa de diferentes factores relacionados con el tiempo de supervivencia o de recidiva tumoral. Se trata de un método no paramétrico de regresión que tiene en cuenta el diferente periodo de seguimiento de los distintos enfermos. La regresión de Cox establece un modelo predictivo que permite calcular la probabilidad individual de fallecimiento o recidiva, que estará en función del tiempo libre de enfermedad o supervivencia y del valor que toman las variables explicativas seleccionadas en ese paciente. En esa función se incluyen solo aquellas variables que influyen de forma significativa en que el suceso ocurra o no.

RESULTADOS

1.- DATOS EPIDEMIOLOGICOS

1.1.-SEXO

La proporción hombres/mujeres en el grupo de pacientes con cáncer vesical fue de 54/11. Los hombres representaban el 83,08% del total de la muestra y las mujeres un 16,92%. El grupo control fué constituido exclusivamente por varones, ya que como se indicó anteriormente se empleó como tejido vesical sano el recogido en pacientes portadores de una hiperplasia prostática benigna sometidos a una adenomectomía suprapúbica tipo Freyer. (FIG. 9).

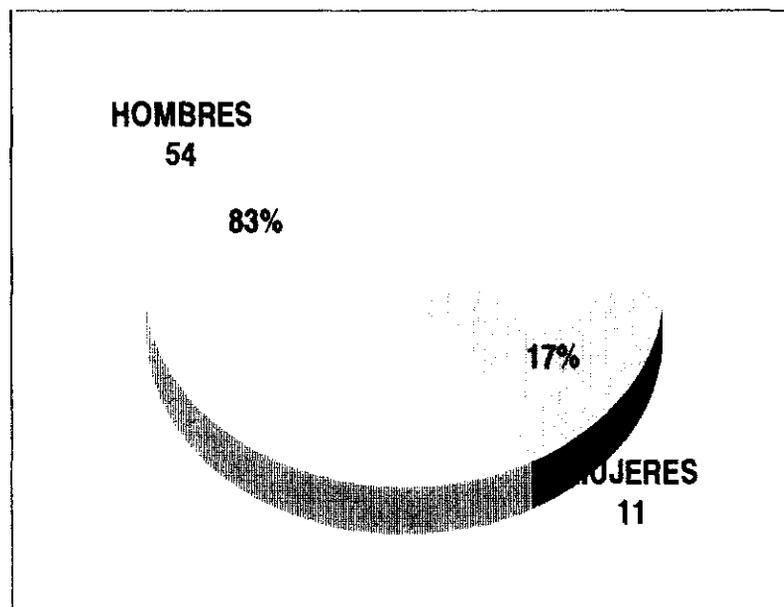


FIG. 9: Distribución de los pacientes con cáncer vesical según el sexo.

1.2.-EDAD

La edad media de los pacientes portadores de tumor vesical fue de 69.09 ± 11.20 años, con un rango que oscilaba entre 23 y 93 años. En el grupo control la edad media fue de 69.7 ± 6.9 años variando en un rango comprendido entre 61 y 90 años.(FIG. 10).

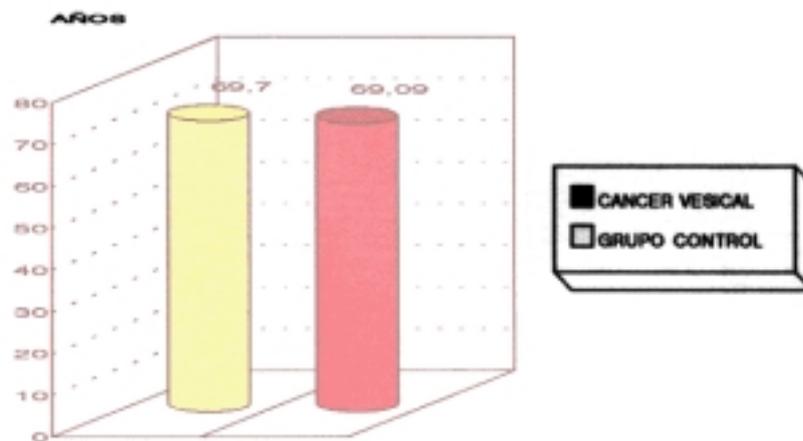


FIG. 10: Edad media de los pacientes estudiados

2.- CARACTERISTICAS DE LOS TUMORES

2.1.-Tipo histológico

Los sesenta y cinco tumores estudiados fueron carcinomas uroteliales de células transicionales.

2.2.- Uni-multifocalidad

En relación con el número de tumores que presentaron los pacientes en el momento del estudio, se observó que el 55.38% (n=36) de los pacientes tenían un tumor único frente al 41.54% (n=27) de los casos que presentaban formas múltiples. En dos casos no estaba recogido este dato en la historia clínica. (FIG. 11).

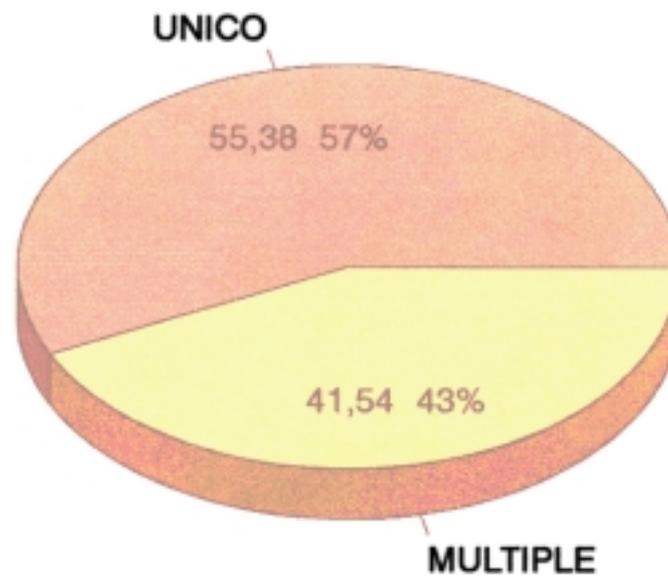


FIG. 11: Distribución de los tumores atendiendo a la uni/multifocalidad tumoral.

2.3.- Aspecto

La distribución de los tumores respecto a esta variable demostró que los tumores más frecuentes fueron los de aspecto papilar 52,31% (n=34) mientras que los tumores de tipo sólido sólo representaban un 16,92% (n=11) del total y tan sólo un caso 2,17% fue descrito como de tipo mixto.(FIG. 12).

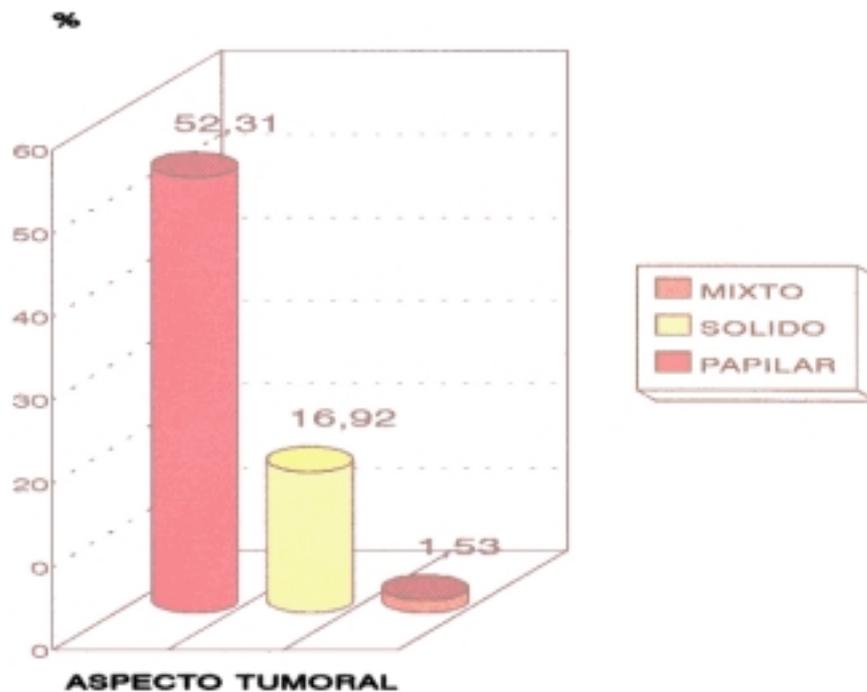


FIG. 12: Distribución de los tumores según el aspecto tumoral

Resultados

Se comprobó que los tumores de aspecto sólido se asociaban preferentemente con tumores únicos (81,8% n=9), en cambio los de tipo papilar se presentaban con mayor frecuencia con formas múltiples (55,88% n=19), no obstante no era tan llamativa la diferencia como en el caso de los tumores sólidos. (FIG.13).

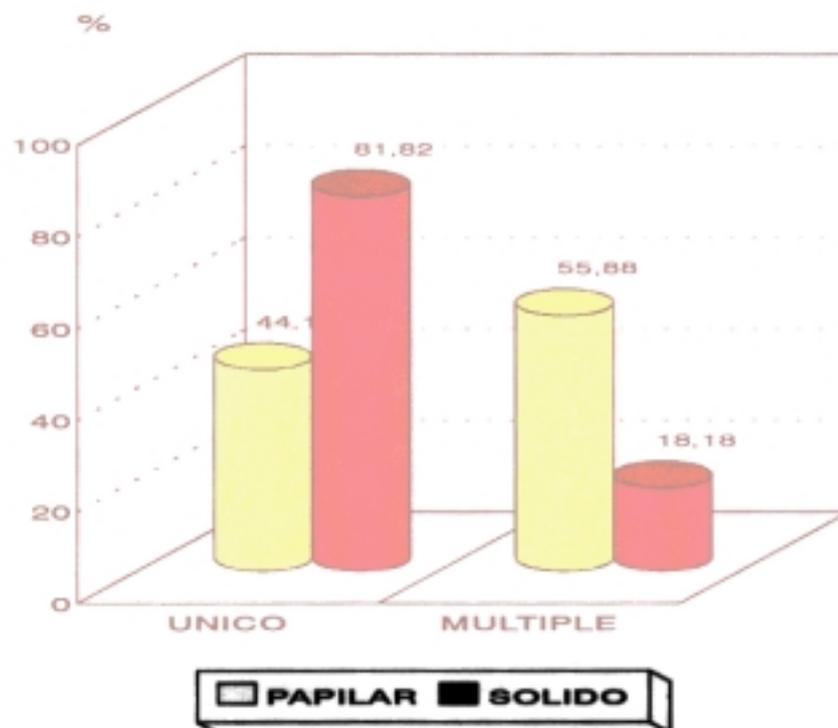


FIG.13: Asociación del aspecto y uni-multifocalidad de los tumores

2.4.- Localización

Destaca que 30 de los tumores se localizaron preferentemente en pared lateral izquierda, siguiendo en frecuencia el fondo vesical y la pared lateral derecha. Siendo estas tres localizaciones las más frecuentes, en la fig.14 se puede ver la distribución de los tumores en las distintas zonas vesicales.

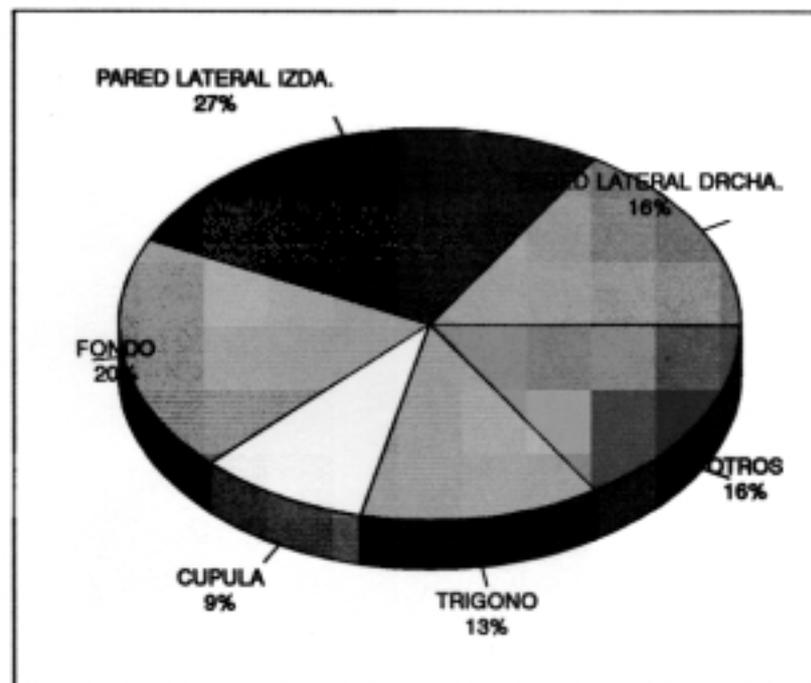


FIG.14: Distribución de los tumores según su localización

3.- CARACTERISTICAS ANATOMOPATOLOGICAS DE LOS TUMORES.

3.1.- Estadio Tumoral

Los tumores fueron clasificados siguiendo la clasificación de Jewett-Marshall, agrupándose la mayor parte dentro del estadio A, 75.38%(n=49) del total y repartiéndose en los otros estadios de la siguiente manera:n=11, 16.92% correspondían al estadio B, 4.62%(n=3) al estadio C y 3.08%(n=2) al estadio D. Estos datos coinciden con las estadísticas aportadas por otros autores, apreciando en nuestra serie que son los tumores superficiales los más frecuentes 75.38%(n=49) frente a un 24.62%(n=16) que tenían carácter infiltrante. (FIG. 15).

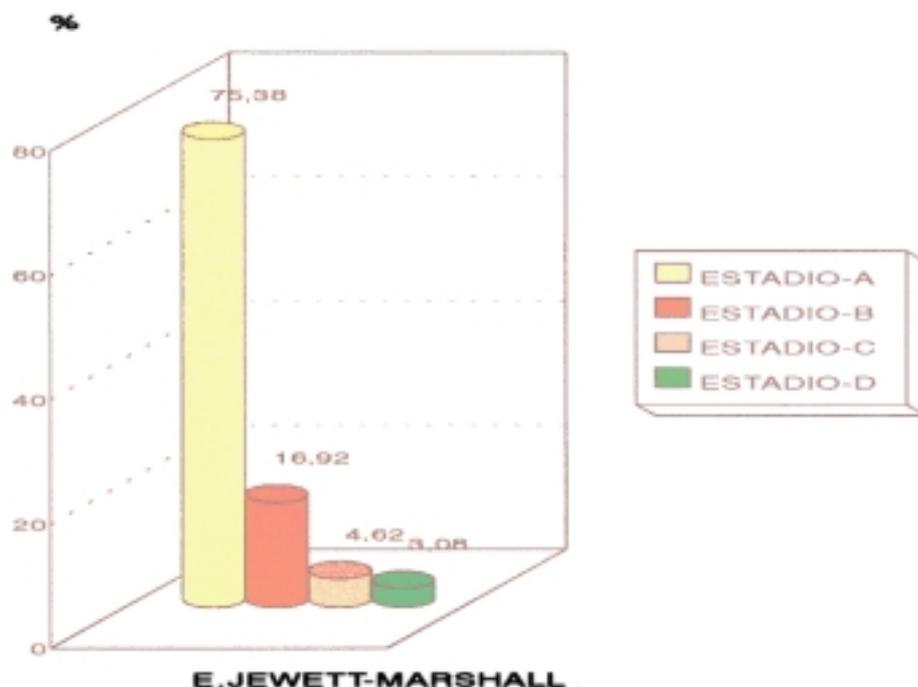


FIG. 15: Distribución de los tumores en relación al estadio de Jewett-Marshall

3.2.-Grado de Diferenciación de Broders

Con relación al grado de diferenciación, se analizó la muestra de acuerdo con la clasificación de Broders, distribuyéndose los tumores en cuatro grupos. Los tumores moderadamente diferenciados (Grado II) fueron los que predominaron, representando un 44.62%(n=29) del total de la muestra, le siguen en frecuencia los pobremente diferenciados 26.15%(n=17), los tumores bien diferenciados representan un 16.92%(n=11) y 8 tumores fueron clasificados como tumores anaplásicos (12.31%).(FIG. 16).

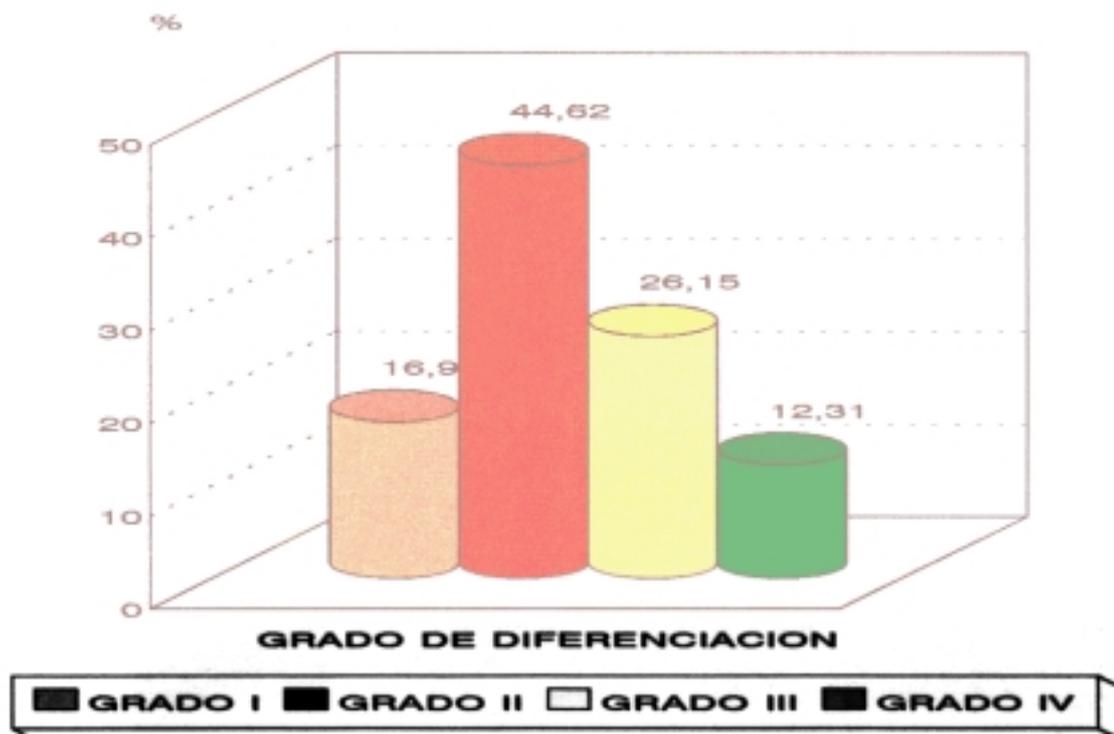


FIG. 16: Distribución de los tumores según el grado de diferenciación de Broders

4.- DETERMINACION DE ONCOGENES EN TEJIDO VESICAL

4.1.-RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF-R)

a) Grupo Control.

El tejido urotelial sano presentó un valor medio de 2.54 fmol/mg de proteína con una DS=1.63

b) Grupo con carcinoma vesical

La concentración media de EGF-R en los pacientes con carcinoma vesical fue de 14.54 fmol/mg de proteína con una DS=14.71.

Entre ambos grupos existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

	MEDIA	DS	MEDIANA	RANGO	P
T.VESICAL	14.54	14.71	9	0.2-64.8	*
CONTROL	2.54	1.63	2.5	0.1-6.2	

* $p < 0.001$

TABLA IV : Concentración de EGF-R en los grupos control y cáncer vesical.

La FIGURA 17 nos muestra la distribución de EGF-R según el grupo de estudio.

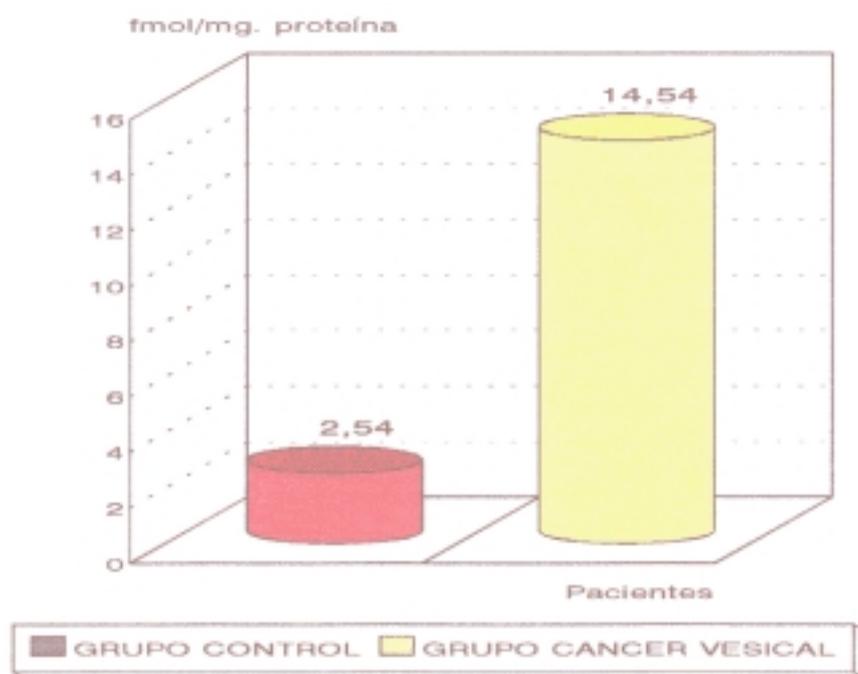


FIG. 17: *Concentración media de EGF-R en el grupo Control y Tumor Vesical*

4.2.- ONCOPROTEINA p185(NEU)

a) Grupo control.

En el grupo control el valor medio fue de 122.08 ± 84.20 HNU/mg de proteína.

b) Grupo con cáncer vesical.

El valor medio de NEU en el grupo de los pacientes con cáncer fue 921.25 ± 644.07 HNU/mg de proteína.

	MEDIA	DS	MEDIANA	RANGO	p
CONTROL	122.08	84.20	98.5	38.5-399.2	*
T. VESICAL	921.25	644.07	816.6	53,8-3804	

* P < 0,001

TABLA V: *Concentración de p185 (Neu) en los grupos de estudio.*

Si analizamos la FIGURA 18 se puede ver que ambos grupos presentan distribuciones para esta variable muy diferentes.

Las concentraciones fueron significativamente inferiores en las muestras control que en las muestras carcinomatosas ($p < 0.001$).

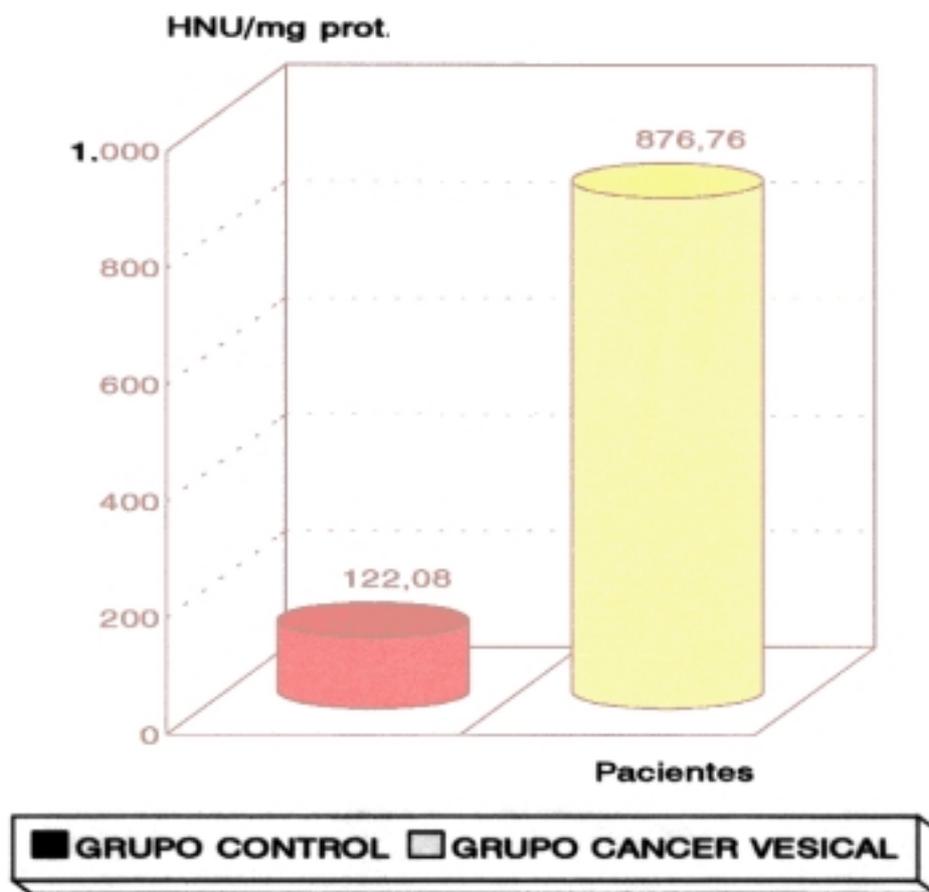


FIG. 18: *Concentración media de p185(NEU)) en el grupo Control y Tumor vesical*

4.3.- ONCOGEN P53

Para el análisis estadístico de la expresión de p53 en los dos grupos estudiados recurrimos a tablas de contingencia puesto que se trata de una variable cualitativa.

a) Grupo control

Ninguno de los casos utilizados como control resultó positivo.

b) Grupo cáncer vesical

El oncogen p53 fue positivo en un 50.8 % (n=33) de los casos. La FIGURA 17 refleja los porcentajes obtenidos para cada una de las valoraciones que se hicieron al analizar dicho oncogén.

La tabla que aparece a continuación nos distribuye los individuos según su nivel de p53 y el diagnóstico.

	0 (N)	1(N)	2(N)	3(N)
T.VESICAL	(32) 49.2%	(10) 15.4%	(16) 24.6%	(7) 10.8%
CONTROL	(20) 100%	(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%

N= número de casos

TABLA VI: p53 en los grupos control y cáncer vesical.

