

# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Programa Doctorado 040 F 991 Cirugía y sus especialidades



**Utilidad clínica de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos  
en el tumor vesical urotelial papilar sin invasión de la muscular  
propia (pTa/pT1) grado 2**

**Tesis Doctoral presentada por:**

**José Antonio March Villalba**

**Dirigida por:**

**Dr. José María Martínez Jabaloyas**

**Dr. David Ramos Soler**

**Dra Cristina Doménech Pérez**

**Valencia, 2015**



**D. José María Martínez Jabaloyas**, Profesor Asociado Asistencial de Urología del Departamento de Cirugía de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València,

**D. David Ramos Soler**, Profesor Titular del Departamento de Patología Humana de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València,

**D<sup>a</sup> Cristina Domenech Pérez**, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València,

### **CERTIFICAN**

Que el trabajo presentado por D José Antonio March Villalba, con el tema “Utilidad clínica de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en el tumor vesical urotelial papilar sin invasión de la muscular propia grado 2”, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Valencia a diecisiete de Julio de dos mil quince

Firmado:

Firmado:

Firmado

.....



## **Agradecimientos**

***“A mis padres José y María Teresa que son los Ingenieros, a mi mujer Katherine Eloise que es quien lo acciona y a mis hijos Katherine Julia y José Antonio que son la energía de este motor que soy yo”.***

*“Cuando comienzas a intentar resolver un problema, las primeras soluciones que se te vienen a la cabeza son muy complejas y por eso la mayor parte de la gente se queda parada cuando llega a este punto. Pero si sigues, vives con el problema y pelas más capas de la cebolla, llegas a menudo a soluciones muy elegantes y muy simples. Tienes que trabajar duro manteniendo tu mente clara para hacer las cosas simples. Vale la pena llegar hasta el final con esto, porque cuando terminas puedes mover montañas”. Steve Paul Jobs 1955-2011.*

*Agradecido también a Laura Martínez García y a David Hervás Marín por su dedicación.*



## ÍNDICE

Lista de abreviaturas .....	13
Lista de tablas.....	15
Lista de figuras .....	17
Introducción .....	21
1. El tumor vesical urotelial papilar sin invasión de la muscularpropia.....	21
1.1. Epidemiología.....	21
1.2. Definición histopatológica y clasificación TNM /OMS2004 .....	23
1.3. Diagnóstico y tratamiento .....	31
1.4. Variables clásicamente utilizadas para predecir el pronóstico de un tumor vesical papilar urotelial sin invasión de la muscular propia (pTa/pT1) .....	34
1.4.1. Variables clínicas.....	34
1.4.1.1. Edad.....	34
1.4.1.2. Sexo (género) .....	35
1.4.1.3. Diabetes mellitus.....	36
1.4.1.4. Hipertensión arterial .....	37
1.4.1.5. Exposición laboral .....	37
1.4.1.6. Consumo de tabaco.....	38
1.4.1.7. Consumo de alcohol.....	39
1.4.2. Variables anatomo-patológicas .....	40
1.4.2.1. Estadio tumoral (pTa/pT1) .....	40
1.4.2.2. Grado tumoral (OMS 1973) .....	41

1.4.2.3. Volumen, tamaño y disposición tumoral.....	42
1.5. El tumor vesical urotelial papilarsin invasión de la muscular propia de grado 2 y su comportamiento incierto .....	43
1.5.1.Reproductibilidad de la puntuación EORTC/CUETO	43
1.5.2. De la clasificación OMS 1973 a la OMS 2004..	46
2. Expresión de los marcadores inmunohistoquímicos en el tumor vesical sin invasión de la muscular propia .....	49
2.1. Tipos de rutas oncogénicas y sus marcadores moleculares más característicos .....	52
2.1.1. Reguladores del ciclo celular / promotores de la proliferación celular.....	52
2.1.1.1. P53.....	53
2.1.1.2. Ciclinas.....	56
2.1.1.3. PRb .....	57
2.1.1.4. P21.....	57
2.1.1.5. P27.....	58
2.1.1.6. P16INK4A.....	59
2.1.1.7. P14.....	59
2.1.1.8. Topoisomerasa-II $\alpha$ .....	60
2.1.1.9. Ki 67 (MIB 1).....	61
2.1.2. Moduladores de la apoptosis .....	61



2.1.2.1. Bcl-2.....	64
2.1.2.2. Survivina .....	65
2.1.2.3. Telomerasa humana.....	66
2.1.2.4. CtIP .....	67
2.1.2.5. Wwox .....	68
2.1.2.6. C-kit .....	68
2.1.3. Moléculas moduladoras de la matriz extracelular .....	69
2.1.3.1. CK 20.....	69
2.1.4. Moduladores de la angiogénesis .....	70
2.1.4.1. VEGF .....	70
2.1.5. Factores de transducción de señales y marcadores del metabolismo celular .....	71
2.1.5.1. GAPDH.....	72
2.1.5.2. COX-2.....	73
2.1.5.3. Racemasa .....	73
Hipótesis.....	77
Objetivos .....	79
Material y métodos .....	81
1. Planteamiento metodológico.....	81
2. Determinación inmunohistoquímica .....	83
2.1 Construcción de las matrices tisulares.....	84
2.1.1 Recogida de bloques donantes y preparaciones histológicas: selección de áreas ..	84
2.1.2 Confección de las planillas .....	85

2.1.3	Preparación de las matrices.....	85
2.1.4	Consolidación del bloque.....	88
2.2	Técnica inmunohistoquímica .....	88
2.2.1	Relación de anticuerpos utilizados en la determinación inmunohistoquímica .....	95
2.3	Interpretación de los resultados .....	100
3.	Gestión de datos .....	102
4.	Análisis estadístico y presentación de resultados....	104
4.1.	Análisis descriptivo de las variables estudiadas	105
4.1.1	Análisis descriptivo de las variables dependientes .....	105
4.1.2	Confección del mapa de los perfiles de expresión inmunohistoquímica .....	106
4.1.3	Análisis descriptivo de los grupos anatomopatológicos TNM/Grado OMS 2004 y la supervivencia .....	108
4.2	Selección de variables predictoras mediante análisis multidimensional .....	108
4.3	Construcción de grupos de riesgo y análisis de la supervivencia como ejemplo de la selección de variables .....	111
	Resultados .....	113
1.	Descripción general de las variables .....	113
1.1	Variables clínicas.....	113

1.2	Variables anatomopatológicas clásicas .....	115
1.3	Variables de la expresión de marcadores	
	Inmunohistoquímicos .....	116
1.3.1	Relación de la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos, el estadio TNM y la clasificación de la OMS 2004 .....	123
1.4	Características generales del seguimiento. Recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica .....	133
1.4.1	Relación de los tiempos de supervivencia (recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica) y el estadio TNM y la clasificación de la OMS 2004 .....	135
2.	Selección de variables predictoras .....	141
2.2	Comparativa de los modelos de análisis estadístico multidimensional LASSO y RSF en cuanto a la selección de variables predictoras de los tiempos de supervivencia.....	141
2.2.1	Resultados con respecto al tiempo libre de recidiva .....	141
2.2.2	Resultados con respecto al tiempo libre de progresión .....	146
2.2.3	Resultados con respecto al tiempo libre de mortalidad cáncer-específica .....	151

3. Confección del perfil de alto riesgo clínico .....	162
3.1 Análisis del perfil de alto riesgo con respecto al periodo libre de recidiva .....	162
3.2 Análisis del perfil de alto riesgo con respecto al periodo libre de progresión .....	166
3.3 Análisis del perfil de alto riesgo con respecto al periodo libre de mortalidad cáncer-específica .....	170
Discusión .....	173
Conclusiones .....	213
Bibliografía .....	217
Documentación anexa.....	235

## Lista de abreviaturas.

**TVu:** tumor vesical urotelial papilar

**NoMinv:** no invasión de la muscular propia

**TNM:** estadio /afectación ganglionar / metástasis

**G:** grado tumoral

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**BCG:** bacilo de Calmette-Guérin

**EORTC:** *European organisation for research and treatment of cancer.* Organización europea para el estudio y tratamiento del cancer

**CUETO:** Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico

**HRP:** moléculas de Peroxidasa

**pTaBG:** tumor vesical Ta de bajo grado (OMS 2004)

**pTaAG:** tumor vesical Ta de alto grado (OMS 2004)

**pT1BG:** tumor vesical T1 de bajo grado (OMS 2004)

**pT1AG:** tumor vesical T1 de alto grado (OMS 2004)

**RSF:** *Random Survival Forest.* Bosques aleatorios de supervivencia

**LASSO:** *Least absolute shrinkage and selection operator*

Regresión penalizada

**AM:** análisis multidimensional



## Lista de tablas

### Introducción

**Tabla 1:** Clasificación TNM del tumor vesical ..... 27

**Tabla 2:** Relación de marcadores inmunohistoquímicos y su estudio en el tumor vesical..... 74

### Material y métodos

**Tabla 3:** Relación de anticuerpos utilizados en la determinación inmunohistoquímica ..... 95

### Resultados

**Tabla 4:** Variables clínicas de los pacientes intervenidos quirúrgicamente que presentaron un tumor vesical urotelial no músculo-invasivo de grado 2 (OMS 1993)..... 114

**Tabla 5:** Variables anatomopatológicas de los tumores uroteliales no músculo-invasivos de grado 2 (OMS 1973) ..... 116

**Tabla 6:** Valores obtenidos por los marcadores inmunohistoquímicos de expresión citoplasmática, ordenados según máximos..... 117

**Tabla 7:** Valores obtenidos por los marcadores de expresión inmunohistoquímica nuclear, ordenados de mayor a menor media.118

**Tabla 8:** Descripción de los valores obtenidos por los marcadores de expresión inmunohistoquímica nuclear según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) ..... 126

**Tabla 9:** Variables seleccionadas por los modelos estadísticos LASSO y RSF que influyen en la presencia de un menor tiempo libre de recidiva.....146

**Tabla 10:** Variables seleccionadas por los modelos estadísticos LASSO y RSF que influyen en la presencia de un menor tiempo libre de progresión.....151

**Tabla 11:** Variables seleccionadas por los modelos estadísticos LASSO y RSF que influyen en la presencia de un periodo libre de mortalidad cáncer-específica corto..... 156

**Tabla 12:** Marcadores inmunihistoquímicos seleccionados por los modelos estadísticos LASSO y RSF ..... 157

**Tabla 13:** Diferencias en la probabilidad de supervivencia y la mediana de recidivas entre los pacientes con TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973) estratificados según estadio TNM y grado OMS 2004, la puntuación de la EORTC y el perfil generado en el estudio..... 164

**Tabla 14:** Diferencias en la probabilidad de progresión y la mediana de supervivencia entre los pacientes con TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973) estratificados según estadio TNM/grado OMS 2004, la puntuación de la EORTC y el perfil generado en el estudio ..... 167

**Tabla 15:** Diferencias en la probabilidad de supervivencia cáncer-específica entre los pacientes con TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973) estratificados según estadio TNM/grado OMS 2004, la puntuación de la EORTC y el perfil generado en el estudio. .... 171



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Histología vesical y estadios del tumor vesical .....	26
<b>Figura 2.</b> Equivalencia entre la clasificación OMS 1973 y la clasificación OMS 2004 de los tumores uroteliales papilares .....	28
<b>Figura 3.</b> Construcción y análisis de una matriz tisular a partir de muestras fijadas en formaldehído y embebidas en parafina.....	99
<b>Figura 4.</b> Cortes histológicos de los cilindros originados, tinción en hematoxilina-eosina. ....	101
<b>Figura 5.</b> Inmuntinción de los cortes histológicos de cilindros.....	101
<b>Figura 6.</b> Esquema de la construcción de los mapas tridimensionales de la expresión inmunohistoquímica de los marcadores analizados en el estudio .....	107
<b>Figura 7.</b> Distribución topográfica de la expresión inmunohistoquímica de los marcadores CK 20 y Bcl-2.....	119
<b>Figura 8.</b> Mapa coroplético 2D de la intensidad de expresión inmunohistoquímica citoplasmática en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	120
<b>Figura 9.</b> Expresión inmunohistoquímica nuclear en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	121
<b>Figura 10.</b> Mapa tridimensional del patrón de expresión inmunohistoquímica en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973) .....	122
<b>Figura 11.</b> Expresión inmunohistoquímica citoplasmática según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	124
<b>Figura 12.</b> Patrón de expresión inmunohistoquímica de los marcadores nucleares según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	125

<b>Figura 13.</b> Patrón de expresión inmunohistoquímica de los marcadores nucleares según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	126
<b>Figura 14.</b> Distribución topográfica de la expresión inmunohistoquímica del marcador CK 20 según los grupos histológicos(TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973). ....	128
<b>Figura 15.</b> Distribución topográfica de la expresión inmunohistoquímica del marcador Bcl-2 según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	129
<b>Figura 16</b> Mapa tridimensional del patrón de expresión inmunohistoquímica en los distintos grupos histológicos (TNM/Grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2. Relación de los marcadores..	131
<b>Figura 17.</b> Mapa tridimensional del patrón de expresión inmunohistoquímica en los distintos grupos histológicos (TNM/Grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973). ....	132
<b>Figura 18.</b> Curvas de supervivencia referentes a los tiempos libres de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica de los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	134
<b>Figura 19.</b> Curva de supervivencia del periodo libre de recidiva con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	135
<b>Figura 20.</b> Curva de supervivencia del periodo libre de recidiva con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	136
<b>Figura 21.</b> Curva de supervivencia del periodo libre de progresión con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	137
<b>Figura 22.</b> Curva de supervivencia del periodo libre de progresión con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	138

<b>Figura 23.</b> Curva de supervivencia del periodo libre de mortalidad cáncer-específica con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	139
<b>Figura 24.</b> Curva de supervivencia del periodo libre de mortalidad cáncer-específica con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	140
<b>Figura 25.</b> Variables predictoras de un tiempo libre de recidiva más corto seleccionadas por LASSO.....	142
<b>Figura 26.</b> Clasificación de las variables según la capacidad de predicción de un tiempo libre de recidiva corto tras el análisis RSF .....	143
<b>Figura 27.</b> Distribución de las variables seleccionadas por RSF con respecto a la probabilidad de presentar un periodo libre de recidiva corto.....	145
<b>Figura 28.</b> Variables predictoras de tiempo libre de progresión corto seleccionadas por LASSO.....	147
<b>Figura 29.</b> Clasificación de las variables según la capacidad de predicción de un tiempo libre de progresión corto tras el análisis RSF .	148
<b>Figura 30.</b> Distribución de las variables seleccionadas por RSF con respecto a la probabilidad de presentar un periodo libre de progresión corto. ....	149
<b>Figura 31.</b> Resultados del análisis LASSO y la probabilidad de presentar un periodo libre de mortalidad cáncer-específica corto. ....	152
<b>Figura 32.</b> Clasificación de las variables según la capacidad de predicción de un tiempo libre de mortalidad cáncer-específica corto tras el análisis RSF.....	153
<b>Figura 33.</b> Distribución de las variables seleccionadas por RSF con respecto a la probabilidad de presentar un periodo libre de mortalidad cáncer-específica corto.....	155
<b>Figura 34.</b> Expresión inmunohistoquímica del marcador Ki 67.....	158

<b>Figura 35.</b> Observación de la expresión inmunohistoquímica en los cilindros 10x a) expresión nuclear de Ciclina D1. b) expresión citoplasmática de p16INK4a. c) expresión citoplasmática de Ctip. d) expresión nuclear de p53.....	159
<b>Figura 36.</b> Observación de la expresión inmunohistoquímica en los cilindros 10x a) expresión nuclear de VEGFR2. b) expresión citoplasmática de VEGFR2. c) expresión citoplasmática de GAPDH d) expresión nuclear y citoplasmática de GAPDH.....	160
<b>Figura 37.</b> Expresión de Survivina.....	161
<b>Figura 38.</b> Curvas de supervivencia del periodo libre de recidiva en el TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973). ....	165
<b>Figura 39.</b> Curvas de supervivencia del periodo libre de progresión en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	169
<b>Figura 40.</b> Curvas de supervivencia del periodo libre de mortalidad cáncer-específica en el TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).....	172

## Introducción

### 1. El tumor vesical urotelial papilar sin invasión de la muscular propia

#### **1.1 Epidemiología**

El tumor vesical urotelial (TVu) genera una gran carga asistencial en los programas de salud a nivel mundial. El cáncer vesical, englobando todos los estadios y grados, es el séptimo más frecuente en varones y el decimoséptimo en mujeres. Puntualmente, el TVu presenta una incidencia a nivel mundial de 294.345 y 88.315 casos anuales en hombres y mujeres, respectivamente. A nivel general, 2.7 millones de personas en el mundo tienen antecedentes de haber padecido o padecer un tumor vesical (1,2,3).

En los países occidentales el TVu constituye la cuarta neoplasia más frecuente y la segunda urológica, por detrás del cáncer prostático. La prevalencia europea es de 112.819 y 30.736 casos anuales en hombres y mujeres, respectivamente. En este ámbito social el carcinoma de células transicionales representa la variedad histológica predominante, con el 93-95% de los tumores vesicales (2).

Con respecto a España, el TVu presenta una alta incidencia en comparación con otros países europeos. Ocupa el primer lugar si se tiene en cuenta sólo a la población masculina, con un alta incidencia, 51.2 por 100.000 hombres, estandarizada por edad, y una tasa de mortalidad del 18.1 por 100.000 (1,2).

El TVu es el quinto cáncer más frecuente en la población española, siendo el cuarto cáncer más frecuente en varones, después de próstata, pulmón y colorrectal.

En la actualidad, las cifras del TVu en España con respecto a la prevalencia se estiman 11.227 y 1.781 nuevos casos anuales con respecto a hombres y mujeres (2).

Las proyecciones en España hasta el año 2022 revelan resultados diferentes según el sexo, ya que en las mujeres se prevé un aumento de la incidencia, con un porcentaje anual de cambio del 19,24% (periodo 2008-2022), mientras que en los varones no se producirá un descenso significativo del número de casos (4).

El TVu NoMinv es el más frecuente de los tumores vesicales, ya que dicho diagnóstico se presenta en un 75-85% de los pacientes con tumor vesical primario (2-3).

En cuanto al seguimiento a largo plazo del TVu NoMinv, un 30-80% de los casos recidivarán y un 1-45% progresarán a músculo-invasivos (infiltrantes) en 5 años tras el diagnóstico

inicial. Como consecuencia, el TVu NoMinv es una enfermedad crónica que puede presentar eventos oncológicos a lo largo del tiempo que requieran la administración de repetidos tratamientos, tanto quirúrgicos como médicos, por lo que es el tumor que presenta el coste más elevado de tratamiento de por vida por paciente, superando a tumores como el colorrectal, mama, próstata y pulmón, ocupando los primeros lugares en cuanto a los gastos totales en atención médica (2,3,5).

## **1.2 Definición histopatológica y clasificación TNM y grado OMS**

Un 95% de las neoplasias vesicales son de naturaleza epitelial, de las cuales un 75-90% se diferencian hacia neoplasias de tipo transicional o urotelial. Los carcinomas uroteliales muestran distintos patrones de crecimiento tumoral, que incluyen el crecimiento papilar (el más frecuente, apareciendo en un 70%), sésil, infiltrante, nodular, mixto e intraepitelial plano (carcinoma in situ) (6,7).

La descripción histopatológica debe comenzar por la definición de los cambios epiteliales tanto citológicos como arquitectónicos, describiendo así la hiperplasia y la displasia para luego acabar con la definición de carcinoma urotelial.

Se entiende como Hiperplasia a la presencia de una mucosa marcadamente engrosada sin atipias citológicas ni anomalías arquitectónicas. El urotelio hiperplásico se dispone formando ondulaciones con pliegues delgados de mucosa en forma papilar de alturas variables, en ausencia de tejido inflamatorio adyacente. La ausencia de atipias citológicas y ejes fibrovasculares la distingue de la neoplasia papilar. Esto ocurre en el papiloma (Grado 0) o papiloma urotelial, es una lesión papilar con un centro fibro-vascular delgado cubierto por mucosa vesical de aspecto normal. No posee más de siete capas de células epiteliales ni ninguna anomalía histológica. Pueden aparecer en la misma vejiga que un cáncer urotelial (6-9).

La displasia se describe como una lesión premaligna donde existen alteraciones citológicas como irregularidades en el contorno nuclear, distribución levemente alterada de la cromatina o eosinofilia citoplasmática. El epitelio displásico no tiene mayor cantidad de capas celulares o de figuras mitóticas (8-9).

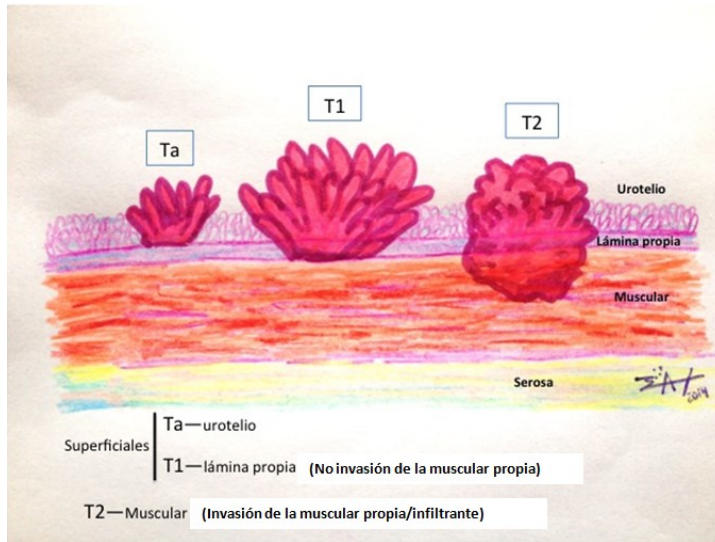
La neoplasia urotelial presenta como cambios citológicos una densidad celular aumentada, alteraciones morfológicas nucleares que varían desde núcleos levemente elongados hasta cambios notables en el tamaño, la forma, la polaridad, en la distribución de la cromatina y en la existencia de mitosis atípicas en las formas más indiferenciadas (8-9).



Con respecto a su clasificación anatomopatológica, el TVu se basa en la estadificación y la gradación.

La estadificación se define como un sistema de clasificación que se fundamenta en una serie de datos clínicos e histológicos que caracterizan la extensión del proceso neofornativo (invasión del espesor tisular, número de ganglios afectos y existencia de metástasis) (10).

En cuanto a la profundidad de invasión del tumor, es importante recordar las capas que presenta el tejido vesical, desde la más externa partiendo de la luz vesical que sería el urotelio, hasta la más interna que sería la grasa perivesical y la serosa. De las distintas capas cabe destacar el urotelio, formado por un espesor celular que suele oscilar de tres a siete capas, existiendo una de células basales sobre la cual descansa una o más capas de células intermedias. La capa más superficial está compuesta por grandes células en paraguas. El urotelio descansa sobre la membrana basal de la lámina propia. En la lámina propia existe una túnica muscular de la mucosa (muscularis mucosae) que tiene fibras dispersas de músculo liso y un plexo vascular. Las siguientes capas serían la muscularis propia y las más externas nombradas con anterioridad, que son la grasa perivesical y la serosa (6,8) (figura 1).



**Figura 1. Histología vesical y estadios del tumor vesical urotelial papilar.**

La clasificación TNM aprobada por la *Union Internationale contre le Cancer*, revisada en 2009 estratifica a los tumores desde el estadio Ta, que indica que el tumor es no invasor, hasta el T1, donde el tumor ya se considera como invasor porque afecta al tejido conectivo subepitelial que comprende la lámina propia y la muscularis mucosae. Cabe diferenciar el concepto de invasor (pT1) con el de infiltrante o invasión de la muscular propia (pT2) (Tabla 1) (10).

**Tabla 1. Clasificación TNM del tumor vesical.**

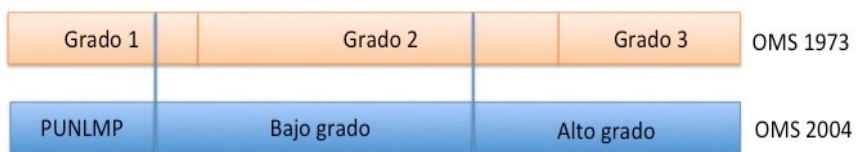
Tumor primario	
Tx	Tumor primario que no se suele evaluar
T0	No hay evidencia de tumor
Ta	Carcinoma papilar no invasivo
Tis	Carcinoma in situ. Tumor plano
T1	Tumor que invade el tejido conectivo subepitelial
T2	Tumor que invade la muscular T2a. Invasión superficial de la mitad interna del músculo T2b Invasión profunda (mitad externa)
T3	Tumor que invade tejidos perivesicales T3a Microscópicamente T3b Macroscópicamente (masa extravesical)
T4	Tumor que invade órganos externos contiguos T4a Próstata, útero o vagina T4b pared pélvica o abdominal

En la actualidad no hay un consenso claro en separar y considerar como grupo pronóstico diferente a los tumores con una microinvasión de la lámina propia (más allá de la membrana basal, siendo una invasión focal y estando a 0,2 cm de la membrana basal más cercana). La subestratificación de la profundidad de la invasión de la lámina propia en invasión sin sobrepasar la muscularis mucosae (pT1a) o más allá de la muscularis mucosae y del plexo vascular (pT1b), tampoco ha ofrecido beneficios. Por ello la OMS no recomienda subestratificar a los tumores pT1 (8).

Con respecto a la gradación, ésta se define como un sistema de clasificación basado en la diferenciación celular, la arquitectura tisular y el grado de mitosis (10).

En 1973 la OMS propuso una clasificación basada en el grado de anaplasia celular, siendo en la actualidad la clasificación más utilizada. Divide a los tumores en bien, moderadamente y pobremente diferenciados, correspondiendo a los grados uno, dos y tres, respectivamente (tabla 2).

En 2004 se publicó una reestructuración de la clasificación de los grados, avalada por la OMS y la Sociedad Internacional de Patología Urológica. El cambio consiste en la nueva redefinición de las lesiones papilares en: lesiones con bajo potencial de malignidad y carcinomas uroteliales de bajo o alto grado. La característica principal estriba en que el grado 2 (intermedio), que está sujeto a mucha controversia, fue eliminado (dibujo 2) (11,12).



**Figura 2. Equivalencia entre la clasificación OMS 1973 y la clasificación OMS 2004 de los tumores uroteliales papilares. (13).**

El grado G1 o tumor bien diferenciado (OMS 1973), se define como un urotelio engrosado que tiene más de 7 capas de células y éstas sólo muestran anaplasia y pleomorfismo leves. La alteración de la maduración celular desde la base hasta la superficie es leve y existen muy pocas figuras mitóticas de localización basal. Cuando están limitadas sólo a la mucosa también se les llama tumores uroteliales papilares de bajo potencial maligno (OMS 2004) (6-9,14).

Los tumores moderadamente diferenciados grado 2 (OMS 1973), tienen un centro fibrovascular más ancho, una alteración mayor de la maduración celular desde la base hasta la superficie y pérdida de la polaridad celular. El cociente núcleo/citoplasmático es mayor que el anterior grado y presenta mayor pleomorfismo nuclear y nucléolos prominentes. Pueden verse algunas figuras mitóticas (6,9).

En la clasificación OMS 2004 se considera el Carcinoma urotelial papilar no invasor de bajo grado cuando se encuentra un tumor con una descripción parecida al tumor papilar urotelial de bajo potencial maligno pero con mayores variaciones en cuanto a la polaridad nuclear y el patrón de cromatina. Los núcleos son uniformemente alargados con diferencias en forma, contorno y distribución de la cromatina. Los nucléolos pueden estar presentes en algunas células. Las mitosis, poco frecuentes, se observan preferentemente en la

zona basal. Los tumores suelen ser usualmente diploides (8,9,14).