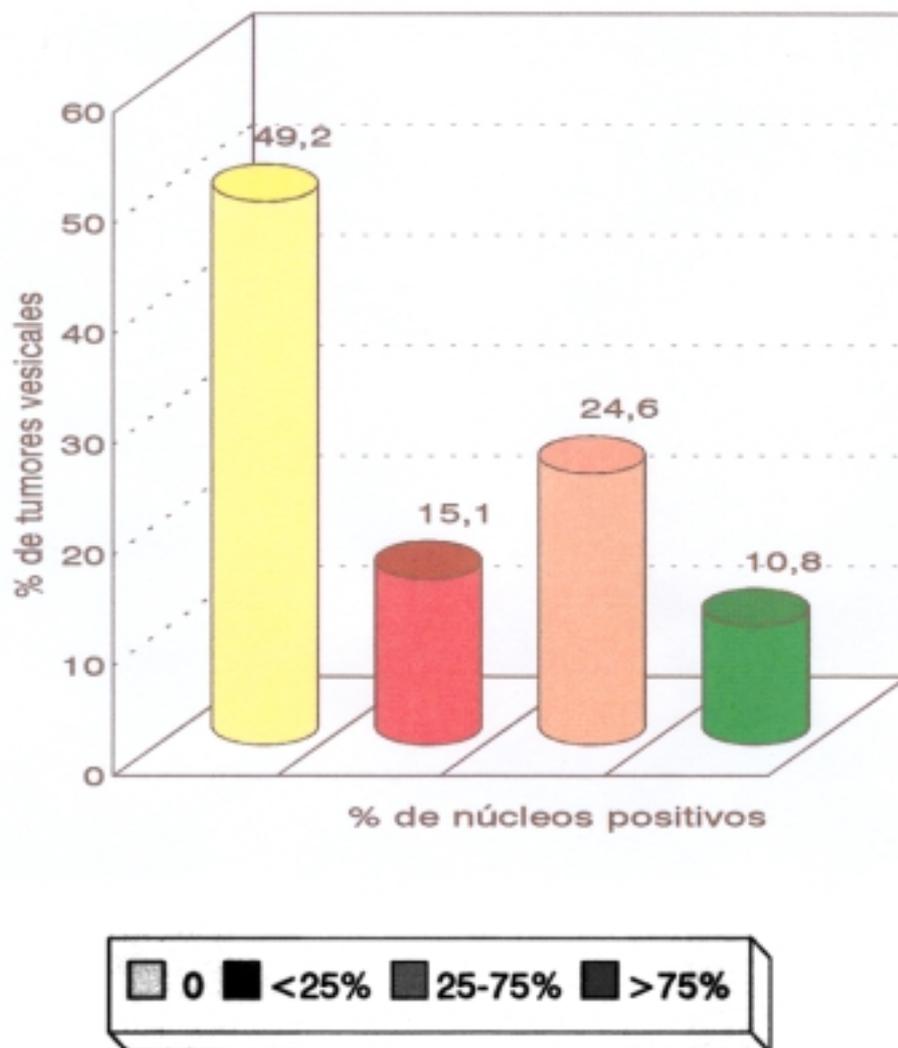


FIG. 19: Expresión de p53 en carcinomas vesicales

5.- RELACION DE LOS ONCOGENES CON LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS TUMORES

5.1.- ONCOGENES Y ASPECTO TUMORAL

El aspecto papilar se asoció con concentraciones más bajas de EGF-R, 13.41 fmol/mg de proteína frente a 21.38 fmol/mg de proteína que presentaron los de aspecto sólido. No obstante no detectamos diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

	Nº CASOS	MEDIA	DS	RANGO	P
PAPILAR	26	13.41	11.63	0.2-42	*
SOLIDO	8	21.38	21.69	0.5-64.8	

* No significativo

TABLA VII: *Concentración de EGF-R (fmol/mg de prot) en relación con el aspecto tumoral.*

En relación con la oncoproteína p185(NEU) son los tumores papilares los que presentaron concentraciones superiores 1038.85 ± 684.52 HNU/mg de proteína, en los de tipo sólido el valor medio de la misma fue de 848 ± 524.19 HNU/mg de proteína. En este caso tampoco existía diferencia estadística significativa.

Resultados

	N°CASOS	MEDIA	DS	RANGO	P
PAPILAR	34	1038.8	684.5	53.8-3804	*
SOLIDO	11	848.70	524.19	253.7-2125.8	

* No significativo

TABLA VIII: *Concentración de NEU(HNU/mg de prot.) en relación con el aspecto tumoral.*

Con respecto al p53 los tumores papilares fueron negativos en un 58.82%(n=20) frente a un 27.27%(n=3) de los tumores sólidos. Cabe destacar que un 36.36% de los tumores sólidos presentaron una tinción fuertemente positiva, con más del 75% de núcleos teñidos y sólo se encontró un 2.94% de tumores papilares con ese porcentaje.

	0	1	2	3
PAPILAR	20 58.82%	5 14.71%	8 23.53%	1 2.94%
SOLIDO	3 27.27%	1 9.09%	3 27.2%	4 36.3%

TABLA IX: *Expresión de p53 en relación con el aspecto tumoral*

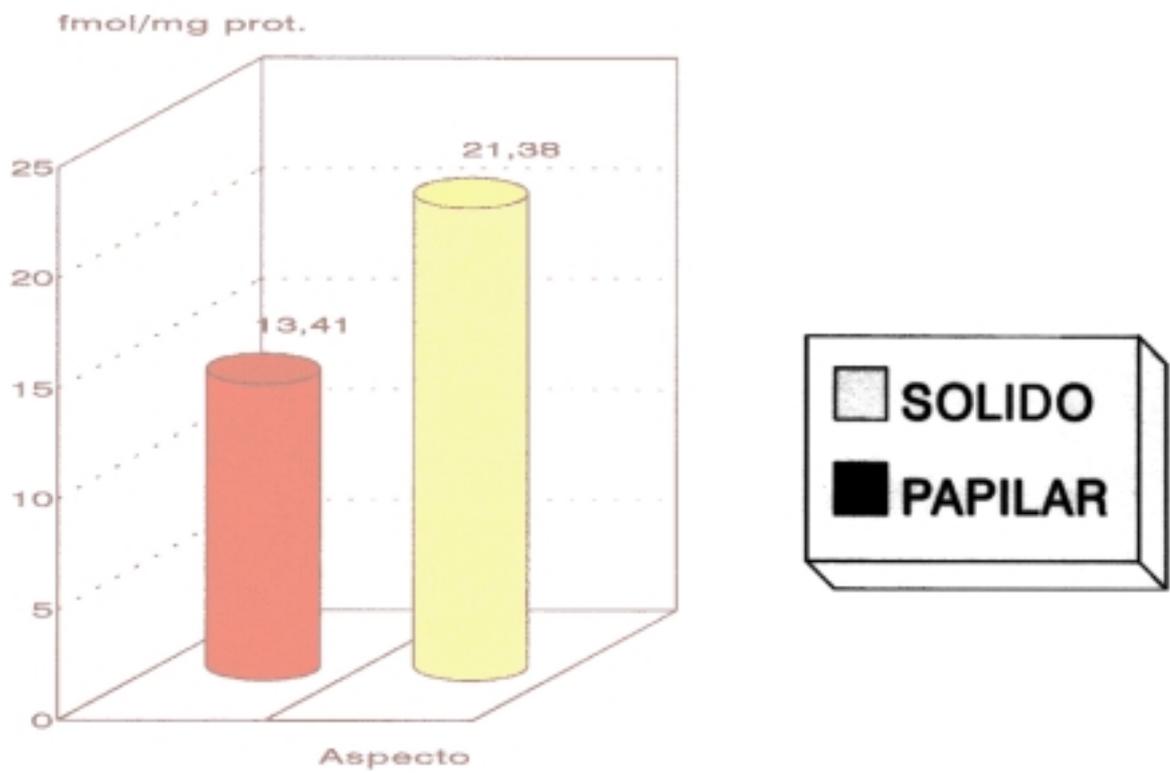


FIG. 20: Concentración media de EGF-R en relación con el aspecto tumoral

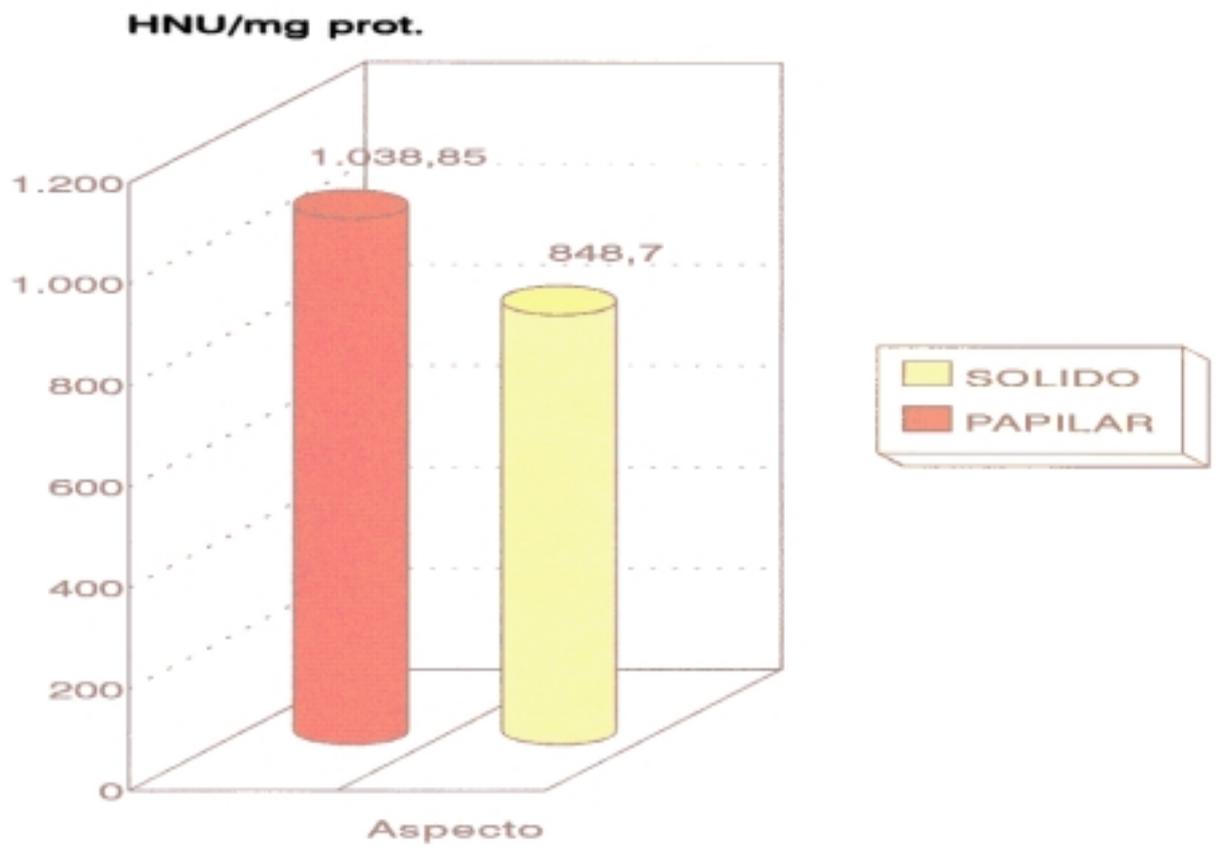


FIG. 21: Concentración media de p185(neu) en relación al aspecto tumoral

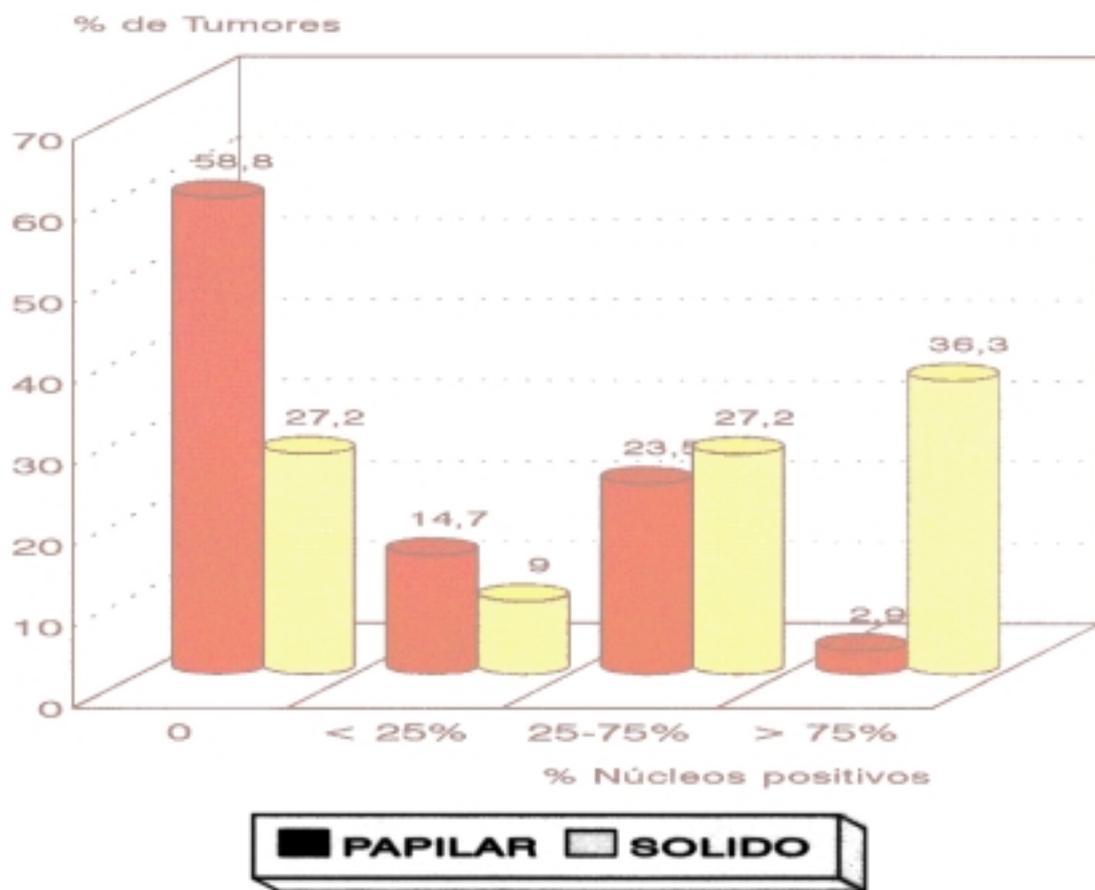


FIG. 22: Expresión de p53 en relación con el aspecto tumoral

5.2.-ONCOGENES Y UNI/MULTIFOCALIDAD TUMORAL

Los tumores únicos fueron más frecuentes que los múltiples, siendo estos últimos los que tenían concentraciones más elevadas EGF-R, 13.30 y 16.22 fmol/mg de proteína respectivamente. (FIG. 23).

	N	MEDIA	DS	RANGO	P
UNICO	27	13.30	16.42	0.2-64.8	*
MULTIPLE	20	16.22	12.26	0.5-42	

* No significativo

TABLA X: *Concentración de EGF-R(fmol/mg de prot) en relación a la característica de uni/multifocalidad tumoral.*

Resultados

Con respecto al NEU los tumores únicos tenían unos niveles de 850.52 HNU/mg de proteína mientras que los tumores múltiples alcanzaron una concentración media de 1046.10 HNU/mg de proteína. (FIG. 24)

	MEDIA	DS	RANGO	N	P
UNICO	850.5	661.0	76-3804	36	*
MULTIPLE	1046.1	629.8	53.8-2776.7	27	

* No significativo

TABLA XI: *Concentración de NEU (HNU/mg. prot.) en relación a la característica de uni/multifocalidad tumoral.*

Resultados

Los tumores múltiples fueron positivos para la oncoproteína p53 en un 63.90% (n=23), en cambio los tumores únicos presentaron positividad en un 36.1% (n=13) de los casos. (FIG. 25).

	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
UNICO	13 36.11%	6 16.67%	11 30.56%	6 16.67%
MULTIPLE	17 62.96%	4 14.81%	5 18.52%	1 3.70%

TABLA XII: *Expresión de P53 en relación a la característica de uni/multifocalidad tumoral.*

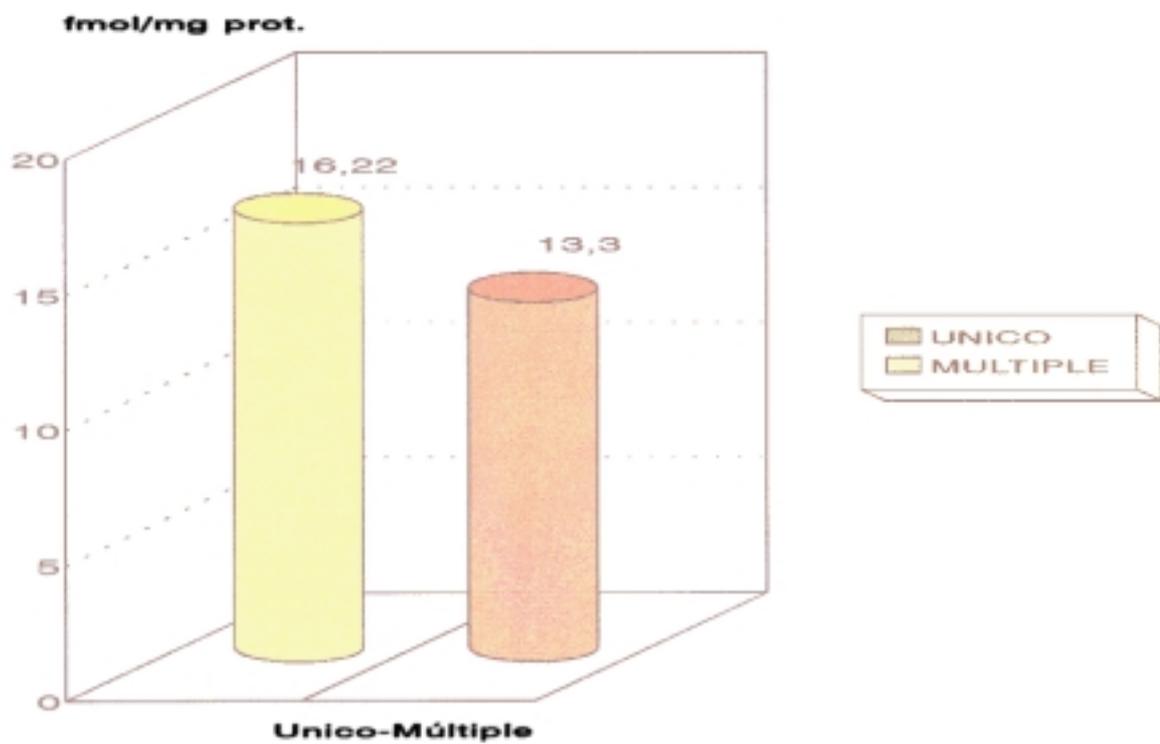


FIG. 23: *Concentración media de EGF-R en relación con la característica uni/multifocalidad tumoral.*

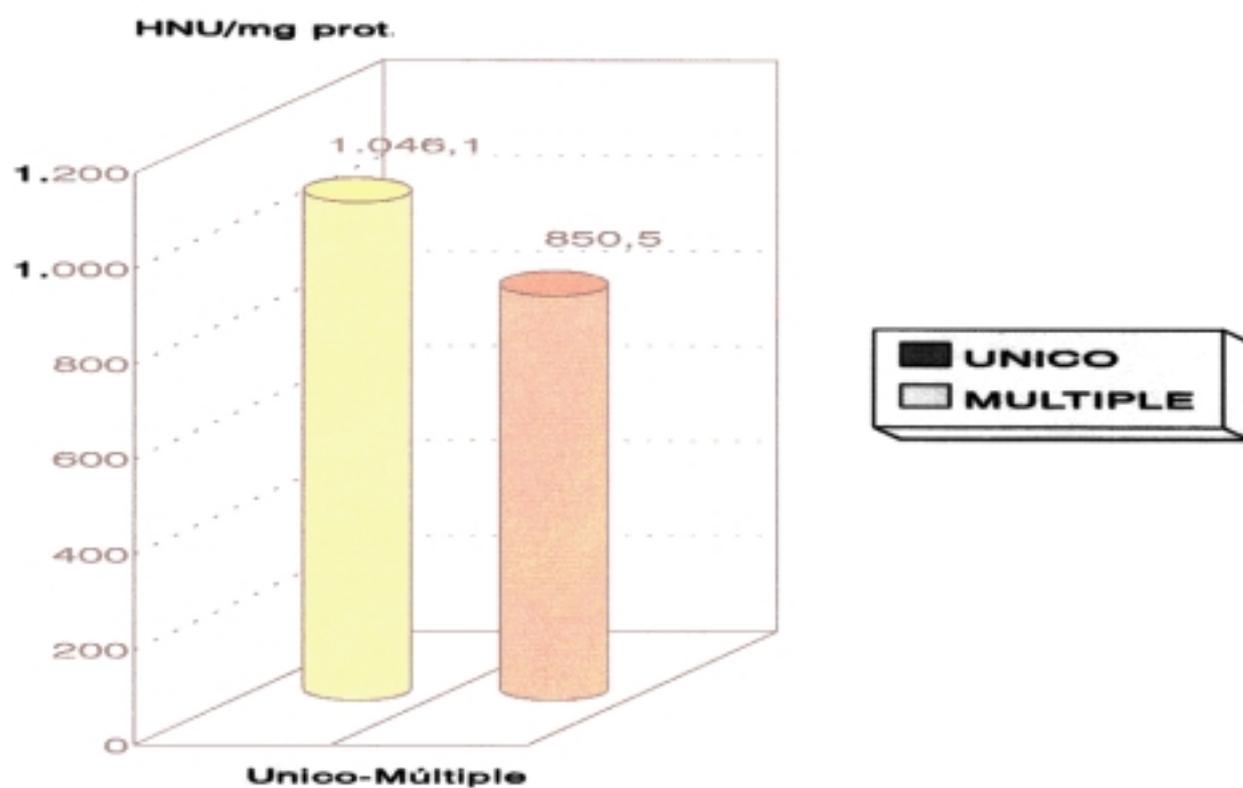


FIG. 24: *Concentración media de p185(neu) en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral.*

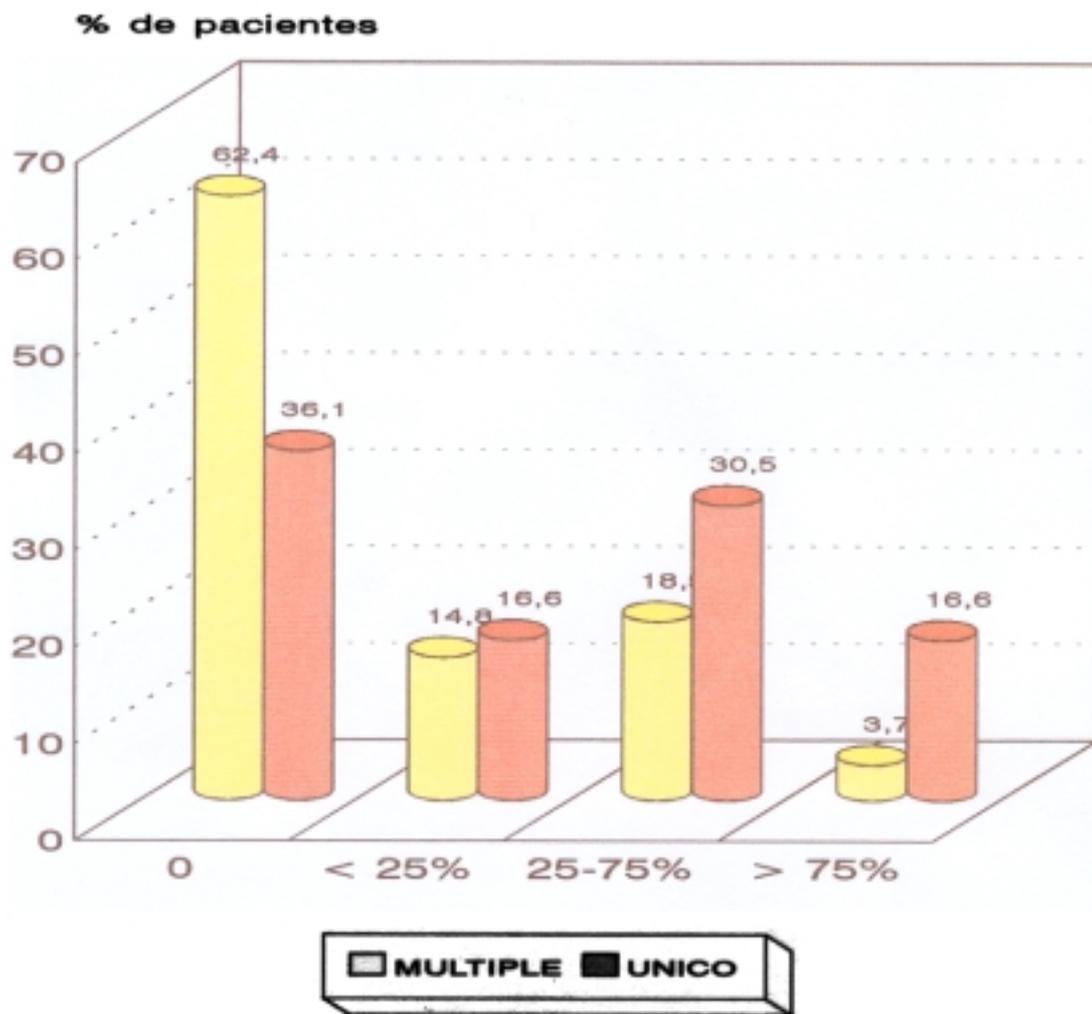


FIG. 25: *Expresión de p53 en relación con la característica de uni/multifocalidad tumoral.*

6.- RELACION DE LOS ONCOGENES CON LAS CARACTERISTICAS ANATOMOPATOLOGICAS DEL TUMOR.