Los tumores pobremente diferenciados grado 3 (OMS 1973) y el carcinoma urotelial papilar no invasor de alto grado (OMS 2004), se caracteriza por presentar células que no se diferencian a medida que progresan desde la membrana basal hasta la superficie. Se observa un pleomorfismo nuclear pronunciado, con un cociente nucleocitoplasmático alto. Las figuras mitóticas pueden ser frecuentes (6,9,14).

Los cambios que se realizaron en la nueva clasificación, agrupan también a pacientes que podrían ser incluidos en el grado 2. En la clasificación de la OMS 2004, los carcinomas papilares no invasores de alto grado presentan una arquitectura papilar, donde esta papila presenta múltiples ramas y el patrón predominante es el desorden con muchas y marcadas variaciones ya comentadas, puede observarse una anaplasia localizada o difusa. El espesor del urotelio varía considerablemente y a menudo se observan células no cohesionadas. Los tumores son usualmente aneuploides (8,9,14).

Por último, el carcinoma in situ es un tumor que se presenta en el 25% o más de los pacientes con tumores superficiales de alto grado. Se caracteriza por su desorden estructural. Presenta una anaplasia nuclear idéntica al tumor de alto grado. Los núcleos alargados son muy pleomórficos e

hipercromáticos y adquieren una engrosada y densa distribución de la cromatina. Se pueden evidenciar grandes nucléolos. Las mitosis atípicas son muy frecuentes. La célula ha perdido su polaridad y el citoplasma suele ser eosinofílico o anfofílico. Estos cambios epiteliales pueden darse en todo el espesor urotelial o en la membrana basal. Suelen ser lesiones multifocales y difusas. La lámina propia suele presentar un infiltrado inflamatorio, edema y congestión vascular. Las células son aneuploides (6,8,14).

### **1.3 Diagnóstico y tratamiento**

El manejo de inicio de un TVu consiste en la resección transuretral de todas las lesiones visibles en la mucosa vesical. La muestra resecada debe incluir la parte exofítica del tumor, la lámina y la muscularis propia, lo que permite también realizar posteriormente el diagnóstico (11,13, 15).

La quimioterapia intravesical posterior a la cirugía (adyuvancia) juega un papel importante en descender la tasa de recurrencias, pero no la progresión, en los tumores superficiales de bajo-moderado grado. La Mitomicina C, la doxorubicina, tiotepa, epirrubicina o la gemcitabina son sustancias que han sido utilizadas en este tipo de tratamiento con similares resultados. En la actualidad las guías europeas

también optan por recomendar el empleo de BCG intravesical ante tumores Ta/T1 grado 2 de la OMS 1973 (8-10).

Existen diversos esquemas de inicio del tratamiento así como las dosis utilizadas y el número de instilaciones, ya que hay controversias sobre cuál sería el esquema adecuado, lo que sí que está claro es que no se exceda del año de duración (10,15,16).

El tratamiento en el postoperatorio inmediato tras acabar la cirugía se basa en destruir el tumor microscópico residual y las células sueltas en vejiga con la finalidad de prevenir la implantación y el crecimiento rápido de las recidivas. Este efecto ha sido observado sobre todo en tumores primarios Ta de bajo grado no multicéntricos. En este tipo de tumores se cuestiona si es mejor la instilación en el postoperatorio inmediato (en las primeras 24 horas tras la resección) que la adyuvancia posterior ya que se ha demostrado una reducción de la tasa de recidiva. En los TVu multicéntricos y en las recidivas que son Ta, el beneficio es incierto y en Tumores T1 o CIS no se evidencia una mejoría. (9,10,13,15).

La inmunoterapia intravesical con bacilo de Calmette-Guérin (BCG) de manera adyuvante está reservada para tumores de alto grado (G2/G3), T1 de elevada tasa de recurrencia o CIS, ya que su instilación presenta elevada



toxicidad. Como se ha comentado anteriormente también se recomienda su uso en tumores Ta/T1 grado 2 (9). Es una terapia más eficaz que las sustancias anteriormente nombradas en cuanto a prevenir recurrencias. Los resultados con respecto a la progresión y a la supervivencia cáncer-específica son controvertidos (9,10,15-17).

Aunque es necesario un esquema de dosis de mantenimiento, el número óptimo de instilaciones durante el periodo de tratamiento y la frecuencia de éstas y duración del periodo de mantenimiento no está definido, por ello existen diversas pautas de actuación, aunque un periodo de mantenimiento igual o mayor a un año es recomendable (9,10,15-17).

La cistectomía radical no está indicada de inicio para el tratamiento del TVu NoMinv, ya que los beneficios (la supervivencia cáncer-específica es mayor comparada con los pacientes con enfermedad músculo-invasiva) adquieren un segundo plano con respecto a la morbi-mortalidad que genera esta cirugía (8,9-12).

La indicación actual se basa en todo paciente con un TVu NoMinv pero con elevado riesgo de progresión. Sería cuestionable en tumores sin invasión de la muscular propia si se trata de pacientes jóvenes con tumor vesical T1 y con al

menos uno de estos factores de mal pronóstico: multifocalidad, CIS asociado, infiltración de uretra prostática, tumor difícil de reseca. La indicación más utilizada es tras una recurrencia de un tumor T1 (sobre todo de alto grado) o CIS después de un fallo de la instilación de BCG (9-11,15-17).

#### **1.4 Variables clásicamente utilizadas para predecir el pronóstico de un tumor vesical urotelial papilar sin invasión de la muscular propia (pTa/pT1)**

##### **1.4.1 Variables clínicas**

###### **1.4.1.1 Edad**

La edad es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de un TVu, pudiendo observar un aumento de la incidencia en pacientes añosos. Varios estudios demográficos han observado que una edad superior a los 65 años presenta once veces más incidencia de cáncer vesical con respecto a la población general y quince veces mayor tasa de mortalidad que el resto de población de menor edad (18,19).

Diversas hipótesis han sido propuestas como mecanismos de asociación entre la edad y el tumor vesical, como es la inestabilidad genómica asociada a un aumento en

las mutaciones, por ejemplo del oncogen p53 y una hipermetilación del ADN de genes supresores tumorales, generando una silenciación de estos (19).

Otra de las teorías se basa en el acúmulo de interacciones con agentes carcinógenos aumenta conforme aumenta la edad. Por último, el envejecimiento genera déficit en el vaciado vesical, por lo que se genera mayor tiempo de contacto de la orina, una orina más concentrada dado que los pacientes añosos suelen beber menor cantidad de líquidos (19).

#### **1.4.1.2 Sexo (género)**

Con respecto al sexo, aunque el tumor vesical es más frecuente en hombres, el pronóstico suele ser peor en las mujeres, ya que en ellas debutan en un estadio más avanzado. Las mujeres suelen presentar en un mayor número de ocasiones una enfermedad multifocal y tumores de mayor tamaño (19,20).

Existe algún trabajo publicado que afirma que los pacientes con un TVu NoMinv de alto grado T1G3 del sexo femenino presentan mayor riesgo de recurrencias, progresión y muerte cáncer específica en comparación con los del sexo masculino en ausencia de CIS en la uretra prostática (21).

Varios estudios atribuyen a la mujer una mayor incidencia proporcional de TVu NoMinv, existiendo diversas

teorías, unas referentes a un menor espesor de la pared vesical con respecto a la vejiga masculina y otras en referencia a que el tumor sin invasión de la capa muscular propia puede comportarse como un tumor sensible a cambios en los esteroides. (22).

Por un lado, un estudio epidemiológico observó que las mujeres postmenopáusicas presentan un mayor riesgo de desarrollar un TVu que las premenopáusicas. Por otro, en la mujer se producen más polimorfismos en el cromosoma 8q24 lo que genera una pérdida en la expresión del receptor androgénico en las células perdiendo la sensibilidad a los andrógenos y activando mecanismos alternativos como el del factor de crecimiento de la insulina y el de la proteína transportadora 2 (binding protein 2) generando un tumor con mayor potencial metastásico. Todo ello podría ocurrir en etapas tempranas del tumor (19,22).

#### **1.4.1.3 Diabetes mellitus**

Existe en la literatura un trabajo retrospectivo que implica a la diabetes mellitus como un factor predictor independiente de recidiva, progresión y supervivencia en el TVu NoMinv. De hecho la presencia de una hemoglobina glicosilada mayor de 7% estuvo asociada a una distribución multicéntrica y a un mayor grado tumoral (23).

Otro estudio prospectivo evidenció que la mortalidad atribuida al cáncer vesical era más frecuente en pacientes con un tiempo de duración de la diabetes largo en el tiempo y observando que el uso de insulina y el consumo de tabaco aumentaban el riesgo de mortalidad cáncer específica. (24).

#### **1.4.1.4 Hipertensión arterial**

Con respecto a esta enfermedad, un estudio de carácter retrospectivo afirma que existe una cierta asociación del TVu con pacientes que presentaron hipertensión tratada médicamente, de otro modo, los pacientes con hipertensión no tratada presentaron menor riesgo de cáncer vesical, generando la hipótesis que los fármacos antihipertensivos como los diuréticos o los calcioantagonistas podrían ser los causantes. La teoría de cómo la hipertensión puede reducir el riesgo de padecer cáncer vesical no está del todo dilucidado. Los autores especulan con la posibilidad de que el estrés oxidativo generado en la hipertensión induce el mecanismo de apoptosis también en células neoplásicas (25).

#### **1.4.1.5 Exposición laboral**

Existen en la literatura científica diversos estudios epidemiológicos ya clásicos que corroboran el aumento de la

incidencia del cáncer vesical con la exposición a determinadas sustancias que incluso pueden categorizar a determinados oficios con un mayor riesgo carcinógeno. Ejemplos de ellos son la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos en la industria del aluminio o como el aumento de la incidencia en los pintores por los componentes químicos en las pinturas y disolventes como las aminas aromáticas. Todos estos estudios son retrospectivos (2,26-28).

En 2001 se publicó un estudio prospectivo en Holanda para analizar dichas exposiciones, encontrando una asociación con respecto al contacto con los componentes anteriormente citados: aminas aromáticas, hidrocarburos policíclicos aromáticos, diesel, componentes en pinturas (bencidina, dioxane, cloruro de metileno) y sobre todo en trabajadores que consumían tabaco. (2,26-28).

Existen otras exposiciones laborales de riesgo como la industria del caucho (2-naftilamina) y peluquería (aminas aromáticas) (2, 26-28).

#### **1.4.1.6 Consumo de tabaco**

Diversos estudios demuestran la fuerte asociación del consumo de tabaco con la incidencia de cáncer vesical. El consumo de tabaco triplica el riesgo de desarrollar cáncer vesical y genera tasa de mortalidad elevada (4).

Existen trabajos publicados que relacionan también dicho consumo con un peor grado y estadio y un mayor tamaño tumoral al diagnóstico, así como un aumento de la progresión y un descenso en la supervivencia cáncer-específica. Incluso la duración del consumo de tabaco y la cantidad pueden influir en la evolución del paciente que ha presentado o presenta un tumor vesical, encontrando una relación dosis-respuesta (29,30).

Con respecto al cese del consumo de tabaco, no existen diferencias en cuanto a la progresión entre exfumadores (diez o más años sin consumo) y no fumadores, pero un cese del consumo de tabaco puede reducir el riesgo de recidiva (29,30).

El humo del tabaco contiene más de sesenta sustancias carcinógenas que pueden inducir cambios genéticos, epigenéticos e inestabilidades, generando tumores muy agresivos, también en el caso del carcinoma vesical (29,30).

#### **1.4.1.7 Consumo de alcohol**

El papel del alcohol en la etiología del cáncer vesical es plausible, de hecho diversos componentes de las bebidas alcohólicas son eliminados por la orina, en particular el acetaldehído, que puede causar daños en el ADN y que es declarado agente carcinógeno en humanos. Pero por otro lado, existen bebidas alcohólicas con efecto diurético, como la

cerveza, que aumentarían el vaciado exponiendo la mucosa vesical poco tiempo a dichas sustancias disueltas en la orina. Existe en la literatura un meta-análisis que descarta la asociación entre la incidencia del cáncer vesical y el consumo de alcohol (31).

## **1.4.2 Variables anatomo-patológicas clásicas**

### **1.4.2.1 Estadio tumoral pTa/pT1**

Un TVu NoMinv se define como pTa cuando no afecta el tejido conectivo subepitelial, luego no es invasor (32). En este grupo de pacientes, si además presentan un bajo grado tumoral G1, la progresión es un evento infrecuente, pero la tasa de recurrencia es alta, pudiendo alcanzar un 35-71% antes de 5 años de evolución (32-34). En cuanto a la progresión, puede ocurrir en el 2% de los Ta G1-2 y el 10-15% de los TaG3 (35).

La supervivencia se encuentra entre un 82-96% en los tumores de bajo grado y en un 74-90% en los de alto grado (12).

La invasión de la lámina propia constituye la enfermedad pT1 e incluye un variado rango de penetrancia tumoral, pero nunca llegando a la muscular propia. En diversos



estudios se demuestra que el estadio T1 es un factor de mal pronóstico en cuanto a la progresión. Está aceptado que los T1 de alto grado son los que presentan mayor riesgo con un índice de progresión que oscila entre el 10 y el 54% (11,33,34,36).

Cuando se habla de progresión en un TVu NoMinv se está indicando el hecho de que éste invada la capa muscular (pT2) con lo que el riesgo de muerte cáncer específica aumenta con la edad (36).

#### **1.4.2.2 Grado tumoral (OMS 1973)**

Un gran número de pacientes diagnosticados de un TVu papilar no infiltrante presentan un grado 2 en la clasificación OMS de 1973. En muchas series estudiadas, un gran porcentaje de pacientes en donde se produce una progresión de enfermedad partían de un diagnóstico primario como G2 en más ocasiones que como G3 (1).

Ni el estadio, ni el grado ni el estatus del tumor (recidiva o primario) se relacionan con las recidivas (36).

El grado tumoral es un factor pronóstico en cuanto a la progresión, siendo el G3 o el carcinoma de alto grado tumoral el que con más frecuencia progresa (1,11).

### **1.4.2.3 Volumen, tamaño y disposición tumoral**

Se ha evaluado el tamaño como variable pronóstica en la literatura. En unos trabajos utilizando el asa de resección como referencia (suele medir unos 7mm de ancho) se categorizó al TVu en tres tamaños que varían desde los tumores menores de 1,5cm a los mayores de 3cm. El límite de 3cm se observó como factor pronóstico con respecto a un tumor vesical sin invasión de la muscular propia (37,38).

Con respecto al volumen tumoral, un trabajo estudió la importancia del peso tras la resección transuretral, concluyendo que un tumor que pese a partir de 6 gramos podía influir en la recidiva. (39).

En otros trabajos se ha observado la importancia de la multicentricidad como factor de riesgo. Se define multicentricidad como más de dos tumores localizados en distintas regiones de la vejiga (37,40). En un estudio de 187 pacientes con una media de seguimiento de 58 meses, la tasa de recurrencia fue del 90% en pacientes con tumores multicéntricos en comparación con los tumores únicos, que fue de un 46% (34).

## **1.5 El tumor vesical urotelial papilar sin invasión de la muscular propia de grado 2 y su comportamiento incierto. ¿son suficientes las herramientas descritas?**

### **1.5.1 Reproducibilidad de la puntuación de la EORTC/CUETO**

La *European organisation for research and treatment of cancer* EORTC en 2006 publicó unas tablas predictivas de puntuación para valorar la probabilidad de recidiva y/o progresión al año y a los 5 años de pacientes con tumores vesicales Ta/T1 a los cuales no se les realizó una segunda RTU y terapia de mantenimiento con BCG (37).

El trabajo de la EORTC está basado en la recogida de los datos de 2.596 pacientes incluidos en 7 ensayos fase 3. Dichas tablas integran los seis factores clínicos y patológicos más significativos: número de tumores, tamaño del tumor, tasa de recurrencia previa, categoría T, presencia de CIS concomitante y grado tumoral (37).

La sociedad Europea de Urología sugiere el uso de las tablas de riesgo de la EORTC, como así dice en las guías sobre el manejo del TVu NoMinv (9).

La validación externa de un modelo pronóstico como el de la EORTC conlleva comprobar que dicho modelo encaja

satisfactoriamente con pacientes no utilizados en la confección original. Dicha validación con respecto a la puntuación de la EORTC no ha sido aún efectuada en una serie prospectiva y de tamaño considerable. Por otro lado, las puntuaciones fueron sacadas en base a una muestra en donde pocos pacientes de alto riesgo fueron tratados con BCG y ninguno realizó una pauta de BCG de mantenimiento (39,40).

No obstante, no hay un claro consenso de que estas tablas de puntuación puedan ser utilizadas de manera universal, aunque existen trabajos que verifican una correcta validación externa, concretamente en cuanto a la recidiva, hay otros que muestran la poca reproductibilidad de las puntuaciones en muestras pequeñas de pacientes, con discordancias en cuanto a las probabilidades de recidiva y/o progresión (41,42).

Otra limitación de la puntuación de la EORTC es que no puede ser aplicada en pacientes con lesiones difusas o múltiples CIS, en donde no se pueda precisar el tamaño concreto, el número de tumores. Además, las variables tamaño del tumor y número de tumores son muy subjetivas y pueden variar según el observador, así como las variaciones interobservador al diagnosticar el estadio y el grado del tumor. En diversos estudios también se ha demostrado que la recidiva y la progresión son influenciadas por otras variables no utilizadas en la puntuación EORTC (22,40,43,44) .

En 2009 el grupo *Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico* (CUETO) publicó un sistema de puntuación desarrollado a partir de los datos de una serie de 1062 pacientes con tumores de medio y alto riesgo tratados con BCG en 4 ensayos del grupo desde 1990 a 1999, basado en la sistemática llevada a cabo para el desarrollo de las tablas publicadas por la EORTC en 2006. El objetivo del estudio del grupo CUETO fue determinar un modelo predictivo para los pacientes tratados con BCG y con una pauta de mantenimiento (36).

Estudios comparativos de ambas clasificaciones llegaron a la conclusión de que en comparación con la puntuación del CUETO, las tablas de la EORTC sobreestiman la probabilidad de recurrencia y progresión en pacientes tratados con BCG (41).

Por contra, un estudio que incluía a 363 pacientes observó una mayor precisión de las tablas de la EORTC con respecto a la puntuación del CUETO, sobre todo en la probabilidad de recidiva (45,46).

En la actualidad, la utilización de dichas tablas depende de la actuación individual de cada unidad clínica. Aunque existe la posibilidad de manejar sus calculadoras on-line para el uso cotidiano, faltan más trabajos que realicen una extensa validación externa de ambas puntuaciones.

### **1.5.2 De la clasificación OMS 1973 a la OMS 2004**

Aunque la clasificación de la OMS de 1973 es un método ampliamente usado, reproducible y clínicamente probado, el mayor problema de su utilización es la gran variabilidad interobservador que conlleva plantear su uso para predecir el pronóstico de cada individuo por separado (1,12).

El problema del sistema de gradación de la clasificación de la OMS 1973 es que no existen unos puntos de corte bien definidos para cada grado tumoral, generando un gran rango de frecuencia del diagnóstico de carcinoma grado 2 (13-69%). Dicho problema adquiere una mayor importancia cuando se enfatiza la carencia de una definición específica del grado 2, que es considerado el “diagnóstico por defecto” (1,40).

El grado 2 adquiere mucha importancia en la práctica clínica habitual ya que es un diagnóstico elegido en un gran porcentaje de las ocasiones, además, existen series importantes de casos en donde se observa que frecuentemente los pacientes en donde progresa la enfermedad fueron diagnosticados inicialmente como TVu grado 2 en comparación con los diagnosticados grado 3 (1,40).

La nueva clasificación de la OMS 2004 fue inicialmente propuesta en 1998 por la OMS/Organización Internacional de

Patología Urológica, aportando tres niveles diagnósticos: neoplasia papilar con bajo potencial de malignidad y los carcinomas de bajo y alto grado (1).

La finalidad de esta nueva nomenclatura es introducir criterios histológicos detallados para cada entidad (ver clasificación y definición histopatológica) con la finalidad de descender dicha variabilidad interobservador. De manera esquemática la transición sería la siguiente; en los extremos, el grado 1 (1973) se convierte “en neoplasia papilar con bajo potencial de malignidad” y algunos de ellos también se clasifican como carcinomas de bajo grado. El grado 3 se clasifica en “carcinoma urotelial de alto grado” (1). El problema que generaba el TVu grado 2 en la clasificación de 1973 se intenta resolver separando a dichos tumores, unos como carcinomas de bajo grado y otros de alto grado, según la descripción histológica (12).

En la literatura se pueden encontrar numerosos trabajos que desaconsejan el sólo uso de la clasificación OMS 2004. Algunos de ellos llegan a la conclusión de que al usar la clasificación OMS 2004 no se reduce la variabilidad interobservador comentada con anterioridad, incluso puede aumentar la variabilidad intraobservador al efectuar la transformación de la antigua a la nueva clasificación (47-51).

En los TVu NoMinv (pTa), la clasificación de la OMS 2004 es más imprecisa en cuanto a la predicción de las recidivas pero parece que mejora la predicción de la progresión con respecto a la OMS 1973. Es en el grupo pTa donde la clasificación de la OMS 2004 podría tener una mayor utilidad (48,49).

En cuanto a los TVu NoMinv pT1, la clasificación de la OMS 1973 parece ser más útil en cuanto a predecir la supervivencia cáncer-específica (45).

Los TVu papilares con bajo potencial de malignidad siguen presentando un porcentaje de recidiva significativo y el porcentaje de progresión de los carcinomas de bajo grado sigue siendo considerable, variando entre un 3,5% a un 13%. Por otro lado parece que los tumores clasificados como carcinomas de alto grado conforman un grupo muy heterogéneo ya que presentan menos tasas de progresión si se comparan con los tumores etiquetados como grado 3 (1).

Aunque ambas clasificaciones son efectivas en cuanto a la predicción de progresión tumoral, en términos generales, la antigua clasificación es más útil al predecir la recidiva. Por otro lado sí que existe un trabajo que demuestra la utilidad clínica de la clasificación de la OMS 2004 y a diferencia de los anteriormente comentados estudia un número importante de pacientes (1.515 casos) con un tiempo de seguimiento de 15 años (47-51).



Actualmente aunque las sociedades Europea y Americana de Urología recomiendan el uso de ambas clasificaciones hasta que la última esté lo suficientemente validada, la clasificación OMS 2004 no presenta en la realidad un uso generalizado, además los sistemas de predicción EORTC / CUETO se basan en la antigua clasificación, careciendo en la actualidad de una suficiente validación externa, como se ha explicado anteriormente (1,12,40,41,49).

Por todas estas razones muchos autores han propuesto el uso conjunto de las herramientas clásicamente utilizadas y de otras herramientas pronósticas que “vayan mucho más allá de la clínica y de la célula”, estos son los marcadores moleculares (35,39).

## 2.-Expresión de los marcadores inmunohistoquímicos en el tumor vesical sin invasión de la muscular propia.

Los mecanismos moleculares que originan la carcinogénesis se pueden categorizar según el nivel donde ocurre la alteración en: cromosómicas (y estos a su vez en alteraciones numéricas y/o estructurales), genéticas (que incluyen: mutaciones, deleciones, fragmentaciones, amplificaciones o cambios epigenéticos) y por último en alteraciones de la expresión y proteicas (que incluyen

modificaciones en la regulación de la expresión proteómica, expresión de proteínas tumorales y proteínas de fusión) (52).

Numerosos factores moleculares están implicados en determinar el fenotipo, genotipo, el comportamiento biológico y por consiguiente, la evolución clínica del tumor vesical (52,53).

Los marcadores inmunohistoquímicos se definen como moléculas características y representativas de varias propiedades del tumor ya que son producidas por éste. En la actualidad se pueden clasificar las familias o rutas oncogénicas en: 1) reguladores del ciclo celular/promotores de la proliferación celular, 2) moduladores de apoptosis, 3) moléculas moduladoras de la matriz extracelular, 4) reguladores de la angiogénesis y 5) factores de transducción de señales y del metabolismo celular (52-54).

Los métodos inmunohistoquímicos comprenden todas aquellas técnicas basadas en reacciones tipo Antígeno-Anticuerpo que sirven para identificar antígenos tisulares y/o celulares. Para visualizar la reacción se utiliza un “trazador” o “marcador”. Este marcaje se puede llevar a cabo con: fluorocromos (inmunofluorescencia), enzimas (técnicas inmunoenzimáticas), iones metálicos (técnicas de inmuno-oro) o isótopos radiactivos (técnicas inmunoradiactivas). El marcaje del antígeno problema se realiza asimismo mediante métodos directos (anticuerpo único o primario) o indirectos a través de

un anticuerpo secundario que se une al primario para terminar uniéndose al antígeno problema (9,55).

Los factores limitantes de esta técnica están en relación con la representatividad de las áreas tumorales seleccionadas para el estudio, el tipo de clon de anticuerpo utilizado y la proporción mínima de células positivas necesarias para considerar un inmunofenotipo tumoral concreto (nivel de corte o umbral de positividad) (9,55).

Para la correcta interpretación de los datos se promueve a realizar una estandarización de dichos procedimientos y así conseguir una reproductibilidad universal de cada una de las técnicas. El resultado final es un análisis cualitativo o semi-cuantitativo tisular donde se ha puesto o no de manifiesto mediante una tinción, el marcador molecular a buscar (9, 55).

La ventaja que presenta la inmunohistoquímica con respecto a otras técnicas más recientes de análisis molecular es que estas últimas son más complejas y caras (55).

El reto en el análisis inmunohistoquímico del cáncer vesical es establecer la relevancia clínica de cada subgrupo de marcadores con respecto a las características del tumor, más allá del diagnóstico histológico (55,56).

## **2.1 Tipos de rutas oncogénicas y sus marcadores moleculares más característicos.**

A continuación se describen las distintas rutas con algunos de sus marcadores más significativos. La tabla 2 recoge un resumen de lo descrito a continuación.

### **2.1.1 Reguladores del ciclo celular / promotores de la proliferación celular**

El ciclo celular consiste en un conjunto de pasos cuidadosamente coordinados y regulados para conseguir una proliferación celular correcta. Esta progresión en el ciclo es mediada, en parte, por un acúmulo de **Ciclinas**, proteínas que activan las Kinasas ciclina-dependientes (CDKS). Las CDKS controlan la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S. Estas fosforilan la proteína del Retinoblastoma (**pRb**), que es tumor-supresora. La fosforilación de pRb prepara el núcleo para una replicación del ADN, forzando a las células a entrar en mitosis (53,54).

Las proteínas **p16INK4a**, **p21** y **p27** son inhibidoras de las CDKS y de la fosforilación de pRb durante la fase G1 y actúan como frenos en la progresión del ciclo celular. La proteína **p53** sirve como “guardián del genoma”, induciendo múltiples mecanismos para detener el ciclo celular como

respuesta a señales de estrés celular o señales antimitógenas, como es el daño en el ADN (53,54).

El enzima **topoisomerasa-II $\alpha$**  juega un papel importante en el ciclo celular ya que participa entre otros mecanismos como la replicación y la transcripción. Es fundamental en la segregación de los pares de cromosomas replicados, en la condensación del cromosoma y en el plegamiento generando la hélice de ADN (57).

La proteína **Ki67 (MIB1)** la expresan exclusivamente las células que están proliferando en cualquier fase del ciclo celular (G1, fase S, G2 y mitosis) (53,55,58).

#### **2.1.1.1**

#### **P53**

El gen TP53 cuyo producto es la proteína p53 es el gen que más frecuente se encuentra mutado en el cáncer humano, concretamente en más del 50% de los tumores vesicales. La frecuencia de dicha mutación se incrementa conforme empeora el estadio y el grado tumoral. TP53 es un gen supresor tumoral y está localizado en el brazo corto del cromosoma 17. La mutación en dicho gen produce la sobreexpresión de una proteína p53 no funcional con una vida media más prolongada, siendo imposible realizar su función de “freno” del ciclo celular. Como resultado, esta expresión anormal de p53 puede ser

detectada y localizada en el núcleo celular mediante inmunohistoquímica (58-64).