6.1.- ONCOGENES/ESTADIO DE JEWETT-MARSHALL

La clasificación de los pacientes con cáncer según el estadio de Jewett reflejó que en el caso del EGF-R los tumores pertenecientes al grupo D tenían concentraciones significativamente superiores a las que presentaban los casos agrupados en el estadio A. En los tumores superficiales la concentración media del receptor de EGF fue de 10.49 fmol/mg de proteína frente a los tumores infiltrantes en los que el nivel medio fue de 25.13 fmol/mg de proteína. Existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos $p < 0.05$. (FIG. 26).

ESTADIO	NºCASOS	MEDIA	DS	RANGO
A	34	10.49	10.13	0.2-42
B	9	24.12	15.97	2.3-47.6
C	2	20.55	14.75	5.8-35.3
D	2	34.3	30.5	3.8-64.8

TABLA XIII: *Concentración de EGF-R (fmol/mg prot) en relación con el estadio de Jewett-Marshall.*

Resultados

Con respecto a la proteína p185 las concentraciones más elevadas se dieron en los tumores que pertenecían al estadio B. Al agrupar los tumores en dos grupos: superficiales e infiltrantes se observó que eran los tumores infiltrantes los que alcanzaron niveles superiores de p185. Los tumores superficiales presentaron una concentración media de 924.86 HNU/mg proteína, en los tumores infiltrantes los niveles medios para dicha proteína fueron de 910. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.(FIG. 27)

ESTADIO	Nº CASOS	MEDIA	DS	RANGO
A	45	924.86	562.6	76-2776.7
B	10	1077.1	960.3	253.7-3804
C	3	349.5	429.3	53.8-355.5
D	2	832.7	705.3	334-433.1

TABLA XIV: *Concentración de p185 (HNU/mg prot) en relación con el estadio de Jewett-Marshall.*

Al analizar el comportamiento del p53 respecto al estadio tumoral llama la atención la asociación de este oncogén con el carácter infiltrante del tumor. Ninguno de los tumores del estadio A presentó una tinción fuertemente positiva siendo un 58% de los tumores clasificados en este estadio negativos para ese oncogén. En cambio, en los tumores infiltrantes un 80% de los mismos fueron clasificados como moderadamente o fuertemente positivos. (FIG. 28).

ESTADIO	0	1	2	3
A	58%	20%	22%	0%
B	20%	0%	50%	30%
C	0%	0%	0%	100%
D	50%	0%	0%	50%

TABLA XV: *Expresión de p53 en relación con el estadio de Jewett-Marshall.*

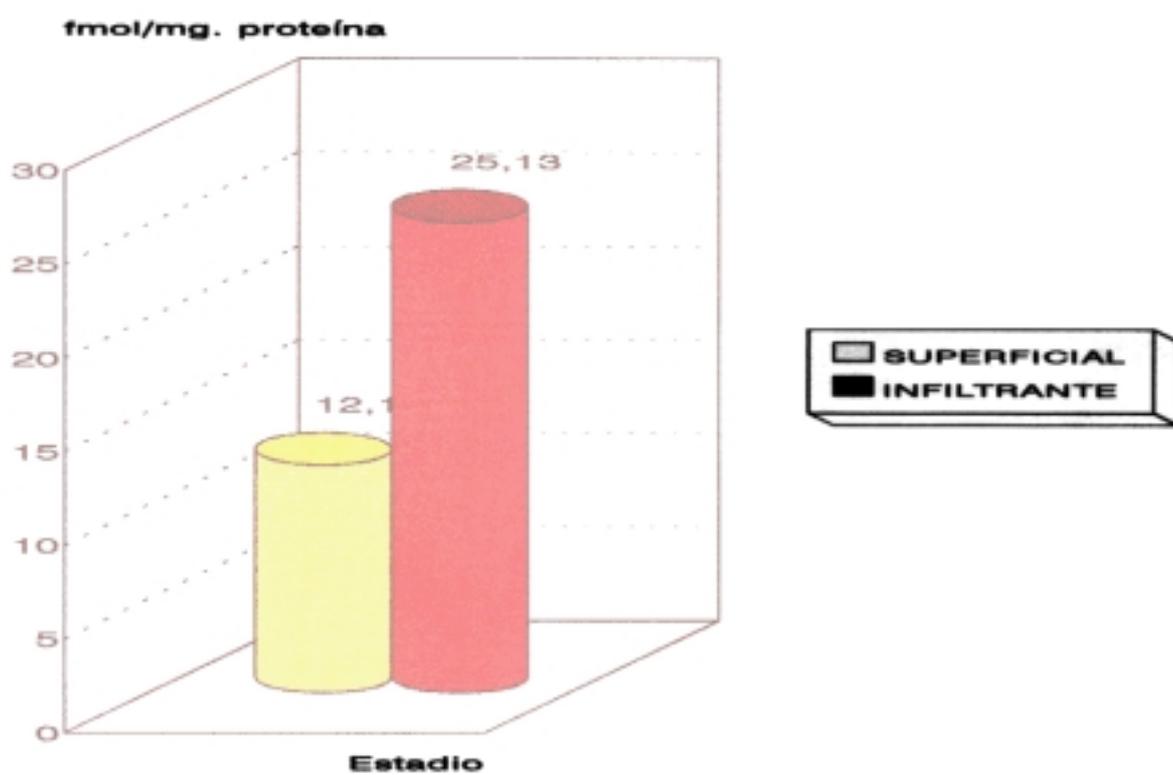


FIG. 26: Concentración media de EGF-R según el grado de infiltración tumoral.

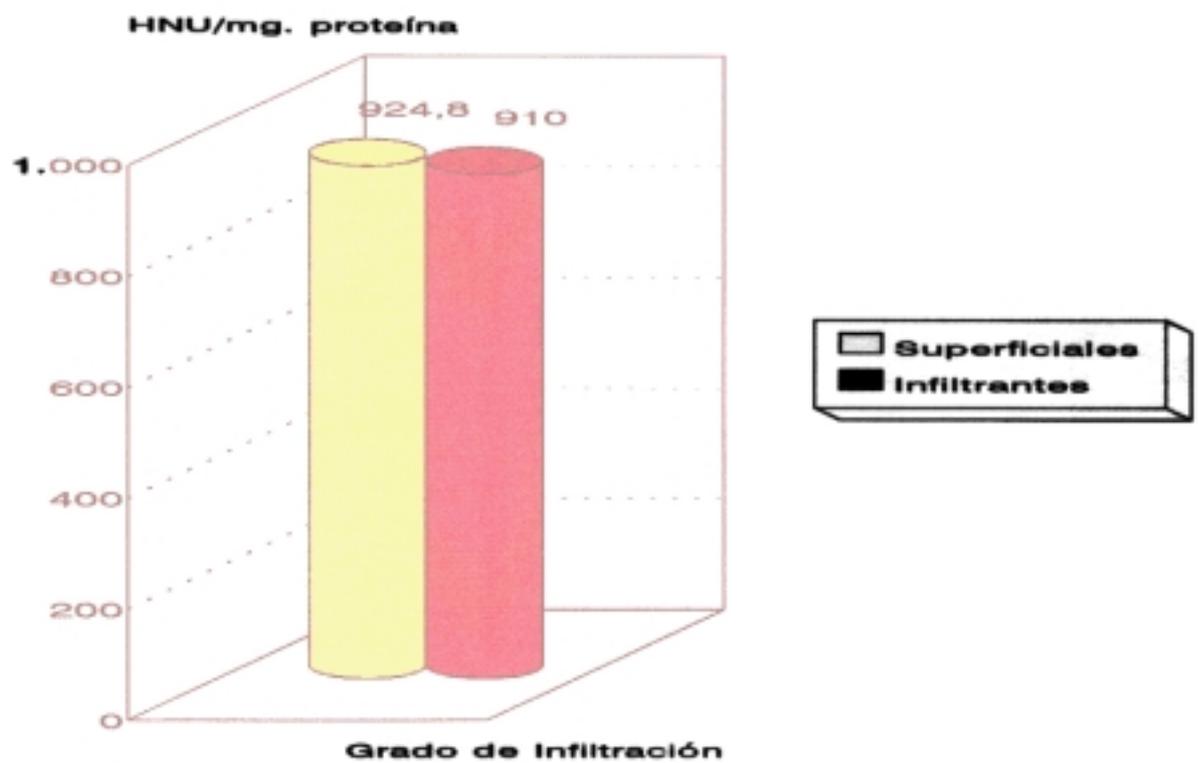


FIG. 27: Concentración media de p185(NEU) en relación con el grado de Infiltración Tumoral.

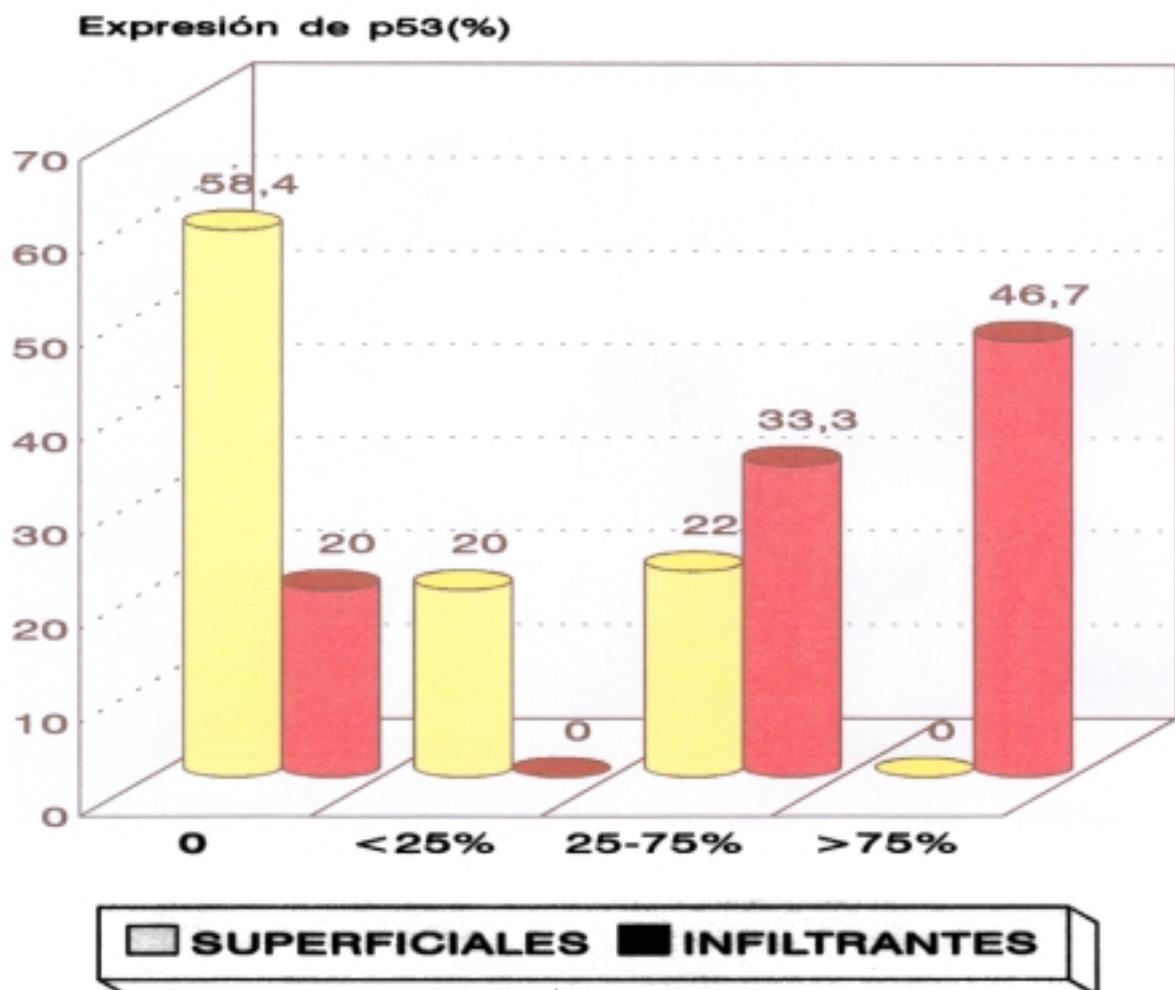


FIG. 28: Expresión de p53 en relación al grado de infiltración tumoral.

6.2.- ONCOGENES Y GRADO DE DIFERENCIACION

Las concentraciones de EGF-R más elevadas se encontraron en los tumores más indiferenciados: 6.73, 14.48 y 17.07 fmol/mg de proteína para los tumores bien diferenciados, moderadamente y poco diferenciados respectivamente. Existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los tumores bien diferenciados con los tumores moderadamente diferenciados ($p < 0.05$), y al comparar los tumores bien diferenciados con los pobremente diferenciados o anaplásicos.(FIG. 29).

	Nº	MEDIA	DS	RANGO
BIEN DIFERENCIADO	6	6.73	4.05	0.2-10.2
MODERADA DIFERENCIACION	22	14.48	15.55	1.3-64.8
POCO DIFERENCIACION	19	17.07	15.48	0.5-47.6
ANAPLASICO	6	13.05	14.1	2.3-47.6

TABLA XVI : *Concentración de EGF-R (fmol/mg de prot.) en relación con el grado de diferenciación de Broders.*

En relación con el NEU no se observan diferencias significativas con respecto al grado de diferenciación. Son los tumores moderadamente diferenciados los que presentan concentraciones discretamente superiores a las de los tumores bien diferenciados o a las de los pobremente diferenciados. Los resultados obtenidos fueron 892.81, 971.76, 817.72 HNU/mg proteína para los tumores bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados respectivamente. (FIG. 30).

	N	MEDIA	DS	RANGO	P
BIEN DIFERENCIADO	11	892.8	521.3	181.4-1922.2	*
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	29	971.7	569.0	161-2776.7	
POBREMENTE DIFERENCIADO	25	817.7	780.7	53.8-3804	

* No significativo

TABLA XVII: *Concentración de NEU(HNU/mg de prot) en relación con el grado de diferenciación de Broders.*

Resultados

El oncogen p53 presentó un comportamiento similar al EGF-R. Los tumores bien diferenciados fueron en un 72.73% de los casos negativos para dicho oncogen y el 27.37% restante presentó una tinción debilmente positiva. En cambio, los tumores pobremente diferenciados tuvieron una tinción moderadamente o fuertemente positiva en un 64% de los casos siendo negativos tan sólo en un 28% de los mismos.(FIG. 31).

	0 N y (%)	1 N y (%)	2 N y (%)	3 N y (%)	P
BIEN DIFERENCIADO	8 (72.7%)	3 (27.3%)	0 (0%)	0 (0%)	*
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	17 (58.7%)	5 (17.2%)	7 (24.1%)	0 (0%)	
POBREMENTE DIFERENCIADO	7 (28%)	2 (8%)	9 (36%)	7 (28%)	

* No significativo

TABLA XVIII: *Expresión de p53 en relación con el grado de diferenciación de Broders.*

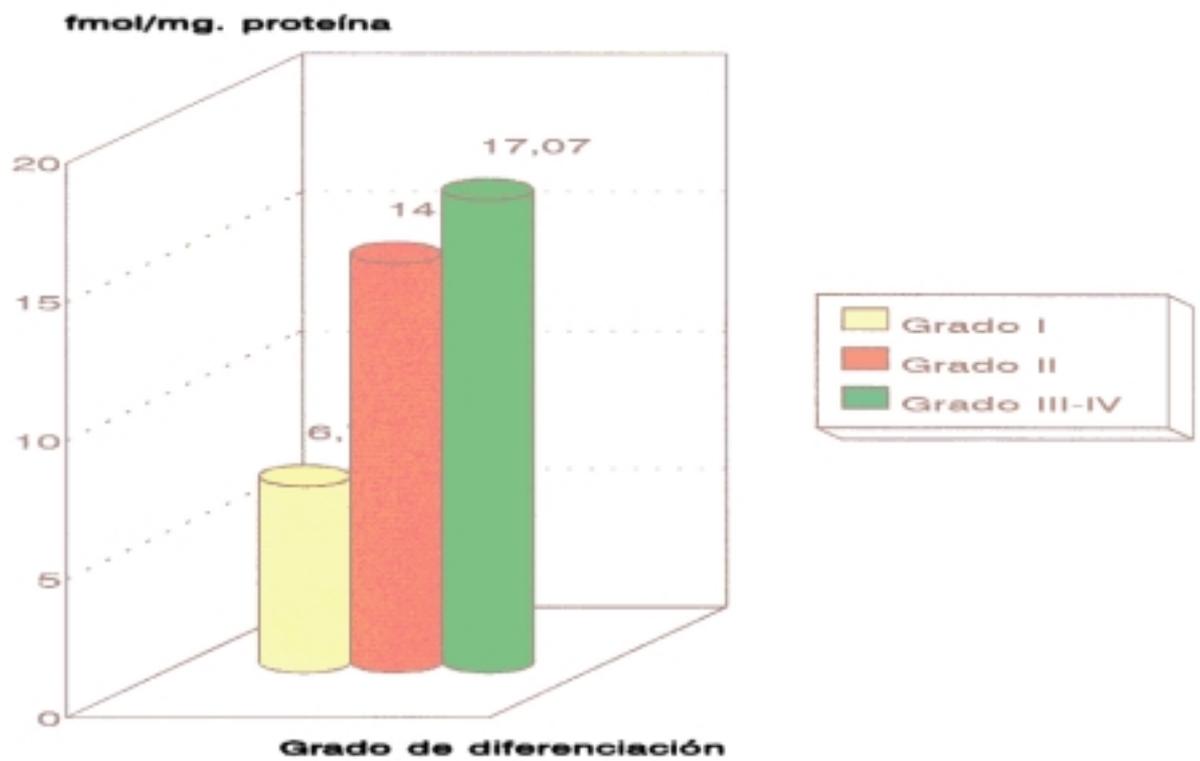


FIG. 29: Concentración media de EGF-R en relación con el grado de diferenciación de Broders.

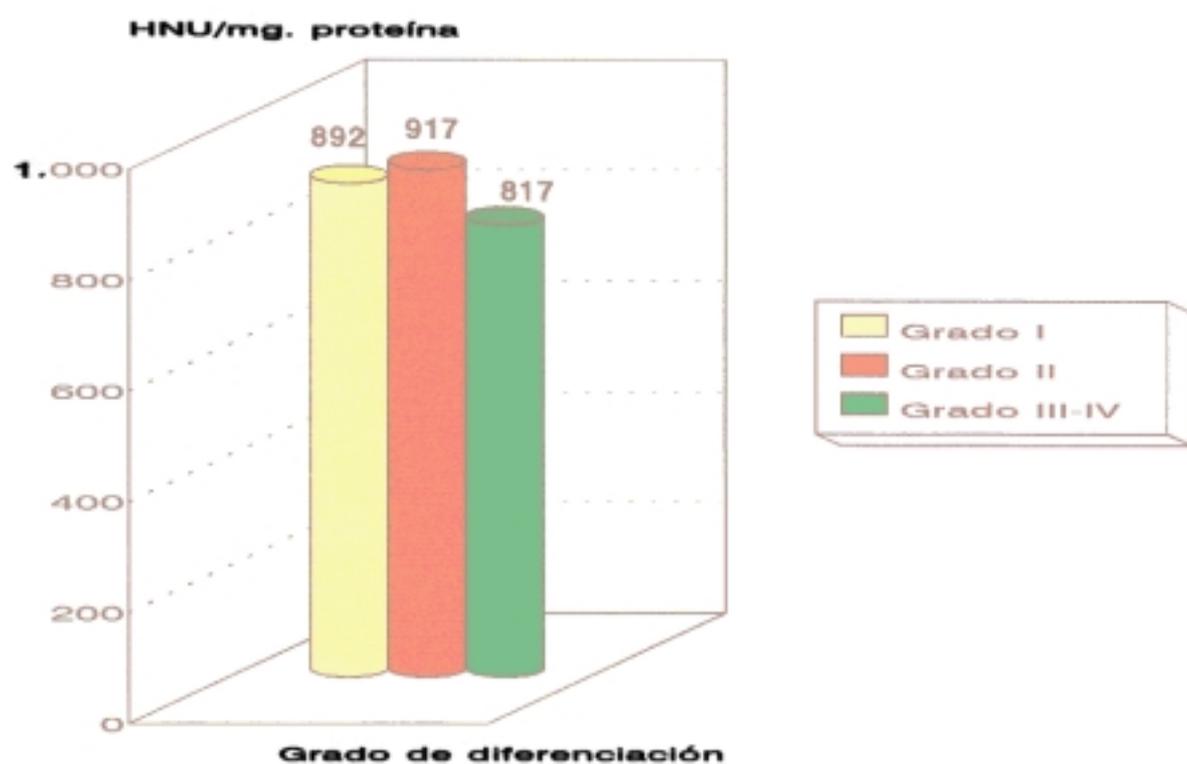


FIG. 30: *Concentración media de P185(NEU) en relación con el grado de diferenciación de Broders.*

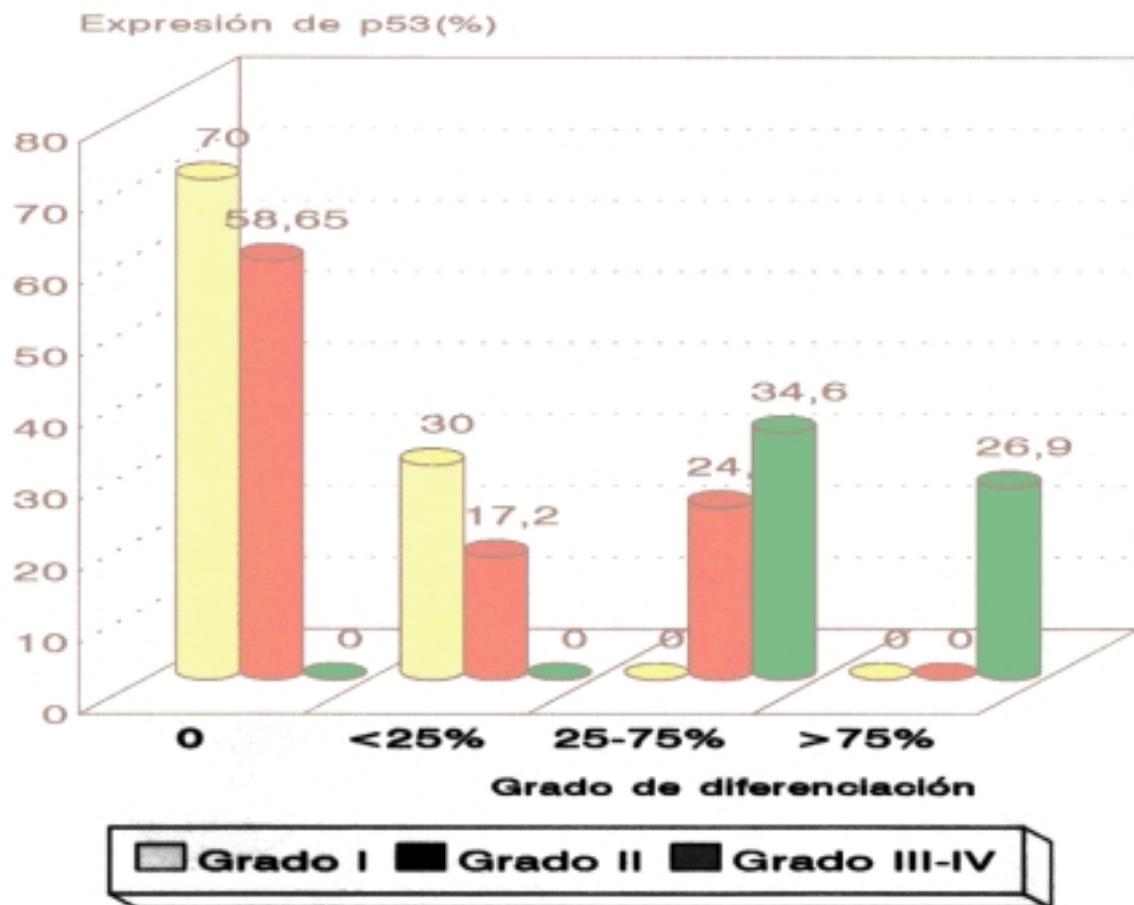


FIG. 31: Expresión de p53 en relación con el grado de diferenciación de Broders.

7.-EVOLUCION POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES AFECTOS POR CANCER. INFLUENCIA DE LOS DATOS ANALIZADOS EN EL DIAGNOSTICO: SUPERVIVENCIA Y RECURRENCIA.

Se realizó un seguimiento de los pacientes durante un período medio de 15.9 ± 6 meses.

La mortalidad fue de 27.7% (n=18). De los pacientes fallecidos, tres fueron excluidos del estudio de supervivencia. Uno de ellos por la coexistencia de carcinoma vesical y carcinoma de mama con metástasis oseas, y otros dos por la coexistencia de carcinoma vesical junto con un adenocarcinoma de próstata.

La supervivencia en los carcinomas fue estudiada estableciendo curvas de supervivencia para los diversos valores de cada uno de los parámetros de posible importancia pronóstica.

I.- En relación con la supervivencia:

*** Características clínicas y anatomopatológicas.**

a) Características clínicas.

Las dos variables estudiadas fueron la *edad* y el *sexo* de los pacientes. Al agrupar a los pacientes por edad en dos grupos, mayor o igual de 70 y menores de 70 años, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al hecho de fallecer o no (**FIG. 32**). De los pacientes que tenían más de 70 años fallecieron un 39.39% (n=13) de los mismos, frente a un 8.69% (n=2) de los que tenían menos de 70 años.