Aunque diversos estudios llegan a la conclusión que la acumulación de dicha proteína en el núcleo es predictiva de la evolución de la enfermedad, todavía no hay evidencia suficiente con respecto al papel de p53 en la biología tumoral y su aplicación en la práctica clínica (53).

Desglosando la utilidad de p53 como marcador pronóstico del cáncer urotelial, ciertos trabajos demostraron que el grado de expresión de p53 mutada estaba asociado a: un peor estadio tumoral, un mayor grado, invasión linfovascular, metástasis ganglionares, recurrencia de la enfermedad y mortalidad cáncer-específica. Estos trabajos sugirieron que p53 podía mejorar el pronóstico en el cáncer vesical de estirpe urotelial de alto riesgo. Un estudio más reciente, el International Study Initiative on Bladder Cancer (ISBC) que analizó 26 trabajos donde se estudiaba la utilidad de la determinación inmunohistoquímica de p53 (929 tumores vesicales T1), demostró que su determinación fue un factor predictor independiente de la progresión, pero no de la supervivencia global. Con respecto al TVu NoMinv, existen estudios que indican que p53 puede ser un marcador pronóstico con respecto a la recidiva en neoplasias de bajo grado y también está asociado a la progresión en tumores de alto grado (53,55,58,62-66).

Por otro lado existen trabajos que encuentran un incremento significativo de formas inactivas de p53 en el carcinoma urotelial vesical (más de un 44%) a expensas, sobre todo de tumores de alto grado. Con respecto a los TVu NoMinv, no hay un consenso en cuanto a que la determinación de p53 mediante inmunohistoquímica pueda estratificar correctamente a los tumores T1 en diferentes grupos de riesgo. A pesar de que en estudios preliminares la sobreexpresión de p53 se correlaciona con un peor estadio y grado tumoral, en estudios de seguimiento (119 tumores) p53 no mejoró ni añadió un valor pronóstico adicional, tampoco el acúmulo nuclear predijo la respuesta al tratamiento con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), ni la recidiva, progresión o la supervivencia cáncer-específica (53,58).

En estos momentos, el uso de p53 en el tumor vesical no está establecido, a pesar de que ha sido uno de los marcadores más estudiados. Esta conclusión la evidenció un meta-análisis de 117 estudios con más de 10.000 pacientes. Este estudio no encontró un beneficio unánime en su uso ya que p53 sólo predijo la recidiva, progresión y mortalidad en un 26%, 50% y 29% de los estudios, respectivamente. Se pudo observar un riesgo de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica de 1.6 (95% CI 1.2-2.1), 3.1 (95% CI 1.9-4.9) y 1.4 (95% CI 1.2-1.7), respectivamente (53,58).

### 2.1.1.2

### Ciclinas

El fallo en la regulación de la transición de la fase  $G_1$  a la fase S es un sello distintivo en la carcinogénesis, generándose una proliferación celular descontrolada. La ciclina D y la ciclina E son las responsables del inicio y del final de la fase  $G_1$ , respectivamente. La ciclina E1 es la proteína predominante en la transición anteriormente nombrada ( $G_1/S$ ) y su alteración influye en la carcinogénesis. Un descenso en la expresión de ciclina  $E_1$  en el tumor vesical urotelial ha sido asociado a: un peor estadio anatomopatológico, invasión linfovascular, metástasis ganglionares y un aumento de la mortalidad cáncer-específica (53,55,58,64).

Con respecto a la expresión de la ciclina D1, a pesar de que está significativamente aumentada en los tumores con respecto a los controles, los estudios publicados no demuestran que tenga una utilidad predictiva en el TVu. Su sobreexpresión es característica de una etapa inicial en el tumor papilar y suele ser asociada a un comportamiento menos maligno (53,55,58,64).

La ciclina G1 (CCNG1) es una proteína codificada en humanos por el gen *CCNG1*, La activación transcripcional de este gen puede ser inducida por la proteína p53. La ciclina G1 induce una detención en la fase  $G_1$  que coincide con la activación de p53. La ciclina G1 tiene actividad inhibidora del crecimiento que está



mecánicamente vinculado a p53 y pRb vías supresores de tumores. No existen trabajos que vinculen el tumor vesical con la expresión de la ciclina G (53,55,58,59).

### **2.1.1.3**

### **PRb**

Es una proteína codificada por el gen RBI, su función es regular el ciclo celular y juega un papel fundamental en el mantenimiento de las células madre, en la regeneración y diferenciación tisular y en las vías de desarrollo. Las quinasas dependientes de las ciclinas (CDKS) 4 y 6 se unen a las ciclinas D (D1-D3) para formar unos complejos moleculares que son capaces de fosforilar la pRb; dicha fosforilación libera factores de transcripción implicados en preparar al núcleo para la replicación del ADN, forzando a las células a entrar en mitosis (52,55).

Los estudios sobre su papel como marcador tumoral revelan que pRb aporta menos relevancia como marcador predictor en el TVu no músculo-invasivo con respecto a otros marcadores del ciclo celular (53,55).

### **2.1.1.4 P21**

Es la proteína que codifica el gen CDKN1A, ésta se une a las Cdk2/4 inhibiendo su actividad y regulando la progresión

del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>. El valor pronóstico de p21 depende del estadio y el manejo del carcinoma urotelial vesical, en el TVu NoMinv se ha encontrado sobreexpresión de la proteína en contraste con la no producción de p21 en los tumores infiltrantes (53,58,64).

Con respecto al TVu NoMinv, la expresión alterada de p21 se ha asociado a recidiva tumoral y a una peor supervivencia. También se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes con CIS aumentando la probabilidad de recidiva y/o progresión. Su asociación con p53 alterado aumenta el riesgo de recidiva, progresión y mortalidad en los pacientes con CIS. En un estudio de 74 tumores sin afectación de la muscular, p21 se asoció con progresión tumoral (53,58,67).

#### **2.1.1.5 P27**

La proteína p27 se une a determinadas CDKS para inhibir la actividad kinasa de éstas, favoreciendo el freno del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>. La expresión de p27 alterada está asociada a un empeoramiento en la supervivencia cáncer-específica en pacientes con tumores pT1. Otros estudios concluyen que el potencial predictor de p27 alterada es limitado (53).

### **2.1.1.6 P16INK4a**

En el brazo corto del cromosoma 9 (9p21) se encuentra el gen CDK2/p16INK4a que codifica una proteína inhibidora de CDKS y reguladora de la proliferación celular, la p16INK4a. Dicha proteína se une al complejo ciclina D1-Cdk4/Cdk6 para inhibir así la fosforilación de pRb, evitando la replicación celular y bloqueando la progresión de la fase G1 a la fase S. La pérdida de sobreexpresión de dicha proteína puede influir en la carcinogénesis. Existe un mayor número de estudios que evidencian dicha pérdida de expresión en el carcinoma urotelial vesical que los que afirman que se produce una sobreexpresión de la proteína. Su alteración es independiente del estadio, grado o de la evolución clínica (64-66).

### **2.1.1.7 P14**

El locus INK4a/ARF del brazo corto del cromosoma 9 (9p21) codifica 2 proteínas reguladoras del ciclo celular p16 y p14. Cuando p16 inhibe la fosforilación de pRb, p14 (ARF) bloquea la oncoproteína MDM2 (“mouse double minute 2”) que induce la degradación de p53, luego la estabilización de p53 y su activación es mediada por p14ARF-MDM2 en respuesta de un estímulo oncogénico. La inmunoexpresión de p14 es nucleolar. La vía p14-MDM2-p53 constituye un

mecanismo efectivo para proteger a las células de un estímulo oncogénico (68).

No existe ninguna publicación que analice la inmunoexpresión de p14 con el cáncer urotelial vesical.

#### **2.1.1.8 Topoisomerasa-II $\alpha$**

Este enzima participa en muchos aspectos del metabolismo del ADN, entre ellos la replicación y transcripción, lo que hace que juegue un papel importante en el ciclo celular. La expresión de Topoisomerasa-II $\alpha$  es un marcador de proliferación tisular, sobre todo está aumentado en la fases del ciclo celular S y G2. Elevados niveles del enzima están relacionados con una elevada proliferación de la célula neoplásica y con la existencia de un tumor indiferenciado (57).

Existe un trabajo que evidencia que una elevada expresión de dicho enzima está asociada con aspectos agresivos en el TVu NoMinv, como son: un estadio más avanzado, un elevado grado y un elevado porcentaje de recidiva (49).

Otros estudios que incluyen tumores vesicales infiltrantes, la determinación de un porcentaje elevado de topoisomerasa II- $\alpha$  también está asociada con la progresión y una peor supervivencia cáncer-específica (69,70).

### **2.1.1.9 Ki 67 (MIB 1)**

La proteína Ki67 es expresada en cualquiera de las fases del ciclo celular exclusivamente por las células que están proliferando. Su determinación inmunohistoquímica en el tumor vesical urotelial ha sido ampliamente demostrada en cualquier grado o estadio. Existen controversias en cuanto su utilidad pronóstica. Existen series a largo plazo donde sí se observa que Ki67 juega un papel predictivo en cuanto a la recidiva y la progresión, aunque no en todos los trabajos publicados sucede esto. En el estudio del TVu NoMinv sí que se ha podido observar en análisis multivariantes la relación de la cantidad de Ki67 expresada (Ki67 labelling index) mediante determinación inmunohistoquímica, la recidiva y un peor comportamiento biológico del tumor (55,71,72).

### **2.1.2 Moduladores de la apoptosis**

La capacidad de las células tumorales en proliferar es determinada no sólo por la capacidad de división sino también por la capacidad de no perecer. El programa apoptótico o de muerte celular programada se puede dividir en dos componentes; los sensores, que se encargan de monitorizar el medio extra e intracelular y los efectores, que son los mecanismos que la activan (52).

Muchas de las señales que provocan la apoptosis convergen en la mitocondria, la cual responde a las señales proapoptóticas activando el citocromo C, un potente catalizador de la apoptosis. Existen proteínas que actúan modulando las señales propapoptóticas que determinan la activación del citocromo C, como es la proteína **Bcl-2**, que frena la activación de los mecanismos apoptóticos. Los últimos efectores de la apoptosis incluyen un gran número de proteasas llamadas Caspasas. Éstas, activadas entre otros por el citocromo C son las encargadas de ejecutar el programa de apoptosis (52).

Las células cancerígenas pueden adquirir la resistencia frente a la apoptosis utilizando varios tipos de estrategias. La propia alteración de la funcionalidad de p53 genera el perder un sensor del daño del ADN que indujera un efecto cascada proapoptótico. Otro mecanismo es conferido por la proteína **Survivina**, perteneciente a la familia de las inhibidoras de la apoptosis, su mecanismo estriba en bloquear la actividad de la caspasa (52,53).

Otro mecanismo de evasión de la apoptosis es la adquisición de una capacidad replicativa ilimitada. En los extremos finales de los cromosomas, llamados telómeros, se encuentran series de repeticiones de material genético con sólo 6 pares de bases en cada secuencia de repetición. Tras cada replicación esos pares de bases (ADN telomérico) se van

perdiendo. Esta “erosión” progresiva de los telómeros en la replicación sucesiva dificulta la protección y reparación de dichos extremos por las ADN polimerasas lo que se traduce en fusiones terminales de los cromosomas que generan un programa de apoptosis. Se ha evidenciado que las células neoplásicas mantienen la longitud de los telómeros en múltiples replications y ello es posible gracias a la acción del enzima **Telomerasa** (52).

Otra enzima que contribuye en la estabilización del ADN durante la replicación en el ciclo celular es **CtIP**. Esta endonucleasa coopera con un complejo proteico llamado MRN (MRE11-RAD50-NBN) para reparar las rupturas de la doble cadena de ADN durante la meiosis y la mitosis (S/G2 fase del ciclo celular), jugando un papel importante en la translocación cromosómica. En los tumores estas proteínas pueden estar sobreexpresadas (73).

La proteína **Wwox** (FORII) es el producto de la codificación del gen supresor tumoral WWOX. Esta proteína interactúa con otra denominada **p73**. Ambas presentan actividad proapoptótica. Cuando interactúan aumenta la tasa de muerte celular. Estas proteínas se encuentran inactivadas en el proceso de carcinogénesis (74).

El proto-oncogen c-kit codifica un receptor transmembrana tirosina quinasa denominado **c-kit** también llamado CD117 implicado en la hematopoyesis, espermatogénesis,

melanogénesis y en la carcinogénesis. La activación mediante un estímulo externo provoca una cascada interna de reacciones enzimáticas que facilita la adaptación de la célula a su entorno, por mediación de mensajeros secundarios inhibiendo la apoptosis (75).

### **2.1.2.1**

### **Bcl-2**

En el estudio inmunohistoquímico se puede observar que la distribución de la proteína en la zona basal es más característica de tejido normal, por el contrario a la vez que el estadio y/o el grado aumenta, la proteína tiende a estar en las células intermedias o superficiales. Si en el tejido tumoral la distribución es difusa, puede indicar mejor pronóstico (55).

Los resultados sobre la expresión de Bcl-2 son controvertidos. Mientras que en unos trabajos la sobreexpresión de esta proteína se ha relacionado con un estadio patológico avanzado, con la recidiva y la mortalidad cáncer-específica, en muestras de tejido tras cistectomía radical, en otras publicaciones se ha evidenciado menos potencial agresivo (53,55,58).

Con respecto al TVu NoMinv, existen algunos trabajos que demuestran la relación entre la sobreexpresión de Bcl-2 y la probabilidad de recidiva. En cambio en otros estudios se



observa una sobreexpresión del marcador en los tumores de bajo grado, confiriendo un mejor pronóstico (55,76-77).

### **2.1.2.2 Survivina**

Survivina es miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis, su función es bloquear la actividad caspasa. También induce cambios en la expresión génica que son asociados a la invasión tumoral. En los tejidos normales está poco expresada o es indetectable y se sobreexpresa en las células tumorales (56,78).

En el TVu, en muestras tisulares tras cistectomía radical, la sobreexpresión de survivina estaba relacionada con un peor estadio tumoral, con metástasis ganglionar, recidiva y peor supervivencia cáncer-específica. Survivina se sobreexpresa con más frecuencia en enfermedad músculo-invasiva que en tumores vesicales superficiales.

En un estudio multicéntrico publicado donde se incluían tanto tumores vesicales superficiales como infiltrantes, la adición de survivina a las variables clásicas anatomoclínicas mejoraba la predicción de la enfermedad en cuanto a la recidiva y supervivencia cáncer específica (53,58).

### **2.1.2.3 Telomerasa humana**

Este enzima contribuye con la estabilidad genómica reparando los telómeros. Está compuesta por una subunidad de ARN y diversos componentes proteicos. La subunidad de ARN (hTR) contiene el molde del ADN telomérico que se añadirá. Dentro de las proteínas que contiene se encuentra la subunidad catalítica transcriptasa reversa (hTERT) y se expresa con la activación de la telomerasa durante la inmortalización celular, siendo esta subunidad la que mejor se correlaciona con la actividad del enzima (77,79).

Su expresión inmunohistoquímica ha sido estudiada en diversos cánceres y un incremento de ella localizada en el núcleo parece estar asociada al proceso neoplásico, como ocurre en el cáncer de cavidad oral. Se ha observado que un aumento de p53 mutada genera un descenso en la expresión de hTERT y el aumento de hTERT es directamente proporcional al aumento de expresión de caspasa-3 (77-80). También se ha evidenciado que un acortamiento en los telómeros activa el gen supresor tumoral de p53, como consecuencia un no acortamiento de los telómeros (difuncionalidad telomérica) puede activar la sobreexpresión de la protenina anómala p53 al presentarse una inestabilidad cromosómica (81).

Existe un estudio publicado en cuanto a su determinación inmunohistoquímica como pronóstico en el cáncer vesical. La

sobreexpresión de hTERT en el núcleo y en el citoplasma está asociada con carcinomas vesicales de bajo grado y estadio, sugiriendo que la activación de la telomerasa es un fenómeno temprano en la carcinogénesis urotelial. También existe una publicación en la que se asocia un aumento de la detección de hTERT en los pacientes con tumor vesical de mal pronóstico infectados por VHC (77,82).

#### **2.1.2.4 CtIP**

CtIP juega un papel en el control del ciclo celular inducido por un daño en el ADN, interactuando con la proteína pRb. Se ha llegado a la conclusión que CtIP puede jugar un papel importante como supresor tumoral. La función normal de CtIP consistiría en prevenir la transformación oncogénica de células que están sufriendo un gran índice de reparación del ADN. Teniendo un doble papel como regulador de la apoptosis y modulador del ciclo celular (83).

No hay hasta el momento ninguna publicación que asocie la inmunoexpresión de este enzima endonucleasa y el cáncer vesical.

#### **2.1.2.5 Wwox**

La expresión de la proteína Wwox se produce en el citoplasma de la célula urotelial no tumoral. La pérdida de la inmunoexpresión de dicha proteína en el tumor vesical urotelial se correlaciona con un empeoramiento en el estadio, del grado y con el aumento de la probabilidad de progresión. La sobreexpresión de Wwox causa la redistribución de p73 desde el núcleo al citoplasma mejorando la actividad proapoptótica, incrementando la tasa de muerte celular (84,85).

#### **2.1.2.6 C-kit**

El receptor tirosina quinasa c-kit está relacionado con el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1). La mutación del gen es la implicada en los procesos neoplásicos, generando un aumento de la inmunoexpresión de la proteína. Existe un factor de célula madre (Stem cell factor) que al unirse a la proteína c-kit la activa, generando una cascada enzimática que protege a la célula de la apoptosis (regulación paracrina) (75).

### **2.1.3 Moléculas moduladoras de la matriz extracelular**

Entre varias clases de estas moléculas se encuentra la familia de las **citoqueratinas**, que comprenden al menos 20 tipos diferentes de filamentos citoplásmicos que presentan un gran número de células epiteliales y tumorales (55).

#### **2.1.3.1**

#### **Citoqueratina 20**

En el urotelio, la citoqueratina 20 (CK20) es expresada por células superficiales. En el TVu esta expresión se encuentra mantenida o se modifica con respecto al grado y/o estadio tumoral. Ha sido descrita que una expresión de CK20 en las células superficiales está asociada a una mejor evolución. En los TVu NoMinv el análisis topográfico de la tinción de CK20 resulta útil como predictor de la evolución clínica, siendo una distribución difusa o la ausencia de expresión las que generan un peor pronóstico. En tumores de bajo grado una expresión de CK20 normal está asociada con una baja tasa de recidiva (55,85,86,87).

### **2.1.4 Moduladores de la angiogénesis**

El oxígeno y los nutrientes aportados por la vascularización son cruciales. El proceso de la angiogénesis es transitorio y cuidadosamente regulado. Los tejidos neoplásicos tienen que desarrollar su capacidad angiogénica para poderse dar a cabo una rápida expansión clonal y un tumor macroscópico. De entre todos los moduladores de la angiogénesis cabe destacar como regulador crucial al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Éste se une a los receptores transmembrana de tirosin kinasa que se encuentran en el endotelio vascular para promover la angiogénesis (52,53,88).

#### **2.1.4.1 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

Diversos miembros de la familia del VEGF han sido caracterizados. En el tumor vesical urotelial, la expresión del VEGF-C ha sido asociada con el tamaño tumoral, el estadio patológico, el grado, la presencia de metástasis ganglionares, siendo en el estudio multivariante, un factor predictor independiente de metástasis en ganglios pélvicos. La expresión marcada de VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D ha sido también asociada al estadio y al grado tumoral. VEGF-A es un factor proangiogénico, jugando un papel importante en la

neovascularización y progresión tumoral e incluso puede tener un papel importante en la linfangiogénesis. La sobreexpresión de VEGF en citoplasma está asociada a un periodo libre de recidiva más corto en los tumores T1/G2. También dicho aumento en la detección de VEGF se asocia a la expresión alterada de otros marcadores como p21, p27, pRb, ciclina E y Ki67 (53,58,89,90).

### **2.1.5 Factores de transducción de señales y marcadores del metabolismo celular**

En este subgrupo se encuentran las moléculas que están implicadas en el metabolismo celular, como la glicólisis y la función que realiza en este caso el Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). También se engloban en este grupo mediadores de la inflamación tisular como el enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). Dicha actividad metabólica e inflamatoria se ha observado que están aumentadas en la carcinogénesis (91-93).

Otra de las funciones que realiza GAPDH es la de estabilizar los telómeros en la división celular contribuyendo a la homeostasis cromosómica (92,93).

El enzima alfa-metilacil coenzima A racemasa (AMACR, p504S), es un enzima envuelto en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena ramificada en las mitocondrias y peroxisomas (94).

#### **2.1.5.1 Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)**

El gen del GAPDH se encuentra en el cromosoma 12 (12p13.31) y produce la proteína también llamada Uracil ADN glicosilasa. Este enzima cataliza la fosforilación oxidativa del gliceraldehido-3-fosfato, un importante paso en el metabolismo de carbohidratos. Es conocido que las células neoplásicas incrementan la glicólisis aeróbica para generar ATP e intermediarios metabólicos que induzcan a una marcada proliferación celular. A parte de dicha función principal en la glicolisis, GAPDH presenta otros cometidos como: activar la transcripción, participar en el ensamblaje del ARN y su externalización del núcleo celular y en la replicación y reparación del ADN. El GAPDH se transloca al núcleo durante la apoptosis. GAPDH interactúa con el complejo telomerasa inhibiéndola y facilitando la apoptosis (92,93).

La expresión del GAPDH está aumentada en los tejidos neoplásicos. No existen en la literatura trabajos que relacionen la inmunoexpresión de GAPDH con el tumor vesical (92,93).



### **2.1.5.2 Ciclooxygenasa 2 (COX 2)**

El enzima ciclooxigenasa (COX) cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina. Presenta dos isoformas, la COX-2 es la principal responsable de la respuesta inflamatoria y es indetectable en el tejido normal. La sobreexpresión de dicha enzima genera una activación de la prostaglandina que a su vez estimula la proliferación celular y la angiogénesis así como influye en la supresión de la apoptosis (91).

Diversos trabajos han demostrado el aumento de la expresión de COX-2 en el citoplasma de la célula tumoral, como ocurre en el carcinoma urotelial vesical, comparado con tejido no-neoplásico. Se ha encontrado una sobreexpresión de COX-2 en el cáncer vesical asociado a la esquistosomiasis (91, 95).

### **2.1.5.3 $\alpha$ -Metilacil-CoA-Racemasa**

Existe un estudio que encontró una asociación de la inmunoexpresión de racemasa en el citoplasma de las células de tumores vesicales superficiales de alto grado (94).

A continuación se presenta una tabla-resumen de lo explicado (tabla 2).

**Tabla 2. Relación de marcadores inmunohistoquímicos y su estudio en el tumor vesical .**

<b>Marcador</b>	<b>Expresión asociada al tumor vesical</b>
P53	Elevado/mutado, peor pronóstico
pRb	Elevado peor pronóstico aunque existe poca asociación
P21	Elevado en los TVu NoMinv Se asocia a p53
P27	Elevada expresión puede asociar peor pronóstico
P16INK4a	Baja expresión, peor pronóstico
Ciclina D1	Aumentada en tumores Vs controles Aumentada en estadios iniciales del tumor vesical
Ciclina E	Descenso asociado a Tvu metastásico
Ciclina G	Vinculada a p53 y pRB
P14	No existen trabajos que analicen su relación
Topoisomerasa 2a	Elevada, peor pronóstico
Ki 67	Elevada, peor pronóstico
Bcl-2	Elevada, peor pronóstico. Sobreexpresión posible recidiva
Survivina	Elevada, peor pronóstico
Telomerasa humana (nuclear, nucleolar)	Elevada en tumores vesicales
C-tip	No hay estudios de asociación

Wwox	Baja expresión, peor pronóstico. Relacionada con el grado, el estadio y progresión
C-kit	Su aumento posible factor de mal pronóstico. No estudiado en TVu
CK 20	Peor pronóstico si su distribución es difusa o existe ausencia de expresión. En los TVu de bajo grado existe una baja tasa de recidiva si la expresión es normal en las células superficiales
VEGFR2	Elevada, peor pronóstico
GAPDH	Elevada en tejidos neoplásicos. No estudiado en TVu.
COX-2	Elevada en tumor vesical (esquistosomiasis)
Racemasa	Elevada en tumor vesical de alto grado.



## Hipótesis.

Existen marcadores inmunohistoquímicos expresados en el tumor vesical urotelial papilar primario sin invasión de la muscular propia (pTa/pT1) grado 2 que pueden predecir la evolución clínica.

La expresión de algunos de estos marcadores puede variar según el estadio T y el grado OMS 2004.



## Objetivos.

### Primarios

Determinar qué variables anatómo-clínicas utilizadas en la práctica clínica habitual y qué marcadores inmunohistoquímicos representativos de las diversas rutas oncogénicas expresados en el tumor vesical urotelial papilar primario sin invasión de la muscular propia (pTa/pT1) grado 2 tiene carácter pronóstico con respecto a los periodos libres de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica.

### Secundarios

-Analizar la relación entre la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos con respecto a la estratificación tumoral según el estadio T y el grado OMS 2004.

-Reflejar de manera gráfica la expresión en conjunto de dichos marcadores inmunohistoquímicos mediante la construcción de mapas tridimensionales.

-Analizar la utilidad clínica y pronóstica de la clasificación del grado tumoral OMS 2004.

-Crear grupos de riesgo según las variables seleccionadas. Comparación de los grupos de riesgo generados con los calculados mediante la puntuación de la EORTC y la clasificación de los pacientes según el estadio T y el grado OMS 2004.





## Material y métodos

### 1.-Planteamiento metodológico

Estudio observacional diseñado en dos fases. Una primera transversal en la que se recogieron los datos de las variables clínicas y anatomopatológicas clásicas con respecto al momento de la cirugía y la realización de las determinaciones inmunohistoquímicas y una segunda fase ambispectiva en la que se efectuó un seguimiento longitudinal de los pacientes para evidenciar si se produjo el evento recidiva, progresión o mortalidad cáncer-específica hasta el cierre del estudio.

Se planteó la recogida de un tamaño muestral representativo de 250 pacientes con las características de presentar un TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973) y que fueron tratados con el mismo esquema de quimioterapia intravesical (Mitomicina C) entre los años 1999-2008, seleccionados de manera aleatoria a partir de la base de datos del Servicio de Anatomía patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. La mayor parte de los pacientes fueron pertenecientes al área 5 de salud de la Comunidad Valenciana.

Una vez seleccionados, se revisaron las muestras del tumor vesical primario procesadas en hematoxilina eosina por medio de un especialista en Anatomía Patológica dedicado a la

Urología y la historia clínica de cada enfermo por un Urólogo si los pacientes cumplieran los criterios de selección del estudio:

- Confirmación del diagnóstico de tumor papilar urotelial primario TVu NoMinv (no infiltrante T2) con un seguimiento no inferior a un año y con un tiempo libre de recidiva/progresión no inferior a tres meses.
- Ausencia de un grado 3. Ausencia de CIS concomitante.
- Enfermos a los que se ha realizado un tratamiento adyuvante sólo con ciclos de Mitomicina C, correspondiente al protocolo de tratamiento/seguimiento de los tumores vesicales superficiales instaurado por el servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia en el periodo 1999-2008 (modificado en 2009) (Documentación anexa).
- Se valoró que el tratamiento y seguimiento de los enfermos del estudio hubiera sido uniforme. Se descartaron los casos tratados con BCG u otro quimioterápico. Ningún paciente tras la resección del tumor vesical primario recibió instilación de Mitomicina C en el postoperatorio inmediato.
- Ausencia de otro tipo de cáncer sincrónico al periodo de obtención de la muestra de tumor vesical.