En cambio la variable *sexo* no reflejó ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto a ese mismo acontecimiento. Las mujeres presentaron un porcentaje de mortalidad ligeramente superior al de los varones. Fallecieron un 44.4% (n=4) de las mismas y un 23.4% (n=11) de los hombres.(FIG. 33).

c) Características morfológicas del tumor

La probabilidad de supervivencia se vio influenciada por la *configuración macroscópica* del tumor. Un 87.5% (n=28) de los pacientes portadores de tumores papilares permanecían vivos al término del estudio, en cambio los tumores sólidos condicionaron un peor pronóstico y sólo 11.12% (n=2) de los mismos sobrevivían para el mismo período de tiempo. La comparación de las curvas de Kaplan-Meier mediante el test de Log-Rank demostró que eran estadísticamente diferentes con una probabilidad $p < 0.001$. (FIG. 34).

No se encontraron diferencias significativas en lo que respecta a la supervivencia cuando se estudió su relación con la existencia de *tumores únicos o múltiples*. De los pacientes portadores de tumores únicos fallecieron 34.48% (n=10) y un 19.23% (n=5) de los pacientes con tumores múltiples.(FIG. 35).

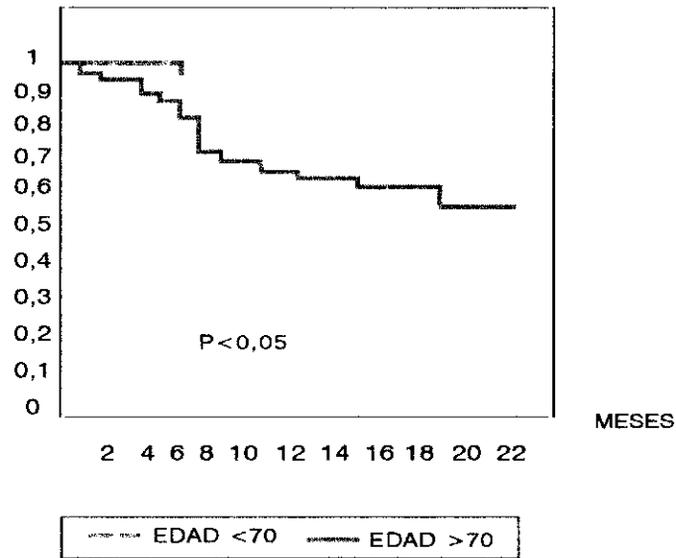


FIG. 32: *Supervivencia/Edad*

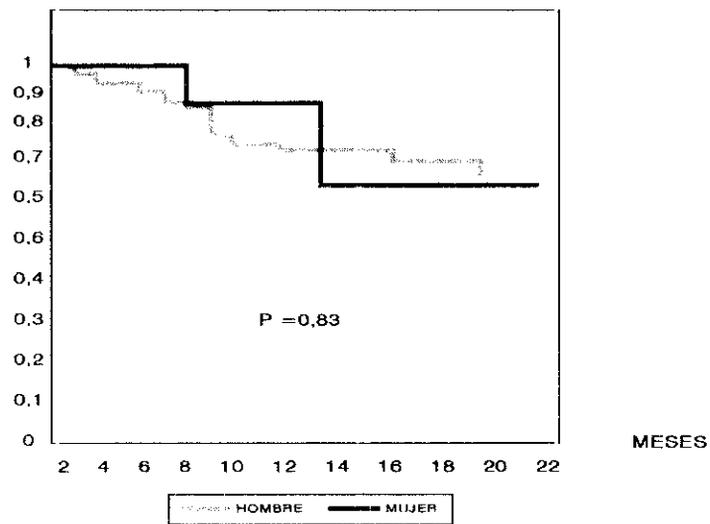


FIG. 33: *Supervivencia/Sexo*

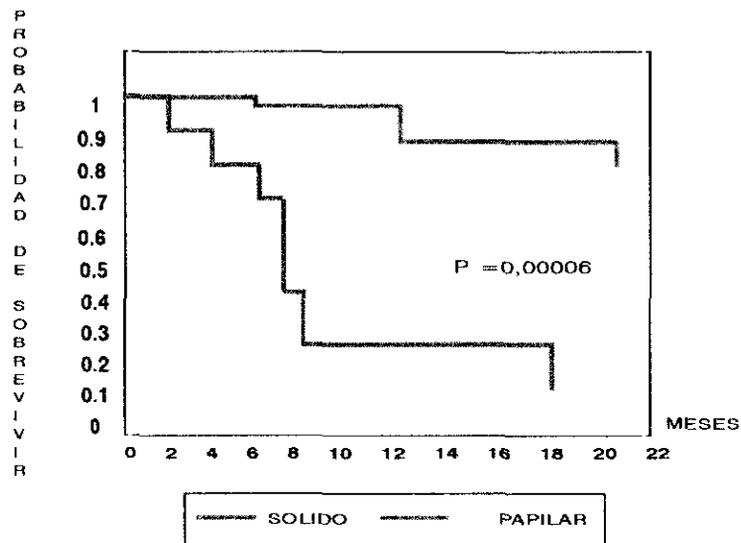


FIG. 34: *Supervivencia/Aspecto Tumoral*

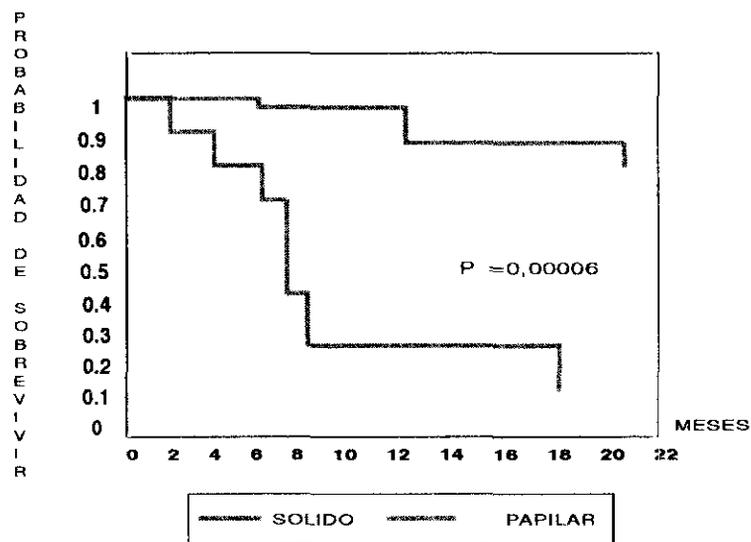


FIG. 35: *Supervivencia/T. Unico-Múltiple*

c) Características anatomopatológicas del tumor.

- Estadio de Jewett-Marhall

La profundidad de invasión en la pared vesical en el momento del diagnóstico, se correlacionó estrechamente con la supervivencia. Fallecieron un 13.63% (n=6) de los pacientes portadores de tumores superficiales frente a un 75% (n=9) de los pacientes portadores de tumores infiltrantes. El análisis estadístico mediante el test de Log-Rank reflejó que existía una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.001$). (FIG. 36).

- Grado de diferenciación de Broders

El grado de diferenciación tumoral fue otro de los factores que condicionó la supervivencia de forma significativa. Durante el período de seguimiento (n=15 meses) no falleció ningún paciente con tumor bien diferenciado. Un 52.38% (n=11) de los tumores de alto grado fallecieron durante ese tiempo, y en los carcinomas moderadamente diferenciados el porcentaje de mortalidad para el mismo período fue del 16% (n=4).

La comparación entre los tumores moderadamente diferenciados y poco diferenciados o anaplásicos resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0.001$). (FIG. 37).

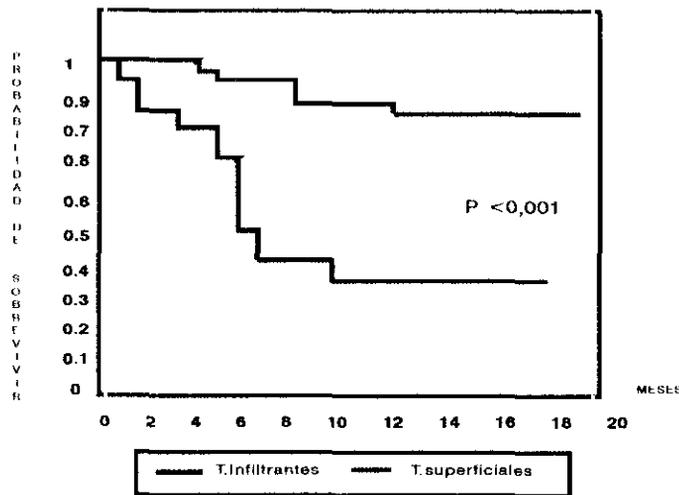


FIG. 36: Supervivencia/Grado de Infiltración

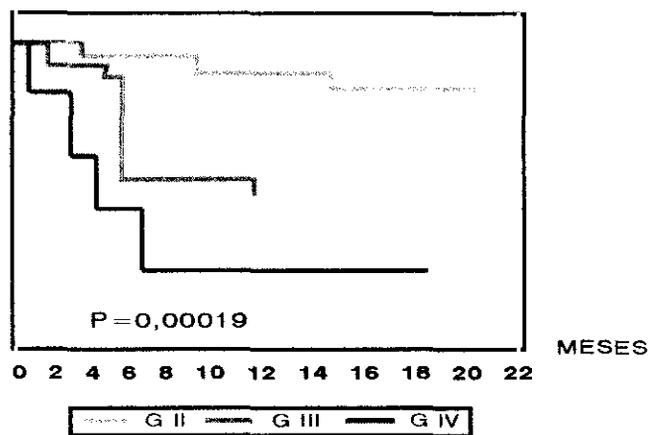


FIG.37 Supervivencia/Grado de Diferenciación

d) Supervivencia y expresión de oncoproteínas

Se investigó la expresión de oncoproteínas y su influencia sobre el hecho de fallecer o no.

Para la proteína p185(NEU) y el EGF-R fue necesario realizar una estratificación de los mismos para seleccionar el punto de corte que mostrara una mayor significación en cuanto a la posibilidad de sobrevivir.

En el caso de *EGF-R* las concentraciones más elevadas se observaron en los pacientes que fallecieron 15.07 ± 14.89 (fmol/mg prot), en los pacientes que sobrevivían los niveles medios de EGF-R fueron 12.47 ± 11.1 (fmol/mg prot). El análisis de las curvas de supervivencia para distintos puntos de corte en el EGF-R no reflejó diferencias estadísticamente significativas para el hecho de fallecer o sobrevivir. El valor de EGF-R que establecía mayores diferencias fue EGF-R=6 fmol/mg de proteína. (FIG. 38).

En relación con la proteína *p185* la concentración media en el grupo de pacientes que fallecieron fue de 1151.1 ± 856.1 (HNU/mg prot.), los pacientes que no murieron presentaron una concentración media de 928.7 (HNU/mg prot). No se encontró un valor de p185 que condicionara un peor pronóstico. (FIG. 39).

La expresión de *p53* se relacionó de manera estadísticamente significativa con las tasas de supervivencia. Los tumores con mayor índice de positividad son los que presentaron una peor evolución, fallecieron un 83% de los mismos frente a un 14% de los tumores negativos para dicho oncogén. (FIG. 40).

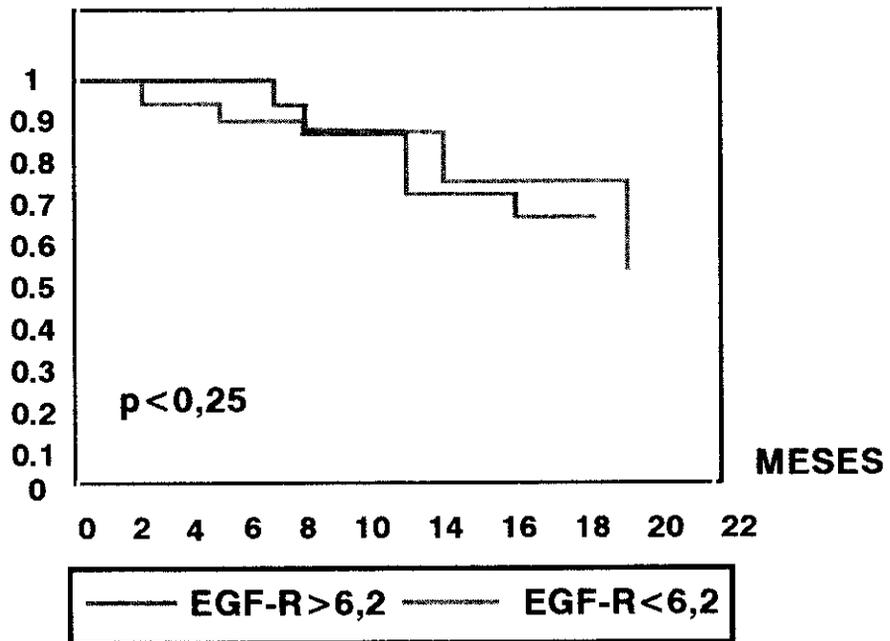


FIG. 38: *Supervivencia/EGF-R*

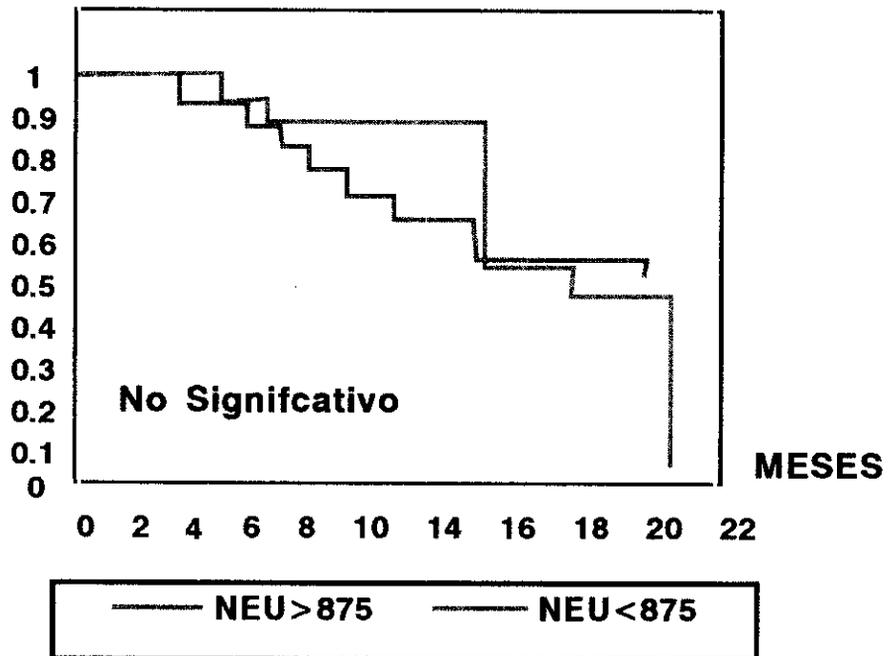


FIG. 39: Supervivencia/NEU

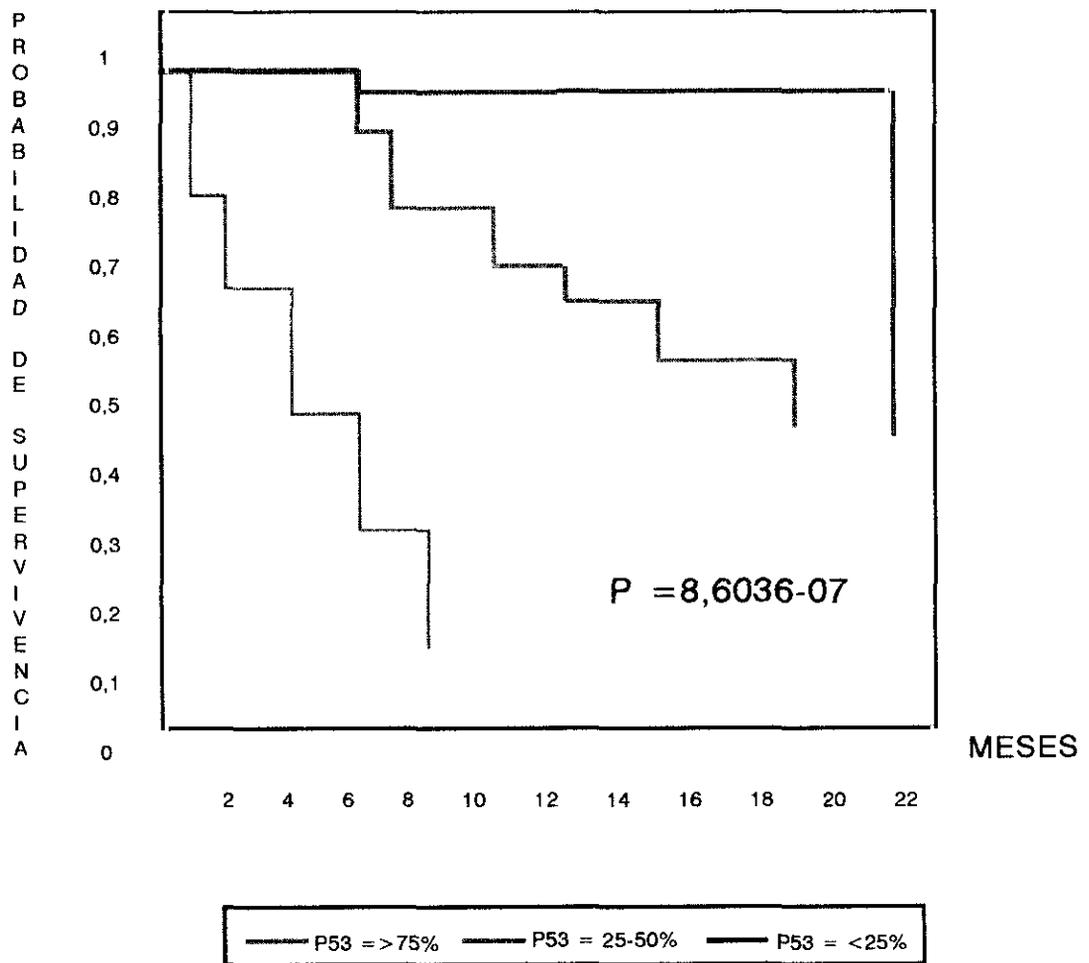


FIG. 40: Supervivencia/Expresión de p53

B.- En relación con el intervalo libre de enfermedad.

En el estudio de intervalo libre de enfermedad se incluyen 50 pacientes. No se consideraron 15 casos: 3 fallecen en un período muy corto tras la resección transuretral (1-2 meses), 3 se les practicó cistectomía como tratamiento, y 9 casos se pierden porque los pacientes no han acudido a revisión en ninguna ocasión.

Durante el período de seguimiento, 24(36.9%) de los pacientes presentaron recurrencias del tumor.

a) Características clínicas de los pacientes

Al analizar la edad y el sexo de los pacientes no se encuentran diferencias significativas en relación con el intervalo libre de enfermedad.(FIG. 41-42).

b) Características morfológicas de los pacientes

No se observan diferencias significativas al considerar el aspecto tumoral como factor que pudiera influir en la recurrencia del tumor.(FIG. 43)

De igual forma el hecho de ser portador de un tumor único o múltiple tampoco condicionó un peor pronóstico respecto al hecho de sufrir recurrencia tumoral.(FIG. 44)

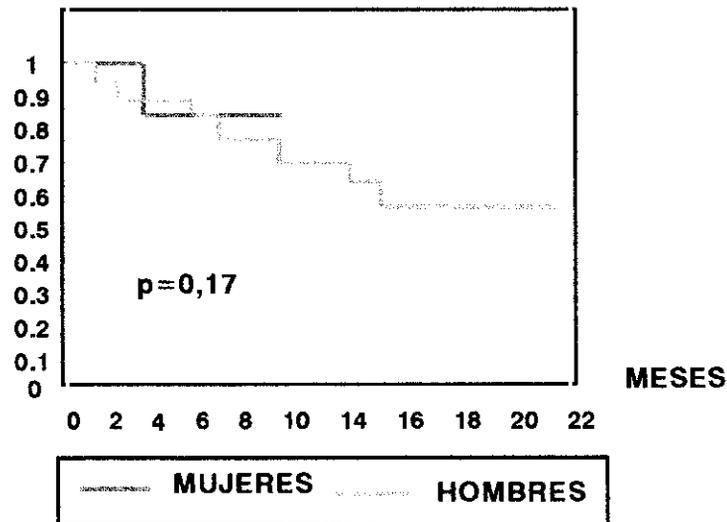


FIG. 41: Intervalo Libre de enfermedad/sexo

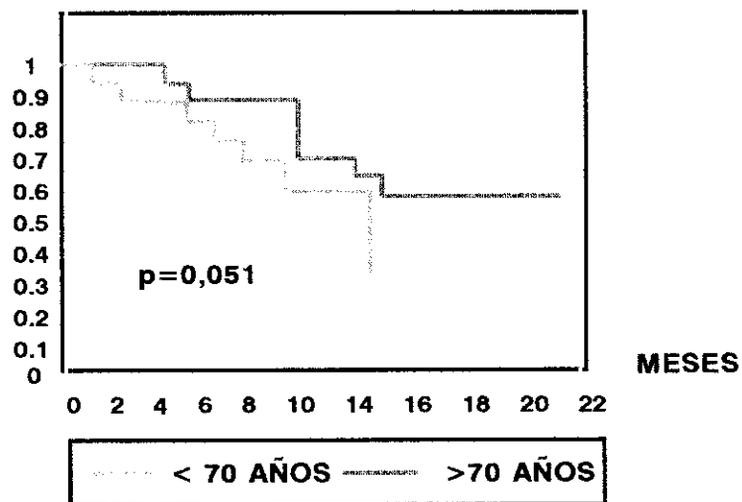


FIG. 42: Intervalo Libre de Enfermedad/Edad

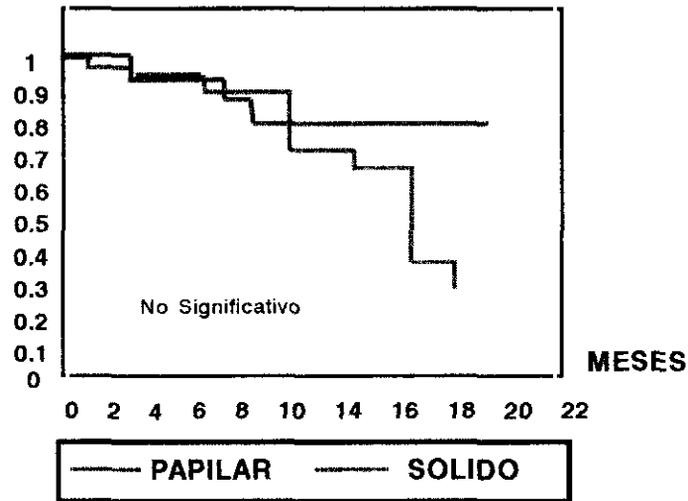


FIG. 43: Intervalo Libre de Enfermedad/
Aspecto Tumoral

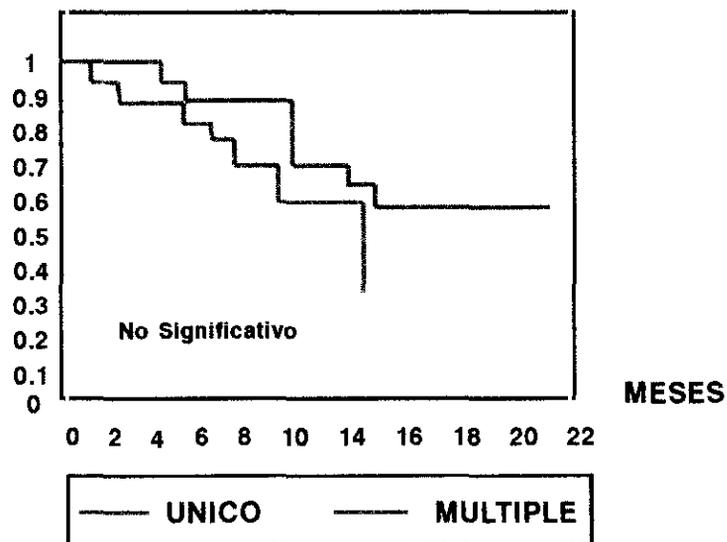


FIG. 44: Intervalo Libre de Enfermedad/Uni-Multifocalidad

c) Características anatomopatológicas del tumor

*** Estadio de Jewett-Marshall**

La probabilidad de mantenerse libre de enfermedad fue superior en los pacientes portadores de tumores superficiales que en aquellos con tumores infiltrantes. De los pacientes con tumores superficiales presentaron recurrencia de la enfermedad un 44.18% frente a un 71.4% de los pacientes con tumores invasivos. La comparación entre ambos grupos mediante el test de Log-Rank reflejó que existía una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p < 0.01$). (FIG. 45).

*** Grado de diferenciación de Broders**

El grado de diferenciación tumoral no condicionó un peor pronóstico en cuanto a la mayor o menor probabilidad de sufrir recaídas de la enfermedad. Los pacientes portadores de tumores bien diferenciados presentaron recaída de la enfermedad en un 57% (n=15) de los casos, en cambio los tumores bien diferenciados sufrieron recaídas en un 22.2%, si bien la diferencia no fue significativa (FIG. 46).