Después de la selección, quedaron 213 pacientes a los que se realizó el estudio inmunohistoquímico. Los pacientes en seguimiento vigente de su enfermedad firmaron un consentimiento informado del estudio (con la finalidad de poner en su conocimiento el tratamiento de sus datos (Documentación anexa). Cabe resaltar que en las fechas del procesado de los tumores vesicales del estudio no estaba vigente y en activo un biobanco de tumores) Se siguieron los principios éticos para la investigación médica en seres humanos explicitados en la Declaración de Helsinki (y sus actualizaciones posteriores) de la Asociación Médica Mundial (*World Medical Association, WMA*) y el estudio fue avalado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación para la investigación del Hospital Clínico Universitario.

## 2.-Determinación inmunohistoquímica

El material biológico estudiado de los 213 pacientes fue obtenido de los bloques de parafina dentro de los cuales el tejido tumoral estaba preservado.

Fueron seleccionados marcadores moleculares representativos de las distintas rutas oncogénicas descritas. La utilidad como marcador oncogénico en el tumor vesical de la mayor parte de ellos está contrastada en la literatura.

Los marcadores estudiados agrupados en las distintas familias oncogénicas fueron:

- Reguladores del ciclo celular/ promotores de la proliferación celular: P53, P14, Topoisomerasa-II $\alpha$ , Ki 67, P16INK4A, P27, P21, PRb, ciclina G, ciclina E, ciclina D1
- Moduladores de la apoptosis: Bcl2, Survivina, Telomerasa humana (hTERT) nuclear y nucleolar, CtIP, c-kit, Wwox.
- Moduladores de la angiogénesis: VEGFR2
- Moduladores de la matriz extracelular: citoqueratina 20 (CK-20)
- Factores de transducción de señales y marcadores del metabolismo celular): GAPDH, COX-2, racemasa.

## 2.1\_Construcción de matrices tisulares

2.1.1 Recogida de bloques donantes y preparaciones histológicas: selección de áreas

De cada uno de los bloques seleccionados se realizó una sección para la tinción con hematoxilina-eosina, en la que se marcaron las áreas de interés para el estudio (dos por cada HE) (figura 4).

Estas áreas marcadas en el porta teñido con HE se trasladaron por comparación a los bloques marcándose éstos con un rotulador indeleble al igual que lo estaban las laminillas.

### 2.1.2 confección de las planillas

Se repartieron los 230 casos del estudio en 8 tablas (planillas de las matrices), conteniendo cada matriz o planilla 30 casos más 1 caso de control en 4 de ellas, 30 casos sin control en 3 de ellas y 20 casos sin control en una de ellas.

### 2.1.3 Preparación de las matrices

Se realizaron 8 bloques en blanco (sin agujeros ni burbujas) destinados a ser los receptores de los cilindros del estudio (cada cilindro corresponderá a una de las áreas seleccionadas)

Estos bloques se desbastaron con el microtomo para igualar su superficie, esto aseguró que los cilindros se cortaban todos al mismo tiempo.

Posteriormente con ayuda del MTA1-manual Tissue Arrayer (serial number 2004615) de Beecher Instruments, Inc. se construyeron las matrices tisulares de la siguiente forma:

1. Ajustar el bloque receptor en el portabloques, de modo que la superficie del bloque sea paralela a la placa base. Elegir el punto 0 de inicio de construcción de la matriz, el cual se sitúa en la esquina inferior izquierda, de tal manera que el resto de cilindros de la matriz quede centrado en el bloque receptor dejando suficiente parafina libre de cilindros rodeando toda la matriz (aprox 2,5-3 mm.). De esta forma evitamos problemas en el momento de cortar los bloques en el microtomo como fragmentación de la parafina o pérdida de cilindros. Colocar a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros. A partir de este punto 0 nos desplazaremos por el eje X y el eje Y con ayuda de los mismos.
2. Elegir el juego de agujas apropiado. La aguja más gruesa de cada juego es la que hace el agujero en el bloque donante y saca el cilindro con tejido y la más pequeña hace el cilindro en el bloque receptor sacando solo parafina. En este caso utilizamos las agujas de 1 mm. de diámetro.
3. No es necesario ajustar la profundidad de descenso de la aguja de menor diámetro porque está fija en nuestro "tissue microarrayer" mediante un tope.
4. Efectuar primero el agujero correspondiente al bloque de parafina receptor. Para ello se introduce la aguja y se

empuja hasta llegar al tope. Se mueve el mango de la aguja para facilitar la realización del cilindro de parafina, hasta su extracción. Desechar el cilindro de parafina. Colocar el puente por encima del portabloques y, a continuación, el bloque de tejido donante sobre el mismo. El bloque de parafina receptor queda bajo el puente en la posición adecuada para introducir el nuevo cilindro.

5. Cambiar la posición de las agujas y pinchar el tejido del bloque donante.
6. Retirar el puente con el bloque donante.
7. Expulsar el cilindro de tejido exactamente encima del agujero realizado en la parafina, de forma que quede justo a nivel de la parafina sin hundirlo.
8. Cambiar las medidas del micrómetro con el fin de hacer el siguiente agujero. En nuestro caso dejamos 1 mm. de separación entre centro y centro de cada cilindro, con lo cual este milímetro sumado al milímetro del diámetro del cilindro nos dará un total de 2 mm. que habremos de desplazar el micrómetro para realizar el siguiente "core".
9. Proseguir con todos los cilindros hasta la finalización del "tissue array", siempre siguiendo el orden de colocación dado por la planilla que realizamos antes.

#### 2.1.4 Consolidación del bloque

Una vez terminada la matriz, introducir el bloque en una estufa a 37 °C durante 12 horas aproximadamente. Esto permite que los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina en los agujeros del “array” del bloque receptor. Sacar el bloque receptor de la estufa y presionar sobre él con un portaobjetos para nivelar la superficie. Aplicar una presión uniforme para empujar todos los cilindros del TMA a un mismo nivel. Dejar enfriar el bloque a temperatura ambiente antes de cortar.

#### 2.2 Técnica inmunohistoquímica

Se obtuvieron secciones de 2 micras de grosor de cada matriz tisular, utilizándose portas de DAKO (ref.K8020). Se realizó la técnica de inmunohistoquímica siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

##### *1. Desparafinación:*

- a) Poner las preparaciones histológicas a 65°C durante 30 minutos.
- b) Incubar en un primer xilol durante 15 minutos y luego realizar pases rápidos por xilol limpio.



## 2. Rehidratación:

- a) Lavar con alcohol absoluto
- b) Lavar con alcohol al 70%
- c) Lavar con alcohol al 50%
- d) Lavar bien con agua y agua destilada

## 3. Desenmascaramiento antigénico:

- a) Los anticuerpos pRB y WWOX se incubaron en tampón EDTA 1mM a pH8 durante 3 minutos en autoclave a 1,5 atmósferas de presión.
- b) El anticuerpo CASPASA-3 se incubó en tampón comercial de Dako con pH Alto (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828) código K8000*). Tampón Tris/EDTA concentrado 50 veces, pH 9. Para su uso se realizó una dilución 1:50 con agua destilada) durante 3 minutos a 1,5 atmósferas de presión en autoclave.
- c) C- Los anticuerpos P53, KI67, GAPDH, P16, P16INK4a, CICLINA G, CICLINA E, BCL2, P27, VEGFR2, CK20, COX2, C-KIT, TOPOISOMERASA II ALFA, SURVIVINA, P14, TELOMERASA y RACEMASA, se incubaron en tampón CITRATO comercializado por DAKO (diluido 1/10 en agua destilada) durante 3 minutos a 1,5 atmósferas de presión en autoclave.
- d) El anticuerpo P73 se incubó en tampón comercial de

DAKO con PH Bajo (*Dako EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (código K8005)*).

Tampón de citrato concentrado 50 veces, pH 6,1. Para su uso se realizó una dilución 1:50 con agua destilada ) durante 3 minutos a 1,5 atmósferas de presión en autoclave.

- e) Por último, los anticuerpos P21, CICLINAD1 y CTIP se incubaron en baño termostático a 99°C durante 40 minutos con tampón TRIS-EDTA pH9.

#### 4. Bloqueo de peroxidasa endógena

Una vez realizada la descompresión del autoclave se dejan enfriar las preparaciones en los respectivos tampones y después se lavan con agua, agua destilada y por último con PBS o TBS comercializado por DAKO (*EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831)*). Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20, concentrada 20 veces, pH 7,6 ( $\pm 0,1$ ). Para su uso se realizó una dilución 1:20 con agua destilada).

Se incubaron las preparaciones en solución de bloqueo de peroxidasa comercializada por DAKO (solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante (Ref. S2023)) durante 10 minutos.

No se bloquea el colágeno para evitar la tinción de fondo inespecífica, ya que gracias a la presencia de proteínas estabilizantes en los reactivos de DAKO utilizados no es

necesario (según recomendaciones de la casa comercial).

### 5. Anticuerpo primario

- a) Lavar 3 veces con PBS o TBS.
- b) Se diluyeron los anticuerpos puros en diluyente de anticuerpo comercializado por Dako (*EnVision™ FLEX Antibody Diluent Ref. K8006*. Tampón Tris, pH 7,2 que contiene 15 mmol/L de NaN<sub>3</sub> y proteína, listo para su uso). Las concentraciones vienen dadas en la tabla para cada uno de los anticuerpos y se incubó una hora a temperatura ambiente.

### 6. Sistema de visualización

- a) Lavar 3 veces con PBS o TBS.
- b) En el caso de los anticuerpos P73 y CASPASA-3 se realizó una incubación con ENVISION durante 30 minutos (*Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) Ref. K5007*). Dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo y ratón en solución tamponada que contiene proteína estabilizante y conservante. Este reactivo es un polímero conjugado con peroxidasa, que también está recubierto de anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón. Se compone de un esqueleto de dextrano al

que se han unido un gran número de moléculas de peroxidasa (HRP) y moléculas de anticuerpo secundario (Para la reacción de unión se ha utilizado una química única, que permite la unión de hasta 100 moléculas de HRP y hasta 20 moléculas de anticuerpo por esqueleto). El anticuerpo secundario unido al esqueleto de dextrano se ha obtenido de cabras. Reacciona igualmente bien con inmunoglobulinas de conejo y ratón, por tanto, solamente se necesita un reactivo de detección para los anticuerpos primarios de conejo y ratón.

- c) Para los restantes anticuerpos se utilizó el sistema de visualización LSAB (*Dako LSAB+ System-HRP Código K0690*) para su uso con anticuerpos primarios de conejo, ratón y cabra. El kit utiliza una técnica avidina-biotina en la que el anticuerpo secundario biotinado reacciona con diversas moléculas conjugadas de estreptavidina. Para ello se realizan incubaciones secuenciales con anticuerpo de enlace biotinado y estreptavidina marcada con peroxidasa. El anticuerpo de enlace contiene inmunoglobulinas biotinadas anti anticuerpos de conejo, ratón y cabra en solución tampón salina fosfato (*PBS, por sus siglas en inglés*) que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida sódica. El reactivo estreptavidina peroxidasa contiene estreptavidina conjugada con peroxidasa en PBS que

- contiene proteína estabilizadora y un agente antimicrobiano).
- d) Primero se incubaron las preparaciones en el reactivo de enlace (biotinylated link universal) durante 20 minutos. Pasado ese tiempo se lavaron las preparaciones con TBS y luego se incubaron con estreptavidina peroxidasa (streptavidin-HRP) durante 20 minutos más.
  - e) Lavar 3 veces con PBS o TBS en todos los casos.
  - f) Lavar con agua destilada.

### 7 Visualización de la reacción

- a) Para la visualización de la reacción se incubaron las preparaciones durante 5 minutos (excepto para los anticuerpos P73 y CASPASA-3 que fueron 10 minutos) en DAB (*Substrate Working Solution (CHROM)* suministrada por el kit Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Código K5007). *E kit contiene un Frasco B Dako REAL™ Substrate Buffer*) con 250 mL de solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante, y un Frasco C (*Dako REAL™ DAB+ Chromogen*) con 5 mL, de concentrado 50 veces tetrahidrocloreto de 3,3' diaminobencidina en disolvente orgánico. La solución *Substrate Working Solution*, que contiene *DAB*

(*CHROM*), se prepara mezclando bien 20  $\mu$ L de *Dako REAL™ DAB+ Chromogen (frasco C)* y 1 mL de *Dako REAL™ Substrate Buffer (frasco B)*. El sistema de sustrato produce un producto final marrón claro en el lugar del antígeno diana).

- b) Parar la reacción lavando con agua destilada.

### *7. Tinción de contraste*

- a) Se utilizó HEMATOXILINA 1 minuto.
- b) Se lavaron las preparaciones con agua corriente.

### *8. Deshidratación*

Se realizó con pases en alcoholes de graduación creciente hasta etanol absoluto.

### *9. Aclarado*

Se realizó mediante pases en Xilol.

### *10. Montaje*

Se cubrieron las preparaciones con cubreobjetos y Entellan (medio de inclusión para microscopía de MERCK)

#### 2.2.1 Relación de anticuerpos utilizados en la determinación inmunohistoquímica

**Tabla 3. Relación de anticuerpos utilizados en la determinación inmunohistoquímica.**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>PRETRATAMIENTO</b>	<b>SISTEMA DE VISUALIZACIÓN</b>
<b>P53 NCL- P53(DO7)</b>	NOVOCASTRA	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>KI67 MIB-1 M7240</b>	DAKO	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>GAPDH MAB374</b>	CHEMICON	1/200	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>P16 P16(F-12) SC- 1661</b>	SANTACRUZ	1/100	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>P21 M7202</b>	DAKO	1/25	BAÑO A 99°C 40' CON TAMPÓN TRIS-EDTA	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>PRB RB Ab1(1F8)</b>	NEOMARKERS	1/200	AUTOCLAVE 3' A 1,5	LSAB DAKO

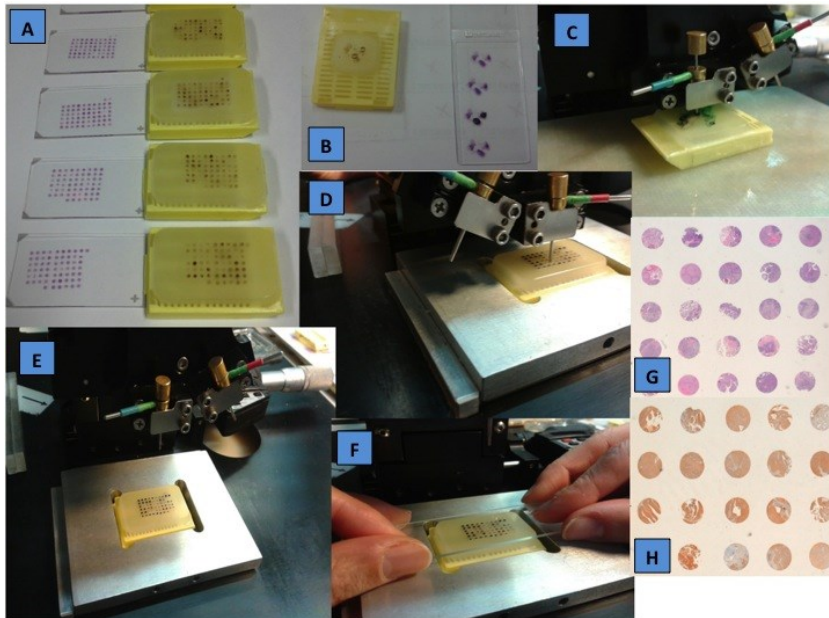
<b>MS-107-P</b>			ATM. CON TAMPÓN EDTA PH 8	K0690 / DAB DAKO K5007
<b>P16INK4a Ab4 CLON 16P04 O JC2 - MS887-P</b>	NEOMAR KERS	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>CICLINA D1 (SP4) RM- 9104-S</b>	NEOMAR KERS	1/50	BAÑO A 99°C 40' CON TAMPÓN TRIS-EDTA	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>CICLINA G NCL-CYCLING 11C8</b>	NOVOCA STRA	1/20	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>CICLINA E NCL-CYCLINE 13A3</b>	NOVOCA STRA	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>BCL2 NCL-BCL2- 486</b>	NOVOCA STRA	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>CTIP CTIP(H300)SC 22838</b>	SANTA CRUZ	1/800	BAÑO A 99°C 40' CON TAMPÓN TRIS-EDTA	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007



<b>ANTICUERPO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>PRETRATAMIENTO</b>	<b>SISTEMA DE VISUALIZACIÓN</b>
<b>WVOX</b>	-----	1/400	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN EDTA PH 8	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>P27 M7203</b>	DAKO	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>VEGFR2 FLK-1(C-20) SC-315</b>	SANTA CRUZ	1/100	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>CK20 M7019 CLON KS20,8</b>	DAKO	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>COX2 CX-2(H-62) SC7951</b>	SANTA CRUZ	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>C-KIT (CD117)</b>	DAKO	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO

			CITRATO PH 6	K5007
<b>TOPOIIa NCL TOPO IIa Batch:12400 6</b>	NOVOCA STRA	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>SURVIVINA NB500-201</b>	NOVUS	1/200	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>P14 P14 Ab4 RB- 1551-P</b>	NEOMAR KERS	1/100	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>TELOMERAS A NCL-h-TERT 44F12</b>	NOVOCA STRA	1/20	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>RACEMASA (P504s) M3616</b>	DAKO	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN CITRATO PH 6	LSAB DAKO K0690 / DAB DAKO K5007
<b>ANTICUERPO</b>	CASA COMERCIAL	DILUCIÓ N	PRETRATAMIENT O	SISTEMA DE VISUALIZACIÓ N
<b>P73 AB7824</b>	CHEMICO N	1/500	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON	ENVISION DAKO K5007 /

			TAMPÓN PH BAJO	DAB DAKO K5007
<b>CASPASA3 AB3623</b>	CHEMICO N	1/20	AUTOCLAVE 3' A 1,5 ATM. CON TAMPÓN PH ALTO	ENVISION DAKO K5007 / DAB DAKO K5007



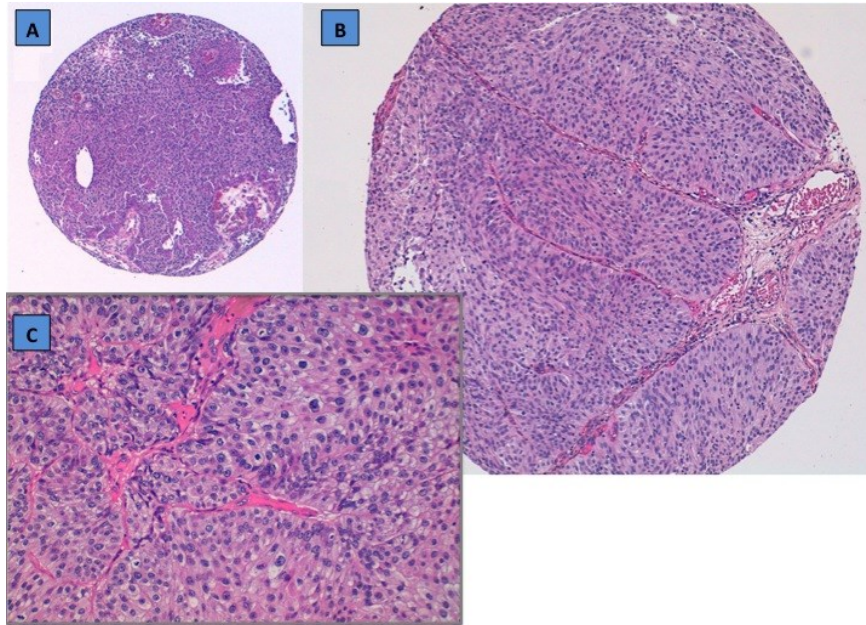
**Figura 3. Construcción y análisis de una matriz tisular a partir de muestras fijadas en formaldehído y embebidas en parafina.** A) Matrices tisulares y sus respectivos cortes teñidos con hematoxilina-eosina B) Marcaje de la zona a analizar en portaobjetos y en su localización en la parafina. C) Fijación del bloque en el micrótopo y extracción de la región marcada, una vez confeccionado el cilindro D) Colocación del cilindro preconfeccionado. E) Distribución del resto de las muestras. F) Corte de la matriz tisular. G) Tinción con hematoxilina-eosina H) Inmunotinción.

### 2.3 Interpretación de los resultados.

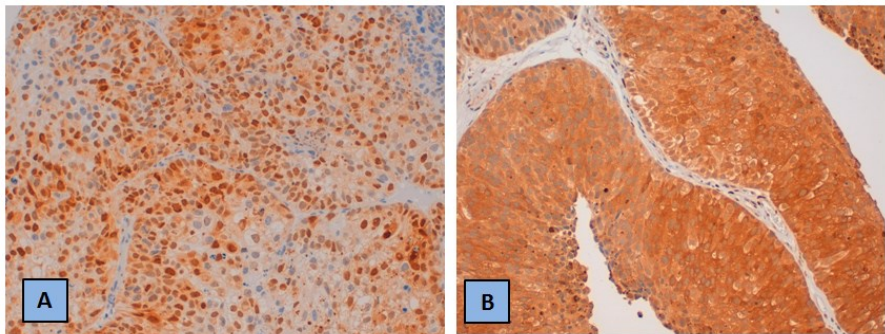
La interpretación diagnóstica de las matrices tisulares fue realizada por un anatomopatólogo experto en inmunohistoquímica y en cáncer urológico que desconocía el trabajo de campo efectuado (variables clínicas) para cada enfermo.

Se utilizaron dos criterios de puntuación, una escala cuantitativa del porcentaje de núcleos teñidos (0-100%) en los marcadores de expresión nuclear y una cualitativa referente a la intensidad de tinción del citoplasma (0-6).

En los marcadores Bcl-2 y CK 20 también se valoró la localización topográfica de la expresión (ausencia-difusa-basal-apical).



**Figura 4.** Cortes histológicos de los cilindros originados, tinción en hematoxilina-eosina. A) vista del cilindro en 10x. B) detalle del cilindro en 20x. C) detalle celular en 40x.



**Figura 5.** Inmunotinción de los cortes histológicos de cilindros. A) tinción nuclear a Ciclina D1 (detalle a 20x) B) tinción citoplasmática de GAPDH (detalle 20x).

### 3.-Gestión de datos

Se generó una matriz de base de datos con el programa IBM® SPSS® Statistics (v 19.0).

Las variables obtenidas fueron las siguientes:

- Clínicas (obtenidas de la historia clínica del enfermo): género, edad, consumo de tabaco, consumo de alcohol, profesión de riesgo, existencia de hipertensión arterial, diabetes mellitus.
- Anatomopatológicas clásicas: diámetro máximo tumoral (dato de la ecografía preoperatoria), número de tumores y localización multicéntrica (obtenido de la historia clínica), grado OMS 2004 y estadio tumoral (obtenido tras la nueva revisión de las preparaciones en hematoxilina-eosina).
- Expresión inmunohistoquímica de los marcadores moleculares, variables según el porcentaje expresión nuclear, de la intensidad de expresión del citoplasma y de la topografía de la expresión: P53 (nuclear), P14 (nuclear), Topoisomerasa-II $\alpha$  (nuclear), Ki 67 (nuclear), P16INK4A (nuclear y citoplasmático), P27 (nuclear), P21 (nuclear), PRb (citoplasmático), ciclina G (nuclear), ciclina E (nuclear y citoplasmático), ciclina D1 (nuclear y citoplasmático), Bcl2 (citoplasmático y topografía), Survivina (nuclear y citoplasmático), Telomerasa

humana (hTERT) nuclear y nucleolar, CtIP (citoplasmático), c-kit (citoplasmático), Wwox (citoplasmático), VEGFR2 (nuclear y citoplasmático), citoqueratina 20 (CK-20) (citoplasmático, topográfico), GAPDH (nuclear y citoplasmático), COX-2 (citoplasmático), Racemasa (citoplasmático).

- Variables tras puntuación EORTC con respecto a la recidiva y progresión de la muestra (riesgos bajo, intermedio y alto).
- Variables longitudinales del seguimiento (obtención retrospectiva o prospectiva): recidiva, tiempo libre de recidiva, progresión, tiempo libre de progresión, mortalidad cáncer-específica, tiempo libre de mortalidad cáncer-específica y fecha del último seguimiento.

Se consideró recidiva a la existencia de un nuevo tumor vesical confirmado por anatomía patológica una vez reseado, en un paciente que al menos estuvo 3 meses libre de enfermedad y controlado según el protocolo de seguimiento de los tumores vesicales del Servicio de Urología del Hospital Clínico de Valencia (anexo 1), mediante cistoscopia y citología.

Se definió como progresión de la enfermedad la existencia de una recidiva tumoral en vejiga cuyo análisis anatomopatológico revelase la presencia de infiltración

muscular (T2) o un tumor T1G3. También se consideró como progresión la presencia de adenopatías o metástasis en otros órganos con biopsia y confirmación histológica perteneciente a tumor urotelial. Otro criterio de progresión fue la existencia de un tumor de urotelio superior al menos T1 de alto grado.

La mortalidad cáncer-específica fue considerada como toda muerte a causa del tumor vesical. Los pacientes vivos en su última fecha de seguimiento y los fallecidos por otras causas se categorizaron como “no muertos (específicos)”.

#### 4.-Análisis estadístico y presentación de resultados.

El tratamiento estadístico del estudio se ha dividido en 3 bloques: análisis descriptivo de las variables estudiadas, selección de las variables predictoras mediante análisis multidimensional y construcción de grupos de riesgo y análisis de la supervivencia.

#### **4.1 Análisis descriptivo de las variables estudiadas**

##### 4.1.1 Análisis descriptivo de las variables dependientes

En primer lugar se representaron los datos descriptivos de las variables clínicas y anatomopatológicas clásicas



utilizando valores centrales como la media y su desviación típica y la mediana y el rango intercuartil.

Con respecto al análisis descriptivo de la expresión inmunohistoquímica, los datos se han representado utilizando gráficos bidimensionales y tridimensionales.

Para la distribución topográfica de los marcadores CK 20 y Bcl-2 se han usado diagramas de anillo y anillos seccionados.

En referencia a la expresión citoplasmática, se han construido mapas, simulando a los tipos coropléticos, hexagonales en modo de celdas para una observación cualitativa mediante una escala de colores que varían en color con respecto a la familia o ruta oncogénica y de intensidad conforme a la intensidad de la expresión.

En cuanto al porcentaje de expresión nuclear, se han representado los datos mediante gráficos de barras en función a la mediana y el rango intercuartil. También se ha utilizado los colores para representar a las distintas familias/rutas oncogénicas.

El análisis de expresión citoplasmática se representó según un mapa tipo coroplético de gradilla y el de expresión nuclear mediante un gráfico radial de superficies o capas. La distribución topográfica de CK 20 y Bcl-2 se representó mediante gráficos de anillos estratificados.

Posteriormente se realizó un análisis descriptivo en la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos con respecto a los tumores vesicales clasificados según el estadio TNM y el grado tumoral (OMS 2004). Al clasificar la muestra según estas características, se generaron 4 grupos: Ta Bajo grado, Ta Alto grado, T1 Bajo grado y T1 Alto grado.

Para valorar las diferencias entre los grupos, se compararon por parejas, el grupo de TVu Ta Bajo grado con respecto a T1 Alto grado y Ta Alto grado con respecto a T1 Bajo grado.

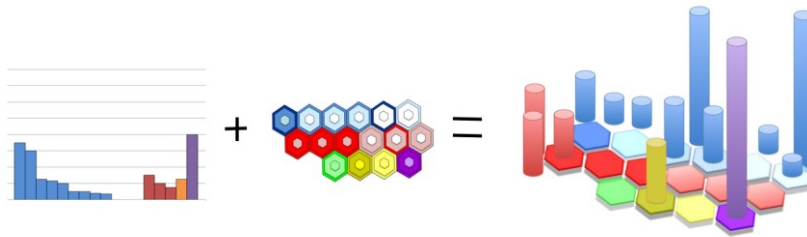
#### 4.1.2 Confección del mapa de los perfiles de expresión inmunohistoquímica

El porcentaje de expresión nuclear se ha expresado mediante gráfico de barras según la mediana.