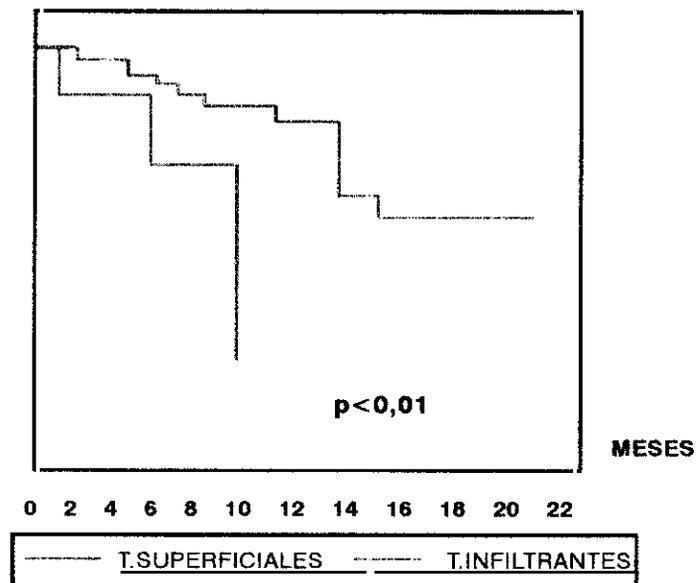


FIG. 45: INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD/ ESTADIO TUMORAL

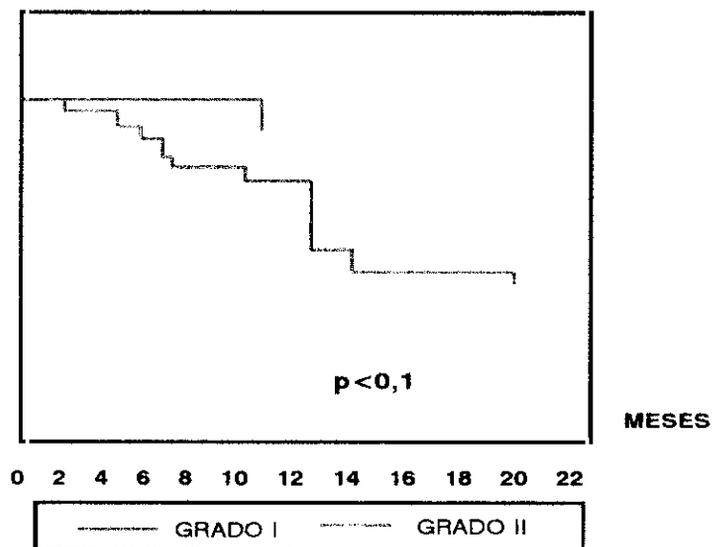


FIG. 46: INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD/GRADO DE DIFERENCIACION

ONCOGENES

La información pronóstica en cuanto a la mayor o menor probabilidad de sufrir recaídas de la enfermedad también fue demostrada para el NEU. En este sentido, la probabilidad de mantenerse libre de enfermedad fue de 63% al finalizar el período de seguimiento para los tumores que exhibieron una concentración de esta oncoproteína menor de 875 HNU/mg proteína, frente a un 39% de los tumores con valores de p185 superiores ($p < 0.05$) (FIG. 47).

Al estudiar el EGF-R en relación con este mismo acontecimiento se observó que un 66.6% de los pacientes que tenían concentraciones de ese receptor superiores a 6.5 fmol/mg proteína presentaron una recaída frente a un 38.4% de los que tenían concentraciones inferiores. Sin embargo, el análisis estadístico no reflejó diferencias significativas entre los mismos (FIG. 48).

La expresión de p53 si condicionó un peor pronóstico. Los tumores que expresaron p53 con una tinción moderada o fuertemente positiva sufrieron una recaída en un 60% de los casos y de los tumores negativos para dicho oncogén lo hicieron en un 42%. (FIG. 49).

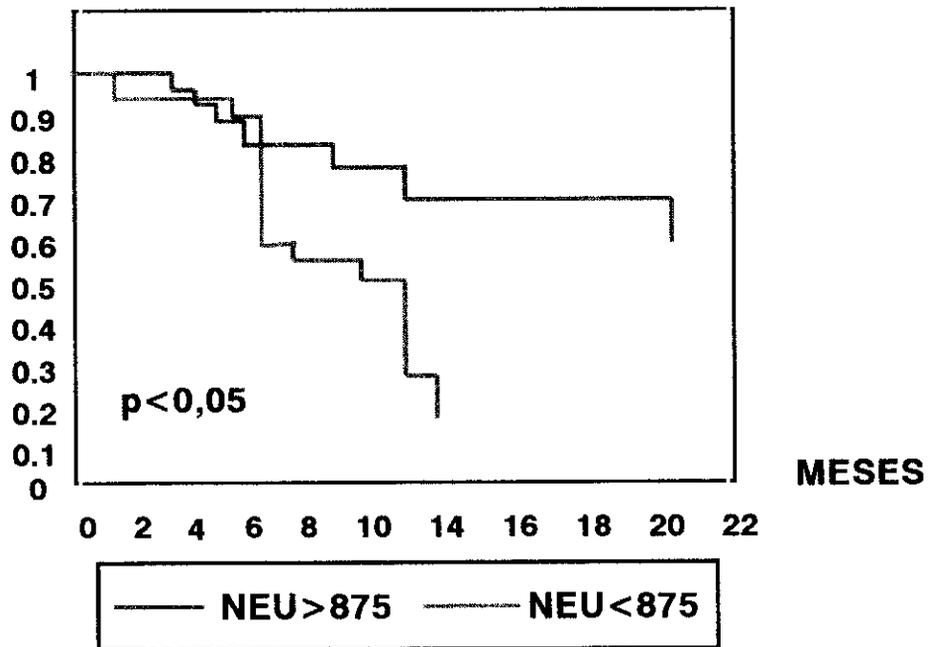


FIG. 47: *Curva de Intervalo Libre de Enfermedad/Expresión de Neu*

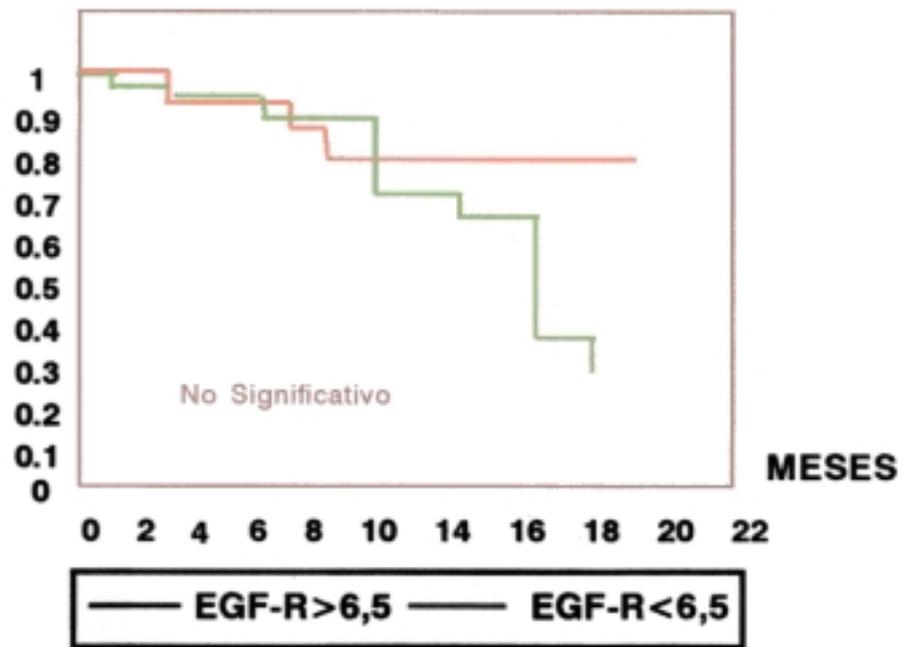


FIG. 48: *Intervalo Libre de Enfermedad/ Expresión de EGF-R*

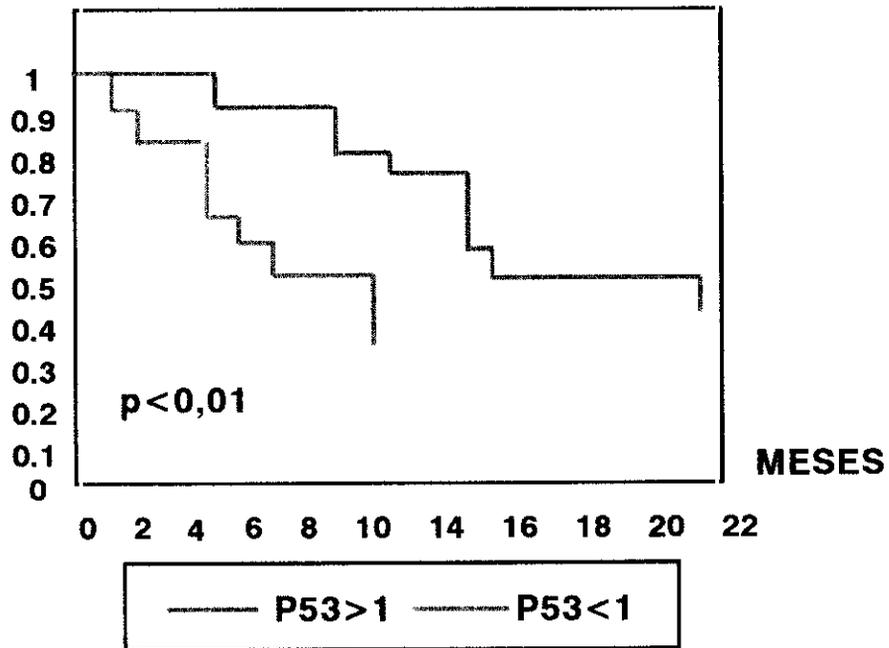


FIG. 49: *Intervalo Libre de Enfermedad/ Expresión de p53*

ANALISIS MULTIVARIANTE: REGRESION DE COX

Una vez establecidas cuales eran las variables que influían en la supervivencia y en el intervalo libre de enfermedad, realizamos una regresión de Cox. El modelo estadístico de Cox permite establecer cuales de los factores relacionados con la supervivencia o la recidiva tumoral tiene factor pronóstico independiente.

Con respecto a la supervivencia, en nuestro estudio, habíamos encontrado que el estadio tumoral, la configuración morfológica del tumor, grado de diferenciación y expresión de p53 influían sobre el hecho de fallecer. Tras realizar la regresión de Cox sólo se puede considerar como factor pronóstico independiente el estadio tumoral ($p < 0.05$). El p53 es la segunda variable que ejerce una mayor influencia sobre la supervivencia ($p < 0.1$).

En relación con el intervalo libre de enfermedad tras realizar las curvas de Kaplan-Meier habíamos encontrado diferencias significativas al analizar el estadio tumoral, la expresión de p53 y p185(NEU). En este caso la regresión de Cox indicó que ninguna de estas tres variables puede ser considerada como factor pronóstico independiente.

DISCUSSION

El cáncer ocupa hoy en día un puesto de primer orden en la problemática sanitaria mundial. En ascensión constante desde comienzos de siglo, representa actualmente la segunda causa de muerte, sólo precedida por las enfermedades cardiovasculares.

El cáncer vesical representa aproximadamente el 2% de todas las neoplasias y constituye un problema de ámbito mundial⁽¹⁸³⁾. En cifras absolutas es uno de los más habituales de la población masculina tras el carcinoma de pulmón, próstata, colorrectal, y, en ocasiones, el carcinoma gástrico⁽¹⁸⁴⁾.

Los datos epidemiológicos y clínicos de nuestra serie son comparables a la mayoría de las series publicadas por diferentes autores. En este sentido, el carcinoma vesical afecta en mayor medida a varones, en una proporción que viene a ser de 3 a 1. En nuestro estudio esta proporción fue mayor correspondiendo 54 de los casos a hombres y 11 a mujeres.

Es una neoplasia que afecta fundamentalmente a personas de edad avanzada. Un 80% de los casos de carcinoma vesical se producen entre los 50 y 79 años, con un pico en la prevalencia a los 70 años⁽¹⁸⁵⁾⁽¹⁸⁶⁾. La edad media de los pacientes con carcinoma vesical en nuestra serie fue de 69,09 años sólo un 3.08 % tenían menos de 50 años. Las neoplasias malignas de esta localización son excepcionales en edades inferiores a 40 años. El grupo control seleccionado presentó una edad media de 69,7 años similar a la de los pacientes con tumor vesical, lo que facilitó el análisis estadístico comparativo entre ambos grupos de pacientes. El conjunto de hallazgos epidemiológicos de nuestra serie coincide con

las características epidemiológicas de otros estudios, lo que nos permitió confrontar adecuadamente nuestros datos con los obtenidos en otras series.

Las neoplasias uroteliales son lesiones de difícil valoración, debiéndose fundamentalmente este fenómeno a una gran heterogeneidad de sus lesiones, una biología tumoral multiforme y una evolución potencial hacia la invasión desde sus manifestaciones iniciales^(187,188). Esto hace necesario llevar a cabo una perfecta caracterización biológica de los tumores y justifica plenamente nuestro trabajo.

El patrón básico de las neoplasias vesicales se caracteriza por tumores superficiales papilares y tumores infiltrantes de aspecto nodular^(189,190). Los tumores papilares suelen ser múltiples y con frecuencia desarrollan recurrencias tras la resección transuretral, pero generalmente tienen un buen pronóstico. En cambio, los tumores de tipo nodular tienen tendencia a desarrollarse en solitario, invaden la capa muscular y consecuentemente tienen un peor pronóstico incluso cuando son tratados con cistectomía radical.

Debemos mencionar que en nuestra serie los tumores papilares representaron un 52.31% de los casos correspondiendo tan sólo un 16.9% del total a los tumores de aspecto sólido. Observamos que un 81.8% de los tumores sólidos se presentaron como formas únicas, mientras que los tumores papilares tenían una mayor tendencia a asociarse con formas múltiples.

Los carcinomas de vejiga se pueden dividir en dos grupos- superficiales e infiltrantes- con importantes diferencias en su historia natural⁽¹⁹¹⁾. Aproximadamente un 80% de los tumores superficiales permanecen confinados a la mucosa y submucosa mientras que la mayoría de los tumores invasivos están asociados

con un peor pronóstico y tendencia a las metástasis.

Aproximadamente un 10-20% de los tumores superficiales evolucionan a carcinomas infiltrantes⁽¹⁹²⁻¹⁹⁴⁾ y la predicción de la llamada "progresión maligna" es uno de los serios problemas en el manejo de los carcinomas de vejiga.

Llegados a este punto son varias las cuestiones sobre biología tumoral que continúan confundiendo a clínicos y científicos: ¿Qué características delimitan las diferencias entre displasia, metaplasia, hiperplasia, carcinoma in situ y carcinoma franco? ¿Por qué algunos tumores superficiales permanecen localizados mientras que otros que parecen morfológicamente idénticos se vuelven invasivos, metastásicos o ambos?. Sin duda alguna estas respuestas no han podido ser resueltas en su totalidad, naciendo por este motivo la necesidad de caracterizar biológicamente los tumores vesicales.

En las últimas décadas se ha producido un impulso en la actitud de dirigir los esfuerzos de investigación hacia la biología celular y molecular, con el ánimo de encontrar en el conocimiento de los mecanismos que controlan y gobiernan la proliferación celular desordenada que constituye la neoplasia, nuevas estrategias terapéuticas.

Al mismo tiempo se buscan en su seno datos de interés pronóstico que nos permitan seleccionar poblaciones de distinto comportamiento biológico sobre las que aplicar de forma más individualizada los regímenes terapéuticos. De una forma análoga a lo que ocurre, en cuanto a pronóstico, con los diferentes tipos histopatológicos de carcinoma vesical, debemos mencionar que la caracterización biológica del cáncer urotelial de vejiga es uno de los objetivos que persigue la

biología molecular. Siguiendo esta línea de trabajo podremos conocer el pronóstico exacto de cada paciente.

Para que estos eventos lleguen a producirse será necesario que algunas técnicas básicas en biología celular sean puestas a punto, (desarrollo de los cultivos de líneas celulares y de las técnicas de clonación del DNA, etc). Del mismo modo ha sido necesario el conocimiento de la expresión y regulación de los procesos neoplásicos desde su origen genético (oncogenes, genes supresores) para poder vislumbrar el lugar exacto que a estos mecanismos y mediadores de la señal integrados en el crecimiento celular les corresponde. El estudio de estos fundamentos que tienen lugar en los tumores ha ayudado mucho a la comprensión de los mecanismos normalmente implicados en la regulación del desarrollo celular.

La determinación cuantitativa o cualitativa de la expresión de oncogenes o de sus productos podría ser de utilidad en la clasificación de los tumores dentro de diferentes categorías pronósticas. Esta información podría complementar a otros factores pronóstico establecidos como son el grado y el estadio tumoral, como ha ocurrido en el carcinoma de mama con EGF-R y el c-erbB-2^(195,196).

Muchos han sido los intentos por clasificar a los tumores vesicales de acuerdo a distintas variables que determinen su pronóstico. Las variables más establecidas hasta estos momentos han sido patrón de crecimiento (papilar vs. sólido)⁽¹⁹⁷⁾, estadio tumoral^(197,198) y grado de diferenciación⁽¹⁹⁷⁻²⁰⁰⁾, cada uno de los cuales ha demostrado tener implicaciones pronósticas. Otros factores como la expresión de determinados oncogenes^(201,202) y la presencia de EGF-R están siendo valorados pero su significado clínico o pronóstico aún no ha sido incorporado en

el sistema actual de clasificación. Posiblemente nuestra línea de trabajo permita realizar una interesante clasificación pronóstica.

Puesto que el cáncer vesical es uno de los tumores más comunes en la sociedad Occidental y su incidencia parece que está aumentando parece justificado el estudio de su biología molecular con el fin de aclarar los interrogantes hasta ahora planteados⁽¹⁹¹⁾.

En la búsqueda de marcadores tumorales sensibles y específicos para carcinomas de vejiga, la expresión de varios oncogenes (como c-erbB2, c-erbB1) y genes supresores (p53) han sido objeto de estudio. Aunque los resultados no han sido concluyentes, estas oncoproteínas parecen ser importantes marcadores que pueden ayudar a catalogar mejor los tumores de células transicionales de vejiga⁽⁴⁾.

GEN TUMOR SUPRESOR p53

El gen supresor p53 está adquiriendo cada vez mayor importancia en oncología, hasta el punto de que consideramos que en el momento actual es uno de los que mayores expectativas suscita en los investigadores de este campo.

La inactivación de los genes supresores p53 y Rb, parece ser un hecho importante en la patogénesis de distintas neoplasias, las evidencias sugieren que la inactivación de p53 se correlaciona con la adquisición por las células neoplásicas de un fenotipo invasivo⁽²⁰³⁾.

La pérdida de una región cromosómica específica representa uno de los mecanismos de inactivación de los genes supresores. Se ha observado que la pérdida del cromosoma 17p es un hecho bastante frecuente en muchos tumores. Trabajos pioneros en cáncer de colon revelaron que la mayoría de los tumores avanzados habían perdido el brazo corto del cromosoma 17⁽²⁰⁴⁾. En este área delecionada se sitúa el gen p53 que ya había sido previamente identificado. Esta deleción es frecuentemente acompañada por una mutación del alelo que permanece^(204,205,206), lo que conlleva a una inactivación de la proteína codificada por el gen. Las mutaciones del gen supresor p53 parecen ser las mutaciones más frecuentes en cáncer humano, identificándose en aproximadamente el 50% de diversas neoplasias, que incluyen mama⁽²⁰⁷⁾, colon⁽²⁰⁸⁾ y pulmón⁽²⁰⁹⁾.

Dada la importancia que parece tener el gen supresor p53 en cáncer humano nos pareció del máximo interés estudiar la expresión de dicho oncogén en el carcinoma vesical de células transicionales.

En nuestro estudio la expresión de este oncogén ha sido determinada mediante inmunohistoquímica. La valoración de la inmunorreactividad de los núcleos con los anticuerpos que detectan la oncoproteína p53 varía en diferentes trabajos. Generalmente todos los autores valoran casos positivos y negativos, si bien algunos diferencian grupos en función del porcentaje de células positivas. Soim et al.⁽²¹⁰⁾ consideran + (<5% de núcleos positivos), ++ (5-10%), +++ (10-40%) y ++++ (>40%). Otros consideran positivos a partir del 10%⁽²¹¹⁾ y algunos no establecen grupos y sólo consideran positivos los casos en los que la mayor parte de los núcleos son inmunorreactivos⁽²¹²⁾. Nosotros hemos establecido cuatro grupos: "0" cuando no aparecía ningún núcleo teñido, "1" cuando aparecían teñidos menos del 25%, "2" si el porcentaje de núcleos teñidos

estaba comprendido entre el 25-75% y "3" para los casos que presentaban más de un 75% de positividad.

Los tumores vesicales en nuestra serie expresaron p53 en un 51% de los casos, presentando en un 10.77%(n=7 una inmunorreactividad fuertemente positiva.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores. Wright⁽²¹³⁾ informa que un 54% de los tumores de vejiga son positivos para p53, presentando un 18% de los mismos una tinción intensa y el 36% restante exhibieron una tinción positiva débil.

Sidransky y sus colaboradores analizaron 18 tumores primarios de vejiga y encontraron mutaciones en p53 en el 61% de los mismos, representando la primera alteración genética común en las neoplasias de esta localización⁽²¹⁴⁾.

Debemos recalcar que todo trabajo científico que se precie debe incluir un grupo de controles sanos. En este sentido, de las muestras de tejido urotelial normal que analizamos en nuestro estudio no resultó positiva ninguna de ellas. Estos datos son semejantes a los obtenidos por otros autores, quienes describen la inexistencia de inmunorreactividad para p53 mutante en urotelio normal, sin afectación neoplásica⁽²¹⁵⁾. YE DW y cols examinaron la expresión de p53 en 67 casos de carcinomas de células transicionales de vejiga y en 6 controles normales. La tinción nuclear de p53 fue detectada en un 51% de los pacientes con cáncer y ninguno de los controles resultó positivo⁽²¹⁶⁾. Por otra parte Sarkis⁽²¹⁷⁾ describieron negatividad inmunohistoquímica en células normales.

Un tema debatido por diferentes autores ha sido la localización de la alteración del gen supresor p53 en el proceso carcinogénico. Entendiendo la cascada carcinogénica como una acumulación de alteraciones genotípicas que dan lugar a modificaciones en la diferenciación y proliferación celulares, se discute si la alteración en el gen supresor p53 podría ser un acontecimiento temprano que facilitaría la posterior alteración de otros genes o por el contrario tiene lugar en las últimas fases.

Al analizar el comportamiento del p53 respecto al estadio tumoral llama la atención la asociación de este oncogén con el carácter infiltrante de los tumores.

Estudios citogenéticos revelan que la pérdida del brazo corto del cromosoma 17 junto con las mutaciones en el gen p53 se aprecian fundamentalmente en tumores con estadios avanzados y alto grado y son raras en los tumores superficiales. Los resultados de nuestro estudio, y de la bibliografía en general, muestran una incidencia superior en tumores vesicales infiltrantes.

En nuestra serie ninguno de los tumores superficiales presentó una tinción fuertemente positiva siendo un 42% de los tumores clasificados en este estadio positivos para este oncogén. En cambio, en los tumores infiltrantes un 80% de los mismos resultaron ser moderadamente o fuertemente positivos. En el estudio realizado por YE DW et al. encontraron la proteína p53 en un 36% de los tumores superficiales y en un 71% de los carcinomas infiltrantes⁽²¹⁶⁾. En general podemos considerar que es rara la expresión mutada de P53 en tumores superficiales, pudiendo alcanzar un 60% en carcinomas invasivos.

Wee et al. la expresión de p53 se encontró en un 92% de los carcinomas invasivos, 86% de los carcinomas in situ, y en un 28% de las áreas displásicas. El hecho de que la proteína p53 se exprese también en casos de displasia y carcinoma in situ nos hace suponer que las mutaciones en este gen pueden tener un papel en la patogénesis del carcinoma vesical. La expresión de p53 puede ser un indicador de progresión de la enfermedad desde displasia a carcinoma in situ y carcinoma infiltrante⁽²¹⁵⁾.

La principal limitación del p53 en estos momentos es que las mutaciones en este gen parecen ser uno de los últimos eventos que ocurren en la progresión del tumor, esto limita la utilización de este test como screening para detectar recurrencias en tumores primarios.

El grupo de Cordon refiere en uno de sus trabajos que la acumulación nuclear de p53 se asocia con progresión tumoral. Analizaron 43 pacientes con carcinoma de células transicionales T1, tratados con resección trasuretral exclusivamente, utilizando métodos de inmunohistoquímica. En 18 casos la tinción nuclear fue negativa, y 25 muestras mostraron un patrón homogéneo o heterogéneo de inmunorreactividad. La tasa de progresión comparando los dos grupos, fue superior en aquellos pacientes que tenían un patrón homogéneo o heterogéneo de expresión de la proteína p53 mutada (20% tasa de progresión por año versus 2,5%)⁽²¹⁷⁾.

Posteriormente ese mismo grupo estudió la expresión de p53 en 54 pacientes con tumores Ta y 31 con carcinoma "in situ". Tras realizar un análisis multivariante, encontraron que la expresión nuclear de la proteína p53 mutada es el predictor más importante de progresión en ambas poblaciones⁽²¹⁸⁾.

Datos similares son expuestos por Spruck et al.⁽²¹⁹⁾ en un estudio realizado en carcinomas "in situ", en el que observaron que la expresión de la proteína nuclear p53 es un evento precoz en la formación de carcinomas "in situ", y que la presencia de la misma explicaba su propensión a invadir.

El estudio del grado histológico demostró que la positividad de p53 estaba asociada significativamente con el grado tumoral. Nuestro estudio detectó una mayor tendencia a expresar p53 en aquellos tumores de alto grado. Los tumores bien diferenciados fueron en un 72.7% de los casos negativos para dicho oncogén y el 27.3% restante presentó una tinción débilmente positiva. En cambio, los tumores pobremente diferenciados tuvieron una tinción moderadamente o fuertemente positiva en un 64% de los casos siendo negativos tan solo un 28% de los mismos y el 8% restante presentó una tinción positiva débil (<20% de núcleos teñidos).

Los trabajos publicados hasta ahora han sido unánimes al asociar la expresión de p53 con el grado de diferenciación tumoral^(215,220). Kamel et al. afirman que la positividad fue significativamente superior en los grados II-III que en los tumores bien diferenciados ($p=0.004$)⁽²²⁰⁾. La mayor positividad se encontró en los tumores de grado III (78%), 48% en grado II y 33% en los de grado I.

Otros dos factores con los que comparamos la expresión de la oncoproteína p53 fueron las características morfológicas del tumor, el aspecto tumoral y la presentación única o múltiple de los mismos. En este sentido, como puede observarse en la tabla IX y en la figura 22, resultó que fueron los tumores con aspecto sólido los que expresaron con mayor frecuencia la proteína p53, un 72.5% de los casos fueron positivos, en cambio los tumores papilares sólo fueron

positivos un 39.1% de los mismos.