La intensidad de expresión citoplasmática se representó según un mapa coroplético hexagonal donde cada marcador es dividido en 3 partes; un hexágono central representa la mediana y los límites del rango superior e inferior correspondientes a los hexágonos interior y exterior.

El mapa coroplético juega con los distintos colores según las familias o rutas biológicas y con la intensidad de cada color correspondiente a la intensidad de expresión citoplasmática.

Una vez confeccionados estos dos gráficos de expresión bidimensional, se procedió a agrupar los marcadores para construir un mapa tridimensional que uniera ambos tipos. Si un marcador inmunohistoquímico presentó expresión tanto nuclear como citoplasmática, se representaron de manera conjunta. La distribución en el espacio se realizó por familias y de manera no aleatoria. Se construyeron los mapas tridimensionales correspondientes a cada uno de los 4 grupos histológicos (figura 6).



**Figura 6. Esquema de la construcción de los mapas tridimensionales de la expresión inmunohistoquímica de los marcadores analizados en el estudio.**

#### 4.1.3 Análisis descriptivo de los grupos anatomopatológicos TNM /grado OMS 2004 y la supervivencia

Se han utilizado las curvas y el análisis de supervivencia tipo Kaplan-Meier con respecto al tiempo libre de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica. El estadístico utilizado fue el de Log Rank (Mantel-Cox). El nivel de significación estadística tolerado fue del 0,05 (96).

El programa informático utilizado para dicho análisis y su representación gráfica fue IBM SPSS Statistics v 20.0

#### **4.2 Selección de variables predictoras mediante análisis multidimensional**

Como consecuencia de presentar un gran número de variables, los métodos de regresión clásicos como la regresión de Cox, no debería ser el procedimiento adecuado de inicio para la selección de variables predictivas independientes ya que la probabilidad de cometer un error tipo II es elevada. Cuantas más variables se analizan, más fácil es que el azar haga que algunas de esas variables parezcan predictoras, es el fenómeno llamado “multiple testing” (97,98)

Por ello en este estudio se han utilizado dos modelos estadísticos de análisis multidimensional para la selección de

variables como son *Random Survival Forests RSF* y *Least absolute shrinkage and selection operator (LASSO)* (99,100).

El análisis mediante bosques aleatorios de supervivencia (*Random survival forest*) (RSF) es un algoritmo consistente en la generación de una combinación de árboles de clasificación o de regresión, que no son más que diagramas de toma de decisiones dicotómicas en base a los valores de distintas variables. Este grupo de árboles se construye de manera que cada árbol sea lo más distinto posible de los demás de manera que la correlación entre ellos sea lo más baja posible. Para realizar predicciones, cada uno de los árboles emite un voto individual que luego se consensa entre todos los árboles para emitir en un voto global. Una de las principales ventajas de *random survival forest* es la flexibilidad que tiene para incluir un gran número de variables y realizar predicciones con ellas. Además, dispone de un método de clasificación de la importancia de las variables por lo que no solo sirve para realizar modelos predictivos, sino que también es útil para seleccionar variables (99,100).

La técnica de regresión penalizada *absolute shrinkage and selection operator (LASSO)* es un método de selección de variables que puede utilizarse para seleccionar predictores  $X^*$  de un objetivo variable  $Y$ , a partir de un conjunto mayor de

potencial o predictores candidatos X. similar a un modelo de regresión lineal, con la forma:

$$y \sim \beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2 + \dots + \beta_j * X_j + \varepsilon$$

Sin embargo, para disminuir la variabilidad e inestabilidad de los coeficientes debido al desequilibrio entre el número de muestras y el número de variables, se le impone una restricción al modelo que consiste en delimitar el valor máximo que pueden sumar todos los coeficientes. Mediante esta restricción lo que se consigue es que muchos de los coeficientes acaben siendo igual a cero, por lo que se eliminan del modelo. De esta forma la lista de variables seleccionadas incluye únicamente aquellas cuyos coeficientes no sean 0 (101).

$$\text{Restricción: } \sum_{j=1}^p |\beta_j| \leq s$$

Como se puede observar ambas técnicas utilizan aproximaciones completamente distintas tanto para la construcción del modelo como para la selección de las variables más importantes. Esto es útil ya que, si las variables seleccionadas por los dos métodos coinciden, se puede interpretar que los resultados obtenidos son robustos. Es lo que se conoce como un análisis de sensibilidad (99-101).

Estos métodos no producen un p-valor ya que no realizan un contraste de hipótesis formalmente. Lo que hacen es seleccionar las mejores variables de entre todas las disponibles para crear un modelo predictivo eficaz (99-101).

Para su cálculo se utiliza el programa estadístico R versión (3.0.2. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>).

#### **4.3 Construcción de grupos de riesgo y análisis de la supervivencia como ejemplo de la selección de variables.**

Una vez seleccionadas las variables predictoras se crearon los grupos de riesgo clínico con respecto a los periodos libres de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica.

Estos grupos de riesgo se denominaron perfiles clínicos de riesgo a raíz de la selección de variables realizada por el análisis multidimensional.

Se realizaron comparaciones con respecto a las curvas de supervivencia generadas por la estratificación de los tumores según el TNM y el grado OMS 2004, según la puntuación de la EORTC obtenida y los perfiles de riesgo tras el análisis multidimensional. La estratificación según la

puntuación de la EORTC obtenida al año y a los 5 años se utilizó al comparar la recidiva y la progresión.

La puntuación de la EORTC de los pacientes de la muestra se obtuvo usando la calculadora de la página oficial:

<http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/download.asp>

Otra de las comparativas analizadas fue las probabilidades de supervivencia con respecto a la recidiva, progresión y mortalidad al año y a los 5 años de seguimiento de los grupos anteriormente descritos: combinación TNM y OMS 2004, puntuación EORTC (recidiva y progresión) y perfil clínico de riesgo generado tras el análisis multidimensional.

La construcción de las curvas de supervivencia según el método Kaplan-Meier y el análisis comparativo de las categorías generadas por los grupos de riesgo obtenidos se realizó utilizando el programa informático IBM SPSS Statistics v 20.0. El estadístico utilizado fue Log Rank (Mantel-Cox) con un nivel de significación estadística tolerado de un 0,05 (102).

Para la categorización de las variables continuas seleccionadas se utilizaron los puntos de corte generados por la tendencia de las curvas de probabilidad del suceso generadas por el análisis RSF.



## Resultados

### **Parte 1. Descripción general de las variables.**

#### **1.1 Variables clínicas**

El tamaño muestral comprendió un total de 213 pacientes. La edad presentó una media y mediana de 69,5 (10,4) años y 71,4 (27-89,7) años. Con respecto al sexo, hubo un predominio de varones (89,7%).

En cuanto a los hábitos tóxicos en el momento de la cirugía, un 51,2% de los pacientes refirieron consumo de tabaco y un 25,4% fueron clasificados como ex-fumadores ( $\geq 15$  años sin fumar). Un 90% afirmaron tomar alcohol de manera muy esporádica o no ser consumidores. Un 28,6% de los pacientes presentaron antecedentes en relación a una profesión de riesgo con respecto al cáncer vesical (pinturas, pesticidas y derivados).

En referencia a la morbilidad asociada, un 41,3% padecían hipertensión arterial y un 20% diabetes mellitus tipo 2.

Todos estos datos quedan recogidos en la tabla 4.

**Tabla 4. Variables clínicas de los pacientes intervenidos quirúrgicamente que presentaron un tumor vesical urotelial papilar sin afectación de la muscular propia grado 2 (OMS 1993).**

<b>Variables clínicas</b>	<b>(n) %</b>
Edad (69,5 ± 10,52* /71,4 (63,1-77,5)**)	
<70 años	98 (46%)
≥70 años	115 (54%)
Sexo	
Hombre	191 (89,7%)
Mujer	22 (10,3%)
Consumo de tabaco	
Sí	109 (51,2%)
No	50 (23,5%)
Exfumador	54 (25,4%)
Consumo de alcohol	
No/ocasional	191 (89,7%)
Moderado/elevado	22 (10,3%)
Profesión de riesgo	
Sí	61 (28,6%)
No	152 (71,4%)
Diabetes mellitus	
Sí	42 (19,7%)
No	171 (80,3%)
Hipertensión arterial	
Sí	88 (41,3%)
No	125 (58,7%)

Se representan:\* media (desviación típica) \*\* Mediana y rango intercuartil.

## **1.2 Variables anatomopatológicas clásicas**

La media de tumores resecados fue de  $2,4 \pm 2,0$  tumores, con un diámetro máximo medio de  $25 \pm 2,1$  mm. En un 37% de los pacientes, los tumores presentaron una localización multicéntrica.

En referencia al estadio según la clasificación TNM, el predominio fue de los tumores con invasión de la lámina propia (pT1) en un 61%.

Respecto al grado tumoral según la clasificación de la OMS del 2004, existió un predominio de tumores de alto grado.

Al combinar el estadio TNM y el grado (OMS 2004), el diagnóstico más frecuente fue el de tumor T1 de Alto grado (pT1AG) en un 48,4%, seguido de Ta de Alto grado (pTaAG) en un 22,7%, Ta de Bajo grado (pTaBG) en un 16,4% y un 12,5% se clasificaron como T1 Bajo grado (pT1BG).

Todos estos datos se recogen en la tabla 5.

**Tabla 5. Variables anatomopatológicas de los tumores uroteliales papilares sin afectación de la muscular propia grado 2 (OMS 1993).**

<b>Variables anatomopatológicas clásicas</b>	(n) %
Número de tumores ( $2,4 \pm 2,04^*$ / 1 (1-3)**)	
Tumor único	111 (52,1%)
Dos o más tumores	102 (47,9%)
Diámetro tumoral ( $2,6 \pm 2,01^*$ / 2 (1-3,2)**)	
< 20mm	118 (55,4%)
≥ 20mm	95 (44,6%)
Estadio	
pTa	83 (39%)
pT1	130 (61%)
Grado OMS 2004	
Bajo	62 (29,1%)
Alto	151 (70,9%)
Multicéntrico	
Sí	78 (36,6%)
No	135 (63,4%)

Se representan: \* media (desviación típica) \*\* Mediana y rango intercuartil.

### 1.3 Variables de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos

Con respecto a la expresión citoplasmática se observó que el marcador GAPDH es el que mayor intensidad alcanzó, con una mediana de 4 (2-5), seguido de cuatro marcadores más: Survivina, CtIP, Wwox y VEGFR2 (mediana de 3).

Los marcadores Ciclina E y p16 Santacruz son los que presentaron unos valores más bajos (tabla 6).

Los marcadores con mayor expresión nuclear fueron VEGFR2 con una media de 37,2 (36,3)% y mediana de 40 (0-75)%, P14 con media y mediana de 38,3 (31,5)% y 35 (5-70)% , y Ciclina G 37,1 (35,0)% y 30 (2,5-68)%, respectivamente. Tanto Ciclina E como pRb y p16INK4a su mediana de expresión fue 0 (tabla 7).

Los dos marcadores inmunohistoquímicos en los que se estudió la distribución topográfica de la expresión inmunohistoquímica presentaron como las más frecuentes, la distribución apical en CK20 y la ausencia de patrón de expresión en Bcl-2 (figura 7).

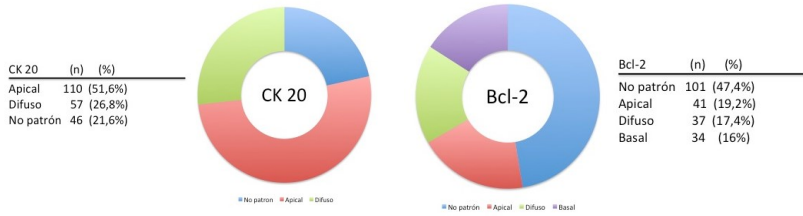
**Tabla 6. Valores obtenidos por los marcadores inmunohistoquímicos de expresión citoplasmática, ordenados según máximos.**

Marcadores inmunohistoquímicos	Mediana (Rango intercuartil)
GAPDH	4 (2-5)
PRb	4 (2-4)
Survivina	3 (1-4)
CtIP	3 (2-3)
Wwox	3 (2-4)
VEGFR2	3 (1-3)
P16INK4a	2 (0-3)
CK 20	2 (1-3)
COX-2	2 (1-3)
Ciclina D1	1 (0-3)
P21	1 (0-3)
Bcl-2	1 (0-2)

C-Kit	1 (0-3)
Racemasa	1 (0-2)
Ciclina E	0 (0-5)
P16 Santacruz	0 (0-2)

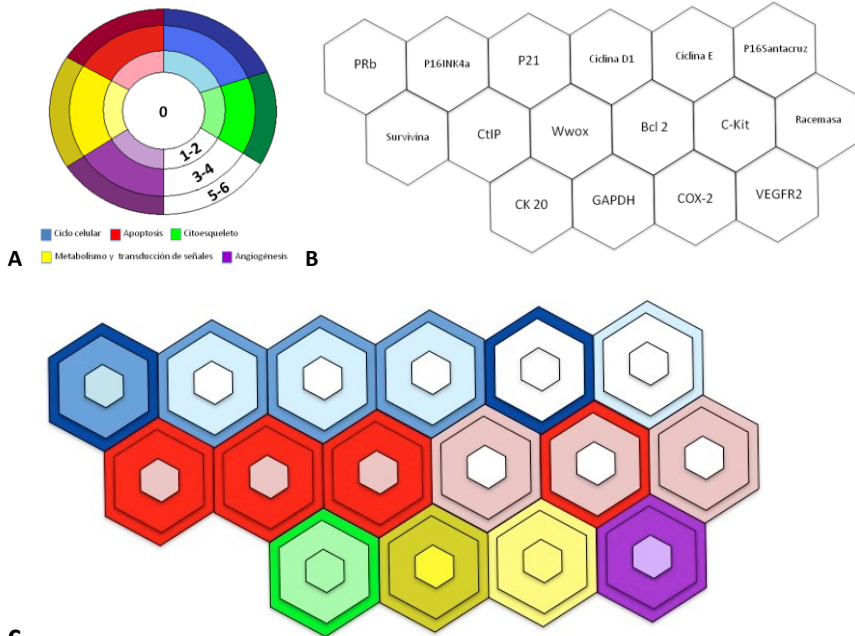
**Tabla 7. Valores obtenidos por los marcadores de expresión inmunohistoquímica nuclear, ordenados de mayor a menor media.**

Marcadores inmunohistoquímicos	Media $\pm$ DE	Mediana (Rango intercuartil)
VEGFR2	37,2 $\pm$ 36,3	40 (0-75)
P14	38,3 $\pm$ 31,5	35 (5-70)
Ciclina G	37,1 $\pm$ 35,0	30 (2,5-68)
Telomerasa Nuclear	29,8 $\pm$ 30,6	15 (2,5-52,5)
Telomerasa nucleolar	29,1 $\pm$ 35,7	10 (0-61,3)
GAPDH	25,6 $\pm$ 29,6	12,5 (0-48)
P21	21,2 $\pm$ 22,9	11,5 (2,5-35,5)
Ciclina D1	20,6 $\pm$ 22,5	12,5 (2,5-35,5)
P16 Santacruz	16,9 $\pm$ 24,9	5 (0-22)
Ki 67	16 $\pm$ 15,7	10 (4-23,5)
Survivina	13,6 $\pm$ 15,8	7,5 (2,5-19,8)
Topoisomerasa-II $\alpha$	9,4 $\pm$ 11,0	5 (2,5-11,8)
P27	8,7 $\pm$ 14,8	4 (0,5-10)
Ciclina E	5,2 $\pm$ 10,9	0 (0-5)
PRb	3,6 $\pm$ 12,2	0
P16INK4a	3,1 $\pm$ 9,0	0



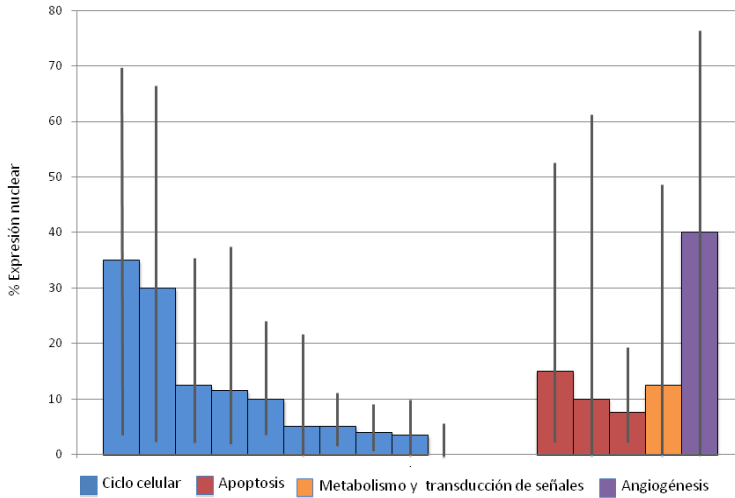
**Figura 7. Distribución topográfica de la expresión inmunohistoquímica de los marcadores CK 20 y Bcl-2.** Se representa las distribuciones apical, difusa, basal, ausencia de patrón en los colores rojo, verde, morado y azul, respectivamente.

En líneas generales, se han podido observar 4 rutas oncogénicas activadas en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973): la familia de reguladores del ciclo celular (P14, Ciclina G y PRb), reguladores de la apoptosis (Survivina, Wwox y CtIP) y GAPDH y VEGFR2 dentro de los marcadores moduladores de señales y metabolismo y de la angiogénesis, respectivamente (figura 8-10).

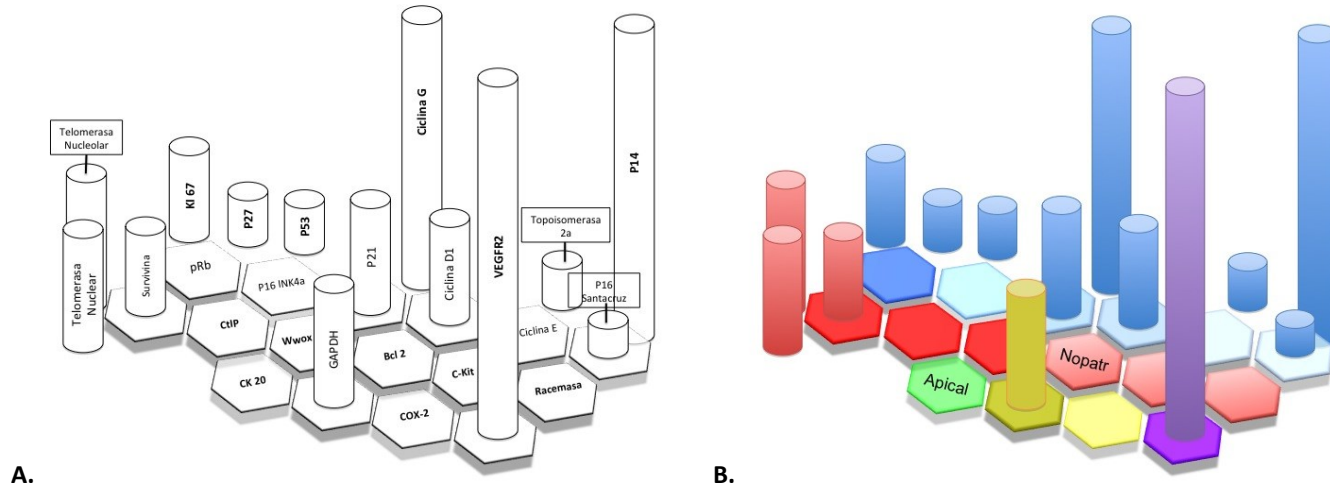


**Figura 8. Mapa coroplético 2D de la intensidad de expresión inmunohistoquímica citoplasmática en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** a.-Clasificación color/intensidad según familias de marcadores moleculares, b.-Distribución hexagonal de los marcadores, c.-mapa de color donde el hexágono interior y exterior corresponden al rango intercuartil y el hexágono medial a la mediana de intensidad según la tabla 3. Por ejemplo, el marcador pRb presenta una mediana de 3 (color hexágono central) y un rango intercuartil de 2 como límite inferior (color hexágono pequeño) y 4 como rango superior (color hexágono más externo).





**Figura 9. Expresión inmunohistoquímica nuclear en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** Se representa el porcentaje de expresión nuclear mediante la mediana. El rango intercuartil está comprendido entre la línea media en cada barra. Los colores de las barras corresponden a las familias/rutas oncogénicas de los marcadores. En orden: P14, Ciclina G, Ciclina D1, P21, Ki 67, p16 Santacruz, Topoisomerasa 2a, P27, P53, Ciclina E, pRb, p16INK4a, Telomerasa nuclear, Telomerasa nucleolar, Survivina, GAPDH, VEGFR2. Se observa que el marcador con mayor % de expresión nuclear es VEGFR2 (extremo derecha), seguido de P14 (extremo izquierda).

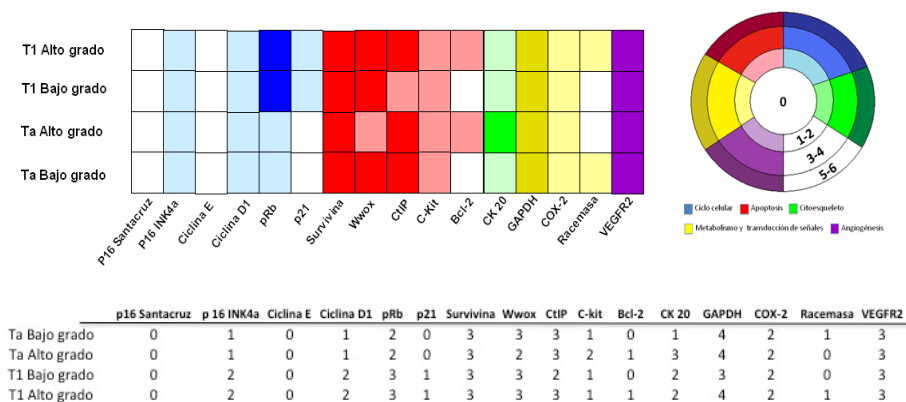


**Figura 10. Mapa tridimensional del patrón de expresión inmunohistoquímica en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** A) Esquema de la distribución de los marcadores. B) Resultado final. Los marcadores están coloreados según su familia/ruta oncogénica. Los hexágonos corresponden a la expresión de los marcadores citoplasmáticos (conservan la intensidad de expresión mostrada en la figura 7). Las columnas corresponden a los marcadores nucleares. La distribución topográfica mas frecuente se nombra encima del marcador correspondiente (Bcl-2 y CK 20). Se observa un predominio en la expresión de los marcadores: Ciclina G, P14, y pRb (ciclo celular), Survivina, CtIP, Wwox (apoptosis), VEGFR2 (angiogénesis) y GAPDH (metabolismo y transducción de señales).

### **1.3.1 Relación de la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos, el estadio TNM y la clasificación OMS 2004**

Se ha observado que los marcadores pRb, p21 y Bcl-2 presentaron una expresión citoplasmática más elevada en los tumores pT1AG con respecto a los pTaBG. Cuando se comparan los grupos pTaAG y pT1BG, los marcadores pRb, p21 y Wwox se encontraron con mayor expresión en el grupo T1 Bajo grado y CtIP, BCL-2 y CK20 en los tumores pTaAG (figura 11).

En líneas generales los marcadores pRb y p21 parecieron estar asociados a un aumento de intensidad en el estadio T1, al igual que el marcador Bcl-2 donde dicho aumento puede ser relacionado a los grupos con alto grado (OMS 2004) (figura 11).



**Figura 11. Expresión inmunohistoquímica citoplasmática según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).**

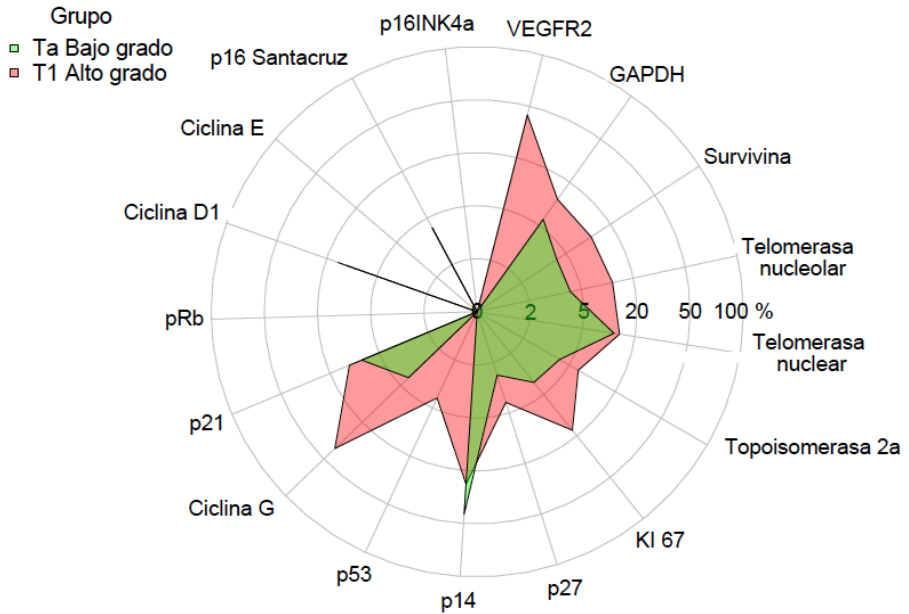
En la tabla se muestra la mediana. Por ejemplo, el marcador P16 Santacruz no muestra expresión en ningún subgrupo histológico. Los marcadores Survivina, GAPDH, VEGFR2, aunque presentan una intensidad elevada de expresión, permanecen invariables con respecto a los grupos histológicos. Los marcadores pRb, p21 y Bcl-2 presentaron una expresión citoplasmática más elevada en los tumores pT1AG con respecto a los pTaBG.

Con respecto a los marcadores de expresión nuclear, el grupo de tumores pT1AG presentó con respecto a los tumores pTaBG un aumento en la expresión de VEGFR2, GAPDH, Survivina, Telomerasa Nucleolar, Telomerasa nuclear, Topoisomerasa 2 alfa, Ki67, p27, p53 y Ciclina G. El marcador p14 es más expresado en los tumores pTaBG (tabla 8, figura 12).

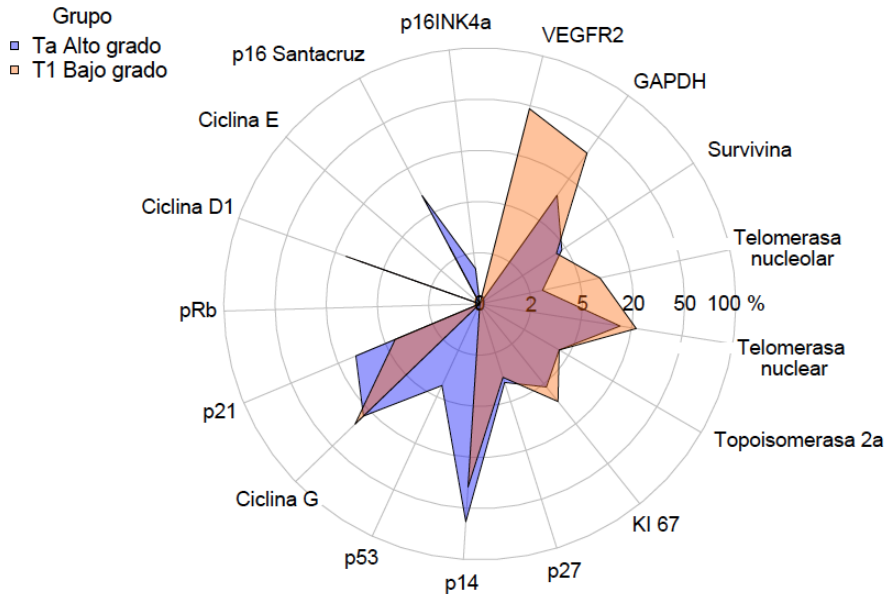
Las diferencias de expresión entre los otros dos grupos, pTaAG y pT1BG, se observaron en el aumento de expresión de p14, p53, p21, p16 santacruz en los pTaAG y un aumento de VEGFR2,

GAPDH, Ki67, Telomerasa nuclear y nucleolar en los pT1BG (tabla 8, figura 13).