Por último y en relación con el número de tumores, se observó que en aquellos casos en los que el tumor era único, se expresaba este oncogén con mayor frecuencia (63.9%).

La correlación con el grado y el estadio tumoral sugiere que las mutaciones en p53 pueden estar asociadas con una evolución más agresiva de los tumores. Por tanto, la expresión de p53 constituye uno de los pilares sobre los que se apoya la caracterización biológica del carcinoma transicional de vejiga.

La expresión de p53 ha sido relacionada con una menor supervivencia en diferentes neoplasias. Según Visakorpi el riesgo de muerte en pacientes portadores de carcinoma de próstata fue 12 veces superior en los casos con p53 positivo.

En nuestro estudio la expresión de p53 en los tumores vesicales de células transicionales condicionó una menor supervivencia. Los tumores con mayor índice de positividad son los que presentaron una peor evolución, fallecieron un 83% de los mismos frente a un 14% de los tumores negativos para dicho oncogén. La curva de supervivencia (Fig. 40) es muy demostrativa para este hecho, los tumores que expresaron en mayor porcentaje la oncoproteína p53 son los que presentan una mayor probabilidad de fallecer.

En relación con el intervalo libre de enfermedad los tumores que expresaron p53 con una tinción moderada o fuertemente positiva sufrieron una recaída en un 60% de los casos y los tumores negativos lo hicieron en un 42%

RECEPTOR PARA FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

Los factores de crecimiento y en general las moléculas "señal" implicadas en los procesos de crecimiento y proliferación celular vieron la luz en los años 50-60 gracias a los ensayos biológicos que Cohen, Levi Montalchini y Metcalf, entre otros, realizaban en la caracterización de los factores de crecimiento epidérmico y neuronal, así como de los factores estimuladores del crecimiento de colonias⁽²²¹⁾.

El EGF-R ha sido determinado por diversos grupos de trabajo, en diferentes tipos de tumores y líneas celulares tumorales⁽²²²⁻²²⁴⁾ mediante el empleo de dos tipos de técnicas básicamente: radioligando-radioinmunoensayo y técnicas de inmunohistoquímica con el concurso de diferentes anticuerpos monoclonales.

La relación entre la expresión de EGF-R y comportamiento clínico ha sido estudiado en detalle en carcinomas de mama, en los que se ha visto que la positividad de este receptor se correlaciona con la ausencia de receptores de estrógenos y presencia de nódulos positivos⁽²²⁵⁻²²⁷⁾. Demostrando que en esta neoplasia la expresión de EGF-R constituye por sí mismo un dato de peor pronóstico independiente de otras variables.

Hallazgos similares se han encontrado en pacientes afectados de carcinomas de esófago y de ovario^(228,229) en los que se ha visto la asociación de niveles de EGF-R elevados con menor supervivencia.

Messing⁽²³⁰⁾ informó en 1984 que ciertas líneas de células transicionales tras la aplicación de EGF respondían a este estímulo creciendo y dividiéndose.

Aproximadamente en esos mismos años Gusterson et al.⁽²³¹⁾ detectaban por inmunohistoquímica la presencia de EGF-R en varios tumores humanos incluyendo el carcinoma de vejiga.

Los métodos utilizados en la medición de la expresión de EGF-R en carcinoma de células transicionales están básicamente representados por la inmunohistoquímica y las técnicas de radioligando y radioinmunoensayo. Siendo el método de inmunohistoquímica el empleado con mayor frecuencia en la mayor parte de los trabajos publicados.

La técnica de inmunohistoquímica utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores de EGF en secciones de tejido de tumores primarios de vejiga⁽²³⁰⁾.

El otro método de estudio para determinar la expresión de EGF-R es mediante radioinmunoensayo(RIA). Se basa en determinar la unión de EGF marcado con un isótopo radioactivo (I125) a una fracción de membranas celulares homogeneizadas y calcular la concentración de receptor. A diferencia de las técnicas inmunohistoquímicas es un método cuantitativo en el que la concentración de EGF es una medida objetiva.

El método de radioligando es más sensible a la hora de detectar tumores con concentraciones bajas o moderadas de EGF-R. No obstante, existe una buena correlación entre el método de inmunohistoquímica y de radioligando cuando los tumores presentan concentraciones de EGF-R superiores a 35 fmol/mg prot⁽²³²⁾.

El método de radioligando seguido en nuestro estudio es sencillo, nos

permite la cuantificación de una forma objetiva, y se encuentra bien establecido en nuestro centro, dado que el procedimiento seguido es similar al empleado en el procesamiento de otros tipos de muestras tumorales, como cáncer de mama por ejemplo.

La amplificación de DNA y/o sobreexpresión de RNAm del receptor para EGF se ha asociado con el potencial maligno de varios tumores humanos. Para determinar la frecuencia de amplificación de DNA y sobreexpresión de RNAm del EGF-R en carcinomas de vejiga, evaluaron 12 tumores vesicales mediante Southern hibridación no encontrando amplificación en ninguno de los 12 tumores. Se encontró sobreexpresión de RNAm de EGF-R en un 36% de los tumores de vejiga y se piensa que puede jugar un papel en la tumorigénesis de las neoplasias vesicales⁽²³³⁾. Resultados similares encontraron tras estudiar 31 tumores de vejiga mediante Southern blotting solo se demostró amplificación del gen en un solo caso de los 31 tumores⁽²³⁴⁾.

Con objeto de analizar la presencia de Receptores para el Factor de Crecimiento Epidérmico se decidió escoger una población control con la que poder comparar los niveles de EGF-R en tejido tumoral. Como ya se indicó los sujetos control seleccionados fueron pacientes portadores de una hiperplasia prostática benigna candidatos a una adenomectomía suprapúbica tipo Freyer. La cuantificación del contenido de EGF-R en tejido urotelial sano reveló diferencias significativas con respecto a las muestras tumorales.

Pocos datos aporta la literatura respecto a la concentración de EGF-R en tejido urotelial sano. Neal y cols. establecen como límite superior en tejido urotelial sano la concentración de 10 fmol/mg prot. considerando como negativos

para EGF-R aquellos tumores que presentan concentraciones inferiores a ese nivel. En nuestra serie la concentración más alta encontrada en tejido urotelial sano fue la de 6.8 fmol/mg prot. Estableciendo este valor como nivel "cut-off".

En diversos estudios realizados mediante inmunohistoquímica no se encontró positividad para EGF-R en tejido sano⁽²³⁵⁾ en estudios inmunohistoquímicos, encontraron mínima reactividad del EGF-R en células de urotelio superficial normal. Estos autores a su vez observan que cuando se encuentra expresión de receptores para EGF en urotelio sano, estos aparecen en las células de la capa basal del urotelio, en cambio, en lesiones premalignas y malignas son las células superficiales las que presentan mayor concentración de receptores para EGF⁽²³⁵⁾.

Una vez que establecimos que el tejido urotelial neoplásico presenta una sobreexpresión de EGF-R, analizamos la relación de este receptor con distintas variables clínicas y anatomopatológicas del tumor en un intento de establecer el papel que dicho receptor juega en el carcinoma de células transicionales.

Dos de los factores pronósticos más importantes en el carcinoma de células transicionales de vejiga son el estadio tumoral y el grado de diferenciación. Nuestra serie confirmó claramente los datos precedentes (Fig.36-37). Se trata ahora de estudiar las relaciones entre estas dos variables anatomopatológicas y la expresión del receptor para el factor de crecimiento epidérmico en tumores vesicales.

El pronóstico del cáncer vesical está fuertemente asociado con la categoría tumoral⁽²³⁶⁻²³⁸⁾: pacientes con tumores de alto estadio tienen mayor posibilidad de desarrollar metástasis o de morir.

La literatura precedente es uniforme a este respecto. Son los tumores infiltrantes los que presentan mayores concentraciones de EGF-R, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

Neal et al. estudiaron mediante inmunohistoquímica la presencia de EGF-R en 101 tumores de vejiga, un 48% fueron positivos para dicho receptor. Una relación significativa se encontró entre la categoría tumoral y positividad de EGF-R. La positividad para el receptor de EGF se asocia significativamente con el estadio tumoral y grado de diferenciación ($p < 0,001$)⁽²³⁹⁾.

En un trabajo realizado por el grupo de Neal⁽²⁴⁰⁾ encontraron que la mayor parte de los tumores invasivos contenían EGF-R (21 de 24) comparado con tumores superficiales (7 de 24).

Cuando se empleó el método de radioligando para la cuantificación de los receptores de EGF en las membranas de las células tumorales, se consideraron positivos 30/47 tumores analizados, siendo indetectable el EGF-R en un 32% de los casos analizados. Las concentraciones alcanzadas por los tumores superficiales fueron significativamente inferiores a las de los tumores infiltrantes. Los niveles encontrados por Neal et al.⁽²³²⁾ oscilan en un rango mucho más amplio que el establecido en nuestro estudio. Siendo 64 fmol/mg proteína el valor más alto alcanzado en nuestra serie, dato que contrasta ampliamente con estos autores que refieren que los tumores infiltrantes presentan una concentración media de EGF-R

de 142 fmol/mg prot. Nuestros resultados son más acordes con los expuestos por Smith et al.⁽²⁴¹⁾. Estos autores encuentran que los tumores superficiales presentan una concentración media de 12.4 fmol/mg prot siendo significativamente inferior a la encontrada en los tumores infiltrantes con un valor medio de 99.9 fmol/mg prot y una mediana de 20,5 fmol/mg prot).

La presencia de niveles superiores de EGF-R en tumores infiltrantes implica un posible papel del receptor de EGF en la invasión de los tumores vesicales⁽²⁴¹⁾. Estos datos son similares a los expuestos previamente por nuestro grupo.

Hoy en día otra de las características morfológicas que ayudan a etiquetar más exactamente cada tumor en cuanto a su comportamiento es el grado de diferenciación celular. Se han encontrado diferencias en el pronóstico de los pacientes al randomizar los tumores en función de esta variable.

Smith⁽²⁴¹⁾ utilizando inmunohistoquímica demostró una relación significativa entre expresión de EGF-R , alto estadio y grado tumoral y mal pronóstico. En nuestro trabajo los tumores más indiferenciados expresaron concentraciones más elevadas de EGF-R. Moreno y cols.⁽²⁴²⁾ obtienen resultados similares, en su serie los tumores bien diferenciados alcanzan concentraciones de 6,7 fmol/mg proteína frente a 22,2 fmol/mg proteína que tienen los tumores pobremente diferenciados. Existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Neal et al. tras realizar un análisis inmunohistoquímico en carcinomas vesicales de células transicionales informan que la positividad de EGF-R determinaba un peor pronóstico. En nuestro trabajo encontramos que la

concentración media de EGF-R en los pacientes que fallecieron fue superior a la de aquellos que permanecían vivos al finalizar el estudio (15.07 vs 12.47 fmol/mg prot). No obstante, el análisis de las curvas de supervivencia (Fig. 38) no reflejó que existieran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En relación con el intervalo libre de enfermedad los tumores con concentraciones superiores de EGF-R (> 6.5 fmol/mg prot) presentaron recidivas en un 66.6% de los casos, en cambio los tumores con concentraciones inferiores sufrieron recaídas en un 38.4% de los casos. Resultados similares obtuvieron el grupo de Neal y colaboradores en su estudio, en el que encontraron un índice de recurrencias significativamente superior en tumores con EGF-R positivo que en tumores que no expresaban dicho receptor.

Todos los datos expuestos hasta aquí sugieren que la presencia de receptores de EGF en cáncer de vejiga está asociada con la invasión muscular, pobremente diferenciación y posiblemente con un peor pronóstico clínico⁽²³⁹⁾.

La información pronóstica asociada a la determinación y medición de algunas sustancias expresadas por las células tumorales, ha sido uno de los fines más perseguidos por la investigación en biología tumoral porque su consecución significaría la correcta indicación de abordajes terapéuticos agresivos desde el momento del diagnóstico de la enfermedad neoplásica así como la adecuada e individualizada instauración de tratamientos adyuvantes.

C-erbB-2/NEU

El proto-oncogén c-erbB-2 codifica una proteína transmembrana que muestra una homología parcial con el EGF-R⁽²⁴³⁾.

Es probable que el HER-2/neu sea un receptor para un factor de crecimiento, pero el ligando aún no ha sido identificado. El mecanismo por el que HER-2/neu transforma células normales en malignas permanece desconocido pero parece razonable pensar que un incremento en la expresión de receptores para factores de crecimiento pueda contribuir a un crecimiento celular incontrolado.

Los resultados de estudios iniciales de c-erbB-2 en neoplasias humanas sugirieron que la amplificación y/o sobreexpresión de este oncogén podría estar confinada a los adenocarcinomas⁽²⁴⁴⁾, pero tanto la amplificación como la sobreexpresión han sido demostrados en carcinoma de células escamosas de bronquio^(245,246).

La importancia pronóstica del oncogén c-erbB-2 está ampliamente demostrada en determinadas neoplasias como el carcinoma de mama, vejiga, cáncer gástrico y de ovario⁽²⁴⁶⁻²⁴⁹⁾.

La amplificación o sobreexpresión del gen c-erbB-2 ha sido relacionada con un peor pronóstico en tumores de mama⁽²⁵⁰⁾, la supervivencia era más corta para aquellos pacientes portadores de tumores que expresaron la proteína p185(neu), que para los tumores negativos^(251,252).

Asímismo en cáncer gástrico el porcentaje de supervivencia para los pacientes portadores de tumores que expresaron la oncoproteína p185 fue de 11 % frente a un 50% de los que fueron negativos⁽²⁵³⁾. Tras realizar un análisis multivariante se demostró el valor pronóstico independiente de este oncogén.

Los proto-oncogenes pueden promover la tumorigénesis por alteraciones en la proteína que codifican o por una sobreproducción de la misma.

En tumores humanos la activación del protooncogén erbB-2 no está mediada por mutaciones puntuales. En estos tumores el potencial oncogénico no se debe a una mutación con actividad constitutiva, sino a una hiperexpresión del receptor c-erbB-2. Por ello nos resultó del máximo interés realizar un análisis cuantitativo de la proteína p185 en tumores vesicales.

La mayoría de los trabajos realizados en tumores vesicales sobre el oncogén c-erbB-2 están basados en pruebas inmunohistoquímicas encontrándonos importantes discrepancias acerca del porcentaje de positividad encontrada en tumores vesicales.

La proteína p185(NEU) ha sido detectada en neoplasias vesicales por algunos autores en tan sólo un 2% de los carcinomas⁽²⁵⁴⁾. Mientras que en otros estudios esta oncoproteína se observó en este tipo de neoplasias entre un 51.8% y un 74.3%^(255,256). La variación en estos datos parece residir en los criterios escogidos para determinar un resultado como positivo.

La técnica de enzimoimmunoanálisis utilizada en nuestro estudio permite realizar un análisis cuantitativo de las concentraciones de p185 en tejido vesical

neoplásico. Se trata de una técnica no sujeta a valoraciones subjetivas y que puede reflejar la sobreexpresión del oncogén c-erbB-2. Esta técnica había sido establecida con anterioridad para el estudio de la expresión de p185 en carcinoma de mama y carcinoma no microcítico de pulmón.

La técnica que empleamos en nuestro estudio para determinar la expresión de esta oncoproteína nos permitió conocer las diferencias cuantitativas en lo que se refiere a concentración de p185 entre tejido urotelial sano y tejido neoplásico de carcinoma vesical de células transicionales. La concentración de p185 fue significativamente inferior en tejido urotelial sano ($p < 0,001$). Siendo 399.2 HNU/mg prot la concentración más elevada de p185 dentro del grupo control. Solamente 20% (n=13) de los tumores presentaron niveles inferiores a ese valor.

Esto apoyaría la teoría de que en neoplasias humanas la activación del oncogén c-erbB-2 es debida a una hiperexpresión del mismo.

A diferencia de lo que ocurre con las otras dos oncoproteínas analizadas (p53 y EGF-R), la proteína p185 no se asocia con tumores indiferenciados, las concentraciones más elevadas se observaron en las neoplasias moderadamente diferenciadas, no obstante, no encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar los diferentes grupos. Los estudios de Nakapoulov⁽²⁵⁷⁾ han descrito por inmunohistoquímica un 60% de positividades, siendo más frecuente en carcinomas transicionales. Estos autores describen que c-erbB-2/neu es independiente del grado y estadio tumoral. Estos datos son similares a los descritos por nuestro grupo en este estudio

En la literatura numerosos trabajos correlacionan la expresión del oncogén

c-erbB-2 con carcinomas bien diferenciados^(258,259), con mayor tendencia a metastatizar⁽²⁵⁹⁻²⁶¹⁾ y peor pronóstico⁽²⁶⁰⁻²⁶²⁾.

En lo que respecta al estadio tumoral se observaron concentraciones superiores de p185 en los tumores infiltrantes que en los tumores superficiales. Siendo la diferencia entre ambos grupos muy discreta. Datos similares refieren Wright et al., observaron que un 25% de los tumores infiltrantes fueron positivos para dicho oncogén frente a un 8% de los tumores superficiales, sin existir entre ambos grupos diferencias significativas⁽²⁶³⁾.

A pesar de no correlacionarse con el estadio tumoral, esto no excluye el oncogén c-erbB-2 como posible factor pronóstico. En cáncer de mama ocurren hechos similares⁽²⁶³⁾.

Con respecto al pronóstico, algunos trabajos han asegurado que la sobreexpresión del proto-oncogén c-erbB-2 se correlaciona con el tiempo libre de enfermedad y con la supervivencia mientras que otros obtienen la conclusión opuesta basada en diferentes datos. Nosotros hemos encontrado que los pacientes que fallecieron presentaron concentraciones superiores de la oncoproteína p185(NEU), sin embargo, la expresión de dicho oncogén no influyó significativamente en la supervivencia. En cambio, este papel parece tener una mayor importancia en las recidiva tumoral. Detectamos diferencias estadísticamente significativas en los pacientes que con concentraciones superiores a 875 HNU/mg prot.

FACTORES PRONOSTICOS

En los carcinomas vesicales de células transicionales los dos parámetros más frecuentemente relacionados con el pronóstico son, para la mayoría de los autores, la infiltración de la capa muscular y el grado de diferenciación.

Se reconocen en la actualidad una serie de características patológicas que se consideran predictoras del curso clínico del carcinoma de vejiga.

En 1946 Jewett y Strong⁽²⁶⁴⁾ demostraron por primera vez la importancia de la profundidad de infiltración como variable pronóstica en el carcinoma vesical y propusieron un sistema de estadiaje que fue posteriormente modificado por Marshall⁽²⁶⁵⁾. Está claramente establecida la diferencia pronóstica en cuanto a supervivencia se refiere entre aquellos pacientes con tumores confinados a la lámina propia y aquellos que presentan infiltración de la capa muscular⁽²⁶⁶⁾.

La profundidad de invasión en la pared vesical en el momento del diagnóstico, se presenta como uno de los factores pronósticos más importantes y se correlaciona estrechamente con la supervivencia⁽²⁶⁷⁻²⁶⁸⁾.

En tumores superficiales el porcentaje de supervivencia es del 70% o más, en tumores infiltrantes se reduce a un 40%⁽²⁶⁹⁾.

En nuestra serie en los tumores superficiales el porcentaje de supervivencia fue de 86.3% mientras que en los tumores infiltrantes era de 25%. Encontrando una diferencia altamente significativa cuando comparamos mediante el método

estadístico de Log-Rank las curvas de supervivencia de tumores superficiales e infiltrantes.

La capacidad invasora de los tumores superficiales suele ser escasa cuando no invaden la lámina propia (la supervivencia a los 5 años del grupo Ta es la misma que la del grupo control). De todos modos, el comportamiento de estos tumores es muy variable (nos referimos fundamentalmente a los T1) y podría estar influido por una serie de factores pronósticos que analizaremos a continuación. Hay que tener en cuenta que, aproximadamente, un tercio de los tumores T1 tratados sólo con resección transuretral van a experimentar una progresión. Por otra parte, la cistectomía radical cura a casi todos los pacientes, pero disminuye la calidad de vida y es innecesaria en muchos casos.

El grado tumoral es junto con la profundidad de invasión el otro factor pronóstico importante⁽²⁷⁰⁻²⁷³⁾.

La mayoría de los tumores TaGI se comportan como una enfermedad benigna que no amenaza la vida de los pacientes.

Los grados I y III son buenos factores de predicción del curso clínico, pero el grado II (aproximadamente el 45% de los casos) tiene poco valor de predicción. Este valor podría aumentarse asociando otros datos⁽²⁷⁴⁾.

Carbin et al.⁽²⁷⁵⁾ han dividido el grado II en una forma benigna (grado IIa) y otra maligna (grado IIb). De 124 pacientes con CCT los que tenían grado I alcanzaron una tasa de supervivencia a los 5 años del 100%, los IIa del 92%, los IIb del 43% y los III del 44%. A la vista de estos resultados han propuesto

clasificar estos tumores en grado A(I+IIa)-94% de supervivencia a los 5 años, grado B(IIb+III)44% y grado C(IV)-27%.

De los pacientes que componen nuestro estudio no falleció ninguno de los que eran portadores de tumores bien diferenciados. Estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa entre los tumores moderadamente diferenciados (Grado II) y los tumores pobremente diferenciados (Grado III). El porcentaje de supervivencia en los tumores de grado II fue de 84%, en cambio los tumores de alto grado sólo sobrevivían un 47.6%.

El tamaño tumoral y el número de tumores originales han sido considerados por algunos autores como factores pronósticos. Se desconoce la razón por la cual unos pacientes presentan un tumor único y otros tienen varios tumores. Nosotros no observamos diferencias significativas en lo que se refiere a la supervivencia entre los tumores único y múltiples.

La configuración macroscópica del tumor es otra importante variable pronóstica. Los tumores papilares implicaron habitualmente una mayor supervivencia, un 87,5% de los pacientes portadores de tumores papilares permanecían vivos al término del estudio, en cambio, sólo un 11,12% de los mismos sobrevivían para el mismo período de tiempo. Esto puede deberse a que los tumores papilares tienden a ser de bajo grado, se presentan en un estadio temprano y tienen un comportamiento menos agresivo que los de presentación no papilar^(271,276).

El carcinoma de células transicionales de vejiga es una neoplasia que afecta fundamentalmente a personas de edad avanzada. La edad media de los

pacientes analizados en nuestro grupo fue de 69,09 años. Al realizar el análisis estadístico univariante comprobamos que los pacientes con más de 70 años habían fallecido en mayor medida que aquellos con una edad menor. No parece estar bien definido si la edad puede ser considerada como un factor pronóstico. Hay autores que sugieren una débil relación entre edad avanzada y mayor grado y estadio⁽²⁷⁷⁾. Se ha demostrado que en los pacientes mayores de 65 años el alto grado tumoral es tres veces más frecuente que entre los 50 y 64 años⁽²⁷⁸⁾. Sin embargo, estudios en menores de 40 años no han demostrado que la evolución sea diferente a la de las personas mayores⁽²⁷⁹⁾.

Por lo que se refiere a parámetros biológicos han sido muchos los intentos por encontrar un parámetro que nos defina a los tumores con un comportamiento más agresivo.

Uno de los oncogenes más estudiado en las neoplasias humanas ha sido el oncogén c-erbB-2/neu. Como ya indicamos la sobreexpresión de este oncogén en tumores de mama está considerado como un factor pronóstico independiente.

Ha sido descrito por algunos autores que la expresión de este oncogén condiciona una menor supervivencia en tumores vesicales de células transicionales^(280,281). Por nuestra parte, el análisis cuantitativo de la proteína p185 codificada por el c-erbB-2/neu no demuestra que existan diferencias significativas en la supervivencia entre los pacientes que expresaron mayor concentración de dicha proteína que en aquellos con concentraciones inferiores.

Algo similar sucede con el receptor para el factor de crecimiento epidérmico. Neal et al. informan tras el estudio inmunohistoquímico del EGF-R

en tumores vesicales que el EGF-R puede ser considerado como un factor pronóstico independiente. En nuestra serie no podemos considerar al EGF-R como una variable que influya en la supervivencia de los pacientes.

El p53 sí condicionó un pronóstico más desfavorable. Aquellos tumores con menos del 25% de inmunorreactividad nuclear positiva presentaron una supervivencia significativamente superior a aquellos con más del 25% de células positivas.

Tras realizar la regresión de Cox para determinar cuales de todos los parámetros que en el análisis estadístico univariante habían mostrado diferencias significativas respecto a la supervivencia, sólo encontramos que el estadio tumoral es el único factor pronóstico independiente.

Otro de los hechos que más preocupan de los carcinomas de células transicionales de vejiga es el alto índice de recurrencias que presentan los pacientes portadores de este tipo de neoplasia. Por ello, analizamos el pronóstico no sólo en cuanto a la probabilidad de supervivencia sino en cuanto a la probabilidad de permanecer libre de recidivas de la enfermedad.

El estadio es un factor muy importante de recurrencia, Wolf y cols. han publicado una tasa de recurrencia del 47% en Ta y del 74% en T1. De igual manera, nosotros observamos que el estadio tumoral influía significativamente sobre el hecho de permanecer libre de enfermedad. Un 55%(n=24) de los pacientes con tumores superficiales permanecían libres de enfermedad al final del estudio y tan sólo un 28%(n=2) de los pacientes con tumores infiltrantes no habían sufrido ninguna recidiva.

El grado histológico fue otra de las variables que influyó en la aparición de recurrencia tumoral. Diversos trabajos apuntan que el grado tumoral es en tumores superficiales un factor pronóstico importante para la predicción de posterior recurrencia y progresión. No obstante con la introducción de nuevos parámetros biológicos de relevancia pronóstica, la importancia del grado tumoral como factor pronóstico se ha visto reducida.

La configuración morfológica del tumor junto con la presentación única o múltiple de los mismos no afectó al hecho de mantenerse libre de enfermedad.

De los parámetros biológicos analizados el receptor para el factor de crecimiento epidérmico no determinó un peor comportamiento. En cambio, tanto la expresión de p53 como de p185(neu) condicionaron un mayor porcentaje de recurrencias. Pudimos comprobar como en aquellos tumores con concentraciones de p185(neu) superiores a 875 HNU/mg proteína el intervalo libre de enfermedad fue significativamente inferior al de los tumores con concentraciones por debajo de ese nivel ($p < 0,05$).

Resultados similares se apreciaron con el oncogén p53, la presencia de más de un 25% de células positivas significó un mayor porcentaje de pacientes con recurrencia tumoral.

El análisis multivariable reflejó que ninguna de las variables analizadas se puede considerar factor pronóstico independiente, en lo que a intervalo libre de enfermedad se refiere.

El estudio de la expresión de oncogenes y genes supresores en los carcinomas vesicales de células transicionales posibilita, como se evidencia en este trabajo, la identificación de los tumores más indiferenciados y con peor pronóstico.

Pensamos que es preciso apurar al máximo el estudio de cada espécimen de cáncer vesical resecaado, para aumentar el número y la fiabilidad de las correlaciones clínico-patológicas con el objeto de disponer de nuevos parámetros pronósticos y criterios de selección terapéutica.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las concentraciones de la oncoproteína p185(NEU) y del Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico en tejido neoplásico de carcinomas vesicales de células transicionales son significativamente superiores a las encontradas en tejido urotelial sin afectación tumoral.

2. La expresión de p53 se observó en un alto porcentaje de tumores vesicales, no encontrándose expresión de esta oncoproteína en tejido urotelial sin afectación tumoral.

3. Los tumores de aspecto sólido presentaron una mayor expresión de p53 y del EGF-R que los tumores papilares.

4. No existe una correlación significativa entre la expresión de p185, EGF-R y p53 en carcinomas vesicales y la característica de uni/multifocalidad tumoral.

5. Detectamos una relación significativa entre la expresión de p53 y del EGF-R y el grado de infiltración tumoral, siendo los tumores infiltrantes los que evidenciaron una mayor expresión de los mismos.

6. La expresión de p53 y de EGF-R se asoció significativamente con el grado de diferenciación de Broders. Encontrándose las mayores concentraciones en los tumores más indiferenciados.

7. La expresión de p185(NEU) no mostró correlación con ninguno de los parámetros estudiados.

8. La expresión de p53 se asoció significativamente con una peor supervivencia y con una mayor probabilidad de recaer.

9. Una concentración de p185(NEU) superior a 875 HNU/mg prot conlleva una mayor probabilidad de recaer.

10. La Regresión de Cox determina que sólo el Estadio Tumoral puede ser considerado como factor pronóstico independiente en los tumores vesicales de células transicionales, siendo la oncoproteína p53 la variable que le sigue con mayor relevancia.

11. La determinación de los oncogenes p53, c-erbB-2 y EGF-R permite establecer subgrupos con un peor comportamiento biológico, contribuyendo a la caracterización biológica de este tumor.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. RUSSELL PJ, BROWN JL, GRIMMOND SM, RAGHAVAN D. Molecular biology of urological tumours. Br J Urol 1990; 65:121-30.
2. MARTINEZ PINEIRO JA. Cáncer de vejiga ¿Dónde estamos?. Arch Esp Urol 1990;43(supl 11): 109-12.
3. PAULSON DF. Cap: Principios de Oncología. En: Campbell. Urología. tomoII,5 ed. Ed. Médica Panamericana S.A. 1991; 1372-1399.
4. OZEN H. Bladder cancer. Curr Opin Oncol 1992; 4: 435-41.
5. NOGUEIRA MARCH JL, OJEA CALVO A, CASTRO IGLESIAS AM, RODRIGUEZ IGLESIAS B. Carcinoma superficial de vejiga. El tumor pT1 G3: Progresión, recidiva y supervivencia. Tratamiento. Act Urol Esp 1992;16:682-90.
6. BORRAS J, GALCERAN J, ANGLADA LL et al. El cáncer en Tarragona 1980-1985 (RCT Monografía nº 2) (Registro de Cáncer. Tarragona) Tarragona AECC, abril, 1988.
7. COMISION DE LAS SOCIEDADES ONCOLOGICAS. Libro Blanco de la Oncología en España. Informe para la Planificación Global. Barcelona, Jims, 1988.
8. CALATAYUD A, SABATER A, GONZALEZ JI y cols. Cáncer de vejiga: clasificación de factores de riesgos y evolución de la mortalidad en España (1951-1985). Oncología 1993;- 15:47-57.

Bibliografía

9. **FRAUMENI JF, HOOVER RN, DEVESA SS, KINLEN LJ.** Epidemiology of cancer. En: De Vita Vt, Hellman s, Rosenberg SA (eds). Cancer: Principles and Practice of Oncology. Filadelfia, JB Lippincott, 1989; 196-236.
10. **MARTINEZ PIÑEIRO JA.** Tumores vesicales. Ponencia al Congreso Español de Urología. Palma de Mallorca 1971.
11. **CARDA APARICIO P.** Mortalidad por tumores malignos en España, quinquenio 1970-1974. Rev Esp Onc 1978;25:-515-554.
12. **PASTOR GUZMAN JM, SALINAS SANCHEZ AS, HERNADEZ MILLAN I, MARTINEZ MARTIN M, CAÑAMARES PABOLUZA L, VIRSEDA RODRIGUEZ JA.** Tumor transicional de vejiga en la infancia. Actas Urol Esp 1992;16:523-525.
13. **MALMSTRON PU, BUSH C, NORLEN BJ.** Recurrence, progression and survival in bladder cancer. A retrospective analysis of 232 patients with 5- year follow-up. Scand J Urol Nephrol 1987;21:185-195.
14. **LUTZEYER W, RUBBEN H, DAHM H.** Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases. J Urol 1982;127:250-252.
15. **POCOCK RD, PONDER BAJ, O'SULLIVAN JP et al.** Prognostic factors in non-infiltrating carcinoma of the bladder: A preliminar report. Br J Urol 1982;54:711-715.
16. **MILLER EC, MILLER JA.** Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. Cancer 1981;47:2327-2345.

Bibliografía

17. **TODARO GJ, HUEBNER RJ.** The viral oncogene hypothesis: new evidence. Proc Nat Acad Sci USA 1972; 69: 1009-1015.
18. **CORTES-FUNES, RIVERA F, COLOMER R.** Natural history of cancer and history of oncology pp 3-16. En Updating on Tumor Markers in Tissues and in Biological Fluids. Basic Aspects and clinical applications. Ed. Minerva Médica, Torino 1993.
19. **BIRNER MJ, MINNA JD.** Molecular genetics of lung cancer. Sem in Oncol 1988;15:226-235.
20. **SANTOS E.** Oncogenes y cáncer humano. Seminario: Biología Molecular del Cáncer. Santander, 1992.
21. **VARMUS HE.** Viruses, genes and cancer. I. The discovery of cellular oncogenes and their role in neoplasia. Cancer 1985;55:2324-2328.
22. **BISHOP JM.** Viruses, genes and cancer. II. Retroviruses and cancer genes. Cancer 1985;55:2329-2333.
23. **WANG LH, HALPERN CC, NADEL M, HANAFUSA H.** Recombination between viral and cellular sequences generates transforming sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1978; 75: 5812-5816.
24. **BIGNE R, BREITMAN ML, MOSCOVICI C, VOGT PK.** Restitution of fibroblast-transforming ability in src deletion mutants of avian sarcoma during animal passage. Virology 1979; 93: 413-26.

25. **BISHOP JM.** Enemies within the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 1981; 30: 5-6.
26. **WEINBERG RA.** Fewer and fewer oncogenes. *Cell* 1982; 30: 3-4.
27. **STEHELIN D, VARMUS H.E, BISHOP JM, VOGT PK.** DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976; 260:170
28. **SHEINESS DK, BISHOP JM.** DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J.Virol*, 1979; 31:514.
29. **CHIEN Y, LAI M, SHIH T, VERMA IM, SCOLNICK EM, ROY-BURMAN P, DAVIDSON N.** Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the genomes of kirsten and Harvey sarcoma viruses, their respective parental murine leukemia viruses, and the rat endogenous 30 S RNA. *J. Virol*, 1979; 31:752
30. **ROUSSEL M, SAULE S, LAGRON C, ROMMENS C, BENG H, GRAF R, STEHELIN D.** Three new types of viral oncogenes of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature*, 1979;281:452
31. **SIMEK S, RICE N.** Analysis of the nucleic acid components in reticuloendotheliosis virus. *J Virol*, 1980;33:320

32. OSKARSSON M, Mc CLEMETS WC, BLAIR DG, MAIZEL JV, VANDE WOUDE GF. Properties of a normal mouse cell dna sequence (sarc) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma virus. *Science*, 1980; 207:1222
33. YOSHIDA M, DAWAI S, TOYOSHIMA K. Uninfected avian cells contain structurally unrelated progenitors of viral sarcoma genes. *Nature*, 1980; 287:653
34. FRANKEL AE, GILBERT JH, PORZIG KH, SCOLNIK EM, AARONSON SA. Nature and distribution of feline sarcoma virus nucleotide sequences. *J Virol*, 1979; 30:821
35. FRANKEL AE, FISCHINGER PJ. Rate of divergence of cellular sequences homologous to segments of Moloney sarcoma virus. *J. Virol*, 1977; 21: 153
36. WONG TC, TEREBA A, VOGT PK, LAI MMC. Characterization of the transformation-specific sequences of avian erythroblastosis virus in normal vertebrate cells. *Virology*, 1981; 111: 418
37. WITTE ON, ROSENBERG NE, BALTIMORE D. A normal cell protein cross-reactive to the major Abelson murine leukaemia virus gene product. *Nature*, 1979; 281:396
38. JOSEPHS SF, GUO C, RATNER L, WONG-STAAAL F. Human proto-oncogene nucleotide sequences corresponding to the transforming region of simian sarcoma virus. *Science*, 1984; 487:223
39. RAPP UR, TODARO GJ. Generation of new mouse sarcoma viruses in cell culture. *Science*, 1978; 201: 821

40. RAPP UR, TODARO GJ. Generation of oncogenic mouse type C viruses: In vitro selection of carcinom-inducing variants. Proc Natl Acad Sci USA, 1980;77:624
41. WANG LH, HALPERN CC, NADEL M, HANAFUSA H. Recombination between viral and cellular sequences generates transforming sarcoma virus. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 5812
42. KARESS RE, HAYWARD WS, HANAFUSA H. Cellular information in the genoma of recovered avian sarcoma virus directs the sythesis of transforming protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 76:3154
43. WANG LH, SNYDER P, HANAFUSA H, HANAFUSA T. Evidence for the common origin of viral and cellular sequences involved in sarcomagenic transformation. J Virol, 1980; 35:52
44. WANG LH, MOSCOVICI C, KARESS RE, HANAFUSA H. Analysis of the src gene of sarcoma viruses generated by recombination between transformation-defective mutants and quail cellular sequences. J Virol, 1979; 32: 546
45. NEEL BG, WANG LH, MATHEY-PREVOT B, HANAFUSA T, HANAFUSA H, HAYMARD W. Isolation of 16 L virus: a rapidly transforming sarcoma virus from an avian leukosis virus-induced sarcoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1982; 79: 5088
46. SWANSTROM R, PARKER RC, VARMUS HE, BISHOP JM. Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous

Sarcoma Virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983;80:2519-23.

47. **GOLDFARB MP, SHIMIZU K, PERUCHO M, and WILGLER M.** Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. Nature 1982; 296: 404-409.

48. **PULCIANI S, SANTOS E, LAUVER AV, LONG LK, ROBBINS K, and BARBACID M,** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982; 79: 2845-49.

49. **SLAMON D.J, CLARK G.M, WONG S.G, LEVIN W.J, ULLRICH A, MC GUIRE W.L.** Science 1987; 235: 177-82.

50. **REDDY E.P, REYNOLDS R.K, SANTOS E, BARBACID M.** A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature 1982; 300: 149-52.

51. **BISHOP JM.** Cellular oncogenes and retroviruses. Annu Rev Biochem 1983; 52: 301-354.

52. **FINLAY C, HINDS P, LAVINE A.** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 1989; 57: 1083-1093.

53. **WEINBERG RA.** Tumor suppressor genes. Science 1991; 254: 1138-1146.

54. **BUCKLEY, I.** Oncogenes and the nature of malignancy. Adv. Cancer Res. 1988; 50:71-90.

Bibliografía

55. **VALLADARES Y.** Biología molecular de los cánceres urológicos. En: Fundamentos fisiopatológicos y clínicos de los marcadores tumorales en uro-oncología. Ed. Pulso, Barcelona 1994.
56. **BISHOP JM.** The molecular genetics of cancer. Science, 1987; 235: 305
57. **BISHOP JM.** Molecular themes in oncogenesis. Cell, 1991: 235-248.
58. **BARBACID M.** Oncogenes humanos. Rev Clin Española 1986;179:412-427.
59. **BISHOP JM.** Cellular oncogenes and retroviruses. Ann Rev Biochem 1983;52:301-354.
60. **DALLA-FAVERA R, BREGNI M, ERIKSON J, PATTERSON D, GALLO RC, CROCE CM.** Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocate in burkitt lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1982;24:7824-7827.
61. **BUTTURINI A, STHIVELMAN E, CANAANI E, CALE RP.** Oncogenes in human leukemias. Cancer Invest, 1988;43:-305-316.
62. **CROSSEN PE.** Cytogenetic and molecular changes in chronic B-cell leukemia. Cancer Genet Cytogent, 1990;43:-143-150.
63. **KLEIN G.** Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. Cell

1983;32:311-315.

64. **ARILLA FERREIRO E.** Bases Moleculares del cáncer. Oncología 1991;14:220-230.

65. **DRABKIN HA, BRADLEY C, HART I, BLESKAN J, LI FP, PATTERSON D.** Translocation of c-myc in the hereditary renal cell carcinoma associates with a t(3;8) (p 14.2;q 24.13) chromosomal translocation. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:6980-6984.

66. **WAHL GM.** The importance of circular DNA in mammalian gene amplification. Cancer Res, 1989;49:1333-1340.

67. **FUJITA J, SRIVASTAVA SK, KRAUS MH, RHIM JS, TRONICK SR, AARONSON SA.** Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1985; 82:3849-53.

68. **WEINBERG RA.** Alteration of the genomes of tumor cells. Cancer 1983;51:1971-1975.

69. **KRONTIRIS TG, COOPER GM.** Transforming activity of human tumor DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1981; 78: 1181-84.

70. **TABIN CJ, BRADLEY SM, BARGMANN CI, WEINBERG RA, PAPAGEORGE AG, SCOLNICK EM, DHAR R, LOWY DR, CHANG EH.** Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 1982;300:143-149.

71. **REDDY EP, REYNOLDS RK, SANTOS E, BARBACID M.** A point mutation responsible for the acquisition of transfor

ming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature 1982; 300:149-152.

72. FUJITA J, YOSHIDA O, YUASA Y, RHIM JS, HATANAKA M, AARONSON SA. Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. Nature 1984; 309:464-66.

73. COOPER CS, BLAIR DG, OSKARSSON MK, TAINSKY MA, EADER LA, VANDE WOUDE GF. Characterization of human transforming genes from chemically transformed, teratocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. Cancer Res. 1984; 44:1-10.

74. HUNTER T. Proteínas de oncogenes. Investigación y Ciencia, 1984, 97:48-58

75. PULCIANI S, SANTOS E, LAUVER AV. Oncogenes in solid human tumours. Nature, 1982; 300: 539-49.

76. LAND H, PARADA LF, WEINBERG RA. Tumorigenic Conversion of Primary Embryo Fibroblasts Requires at Least Two Cooperating Oncogenes. Nature 1983;304:596-602.

77. BISHOP JM. The molecular genetics of cancer. Science, 1987;235:305-311.

78. PETO R, ROE FJC, LEE PN, LEVY L, CLACK J. Cancer an aging in mice and men. Br J Cancer 1975;32:411-424.

79. FREEMAN CS, KIMES BW, MARTIN MR, MARKS CL. An overview of tumor biology. Cancer Invest, 1989;7:247-266.

80. **FEARON ER.** Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Surveys* 1992;12:119-136.
81. **VALLADARES Y.** Biología molecular de los cánceres urológicos. En *Fundamentos fisiopatológicos y clínicos de los marcadores tumorales en uro-oncología*. Ed. PULSO, Barcelona 1994.
82. **SCHECHTER AL, STERN DF, VAIDYANATHAN L, DECKER SJ, DREBIN JA, GREENE MI; and WEINBERG RA.** The neu oncogene: an erbB-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312: 513-16.
83. **SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, HOLT JA, WONG SG, KEITH DE, LEVINN WJ, STUART SG, UDOVE J. ULLRICH A, PRESS MF.** Studies of the HER-2/neu proto-oncogenes in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-12.
84. **ANDERSON E. HOWELL T.** Breast Cancer: Oncogenes and suppressor genes. *Ann. Oncol.* 1990;1: 242-3.
85. **LEVINE MN, ANDRULIS I.** The Her-2/neu oncogene in breast cancer: so what is new?. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10:1034-36.
86. **Mc CANN A, DERVAN PA, GULLICK WJ, CARNEY DN.** c-erbB2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990; 65:88-92.
87. **MASUI T, MANN AM, MACATEE TL, GARLAND EM, OKAMURA T, SMITH RA, COHEN SM.** Direct DNA sequencing of the rat neu oncogene transmembrane domain reveals no mutation in

urinary bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, n-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide or N-methyl-N-nitrosourea. Carcinogenesis 1991; 12:1975-78.

88. **BARBACID M.** Oncogenes y Cáncer. En: Barbacid M, Mayor F, Ochoa S, editores. Recientes progresos en etiología del cáncer y patología molecular. Fundación Ramón Areces, Madrid 1989

89. **MORI S, AKIYAMA T, YAMADA Y, et al.** C-erbB-2 gene product, a membrane protein commonly expressed on human fetal epithelial cells. Lab Invest 1989; 61:93-97.

90. **YONEMURA Y, NINOMIYA I, OHYAMA S, et al.** Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. Cancer 1991; 67: 2914-2918.

91. **SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, et al.** Studies of the her-2/neu proto-oncogenes in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244:707-712.

92. **MORIYAMA M, MORISHITA Y, MORI S, AKIYAMA T, KATO T.** Ultrastructural localization of c-erbB-2 gene product in transitional cell carcinoma of the urinary tract. Ultrastruct Pathol 1990; 14:399-405.

93. **MORIYAMA M, AKIYAMA T, YAMAMOTO T, et al.** Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. J Urol 1991; 145:423-427.

94. ZHAU HE, ZHANG X, von ESCHEMBACH AC, et al. Amplification and expression of the c-erbB-2/neu proto-oncogene in human bladder cancer. *MolCarcinog* 1991; 3:254-257.
95. COOMBS LM, PIGOTT DA, SWEENEY E, et al. Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 1991; 63:601-608.
96. McCANN A, DERVAN PA, JOHNSTON PA, GULLICK WJ, CARNEY DN. C-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990; 65:88-92.
97. WRIGHT C, MELLON DE, NEAL DE, JOHNSTON P, COBERTT PP, HORNE CHW. Expression of c-erbB-2 protein product in bladder cancer. *Br J Cancer* 1990; 62:764-765.
98. KAZUNARI S, MASATSUGU M, SHIGEO M, MASAHIRO S, WATANUKI T, TERADA K, OKUHARA E, et al. An Immunohistologic Evaluation of c-erBB-2 Gene Product in Patients with Urinary Bladder Carcinoma. *Cancer* 1992; 15: 2493-7
99. LÖNN U. LÖNNS, NYLEN U, FRIBERG S, and STENKIVIST B: Gene Amplification Detected in Carcinoma Cells from Human Urinary Bladder Washins by the Polymerase Chain Reaction Method. *Cancer* 1993; 71: 3605-10.
100. BARBACID M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:779-827.
101. BARBACID M. Oncogenes and human cancer: cause or consequence?. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1037-42.

102. REDDY EP, REYNOLDS RK, SANTOS E, and BARBACID M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982; 300:149-52.
103. TABIN CJ, BRADLEY SM, BARGMANN CI, WEINBERG RA, PAPAGEORGE AG, SOOLNICK EM, DHAR R, LOWY DR, and CHANG EH. *Nature* 1982; 300: 143-49.
104. TAPAROWSKY E, SUARD Y, FASANO O, SHIMIZU K, GOLDFARB M, and WIGLER M. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982; 300: 762-5.
105. BARBACID M. In *Important Advances in Oncology 1986*. De Vita V, Hellman S, and Rosenberg S, eds. J.B. Lippincott Co, Philadelphia PA, pp 3-22.
106. PULCIANI S, SANTOS E, LAUVER AV, LONG LK, ROBBINS KC, BARBACID M. Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2845-49.
107. VIOLA MV, FROMOWITZ F, ORAVEZ S, DEB S, SCHLOM J. Ras oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and in high grade bladder carcinoma. *J Exp Med* 1985;161:1213-18.
108. REDDY EP, REYNOLDS RK, SANTOS E. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982; 300: 149-52.

109. **TAPAROWSKY E, SUARD Y, FASANO O.** Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single aminoacid change. *Nature* 1982;300:762-5.
110. **TOBIN CJ, BRADLEY SM, BARGMANN CI.** Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982;300:143-149.
111. **JONES RF, DEBIEC, RYCHETER M, ZUKOWSKI K, WANG CY.** Activating missense mutations in Ha-ras-1 genes in a malignant subset of bladder lesions induced by N-butyl-N-(4-hydroxy-butyl)nitrosamine or N-[4-(5-nitro-2-furanyl)-2-thiazolyl]formamide. *Mol Carcinog* 1990;3:393-402.
112. **FEARON ER, FEINBERG AP, HAMILTON SH.** Loss of gene on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature* 195;318:377-80.
113. **DESCOTES F, BITTARD H, REMY-MARTIN A, KHENIFAR E, BITTARD M, ADESSI GL.** Study of ras gene alterations in human bladder tumors. En: Olsson CA. Churchill Livingstone, editores. *Oncogenes and molecular genetics*. Edinburgh 1992.
114. **DELAKAS D, AGNANTIS NJ, PARLIARAS J, GRANIDIS A, SPANDIDOS DA.** The role of ras p21 oncoprotein in human bladder cancer. In: *Oncogenes and molecular genetics*. Ed. Olsson CA. Churchill Livingstone. Edinburgh 1992, 95-102.
115. **ROBERTS AB, SPORN MB.** Principles of molecular cell biology of cancer: Growth factors related to transformation. In: *Cancer: Principles and practice of oncology*.

Eds: De Vita Vt, Hellman s, Rosemberg SA. Philadelphia JB Lippincott company 1989;67-78.

116. **FERNANDEZ D, AYENDE MT, GENOLLA J et al.** Factores de crecimiento y sus receptores. Actas del XVII Congreso Nacional de la SMNN. Med Nucl 1993; 15-30.

117. **WATERFIELD MD.** Growth Factors. Br Med Bull 1989;45-:357-600.

118. **HERNDON DH, NGUYEN TT, GILPIN DA, BCH MB.** Growth Factors. Arch Surg 1993;128:1227-1233.

119. **VEALE D, ASHCROFT T, MARSH C, GIBSON G, HARRIS AL.** EGF Receptors in Non-small Cell Lung Cancer. Br J Cancer 1987;55:513-517.

120. **COHEN S.** Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid openin in the newborn animal. J Biol Chem 1962; 237:1555-1562.

121. **BURGUESS AN.** Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor Alfa. Br Med Bull 1989;45:401-424.

122. **MANJUSRI D, REGANRAJU M, SAMANTHA A.** Epidermal Growth Factor. In Human cytokines. Handbook for basic and clinical research. Boston. Blackwell Scientific Publications. 1992;365-382.

123. **JOHNSON MD, GRAY ME, CARPENTER G, et al.** Ontogeny of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and lipocortin-I in fetal and neonatal human lungs. Human Pathology. 1990;21:182-

124. **DOWNWARD J, YARDEN Y, MAYES E.** Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307: 521-4.
125. **FITZPATRICK SI, BRIGHTWELL J, WITTLIFF JL, BARROWS GH and SCHULTZ GS.** Epidermal growth factor binding by breast tumour biopsies and relationship to oestrogen and progesterin receptor levels. *Cancer Res* 1984; 44: 3448-53.
126. **SAINSBURY JRC, FARNDON JR, SHERERT GU and HARRIS AL.** Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985;i:364-366
127. **LIBERMANN TA, NUSBAUM HR, RAZON N, KRIS R, LAX I, SOREQ H, WHITTLE N, WATERFIELD MD, ULRICH A and SCHLES-SINGER J.** Amplification enhanced expression and possible rearrangement of EGF-receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 1985;313:144-7.
128. **MALDEN LT, NOVAK U, KAYE AH and BURGESS AW.** Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1988;48:2711-14.
129. **DAZZI H, HASLETON PS, THATCHER N, et al.** Expression of epidermal growth factor receptor (EGf-R) in non-small cell Lung Cancer. Use of archival tissue and correlation of EGF-R with histology, tumor size, node status and survival. *Br J Cancer*, 1989; 59:746-749.
130. **BAUKNEEHT T.** The evidence and evaluation of epidermal growth factor receptors and EGF-like factors as prognostic agents in ovarian carcinoma. *J Cell Biochem*

1986, Suppl, 10C:161

131. GULICK WJ, MARSDEN JJ, WHITTLE N, WARD B, BOBROW L and WATERFIELD MD. Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian and vulvar carcinoma. Cancer Res 1986;46:285-92.

132. MESSING E. Growth Factors in human bladder tumours. J Urol 1984;131:111A.

133. BERGER MS, GREENFIELD C, GULLICK WJ, HALEY J, DOWNWARD J, NEAL DE, HARRIS AL and WATERFIELD MD. Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. Br J Cancer 1987;56:533-7.