Los marcadores Ki67, Ciclina G y Telomerasa nuclear ofrecieron una mayor expresión conforme empeoraba el estadio y el grado. El marcador P14 expresó niveles más altos en los grupos con estadio Ta con respecto a los T1, la expresión de P53 se asoció a los grupos de alto grado y, por último, el marcador VEGFR2 se expresó sólo en los grupos con estadio T1. (tabla 8) (figuras 12 y 13).



**Figura 12. Patrón de expresión inmunohistoquímica de los marcadores nucleares según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** Diferencias entre los tumores pTaBG y pT1AG. Los pT1AG presentan mayor porcentaje de expresión nuclear que los pTaBG a excepción del marcador P14.



**Figura 13. Patrón de expresión inmunohistoquímica de los marcadores nucleares según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** Diferencias entre los tumores Ta Alto grado y T1 Bajo grado. Los pTaAG presentan mayor expresión de P14, P53, P21, P16, en cambio los pT1BG presentan un mayor porcentaje de VEGFR2, GAPDH, Telomerasa nuclear y nucleolar y KI 67.

**Tabla 8. Descripción de los valores obtenidos por los marcadores de expresión inmunohistoquímica nuclear según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004).**

	p27	KI 67	Topoisomerasa 2a	Telomerasa nuclear	Telomerasa nucleolar	Survivina	GAPDH	VEGFR2
Ta Bajo grado	2,5 (0-7)	4,5 (2,5-9)	5 (0-7,5)	12,5 (0-36,5)	5 (0-56)	5 (0-7,5)	7,5 (0-24,5)	0 (0-75)
Ta Alto grado	4 (0,4-9,3)	7 (2,6-17,4)	5 (2,8-12,5)	15 (5-49,8)	2,5 (0-72)	5,8 (2,5-15)	12,5 (0-51,1)	0 (78,8)
T1 Bajo grado	3,5 (0-9)	10,5 (7-16,5)	5 (0-8)	21 (0-50,5)	10 (0-75)	5 (0-14)	36 (0-60)	50 (0-65)
T1 Alto grado	5 (1-12,5)	16,5 (6,6-30)	8 (5-15,5)	14 (2,5-61,5)	12,5 (0-60)	12 (5-30)	12,5 (2,5-42,5)	45 (0-75)

	p16INK4a	p16 Santacruz	Ciclina E	Ciclina D1	pRb	p21	Ciclina G	p53	p14
Ta Bajo grado	0 (0-2,5)	5 (0-13)	0	15 (2,5-32,5)	0	9,5 (4,5-39)	5 (0-40)	0 (0-5)	45 (5-70)
Ta Alto grado	1 (0-5)	10 (0-20)	0 (0-4,4)	11 (2,9-38,3)	0	12,8 (3,5-39,8)	22,5 (0-61,1)	4,8 (1-10,5)	70 (17-80)
T1 Bajo grado	0	2,5 (0-22)	0 (0-5)	15 (0-38,5)	0	5 (0-21,5)	28,5 (9,5-67,5)	0 (0-6)	35 (2,5-60)
T1 Alto grado	0	5 (0-23)	0 (0-7,5)	12,5 (0-30,5)	0	12,5 (3-37,5)	40 (7,5-72)	5 (0-18)	25 (5-55)

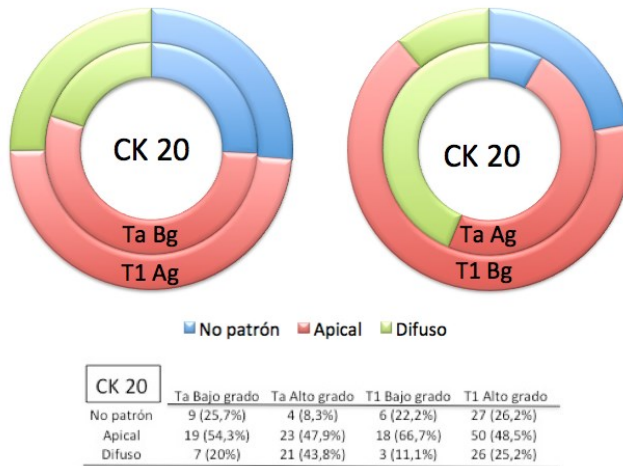
Se muestra mediana y rango intercuartil.

El marcador CK20 presentó la distribución apical como la más frecuente. No hay diferencias entre las proporciones de expresión topográfica entre pTaBG y pT1AG. Los tumores pTaAG presentan un mayor patrón difuso con respecto a los pT1BG. Estos últimos presentan una ausencia de patrón con mayor frecuencia que los anteriores. El grupo de peor pronóstico pT1AG es el que presenta mayor proporción de distribución difusa (figura 14).

En cuanto al marcador Bcl-2, la ausencia de patrón fue lo más frecuente entre los grupos, encontrándose marcadamente más aumentado en el grupo pTaBG frente al pT1AG. El grupo pT1AG presentó los patrones apical y basal marcadamente más expresada que en pTaBG (figura 15).

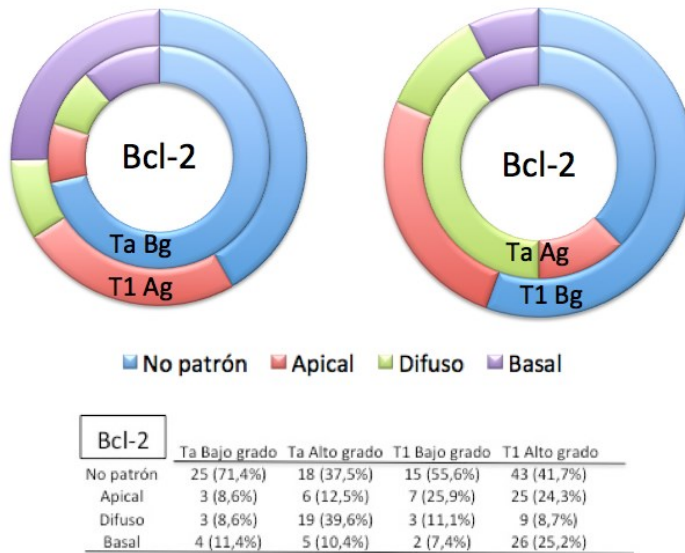
El grupo pTaAG presentó el patrón difuso más aumentado que pT1BG. En este último grupo predominó la ausencia de patrón y la distribución apical (figura 15).

Tanto el patrón apical como el basal se encontraron más aumentados en los grupos en el que el estadio fue T1 (figura 15).



**Figura 14. Distribución topográfica de la expresión inmunohistoquímica del marcador CK 20 según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973). Bg= Bajo grado, Ag= Alto grado. El patrón apical es el expresado con mayor frecuencia. Los T1 Ag expresan con más frecuencia un patrón difuso con respecto a los Ta Bg. Dicho patrón difuso es expresado con más frecuencia en los tumores Ta Ag con respecto a los T1 Bg, luego podría estar asociado a un alto grado. Los tumores T1 Bg presentan con mayor frecuencia una ausencia de patrón, con respecto a los Ta Ag. En la tabla se representa la mediana y rango intercuartil.**





**Figura 15. Distribución topográfica de la expresión inmunohistoquímica del marcador Bcl-2 según los grupos histológicos (TNM / grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** Bg= Bajo grado, Ag= Alto grado. La ausencia de patrón de expresión es la situación dada con mayor frecuencia. Los T1 Ag expresan con más frecuencia un patrón basal y apical con respecto a los Ta Bg. Dicho patrón difuso es expresado con más frecuencia en los tumores Ta Ag con respecto a los T1 Bg, luego podría estar asociado a un alto grado. Los tumores T1 Bg presentan con mayor frecuencia el patrón apical, con respecto a los Ta Ag, lo que indica que el patrón apical podría estar asociado al estadio T1. En la tabla se representa la mediana y rango intercuartil.

Como resumen, la expresión inmunohistoquímica presentó diferencias concretas entre los grupos histológicos.

Al comparar los grupos tumorales pTaBG con respecto pT1AG, se han encontrado diferencias de expresión en 16 marcadores (69,5% de los estudiados). Casi las mismas diferencias se han encontrado entre pTaAG y pT1BG (15 marcadores, un 65,2%).

Con respecto al estadio Ta se evidenció un aumento en la expresión nuclear de P14. En los tumores T1 se observó un aumento de la expresión nuclear del marcador de angiogénesis VEGFR2 y en la expresión citoplasmática de los marcadores pRb y p21. También dicho estadio se asoció una mayor tendencia a presentar un patrón de expresión topográfica de Bcl-2 apical y basal.

En cuanto al grado, la expresión citoplasmática del marcador Bcl-2 se relacionó con los grupos de alto grado (OMS 2004), hecho que también ocurre con respecto al aumento de la expresión nuclear de P53 (figuras 16 y 17).

Cabe resaltar que los marcadores Ki67, Ciclina G y Telomerasa nuclear presentaron una expresión nuclear progresivamente mayor conforme empeoraba el estadio y el grado de los grupos (figuras 16 y 17).

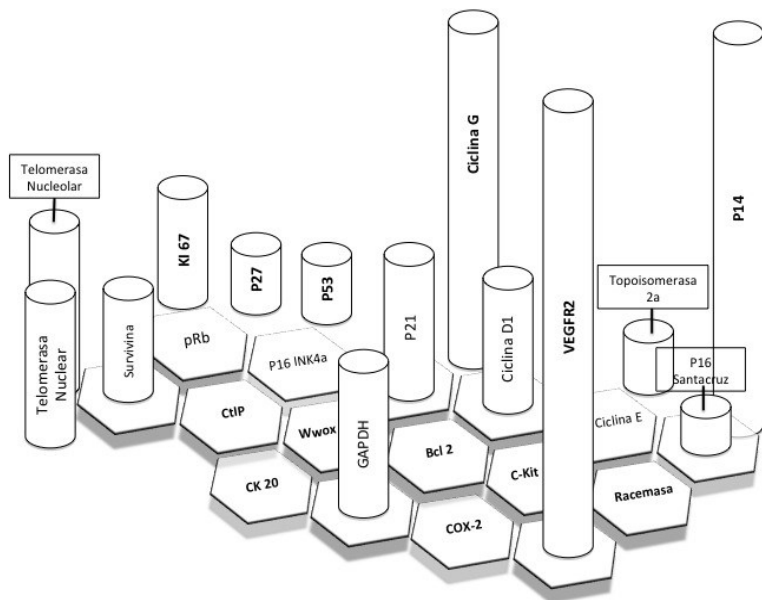


Figura 16 Mapa tridimensional del patrón de expresión inmunohistoquímica en los distintos grupos histológicos (TNM/Grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2. Relación de los marcadores.

Marcadores inmunohistoquímicos en el tumor vesical urotelial sin invasión muscular grado 2

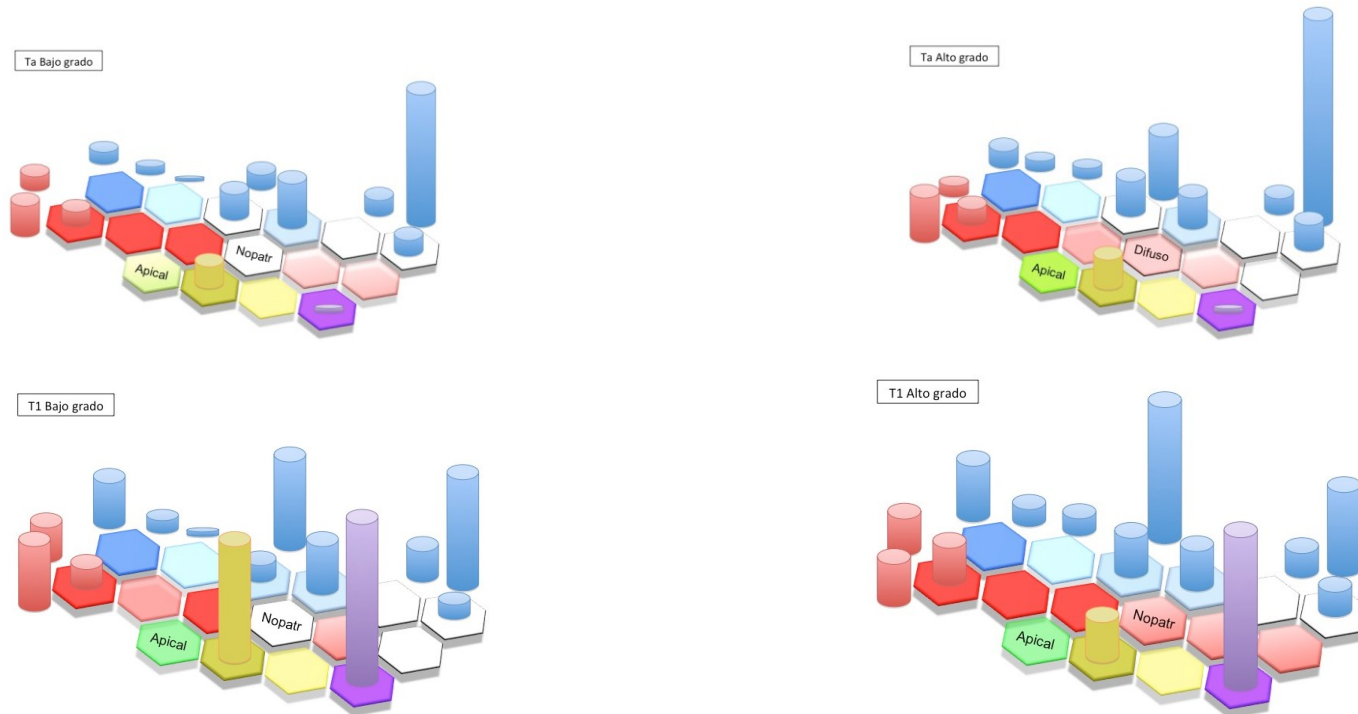


Figura 17. Mapa tridimensional del patrón de expresión inmunohistoquímica en los distintos grupos histológicos (TNM/Grado OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973). Muy destacable se puede observar que la expresión elevada de VEGFR2 nuclear, Ciclina G y KI 67 está asociada al estadio T1. La expresión nuclear de P14 elevada se asocia al estadio Ta

#### **1.4 Características generales del seguimiento. Recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica.**

El rango de seguimiento de la muestra estuvo comprendido entre los 12 y los 162 meses. La media y mediana del periodo de seguimiento fue de 58 (33,5) meses y 52,5 (31-77,5) meses respectivamente.

Las tasas de recidiva, progresión y mortalidad fueron de 54,5%, 17,4% y 38%, respectivamente, siendo la tasa de mortalidad cáncer-específica del 11,3%.

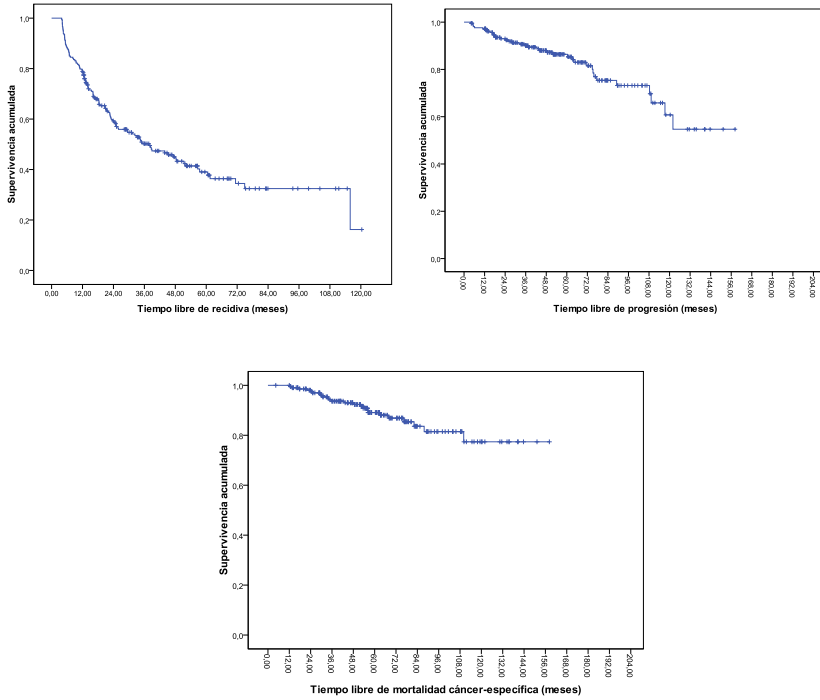
Con respecto a la recidiva, su mediana de supervivencia fue de 37,8 (25,6-50) meses. La probabilidad de supervivencia libre de recidiva al año fue de un 78% y de un 40% a los 5 años. La media y mediana del número de recidivas fue de 1,2 (1,5) y 1 (0-2) ocasiones.

Se observó una probabilidad de supervivencia libre de progresión al año y a los 5 años de un 98% y un 85%, respectivamente.

En cuanto a la mortalidad cáncer-específica, la supervivencia al año y a los 5 años fue de un 100% y un 86%, respectivamente.

En la figura 18 se puede observar las curvas de supervivencia originadas.

Marcadores inmunohistoquímicos en el tumor vesical urotelial sin invasión muscular grado 2

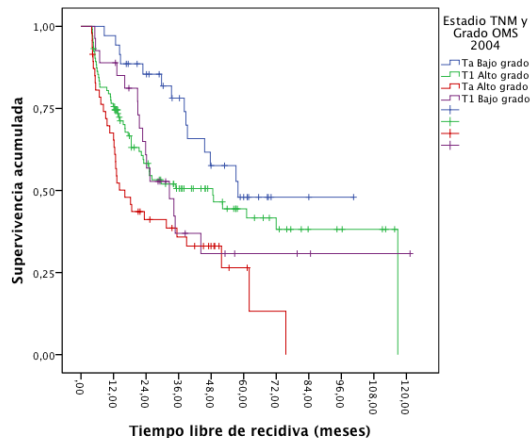


**Figura 18.** Curvas de supervivencia referentes a los tiempos libres de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica de los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).

### 1.4.1 Relación de los tiempos de supervivencia (recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica) y el estadio TNM y la clasificación OMS 2004

Con respecto a la supervivencia libre de recidiva, el grupo de tumores pTaBG es el que mostró un tiempo libre significativamente más prolongado, con una mediana de supervivencia de 57,4 (53,5-79) meses.

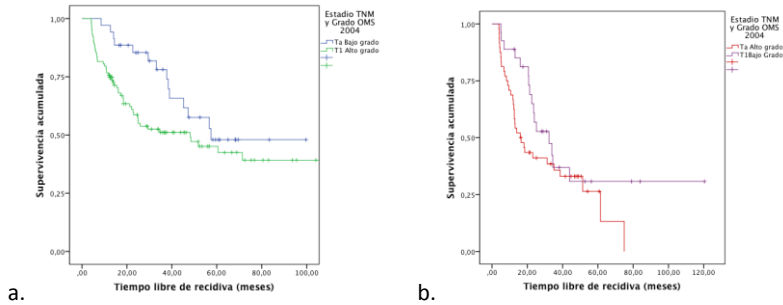
El grupo pT1 AG a pesar de su peor pronóstico no es el que presentó, comparado con los restantes grupos histológicos, el periodo libre de recidiva más corto (mediana de supervivencia de 48,2 (20,6-76) frente a pTaAG 16,1 (9,9-22,2) meses y pT1BG 32,3 (18,5-46,1) meses (figura 19).



**Figura 19.- Curva de supervivencia del periodo libre de recidiva con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).**

Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,004$ .

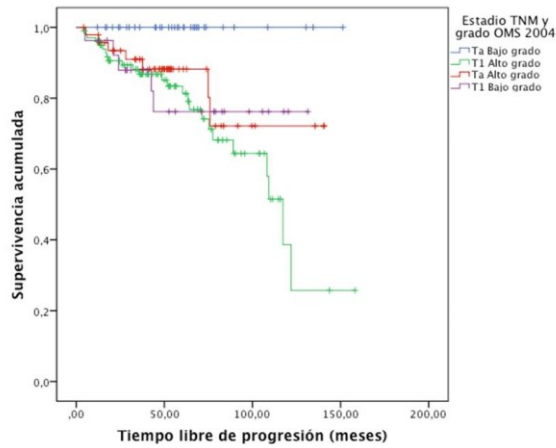
Al realizar el estudio comparativo entre los grupos pTaBG frente a pT1AG y pTaAG frente a pT1BG se observó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (figura 20).



**Figura 20. Curva de supervivencia del periodo libre de recidiva con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973). a) Ta Bajo grado frente a T1 Alto grado ( $p= 0,080$ ) b) Ta Alto grado frente a T1 Bajo grado ( $p=0,108$ ). Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox).**

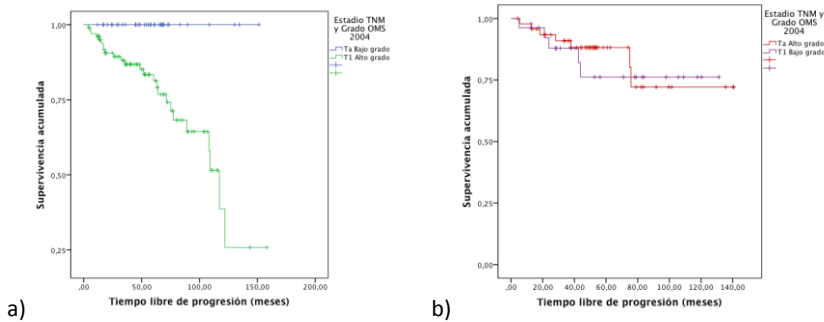
Con respecto a la supervivencia libre de progresión, no se produjo ningún evento en el grupo de los tumores pTaBG, lo que implicó que la diferencia entre los grupos fuera significativa. La probabilidad de no presentar progresión al año y a los 5 años fue respectivamente: pTaAG 95%/88%, pT1BG 97%/76% y pT1AG 96%/84% (figura 21).





**Figura 21. Curva de supervivencia del periodo libre de progresión con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,016$ .

Al ser analizados por separado los tumores pTaBG frente a los pT1AG se observó que estos últimos tienen un periodo libre de progresión significativamente más corto. No ocurre así cuando son comparados los pTaAG frente a los pT1BG, ya que no existen diferencias entre ellos (figura 22).



**Figura 22. Curva de supervivencia del periodo libre de progresión con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).**

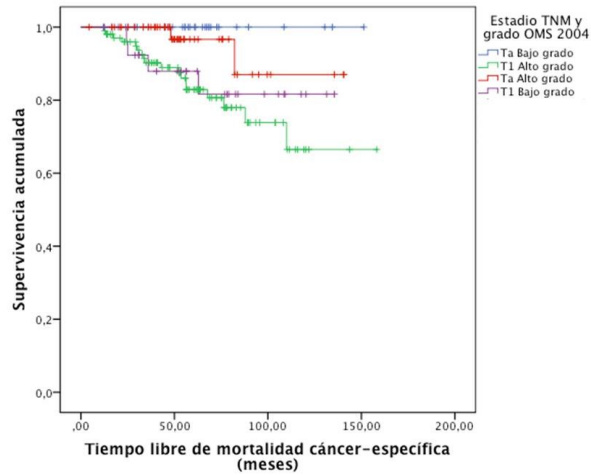
a) Ta Bajo grado frente a T1 Alto grado ( $p= 0,002$ ) b) Ta Alto grado frente a T1 Bajo grado ( $p=0,750$ ). Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox)

En cuanto a la mortalidad cáncer-específica, el grupo pTaBG no presentó ningún caso.

Los restantes grupos histológicos tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las supervivencias obtenidas.

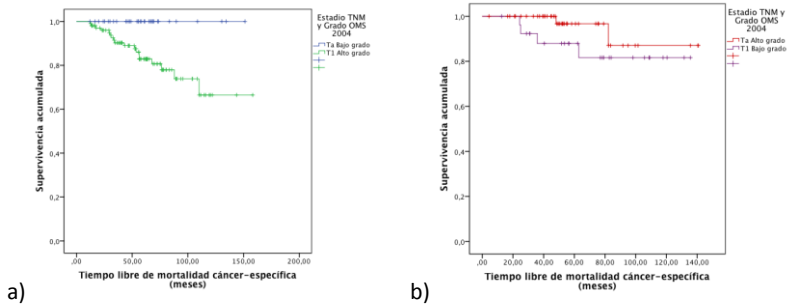
La probabilidad de supervivencia cáncer-específica al año y a los 5 años, fue respectivamente: pTaAG 100%/96%, pT1BG 100%/87% y pT1AG 98%/83% (figura 23).

La probabilidad de supervivencia cáncer específica al año y a los 5 años de los grupos pTaAG, pT1BG y pT1AG fueron respectivamente: 100%/96%, 100%/87% y 98%/83% (figura 21).



**Figura 23. Curva de supervivencia del periodo libre de mortalidad cáncer-específica con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** Estadístico Log Rank test (Mantel-Cox)  $p=0,140$ .

Con respecto a la comparación entre grupos se pudo observar que los tumores pTaAG presentaron un periodo libre de mortalidad cáncer-específica más corto con respecto a los pTaBG (no se registraron eventos). No hubo diferencias significativas entre los grupos pTaAG y pT1BG (figura 24).



**Figura 24. Curva de supervivencia del periodo libre de mortalidad cáncer-específica con respecto a los grupos histológicos (TNM/OMS 2004) en los TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** a) Ta Bajo grado frente a T1 Alto grado ( $p=0,016$ ) b) Ta Alto grado frente a T1 Bajo grado ( $p=0,203$ ). Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox)

Sintetizando los resultados de este apartado, el único grupo histológico en el que se observó mejor pronóstico clínico fue el correspondiente a los tumores pTaBG, ya que presentaron un periodo libre de recidiva más prolongado que los restantes grupos (sólo existiendo diferencias significativas con respecto a los pTaAG) y no se objetivaron casos de progresión ni de mortalidad cáncer-específica. El grupo pT1AG presentó peor pronóstico clínico en comparación con pTaBG (figuras 19-24).

No ocurre lo mismo con los grupos histológicos pTaAG y pT1BG, ya que no mostraron una estratificación significativa entre ellos en cuanto a los periodos libres de recidiva, progresión ni mortalidad cáncer-específica (figuras 19-24).

## **Parte 2. Selección de variables predictoras de la evolución clínica en los tumores vesicales uroteliales no músculo-invasivos grado 2 (OMS 1973).**

### **2.2 Comparativa de los modelos de análisis estadístico multidimensional LASSO y RSF en cuanto a la selección de variables predictoras de los tiempos de supervivencia.**

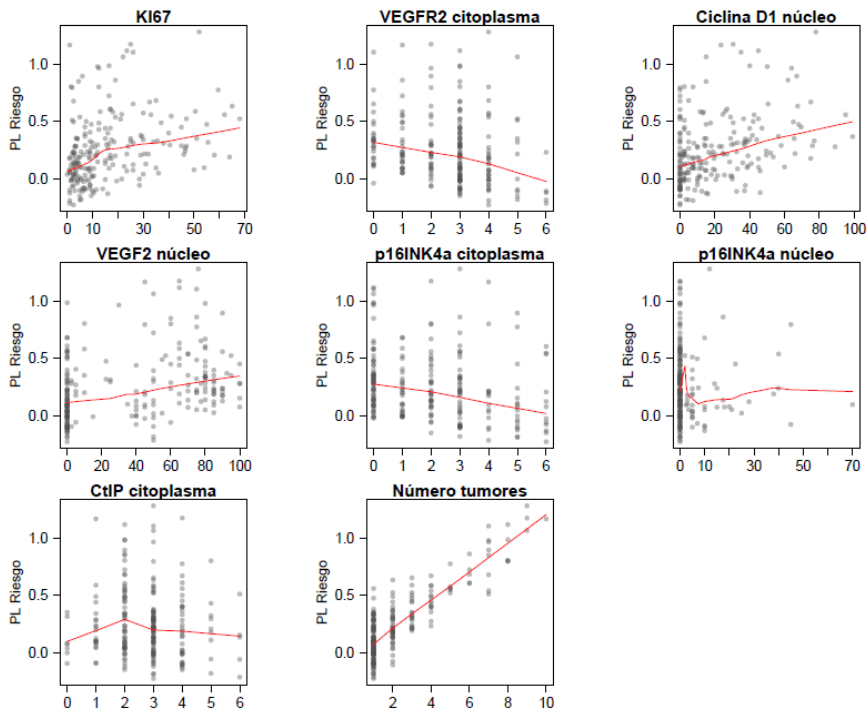
#### **2.2.1 Resultados con respecto al tiempo libre de recidiva**

El modelo LASSO seleccionó como variables importantes con respecto al tiempo libre de recidiva al número de tumores resecaados y a los marcadores: Ki67, VEGFR2, Ciclina D1, CtIP y P16INK4a (figura 23).