134. GREGORY H, HOLMES JE, WAILLSHIRE IR. Urogastrone levels in the urine of normal adult humans. J Clin Endocr Metab 1977;45:668-72.

135. NEXO E, LAMBERG S, HOLLENBERG MD. Comparison of a receptor binding assay with radioimmunoassay from measuring of human epidermal growth factors-urogastrone in urine. Scand J Lab Invest 1981;41:577-82.

136. MESSING EM, HANSON P, ULRICH P and ERTURK E. Epidermal Growth Factor-interactions with normal and malignant urothelium: In vivo and in situ studies. J Urol 1987;138:1329-35

137. COLBY WW, CH EN BY, SMITH DH, LEVINSON AD: Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29. Nature 1983;301:722-725.

138. HANN SR, and EISENMANN RN. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. Mol Cell Biol 1984; 4: 2486-97.

139. DONNER P, GREISER-WILKE I, and MOELLING K. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. Nature 1982; 296: 262-9.

140. KELLY K, COCHRAN BH, STILES DE, LEDER P. Cell specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell 1983;35:603-10.

141. HANN SR, THOMPSON CB, EISENMAN RN. c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and acian cells. Nature 195;314:366-369.

142. BRODEUR GM, SEEGER RC, SCHWARB M, VARMUS HE, BISHOP JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. Science 1984;224:1121-24.

143. SEEGER RC, BRODEUR GM, SATHER H, DALTON A, SIEGEL SE, WONG KY, HAMMOND D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. N Engl J Med 1985;313:111-16.

144. DER C, KRONTIRIS T and COOPER G. Transforming genes of hman bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 3637-40.

145. **AGNATIS NJ, APOSTOLIKOS N, SFICOS C.** Immuno-histochemical detection of ras-p21 and c-myc in colonic adenomas and carcinomas. *Hepatogastroenterology* 1991;38:239-242.
146. **RIVIERE A, WILCKENS C, LONING T.** Expression of c-erbB-2 and c-myc in squamous epithelia and squamous cell carcinoma of the head and neck and the lower female genital tract. *J Oral Pathol Med* 1990; 19:408-13.
147. **REW DA, TAYLOR I, COX H, WATSON JV, WILSON GD.** c-myc oncoprotein product as a marker of DNA synthesis but not of malignancy in human gastrointestinal tissues and tumors. *Br J Surg* 1991; 78:1080-83.
148. **FLEMING WH, HAMELA, Mc DONALD R.** Expression of the c-myc proto-oncogene in human prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Res* 1986; 46:1535-8.
149. **NISEN PD, ZIMMERMAN KA, COTTER SV.** Enhanced expression of the N-myc gene in Wilms`tumors. *Cancer Res* 1986; 46:6217-22.
150. **MASTERS JR, VESEY SG, MUNN CF, EVAN GI, WATSON JV.** C-myc oncoprotein levels in bladder cancer. *Urol Res* 1988; 16:341-4.
151. **NIGRO JM, BAKER SJ, PREISINGER AC, JESSUP JM, HOSTETTER R, CLEARY K, BIGNER SH, DAVIDSON et al.** Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342:705-708.

152. **BAKER SJ, FEARON ER, NIGRO JM, HAMILTON SR, PREIN-SINGER AC, JESSUP JM** et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-21.
153. **ELIYAHU RAZ A, GRASS P, GIVOL D, OREN M.** Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984;312:646-9.
154. **FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ.** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1083-93.
155. **MALKIN D, LI FP, STRONG LC, FRAUMENI Jr JF, NELSON CE, KIM DH, HASSEL J, GRYKA MA, BISCHOFF FZ, TANSKY MA, FRIEND SH.** *Science* 1990;250:1233-8.
156. **PROSSER J, THOMPSON AM, CRANSTON G** et al. Evidence that p53 behaves as a tumour suppressor gene in sporadic breast tumours. *Oncogene* 1990;5:1573-9.
157. **LANE D, CRAWFORD L.** T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature*, 1979; 278: 261-4
158. **CRAWFORD LV, PIN DE, BULBROOK RD.** Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403-8
159. **GANNON JV, LANE DP.** Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* 1991;349:802-6.

160. WOLF D, HARRIS N, ROTTER V. Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. Cell 1984; 38:119-26.
161. CHEN PL, CHEN Y, BOOKSTEIN R, LEE W-H. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. Science 1990;250:1576-80.
162. FUJIMOTO K, YAMADA Y, OKAJIMA E, KAKIZOE T, SUGIMURA T, TERADA M. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder carcinoma. Cancer Res, 1992; 52: 1393-98.
163. CERUTTI P, HUSSAIN P, POURZAND C, AGUILAR F. Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the p53 tumor suppressor. Cancer Res 1994; 54(Suppl): 1934s-1938s.
164. JENKINS JR, RUDGE K, CURRIE GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. Nature 1984;312:651-4.
165. BENCHIMOL S. Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogen. Oncogen 1988;2:445-52.
166. ELRYAHU D et al. Coamplification of p53 and ras genes in cell lines. Nature 1984;312:651-54.
167. LEVINE AJ, MOMAND J, FINLEY CA: The p53 tumor suppressor gene. Nature 1991;351:453-6.

168. MATOZAKI T, SAKAMOTO T, SUZUKI T, MATSUDA K, UCHIDA T: p53 gene mutations in human gastric cancer: Wild-type but not mutant p53 supresses growth of human gastric cancer cells. *Cancer Res* 1992;12:4335-41.
169. VOGELSTEIN B: Cancer:A deadly inheritance. *Nature* 1990; 348: 681-2.
170. WRIGHT C, MELLON K, JOHNSTON D, LANE D, HARRIS A, HORNE C, NEAL D. Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br.J.C* 1991; 63:967-70.
171. FOSSA SD, BERNER AA, JACOBSEN AB, WAEHRE H, KVARSTEIN B, URNES T, OGREID P, BJERKLUNDJOHANSEN TE, SILDE J, PETTERSEN EO. Clinical significance of DNA ploidy and S-phase fraction and their relation to p53 protein, c-erbB-2 protein and HCG in operable muscle-invasive bladder cancer. *Br J Cancer*, 1993; 68:572-8.
172. SIDRANSKY D, ESCHENBACH AV, TSAI YC et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 1991; 252:706-9.
173. DE CAPRIO JA, LUDLOW JW, LYNCH D, FURUKOWA Y, GRIFFIN J, PIWINICAWORMS H, HUANG CM, LIVINGSTON DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; 58:1085-95.
174. CHEN PL, SCULLY P, SHEW JY, WANG JYJ, LEE WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is

modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58:1193-8.

175. MIHARA K, CAO XR, YEN A, CHANDLER S, DRISCOLLB, MURPHREE AL, T'ANG A, FUNG YKT. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 246:1300-3.

176. MITTNACHT S, WEINBERG RA. G1/s phosphorylation of the retinoblastoma protein is associates with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* 1991;65:381-93.

177. TEMPLETON DJ, PARK SH, LANIER L, WEINBERG RA. Nonfunctional mutants of the retinoblastoma protein are characterized by defects in phosphorylation, viral oncoprotein association and nuclear tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:3033-37.

178. PRESTI JC, REUTER VE, GALAN T. Molecular alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* 1991; 51:5405-9.

179. BRODERS AC: Epithelioma of the genitourinary organs. *Ann Surg*, 1922; 75:574-80.

180. MARSHALL VF. The relation of the preoperative estimate to the pathologic demonstration of the extent of vesical neoplasms. *J Urol* 1952; 68: 714-23.

181. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL et al. Protein measurements with Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-269.

182. **KAPLAN EL, MEIER P.** Non parametric stimation from incomplete observation. J Am Stat Assoc 1984; 38:511-35.
183. **NOGUEIRA JL, OJEA A, CASTRO I, RODRIGUEZ .** Carcinoma superficial de vejiga. El tumor pT1 G3: Progresión, recidiva y supervivencia. Tratamiento. Actas Urol Esp, 1992; 16: 682-690.
184. **WATERHOUSA J. SHANMUGARATNAM K, MUIR C, POWELL J(EDS).** Cancer incidence in five continents. (Vol IV). Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1982.
185. **FELDMAN AR, KESSLER L, MYERS MH, NAUGHTON MD.** The prevalence of cancer: estimates based on the Connecticut Tumor Registry. N Engl J Med, 1986; 315: 1394-1397.
186. **SILVERBERG E, BORING CC, SQUIRES TS.** Cancer statistics, 1990. CA 1990; 40: 9-26.
187. **MORENO SIERRA J, GOMEZ RUIZ JJ, ORTEGA HEREDIA MD, BLANCO JIMENEZ E, SILMI MOYANO A, BLAZQUEZ IZQUIERDO J, CORRAL ROSILLO J, RODRIGUEZ MOLINA J, RAMIREZ FERNANDEZ JC, RESEL ESTEVEZ L.** Conceptos básicos en la utilización de los marcadores tumorales en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias vesicales malignas. Arch Esp Urol 1993; 46: 187-98.
188. **MORENO SIERRA J. RESEL ESTEVEZ L.** Estado actual de los marcadores tumorales en las neoplasias uroteliales malignas. En: Resel L, Moreno J, Ortega MD, Maestro ML, editores. Fundamento fisiopatológicos y clínicos de los marcadores tumorales en Uro-Oncología. Actualizaciones urológicas. Pulso Ediciones S.A. Barcelona. 1994.

Bibliografía

189. **DROLLER MJ.** Transitional cell cancer: upper tracts and bladder. In: **WALSH PC, GITTES RF, PERLMUTTER AD et al (eds)** Campbell`s urology. Saunders, Philadelphia, p 1343.
190. **KAKIZOE T, MATSUMOTO K, NISHIO Y et al.** Analysis of 90 step-sectioned cystectomized specimens of bladder cancer. *J Urol*, 1984; 131: 467-72.
191. **MOSTOFI FK, DAVIS CJ, SESTERHENN IA.** Pathology of tumors of the urinary tract. In: **Skinner DG, Lieskovsky G, eds.** Diagnosis and management of genitourinary cancer. Philadelphia: W.B Saunders, 1988: 83-117.
192. **GREEN LF, HANASH KA, FARROW GM.** Benign papilloma or papillary carcinoma of the bladder?. *J Urol*, 1973; 110: 205-7.
193. **HENEY NM, AHMED S, FLANAGAN M.** Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol*, 1983; 130: 1083-6.
194. **BIRCH BRP, HARLAND SJ.** Review: The pT1 G3 bladder tumor. *Br J Urol*, 1989; 64: 109-16.
195. **LEWIS S, LOCKER A, TODD JH.** Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. *J Clin Pathol*, 1990; 43: 385.
196. **SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, et al.** Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989; 244: 707-12.

197. **SLACK NH, PROUT GR.** The heterogeneity of invasive bladder carcinoma and different responses to treatment. J Urol 1980; 123:644-52.
198. **WHITMORE WF.** Integrated irradiation and cystectomy for bladder cancer. Br J Urol 1980;52:1-9.
199. **KAYE KW, LANGE PH.** Mode of presentation of invasive bladder cancer: reassessment of the problem. J Urol 1982; 128:31-3.
200. **JEWETT HJ, KING LR, SHELLEY WM.** A study of 365 cases of infiltrating bladder cancer: relation of certain pathological characteristics to prognosis after extirpation. J Urol 1964: 668-78.
201. **VIOLA MV, FROMOWITZ F, ORAVEZ S, DEB S, SCLOM J.** Ras oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. J Exp Med 1985; 161:1213-8.
202. **MASTERS JR, VESKY SG, MUNN CF, EVAN GI, WATSON JV.** C-myc oncoprotein levels in bladder cancer. Urol Res 1988; 16:341-4.
203. **BORLAND RN, BRENDLER CB, ISAACS WB.** Molecular biology of bladder cancer. Hematol-Oncol-Clin-North-Am, 1992; 6: 31-9.
204. **BAKER SJ, FEARON ER, NIGRO JM et al.** Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 1989; 244:217-21.

205. **NIGRO JM, BAKER SJ, PRESINGER AC et al.** Mutations in the p53 gene occur in diverse tumor types. *Nature* 1989; 324:705-8.
206. **TAKAHASHI R, HASHIMOTO T, XU HJ et al.** The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:5257-61.
207. **CATTORETTI G, RILKE F, ANDREOLA S, D'AMATO L and DELIA D.** p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988, 41:178-80
208. **VAN DEN BERG.** *Br.J.Cancer* 1989, 61:967-70
209. **IGGO R, GATTER K, BARTEK J, LANE D, and HARRIS AL.** Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990,i,675.
210. **SOIM Y, RAAKO P, NURVA K.** Comparative analysis of p53 protein immunoreactivity in prostatic, lung and breast carcinoma. *Virchows Arch A* 1992;42(3):223-6.
211. **DEI TOS AP.** p53 protein expression in non-neoplastic of soft tissue. *Histopathology* 1993,1:45-50
212. **BELL.** Prognostic value of p53 overexpression and K-ras gene mutation in colorectal cancer. *Gastro-enterology* 1983;104(4):57-64.
213. **WRIGHT C, MELLON K, JOHNSTON P, LANE DP, HARRIS AL, HORNE CH.** Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell

carcinoma of the human urinary bladder. Br J Cancer 1991;63:967-70.

214. SIDRANSKY D, VON ESCHENBACH A, TSAI YC. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. Science 1991; 252:706-9.

215. WEE A, TEH M, RAJU GC. Clinical importance of p53 protein in gall bladder carcinoma and its precursor lesions. J Clin Pathol 1994, 47:453-6.

216. YE DW, ZHENG JF, QIAN SX, MA YJ. Expression of p53 producto in Chinese human bladder carcinoma. Urol Res 1993, 21:223-6.

217. SARKIS AS, DALBAGNI G, CORDON CARDO C. Nuclear overexpression of p53 protein n transitional cell bladder cancer: a marker for disease progression. J Nat. Cancer Inst, 1993; 85:53-9.

218. SARKIS AS, DALBAGNI GD, MELAMED. p53 nuclear overexpression in carcinoma in situ and in non-invasive papillary transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 1993

219. SPRUCK CH, ESRIG D, GONZALEZ M, OHNESEIT PF. p53 mutation: an early event in the formation of transitional cell cancer in situ. J Urol 1993; 149:95

220. KAMEL D, SOINI Y, NUORVA K, KHALIFA A, MANGOUD A, VAHAKANGAS K, PAAKKO P. p53 and c-erbB-2 expression in schistosomal urinary bladder carcinomas and schistosomal cystitis with premalignant lesions. Virchows Arch 1994,

424(4):349-55.

221. **WATERFIELD MD.** Growth Factors. Br.Med.Bull, 1989; 45:357-600.

222. **FERNANDEZ D., AYENDE MT., GENOLLA J.** Factores de Crecimiento y sus Receptores. Actas del XVII Congreso Nacional de la SMNN. Medicina Nuclear 1993; 15-30.

223. **OZANNE B., RICHARDS CS., HENDLER F., BURNS D.** Overexpression of the EGF-R is a hall mark of squamous cell carcinomas. J.Pathol. 1986; 149: 9-14.

224. **HERNDON DH., HAYWARD PG., RUTAN RL., BARROW RE.** Growth hormones and factors in surgical patients 1993; 1:65-97.

225. **SAINSBURY JRC, MALCOLM AJ, APPLETON DR, FARNDON JR, HARRIS AL.** Presence of epidermal growth factor receptors as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. J.Clin.Pathol 1985;38:1225-1228.

226. **SAINSBURY JRC, SHERBERT GV, FARNDON JR, HARRIS AL:** Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. Lancet 1985;i:364-366.

227. **SAINSBURY JRC, FARNDON JR, NEEDHAM GK, MALCOLM AJ, HARRIS AL:** Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. Lancet 1987; i:1398-1402.

228. **BAUKNECHT T:** The evidence and evaluation of epidermal growth factor receptors and EGF like factors as prognostic agents in ovarian carcinomas. J Cell Biochem

1986(suppl 10C): 161.

229. GULLICK WJ, MARSDEN JJ, WHITTLE N, WARD B, BOBROW L, WATERFIELD MD: Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian and vulval carcinomas. *Cancer Res* 1986;46:285-292.

230. MESSING E: Growth factors and human bladder tumors. *J Urol* 1984; 131:111A.

231. GUSTERSON B, COWLEY G, SMITH JA, OZANNE B: Cellular localisation of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Int Rep* 1984;8:649-658.

232. NEAL DE, SMITH K, FENNELLY JA, BENNETT MK, HALL RR, HARRIS AL. Epidermal growth factor in human bladder cancer: A comparison of immunohistochemistry and ligand binding. *J Urol*, 1989;141:517-521.

233. WOOD DP, FAIR WR, CHAGANTI RS. Evaluation of epidermal growth factor receptor DNA amplification and mRNA expression in bladder cancer. *J Urol* 1992;147(1):-274-7

234. BERGER MS, GREENFIELD C, GULLICK WJ, HALEY J, DOWNWARD J, NEAL DE, HARRIS AL, WATERFIELD MD: Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. *Br J Cancer* 1987;56:533-537.

235. MESSING EM, HANSON P, ULRICH P, ERTURK E. Epidermal growth factor interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J Urol* 1987; 138:1329-32.

236. **ANDERSTROM C, JOHANSSON S, NILSSON S.** The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumours. *J Urol* 1980;124:23-26.
237. **HENEY NM, NOCKS BN, DALY JJ et al.** Ta and T1 bladder cancer: Location, recurrence rate of newly diagnosed superficial bladder cancer: An MRC trial. *Br J Urol* 1985;57:680-685.
238. **LUTZEYER W, RUBBEN H, DAHM H.** Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases. *J Urol* 1982; 127:250-253.
239. **NEAL DE, MELLON K.** Epidermal growth factor receptor and bladder cancer: A review. *Urol Int* 1992;48:365-371.
240. **NEAL DE, SHARPLES L, SMITH K, FENNELLY J, HALL RR, HARRIS AL:** The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990; 65: 1619-25.
241. **SMITH K, FENNELLY JA, NEAL DE, HALL RR and HARRIS AL.** Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and Supeficial bladder tumors. *Cancer Res.* 1989; 49: 5810-15.
242. **MORENO SIERRA J, MAESTRO DE LAS CASAS M, ORTEGA HEREDIA MD, HERMIDA GUTIERREZ J, RESEL ESTEVEZ L.** Dosificación cuantitativa del receptor urotelial del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en carcinomas vesicales superficiales e invasivos. *Actas Urol Esp* 1994; 18: 215-22.

243. GULLICK WJ, BERGER MS, BENNETT PLP, ROTHBARD JB and WATERFIELD MD. Expression of the c-erbB-2 protein in normal and transformed cells. *Int J Cancer*, 1987;40:246-
244. TAL M, WETZLER M, JOSEFBERG Z, et al. Sporadic amplification of the HER2/neu protooncogene in adenocarcinomas of various tissues. *Cancer* 1988; 48:1517-
245. SCHENEIDER PM, HUNG MC, CHIOCCA SM et al. Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1989;-49: 4968-72
246. WEINER DB, NORDBERG J, ROBINSON R, NOWELL PC, GAZDAR A, GREENE MI, WILLIAMS WV, COHEN JA, KERN JA . Expression of the neu gene-encoded protein (p185^{neu}) in human non-small cell carcinomas of lung. *Cancer Res* 1990;50:421-5
247. BARNES DM, LAMMIE GA, MILLS RR, GULLICK WJ, ALLEN DS, ALTMAN DG. An immunohistochemical evaluation of c-erbB.2 expression in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 1988;58:448-
248. NATALI PG, NICOTRA MR, BIGOTTI A, BENTURO I, SLAMON DJ, FENDLY BM, ULLRICH A. Expression of the p185 encoded by HER-2-oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 45:457
249. YONEMURA Y, NINOMIYA I, YAMAGUCHI A, FUSHIDA S, KIMURA H, OHYAMA S, MIYAZAKI I, ENDOR Y, TANAKA M, SASAKI T. Evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in

gastric cancer. *Cancer Res*, 1991;51:1034-

250. **SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL.** Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987;235:177-181

251. **MCCANN A, DERVAN PA, JOHNSTON PA, GULLICK WJ, CARNEY DN.** C-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990; 65: 88-92.

252. **SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, et al.** Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989; 244: 707-712.

253. **MORIYAMA M, AKIYAMA T, YAMAMOTO T, et al.** Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol*, 1991; 145:423-427.

254. **YONEMURA Y, NINOMIYA I, OHYAMA S, et al.** Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer*, 1991; 67: 2914-18.

255. **GU FL, SHEN JC, ZHOU AR, GE ZL.** Amplification and expression of the c-erbB-2 and c-myc proto-oncogenes in bladder and renal cell carcinoma. In: *Oncogenes and molecular genetics of urological tumors*. Ed. Olsson CA. Churchill Livingstone. Edinburgh 1992, 103-110.

256. WOOD DO, WARTINGER DD, REUTER V, CORDON C, FAIR WR, CHAGANTI RSK. DNA, RNA and immunohistochemical characterization of the HER-2/neu oncogene in transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 1992, 146: 1398-1401.
257. NAKOPOULOU L, ZERVAS A, ZOLOTA V, FILKTOPOULU D, DIMOPOULUS G. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor and protooncogene erbB2 in transitional cell carcinoma of the bladder. En: Oncogenes and molecular genetics of urological tumors. Ed. Olsson CA. Churchill Livingstone. Edinburgh 1992.
258. HILTON DA, WEST KP. c-erbB2 oncogene product expression and prognosis in gastric cancer. J Clin Pathol 1992;45:454-456.
259. KAMEDA T, YASUI W, YOSHIDA K, TSUJIRO T, NAKAYAMA H, et al: Expression of ErbB2 in human gastric cancer: relationship between p185 expression and the gene amplification. Cancer Res 1990; 50:8002-8009.
260. YONEMURA Y, NINOMIYA I, OYAMA S, KINURA H, et al: Expression of c-erbB2 oncoprotein in gastric carcinoma. Cancer 1991;67:2914-2918.
261. YONEMURS Y, NINOMIYA I, YAMAGUCHI A, FUSHIDA S, KIMURA H et al: Evaluation of immunoreactivity for erbB2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric carcinoma. Cancer Res 1991;51:1034-1038.
262. JAEHNE J, URMACHER C, THALER HT, FRIEDLANDER-KLER H, et al: Expression of HER 2/neu oncogene product p185 in correlation to clinicopathological and prognostic

factors of gastric cancer. J Cancer Res Clin Oncol 1992;118:474-479.

263. **WRIGHT C, MELLON K, JOHNSTON P, LANE DP, HARRIS AL, HORNE CHW and NEAL DE.** Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder.

264. **JEWETT HJ, STRONG GH.** Infiltrating carcinoma of the bladder:relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of local extension and metastases. J Urol 1946;55:366-72.

265. **MARSHALL VF.** The relation of the preoperative estimate to the pathologic demonstration of the extent of vesical neoplasms. J Urol 1952;68:714-23.

266. **RICHIE JP, SKINNER DG, KAUFMAN JJ.** Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: 16 years experience. J Urol 1975;113:186-89.

267. **ANDERSTROM C, JOHANSSON S, NILSSON S.** The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors. J Urol 1980;124:23-26.

268. **PORTILLO JA, VAL F, GARIFO F Y COLS.** Factores pronósticos de 243 carcinomas transicionales de vejiga II:parámetros microscópicos tumorales y estadio. Arch Esp Urol 1991;44:161-168.

269. **WOLF H.** Factores pronósticos del carcinoma de vejiga. En: E Díaz Rubio, (ed.). Arán Revisiones en Cáncer 2. Madrid, 1992; 793--799.

270. **CODES M, BARROS MM, ALBERO A.** Carcinoma de vejiga. En: M. González Barón (ed.), McGraw-Hill Interamericana, Oncología Clínica II. Patología especial, Madrid, 1992:276-93.
271. **LUTZEYER W, RUBBEN H, DAHM.** Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. *J Urol* 1982;127:250-253.
272. **KERN WH.** The grade and pathologic stage of bladder cancer. *Cancer* 1984;53:1185-1189.
273. **SKINNER DG.** Current perspectives in the management of high-grade invasive bladder cancer. *Cancer* 1980;45:- Suppl:1866-74.
274. **SHIPLEY WU, ROSE MA, PERRONE TL, MANNIX CM, HENEY NM, PROUST GR.** Full-dose irradiation for patients with invasive bladder carcinoma: clinical and histologic factors prognostic of improved survival. *J Urol* 1985;- 134:679-83.
275. **CARBIN BE, EKMAN P, GUSTAFSON H Y COLS.** Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypic and mitotic frequency I. Histological description. *J Urol*, 1991;145:968-971.
276. **HENEY NM, PROPPE K, PROUT GR, GRIFFIN PP, SHIPLEY WU.** Invasive bladder cancer: tumor configuration, lymphatic invasion and survival. *J Urol* 1983;130:895-897.

Bibliografía

277. PORTILLO JA, VAL F. MARTINB Y COLS. Factores pronósticos de 243 carcinomas transicionales de vejiga I: parámetros clínicos y macroscópicos del tumor. Arch Esp Urol 1991;44:151-158.
278. BRIGS NC, YOUNG TB, GILCHVIST KW Y COLS. Age as a predictor of an aggressive clinical course for superficial bladder cancer in men. Cancer, 1992;69:1445-1451.
279. KIRKALI Z, ERYIGIT M. Carcinoma of the bladder in patients less than 40 years old. Int Urol Nephrol, 1991;23:337-339.
280. MORIYAMA M, AKIYAMA T, YAMAMOTO T, KAWAMOTO T, KATO T, SATO K, WATANUKI T, HIKAGE T, KATSUTA N, and MORI SH. Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. J Urol 1991;145:423-427.
281. SATO K, MOTYAMA M, MORI SH, SAITO M, WATANUKI TS, TERADA K, OKUHARA E, AKIYAMA T, TOYOSHIMA K, YAMAMOTO R and KATO T. An immunohistologic evaluation of c-erbB.2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. Cancer 1992;70:2493-2498.