En las gráficas generadas se puede observar un aumento de la probabilidad de presentar un tiempo libre de recidiva corto conforme aumenta el número de tumores resecaados. Esta tendencia también se evidencia en cuanto a la expresión nuclear de los marcadores Ki67, p16INK4a, VEGFR2 y Ciclina D1 (figura 25).

Con respecto a la expresión citoplasmática de VEGFR2 y P16INK4a ocurrió el suceso contrario (figura 25).

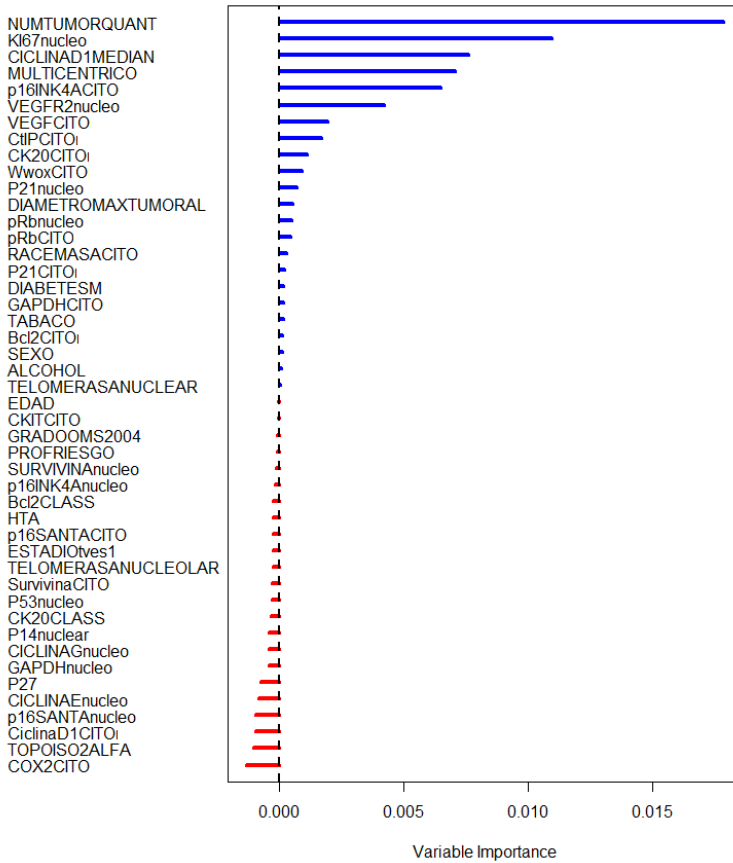
En las gráficas del modelo se puede observar que la presencia de baja expresión citoplasmática del marcador VEGFR2 así como una elevada expresión nuclear de éste empeoran el pronóstico (figura 25). Este modelo no selecciona al estadio ni al grado OMS 2004.



**Figura 25. Variables predictoras de un tiempo libre de recidiva más corto seleccionadas por LASSO.** En el eje de abscisas de las gráficas: KI67, Ciclina D1 núcleo, VEGFR2 núcleo, p16INK4a núcleo se representa el porcentaje de núcleos expresados. En las abscisas de VEGFR2 citoplasma, CtIP citoplasma, p16INK4a citoplasma, se representa la intensidad de expresión de citoplasma (0-6). En número tumores, las abscisas indican el número de tumores. En el eje de ordenadas de todas las gráficas se representan los coeficientes LASSO.

En el caso del modelo Random Forest para el tiempo libre de recidiva, seleccionó como las ocho variables con mayor importancia las siguientes: número de tumores resecaados, disposición multicéntrica, expresión nuclear de KI67, p16INK4a, Ciclina D1 y VEGFR2 y la expresión citoplasmática de VEGFR2 y CtIP (figura 26).

Tanto el estadio como el grado OMS 2004 no se encuentran dentro del grupo de las variables con mayor importancia (figura 26).



**Figura 26. Clasificación de las variables según la capacidad de predicción de un tiempo libre de recidiva corto tras el análisis RSF**

Según RSF, un aumento del número de tumores resecaados y de la expresión nuclear de los marcadores Ki67, Ciclina D1 y VEGFR2

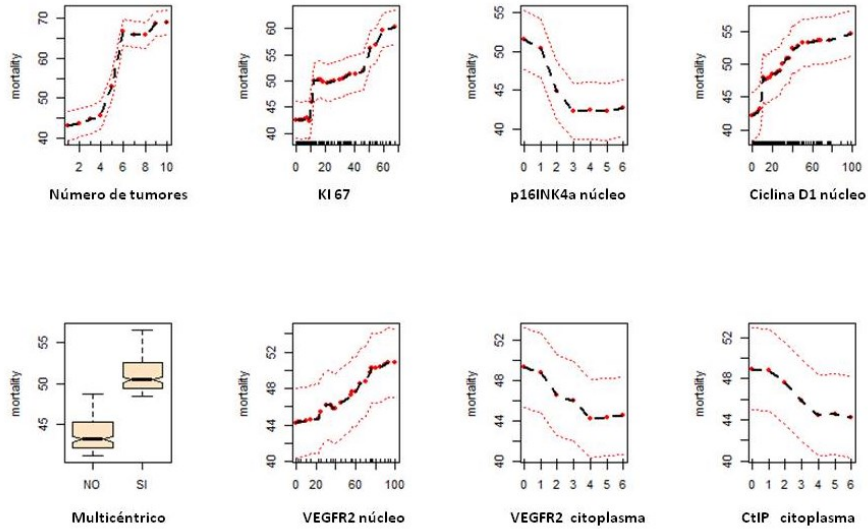
genera una tendencia a presentar un tiempo libre de recidiva más corto (figura 27).

La localización multicéntrica de los tumores resecaos también aumenta la probabilidad de presentar un tiempo libre de recidiva reducido (figura 27).

En cuanto a la expresión citoplasmática de p16INK4a, VEGFR2 y CtIP, una ausencia de expresión o una expresión baja fue asociada a un tiempo libre de recidiva más corto (figura 27).

En las gráficas generadas por el marcador VEGFR2, se puede observar también lo ocurrido en el modelo LASSO, entre la expresión núcleo/citoplasma y el pronóstico, ya que conforme aumenta la expresión nuclear o disminuye la citoplasmática, dicho pronóstico empeora (figuras 25 y 27).





**Figura 27. Distribución de las variables seleccionadas por RSF con respecto a la probabilidad de presentar un periodo libre de recidiva corto.** En el eje de abscisas de las gráficas: KI67, Ciclina D1 núcleo, VEGFR2 núcleo se representa el porcentaje nuclear expresado. En las abscisas de VEGF2 citoplasma, CtIP citoplasma se representa la intensidad de expresión de citoplasma (0-6). En número de tumores, las abscisas indican el número de tumores. En el eje de ordenadas de todas las gráficas se representa el porcentaje de probabilidad del suceso.

Si se contrasta ambos métodos se puede observar coincidencias en 7 de las 8 variables seleccionadas por cada uno: número de tumores resecados, Ki67, Ciclina D1 nuclear, p16INK4a nuclear, VEGFR2 expresión nuclear y citoplasmática y CtIP. La relación entre la expresión inversa núcleo/citoplasma del marcador VEGFR2 ya comentada es seleccionada por ambos modelos.

No son incluidos ni el estadio tumoral ni el grado OMS 2004 (tabla 9).

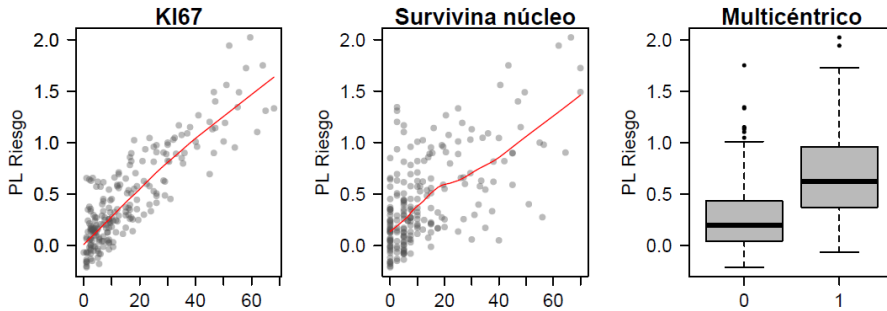
**Tabla 9. Variables seleccionadas por los modelos estadísticos LASSO y RSF que influyen en la presencia de un menor tiempo libre de recidiva.**

Variables	Seleccionada por LASSO	Seleccionada por RSF
Número de tumores	Sí	Sí
KI 67	Sí	Sí
Ciclina D1 nuclear	Sí	Sí
P16INK4A citoplasma	Sí	Sí
VEGFR2 nuclear	Sí	Sí
VEGFR2 citoplasma	Sí	Sí
CtIP citoplasma	Sí	Sí
Disposición multicéntrica	No	Sí
P16INK4a nuclear	Sí	No

### 2.2.2 Resultados con respecto al tiempo libre de progresión

Con respecto al tiempo libre de progresión, el modelo LASSO seleccionó las variables: disposición multicéntrica, Ki67 y Survivina en su expresión nuclear (figura 28).

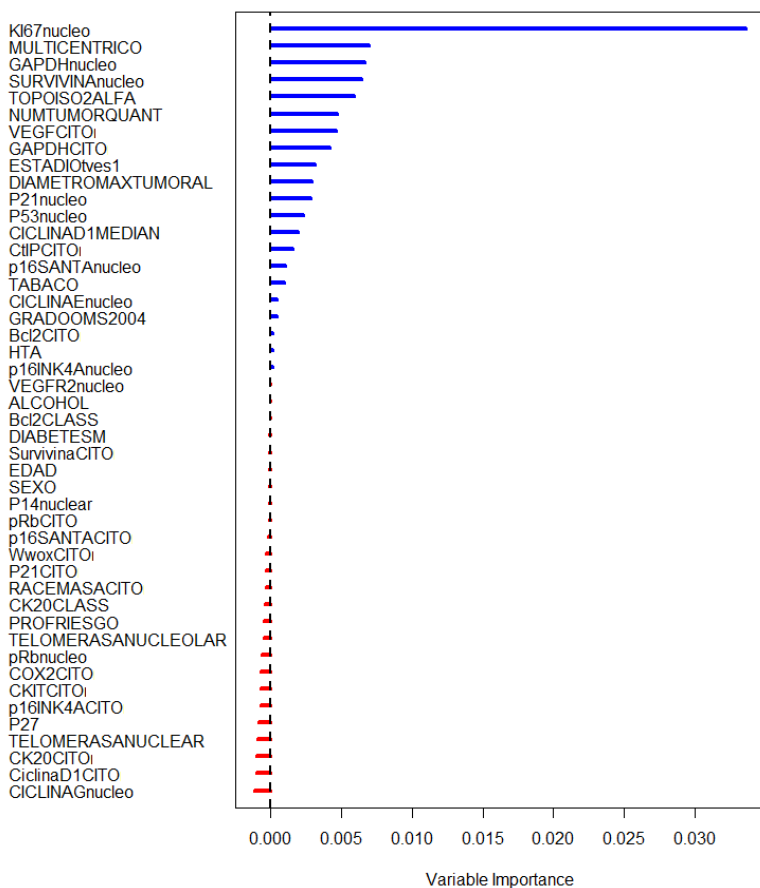
Se pudo observar que existió una fuerte asociación entre el porcentaje de expresión nuclear de Ki67 y Survivina y la probabilidad de presentar un periodo libre de progresión más corto. La última variable que el modelo selecciona es la localización multicéntrica de los tumores resecaos asociándola a un periodo libre de progresión más corto (figura 28).



**Figura 28 . Variables predictoras de tiempo libre de progresión corto seleccionadas por LASSO.** En el eje de abscisas de las gráficas: Ki67 y SURVIVINA núcleo se representa el porcentaje de núcleos expresados. En el diagrama de cajas Multicéntrico 0=NO 1=SI. En el eje de ordenadas de todas las gráficas se representa el coeficiente de probabilidad del suceso.

El modelo RSF seleccionó como las 8 variables más importantes: Ki67, disposición multicéntrica, GAPDH nuclear, Survivina nuclear, Topoisomerasa 2 $\alpha$ , el número de tumores resecaados, y la expresión citoplasmática de los marcadores VEGFR2 y GAPDH (figura 29).

El marcador Ki67 es la variable que presentó una destacada importancia en la selección, seguida de la disposición multicéntrica de los tumores y de los marcadores: GAPDH nuclear y Survivina nuclear. El estadio tumoral se encuentra seleccionado en la novena posición. El grado tumoral OMS 2004 no presenta casi capacidad de predicción en el modelo (figura 29).

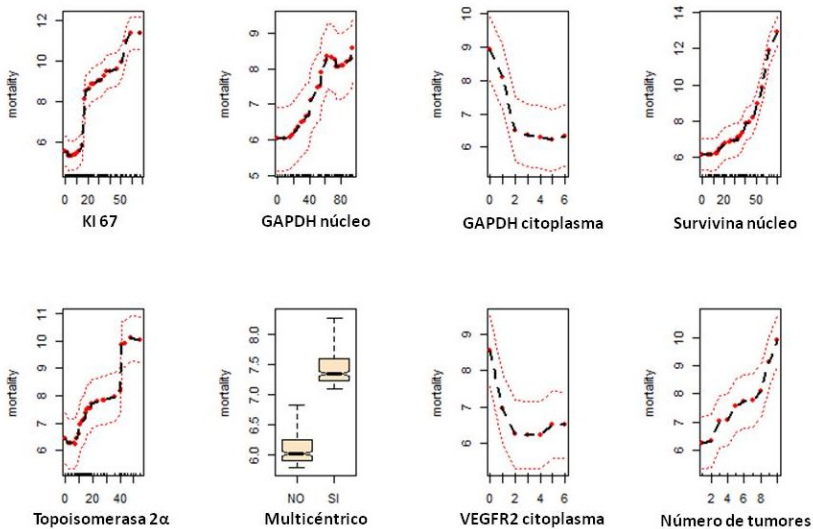


**Figura 29. Clasificación de las variables según la capacidad de predicción de un tiempo libre de progresión corto tras el análisis RSF.**

En estos casos también se puede observar que la probabilidad de que el tiempo libre de progresión fuera más corto se asoció a un aumento progresivo del porcentaje de expresión nuclear de los marcadores: Ki67, GAPDH, Survivina y Topoisomerasa 2α. También ocurrió esto con respecto al número de tumores resecaados (figura 30).

En cuanto a la expresión citoplasmática, también se pudo observar en líneas generales que la ausencia de expresión se asoció a una mayor probabilidad de presentar un tiempo libre de progresión más corto) (figura 30).

Con respecto al marcador GAPDH se observó un fenómeno similar al ocurrido en la recidiva con el marcador VEGFR2, la ausencia de expresión citoplasmática o el aumento de expresión nuclear del marcador están asociados a un peor pronóstico (figura 30).



**Figura 30. Distribución de las variables seleccionadas por RSF con respecto a la probabilidad de presentar un periodo libre de progresión corto.** En el eje de abscisas de las gráficas: Ki67, GAPDH núcleo, SURVIVINA núcleo, TOPOISO2α se representa el porcentaje de núcleos expresados. En las abscisas de GAPDH citoplasma, VEGFR2 citoplasma se representa la intensidad de expresión de citoplasma (0-6). En Número de tumores, las abscisas indican el número de tumores resecados. En el eje de ordenadas de todas las gráficas se representa el porcentaje de probabilidad del suceso.

En relación a los dos modelos, el modelo LASSO sólo seleccionó 3 variables, Ki67, Survivina nuclear y disposición multicéntrica, las cuales también fueron seleccionadas por RSF, presentando un gran peso específico con respecto a las restantes (tabla 10, figuras 28,29).

Sólo el modelo RSF mostró la posible relación entre la ausencia de expresión citoplasmática y el aumento de expresión nuclear del marcador GAPDH (tabla 10).

Tampoco en el caso del tiempo libre de progresión, el estadio tumoral (sólo seleccionado por RSF) y el grado OMS 2004 son seleccionados.

**Tabla 10. Variables seleccionadas por los modelos estadísticos LASSO y RSF que influyen en la presencia de un menor tiempo libre de progresión.**

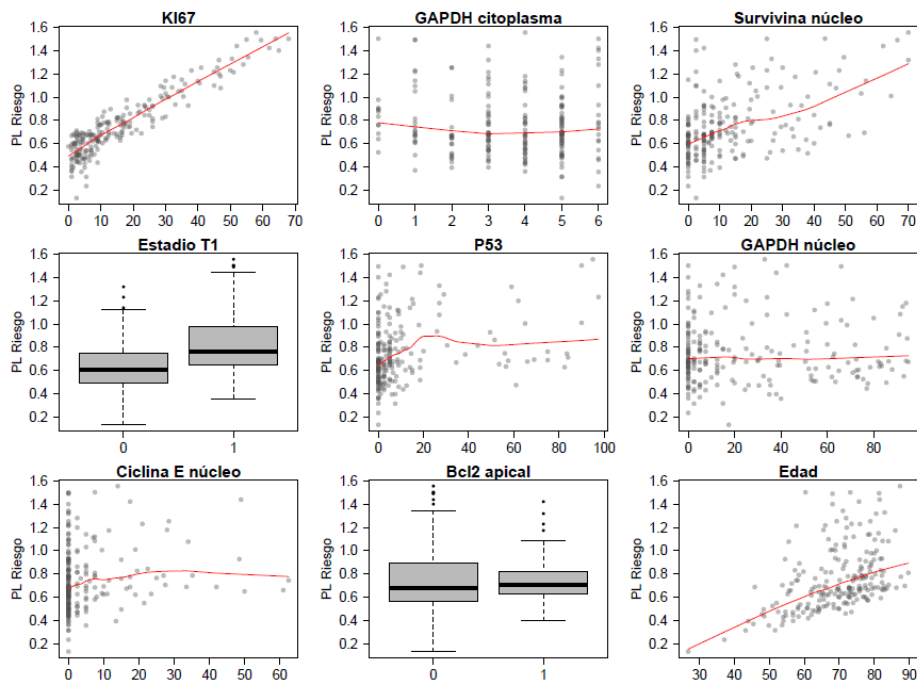
Variables	Seleccionada por LASSO	Seleccionada por RSF
KI 67	Sí	Sí
Disposición multicéntrica	Sí	Sí
Survivina nuclear	Sí	Sí
GAPDH nuclear	No	Sí
Topoisomerasa 2 $\alpha$	No	Sí
Número de tumores	No	Sí
VEGFR2 citoplasmático	No	Sí
GAPDH citoplasmático	No	Sí
Estadio tumoral	No	Sí

### 2.2.3 Resultados con respecto al tiempo libre de mortalidad cáncer-específica

El modelo LASSO seleccionó como las variables más importantes: la edad, el estadio T1, y a los marcadores moleculares: Ki67, Survivina nuclear, p53, GAPDH con expresión nuclear y citoplasmática, Ciclina E nuclear y Bcl2 en disposición apical (figura 31).

Son la edad y los marcadores Ki67 y Survivina los que mostraron una asociación más fuerte en cuanto al aumento de la probabilidad de presentar una supervivencia cáncer-específica más corta. Lo mismo

ocurre con respecto al estadio T1. El grado OMS 2004 no fue seleccionado por el modelo LASSO (figura 31).

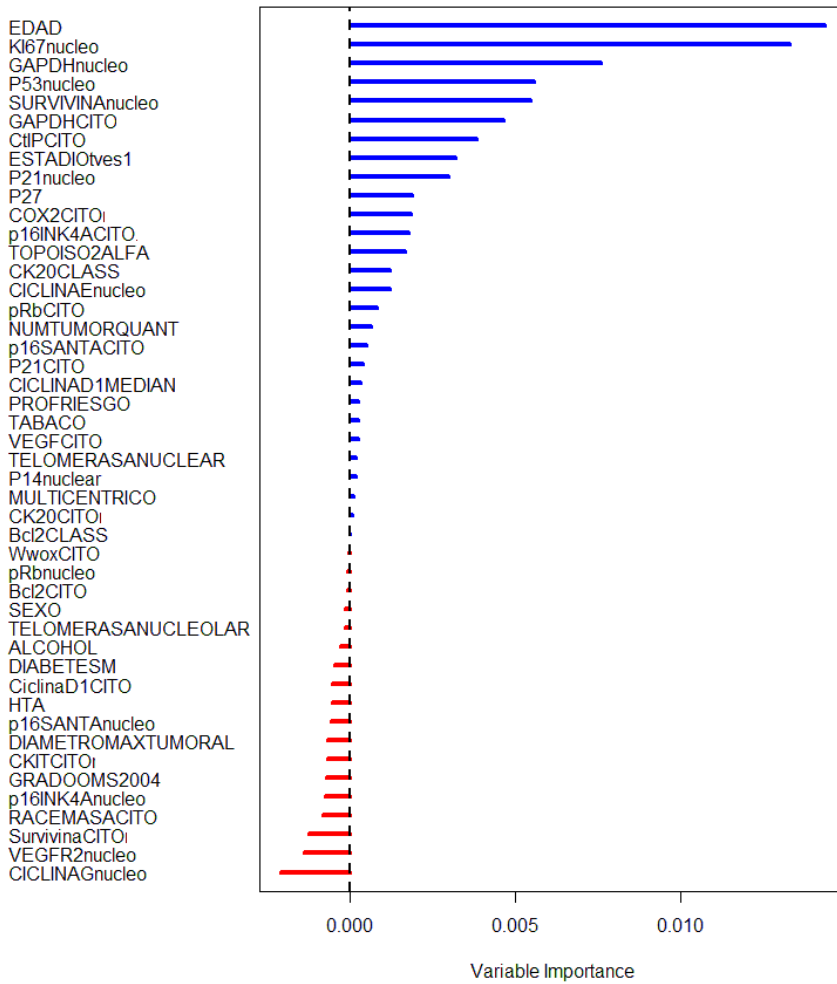


**Figura 31. Resultados del análisis LASSO y la probabilidad de presentar un periodo libre de mortalidad cáncer-específica corto.** En el eje de abscisas de las gráficas: Ki67, Survivina núcleo, GAPDH núcleo, Ciclina E núcleo p53 se representa el porcentaje de núcleos expresados. En GAPDH citoplasma se representa en abscisas la intensidad de expresión citoplasmática (0-6). La variable edad presenta en el eje de abscisas la edad en años. En el diagrama de cajas Estadio T1 y Bcl2 apical 0=NO 1=SI. En el eje de ordenadas de todas las gráficas se representa el coeficiente de probabilidad del suceso.

En cuanto al análisis mediante RSF, el modelo seleccionó como las 8 variables más importantes: edad, Ki67, GAPDH nuclear, p53, Survivina nuclear, GAPDH citoplasma, CtIP y estadio tumoral. La



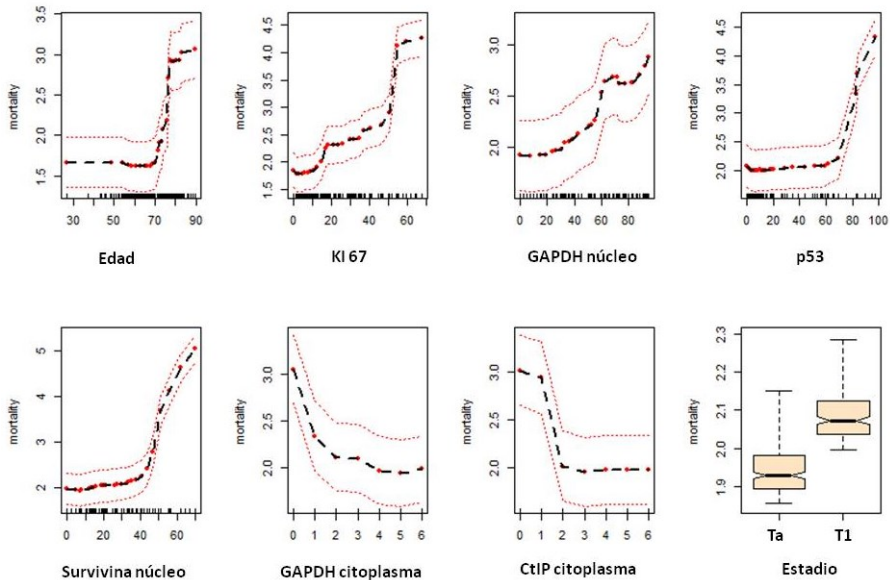
edad y el marcador Ki 67 son las variables que han presentado una destacada importancia en esta selección, seguida de los marcadores: GAPDH nuclear y p53. El estadio tumoral se encuentra seleccionada en la octava posición. El grado de la OMS 2004 no se encuentra dentro de las variables con importancia (figura 32).



**Figura 32. Clasificación de las variables según la capacidad de predicción de un tiempo libre de mortalidad cáncer-específica corto tras el análisis RSF.**

Se pudo observar en cuanto a las variables cuantitativas la tendencia a aumentar la probabilidad de presentar un periodo libre de mortalidad cáncer-específica menor conforme aumentaba la edad y la expresión nuclear de P53, Ki67, GAPDH y Survivina (figura 33).

Con respecto a los marcadores con expresión citoplasmática (GAPDH, CtIP) ocurre el fenómeno similar a lo descrito en otros apartados, donde una ausencia de expresión citoplasmática se asoció a una mayor probabilidad de presentar un periodo libre de mortalidad cáncer-específica más corto. En concreto, con respecto al marcador GAPDH, se pudo observar la tendencia similar al ocurrido en la progresión, la ausencia de expresión citoplasmática o el aumento de expresión nuclear del marcador están asociados a un peor pronóstico (figura 33).



**Figura 33. Distribución de las variables seleccionadas por RSF con respecto a la probabilidad de presentar un periodo libre de mortalidad cáncer-específica corto.**

En el eje de abscisas de las gráficas: Ki67, GAPDH núcleo, Survivina núcleo, p53. Se representa el porcentaje de núcleos expresados. En las abscisas de GAPDH citoplasmático, CtIP citoplasmático se representa la intensidad de expresión de citoplasma (0-6). En Edad las abscisas indican los años. En el eje de ordenadas de todas las gráficas se representa el porcentaje de probabilidad del suceso.

Ambos modelos seleccionaron en común las variables: edad, Ki67 y Survivina nuclear (tabla 11, figuras 31-33).

Al igual que sucedió en el análisis del periodo libre de progresión, sólo el modelo RSF mostró la posible relación entre la ausencia de expresión citoplasmática y el aumento de expresión nuclear del marcador GAPDH. No están seleccionados en ambas ni el estadio ni el grado OMS 2004 (tabla 11, figuras 31-33).

**Tabla 11. Variables seleccionadas por los modelos estadísticos LASSO y RSF que influyen en la presencia de un periodo libre de mortalidad cáncer-específica corto.**

Variables	Seleccionada por LASSO	Seleccionada por RSF
Edad	Sí	Sí
Estadio T1	Sí	Sí
Ki 67	Sí	Sí
GAPDH nuclear	Sí	Sí
Survivina nuclear	Sí	Sí
P53	Sí	Sí
Ciclina E	Sí	No
Disposición multicéntrica	Sí	No
GAPDH citoplasmático	No	Sí
Topoisomerasa 2 $\alpha$	No	Sí
VEGFR2 citoplasmático	No	No
Bcl2 Apical	Sí	No
Número de tumores	No	Sí

Los modelos estadísticos utilizados han seleccionado de las variables clínicas sólo la edad con respecto al periodo libre de mortalidad cáncer-específica. Las variables anatomopatológicas clásicas seleccionadas han sido el número de tumores resecaados, la disposición multicéntrica y el estadio T1.

Con respecto a los marcadores estudiados, han sido seleccionados con mayor frecuencia marcadores de expresión nuclear, siendo Ki67 el que se ha encontrado relacionado en todos los periodos de supervivencia. El marcador Survivina nuclear es el segundo en utilidad, ya que determina tanto el periodo libre de progresión como de

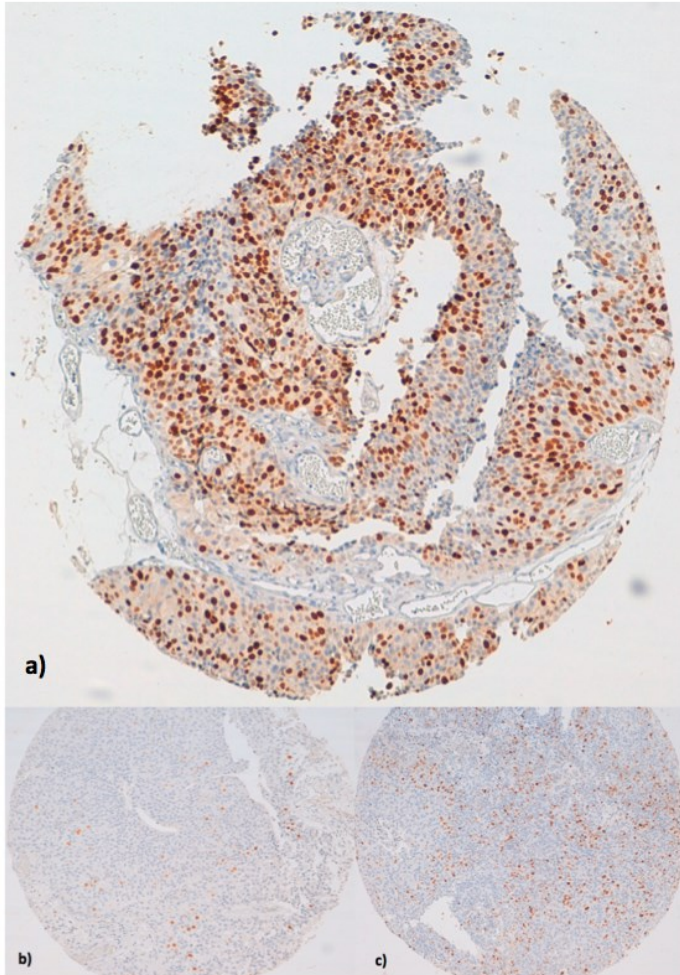
mortalidad cáncer-específica. Los marcadores de expresión citoplasmática sólo se seleccionaron en el periodo libre de recidiva presentando un comportamiento antagónico a la expresión nuclear (a menos intensidad de expresión, peor pronóstico).

En la tabla 12 se presenta un resumen de los resultados de este apartado.

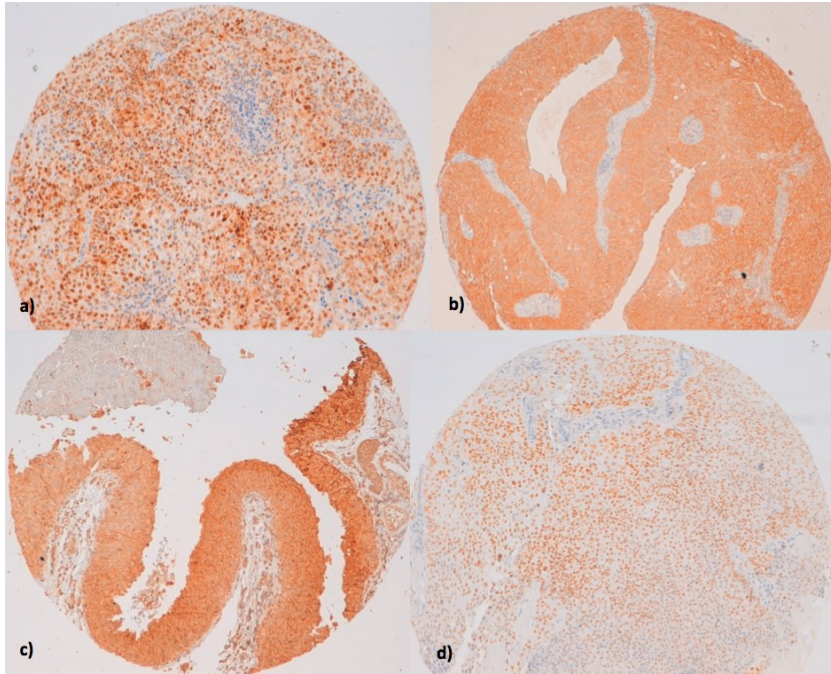
**Tabla 12. Marcadores inmunohistoquímicos seleccionados por los modelos estadísticos LASSO y RSF**

	Recidiva (TL)	Progresión (TL)	Mortalidad (TL)
Ki 67	+	+	+
Ciclina D1 <sub>nucl</sub>	+		
p16INK4a <sub>cito</sub>	+		
VEGFR2 <sub>nucl</sub>	+		
VEGFR2 <sub>cito</sub>	+		
Ctip	+		
Survivina <sub>nucl</sub>		+	+
p53			+
GAPDH <sub>nucl</sub>			+

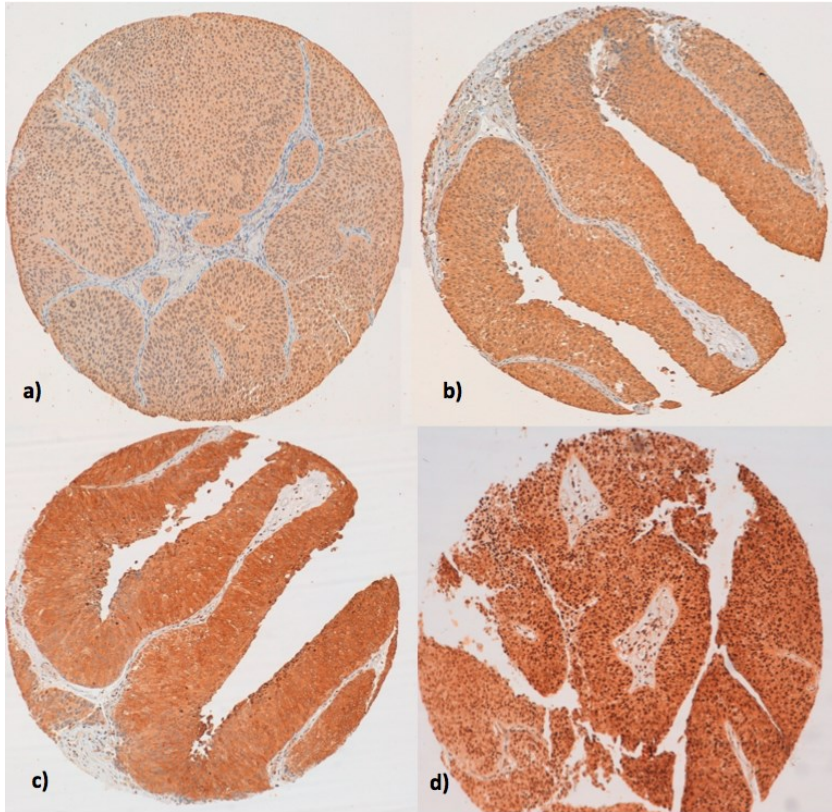
A continuación se presenta la iconografía correspondiente a los patrones de expresión nuclear y citoplasmática de los marcadores significativos, observados mediante el microscopio óptico (figuras 34-37).



**Figura 34. Expresión inmunohistoquímica del marcador Ki 67.** a) cilindro 10x donde se observan los núcleos teñidos. b) cilindro 10x con escasa expresión nuclear. c) cilindro 10x con mayor expresión nuclear.

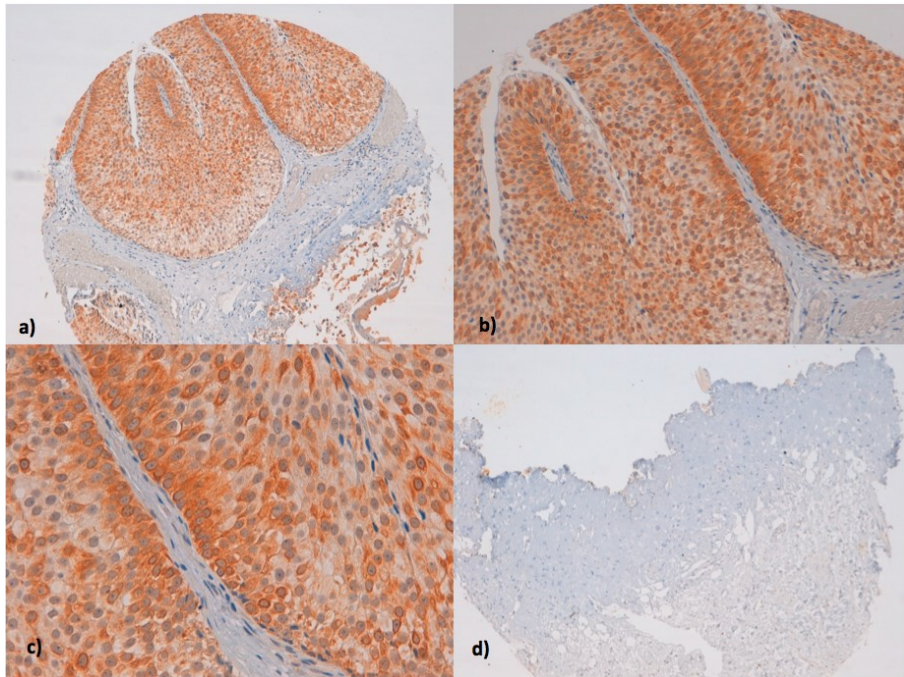


**Figura 35. Observación de la expresión inmunohistoquímica en los cilindros 10x a) expresión nuclear de Ciclina D1. b) expresión citoplasmática de p16INK4a. c) expresión citoplasmática de CtIP. d) expresión nuclear de p53.**



**Figura 36. Observación de la expresión inmunohistoquímica en los cilindros 10x** a) expresión nuclear de VEGFR2. b) expresión citoplasmática de VEGFR2. c) expresión citoplasmática de GAPDH d) expresión nuclear y citoplasmática de GAPDH.





**Figura 37. Expresión de Survivina. a) con un aumento de 10X b) aumento 20x. C) aumento 40x donde se observa con más detalle la tinción nuclear. d) ausencia de tinción para Survivina.**

### **Parte 3. Confección del perfil de alto riesgo clínico en el paciente con tumor vesical urotelial no músculo-invasivo grado 2 (OMS 1973)**

#### **3.1 Análisis del perfil de alto riesgo con respecto al periodo libre de recidiva.**

Las variables anteriormente seleccionadas por los modelos LASSO y RSF fueron: número de tumores resecaados, los marcadores de expresión nuclear: Ki67, VEGFR2 y Ciclina D1 y los marcadores de expresión citoplasmática: VEGFR2, CtIP y p16INK4a. No fueron seleccionados ni el estadio TNM ni el grado OMS 2004 (tabla 9) (figuras 25-27).

Al estratificar a los pacientes de la muestra tras el análisis multidimensional en base a un perfil de buen pronóstico frente a la recidiva (AM buen pronóstico) definido por: la presencia de 1-2 tumores resecaados y una expresión nuclear de Ki67, VEGFR2 y Ciclina D1 menor de 10%,20%,10%, respectivamente o una tinción citoplasmática superior o igual a 1 en los marcadores P16INK4a, CtIP y VEGFR2. Se pudo observar una probabilidad de no recidivar al año similar a los pacientes con tumor pTaBG.

Otro hecho que se evidenció al comparar esta nueva clasificación con la asociación TNM/Grado OMS 2004, fue una mejora en la probabilidad de no recidivar a los 5 años, así como una mayor mediana de supervivencia. También se observó una menor mediana

del número de recidivas durante el seguimiento en los pacientes con perfil de buen pronóstico (tabla 13).

Con respecto a la puntuación de la EORTC, un 52,1% y un 47,9% de la muestra presentó un riesgo de recidiva tanto al año como a los 5 años intermedio y alto, respectivamente.

Los perfiles del riesgo de recidiva generados a partir del análisis multidimensional (AM) discriminan mejor a los pacientes cuando se comparan con la estratificación generada por la puntuación de la EORTC (tabla 13) (figura 38).

La curva de supervivencia determinada por el perfil de recidiva generado en este estudio, discrimina perfectamente a los pacientes con buen y mal pronóstico de presentar una recidiva temprana, comparada con las curvas de la clasificación TNM/grado OMS 2004 y de la EORTC (figura 38).

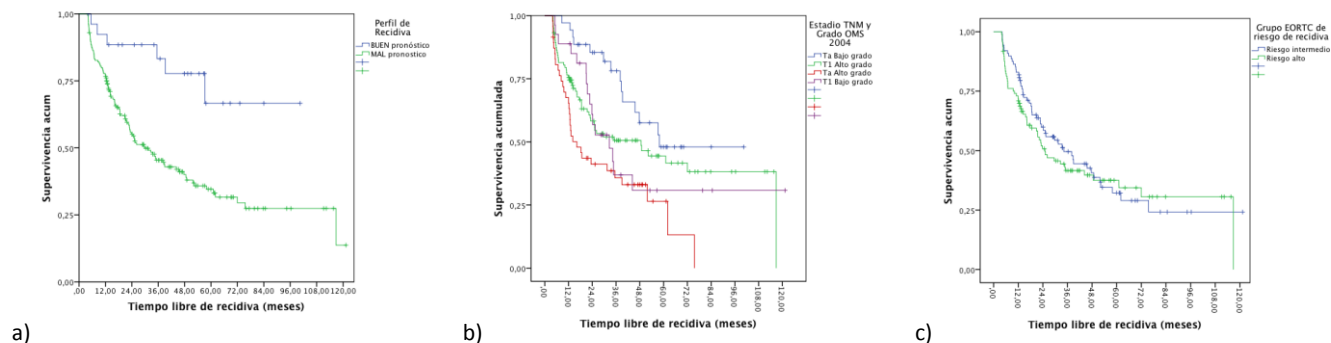
**Tabla 13. Diferencias en la probabilidad de supervivencia y la mediana de recidivas entre los pacientes con TVu NoMInv grado 2 (OMS 1973) estratificados según estadio TNM y grado OMS 2004, la puntuación de la EORTC y el perfil generado en el estudio.**

	Mediana de recidivas	Prob de NO Recidivar al año	Prob de NO recidivar a los 5 años	Mediana supervivencia (meses)
Muestra en general	1 (0-2)	78%	40%	37,8 (25,6-50)
AM BUEN pronóstico	0 (0-0)	95%	68%	----
AM MAL pronóstico	1 (0-2)	80%	35%	29,7 (19,5-39,9)

Ta Bajo grado	1 (0-1)	98%	53%	57,4 (53,5-79)
T1 Alto grado	1 (0-2)	77%	47%	48,2 (20,6-76)
Ta Alto grado	2 (0-4)	66%	26%	16,1 (9,9-22,2)
T1 Bajo grado	1 (0-2)	89%	33%	32,3 (18,5-46,1)

EORTC Riesgo intermedio	1 (0-2)	84%	36%	34,2 (21-47,5)
EORTC riesgo alto	1(0-2)	71%	39%	25 (14,8-35,1)

AM= análisis multidimensional. Buen pronóstico: 1-2 tumores resecaados + expresión nuclear de KI67 <10%, VEGFR2 <20% y Ciclina D1 < 10% o intensidad citoplasmática=0 en P16INK4a, CtIP y VEGFR2.



**Figura 38. Curvas de supervivencia del periodo libre de recidiva en el TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** a) con respecto a los perfiles obtenidos tras el análisis multidimensional. Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,001$ . b) Con respecto al estadio TNM y grado OMS 2004 combinados. Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,004$  c) Con respecto a la puntuación de la EORTC. Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,501/$   $p=0,188$  si se considera el tiempo de seguimiento hasta los 5 años.

### **3.2 Análisis del perfil de alto riesgo con respecto al periodo libre de progresión.**

Los modelos estadísticos LASSO y RSF seleccionaron como variables pronósticas la localización multicéntrica y el porcentaje de expresión nuclear de los marcadores Ki67 y Survivina (tabla 10) (figuras 28-30) .

En la progresión de la muestra el estadio y el grado OMS 2004 fueron importantes ya que los tumores pTaBG estuvieron libres de ésta.

El perfil de alto riesgo de progresión se centró en clasificar a los tumores pTaAG y pT1 BG/AG. Dicho perfil se caracterizó por presentar: disposición multicéntrica de los tumores asociada a una expresión de Ki67>15% y/o expresión nuclear de Survivina >20%.

El perfil del riesgo de progresión generado en el estudio estratificó mejor el pronóstico de los pacientes en comparación con la clasificación del estadio TNM asociado al grado OMS 2004 (a excepción de pTaBG) (tabla 14) (figura 39).

**Tabla 14. Diferencias en la probabilidad de progresión y la mediana de supervivencia entre los pacientes con TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973) estratificados según estadio TNM/grado OMS 2004, la puntuación de la EORTC y el nuevo perfil clínico-anatomopatológico generado en el estudio.**

	Prob de NO progresar al año	Prob de NO progresar a los 5 años	Mediana supervivencia (meses)
Muestra en general	98%	85%	-----
AM BUEN pronóstico	98%	89%	---
AM MAL pronóstico	87%	73%	108,3 (57,2-159,4)

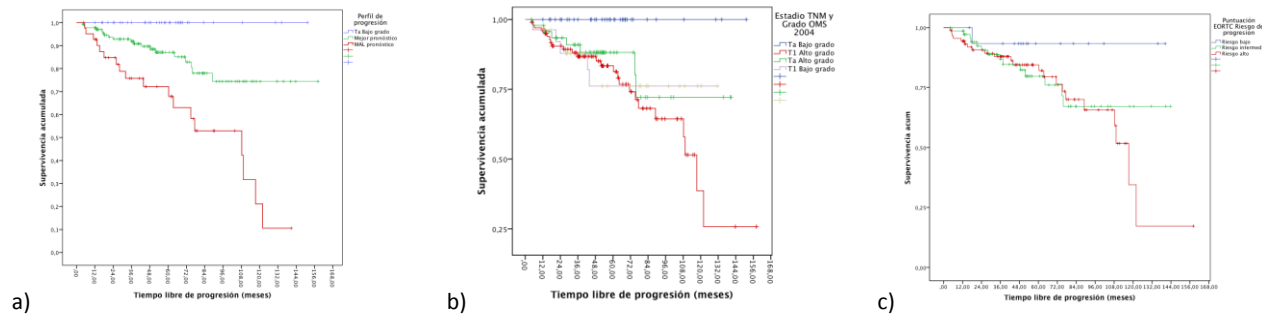
Ta Bajo grado	100%	100%	-----
T1 Alto grado	96%	84%	117,3 (105-129,6)
Ta Alto grado	98%	87%	-----
T1 Bajo grado	96%	76%	-----

EORTC Riesgo bajo	100%	93%	-----
EORTC Riesgo intermedio	98%	78%	-----
EORTC Riesgo alto	93%	83%	117,3 (106-128,6)

AM= análisis multidimensional. Mal pronóstico/ alto riesgo de progresión: tumor distinto a Ta Bajo grado, disposición multicéntrica + expresión nuclear de KI67 >15% +/- Supervivencia >20%.

Con respecto a la puntuación de la EORTC, un 16%, 41,3%, 42,7% de la muestra presentó un riesgo de recidiva al año y a los 5 años bajo, intermedio y alto, respectivamente. A pesar de que la puntuación de la EORTC de riesgo bajo presenta un leve mayor porcentaje de supervivencia libre de progresión al año y a los 5 años que el grupo de perfil de buen pronóstico, los perfiles del riesgo de progresión generados a partir del análisis multidimensional discriminaron mejor a los pacientes comparados con la puntuación de la EORTC (tabla 14) (figura 39).





**Figura 39.- Curvas de supervivencia del periodo libre de progresión en los TVu NoMInv grado 2 (OMS 1973).** a) con respecto a los perfiles obtenidos tras el análisis multidimensional. Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,001$ . b) Con respecto a la clasificación asociada del estadio TNM y el grado OMS 2004. Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,016$  /  $p=0,379$  si se elimina la variable Ta Bajo grado. c) con respecto a la puntuación de la EORTC. Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,201$  /  $p=0,211$  si se considera el tiempo de seguimiento hasta los 5 años.

### **3.3 Análisis del perfil de alto riesgo con respecto al periodo libre de mortalidad cáncer-específica.**

Con respecto al periodo libre de mortalidad cáncer-específica, las variables seleccionadas por ambos modelos fueron: edad, el estadio T1 y la expresión nuclear de Ki67, GAPDH, P53 y Survivina (tabla 11) (figuras 31-33).

Se pudo caracterizar un perfil de alto riesgo de mortalidad cáncer-específica al cumplir estos criterios: tumor distinto a pTaBG, edad >70 años, estadio T1 y la expresión nuclear siguiente: KI67 >15% +/- GAPDH >20% +/- Survivina >40% +/- p53 >60%.

De nuevo en la mortalidad cáncer-específica de la muestra el estadio y el grado OMS 2004 fueron importantes ya que los pacientes con tumores Ta de Bajo grado no la presentaron, y el estadio T1 estaba dentro de los factores de riesgo seleccionados por el análisis multidimensional.

El perfil del riesgo de mortalidad cáncer-específica generado en el estudio discriminó mejor los grupos pronósticos, comparado con los generados mediante la combinación TNM / grado OMS 2004. Con respecto a esta última clasificación, los grupos pTaAG, pT1AG, pT1BG no presentaron diferencias significativas en las curvas de supervivencia ( $p=0,140$ ) (tabla 15) (figura 40)

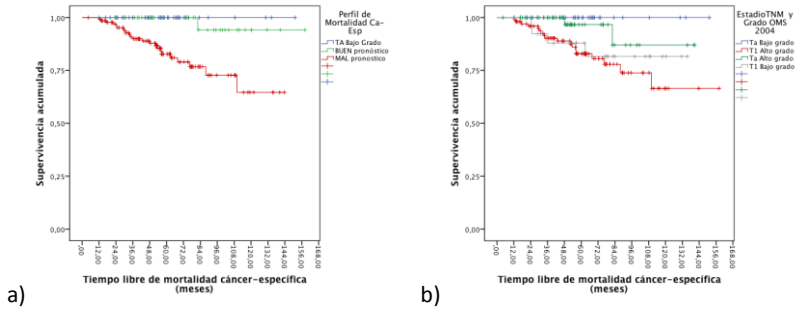
**Tabla 15. Diferencias en la probabilidad de supervivencia cáncer-específica entre los pacientes con TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973) estratificados según estadio TNM/grado OMS 2004, la puntuación de la EORTC y el perfil generado en el estudio.**

	Prob de supervivencia cáncer-específica al año	Prob de supervivencia cáncer- específica a los 5 años
Muestra en general	99%	89%
AM BUEN pronóstico	100%	100%
AM MAL pronóstico	100%	83%

Ta Bajo grado	100%	100%
T1 Alto grado	98%	83%
Ta Alto grado	100%	94%
T1 Bajo grado	96%	86%

AM= análisis multidimensional. Perfil de alto riesgo de mortalidad cáncer-específica: tumor distinto a Ta Bajo grado, edad >70 años, estadio T1 y la expresión nuclear: KI67 >15% +/- GAPDH >20% +/- Survivina >40% +/- p53 >60%.

## Marcadores inmunohistoquímicos en el tumor vesical urotelial sin invasión muscular grado 2



**Figura 40. Curvas de supervivencia del periodo libre de mortalidad cáncer-específica en el TVu NoMinv grado 2 (OMS 1973).** a) con respecto a los perfiles obtenidos tras el análisis multidimensional. Estadístico utilizado Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,001$ . b) Con respecto a la clasificación asociada del estadio TNM y el grado OMS 2004. Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,027$  /  $p=0,140$  si se elimina la variable Ta Bajo grado.

## Discusión

El TVu NoMinv es uno de los tumores urológicos más frecuentes. Muchos de estos tumores vesicales no músculo-invasivos presentan al diagnóstico inicial un comportamiento clínico indeterminado (1,41).

A pesar del tratamiento habitual mediante resección transuretral y protocolos de instilación vesical adyuvante, un 30-70% de estos tumores presentan recidiva vesical y un 10-30% progresan a infiltración muscular (54).

El hallazgo de los factores pronósticos potencialmente determinantes de recidiva, progresión y mortalidad es fundamental para estratificar los riesgos clínicos y ayudar al diseño de una estrategia terapéutica ante esta situación.

El problema que genera el uso de las clasificaciones diagnósticas propuestas por la OMS tanto en 1973 como en 2004 es la gran variabilidad interobservador. Las variables anatomoclínicas han sido utilizadas como predictoras del riesgo de recidiva, progresión y mortalidad, formando parte incluso de tablas de puntuación de riesgo como la diseñada por la EORTC. Pero estas no son capaces de estimar de forma correcta la recidiva y la progresión para cada enfermo. (41,42,44,52,53).

Es conocido que en un tumor los cambios moleculares preceden a los cambios morfológicos, estos pueden ser detectados

en base a la codificación de genes o a la expresión proteica. Se ha observado que dicha determinación puede precisar el comportamiento clínico-biológico tumoral (52,103). Esta es la razón por la que está siendo investigada tanto la expresión como la utilidad clínica de biomarcadores que ayuden a esclarecer el comportamiento indeterminado del TVu NoMinv (54,104).

Si bien el tumor vesical grado 1 tiene un comportamiento bastante benigno en contrapartida a los tumores grado 3 que pueden presentar una mala evolución, el tumor vesical grado 2 tiene un comportamiento bastante incierto. A pesar de que la clasificación de la OMS elimina a este grupo de tumores grado 2 no acaba de mostrarse mucho mejor que la de la 1973 (9,39,40).

Es por ello que nuestro estudio se basa en este grupo de tumores, los grado 2, ya que son los que de entrada va a ser más difícil predecir su comportamiento. Este tipo de tumores es uno de los diagnósticos más frecuentes dentro del tumor no músculo-invasivo y presentan una gran tasa de recidiva y progresión (9,16,39).

A pesar del gran número de estudios publicados y de los marcadores estudiados, ninguno se utiliza de manera sistemática en la actividad clínica habitual (103).

También hay que resaltar que existe una gran heterogeneidad en los trabajos publicados al respecto ya que muchos difieren en la metodología aplicada (66,103). Por ejemplo:

- Distinta metodología en el análisis inmunohistoquímico
- Heterogeneidad en el grado y el estadio de los tumores

vesicales incluidos (varían desde Ta hasta T4 en algunas publicaciones, incluso incluyendo también a los tumores in situ cuando se analizan los tumores “superficiales”. También suelen ser incluidos todos los tipos de grados según la clasificación de la OMS 1973 (G1-G3)).

- Distintas definiciones de progresión de la enfermedad
- Diversidad de puntos de corte utilizados para definir la expresión de un marcador en concreto
- Diversidad en los tratamientos realizados durante el seguimiento

Por ello es difícil realizar un estudio comparativo del tipo metaanálisis sobre los trabajos al respecto, siendo más útil realizar un análisis en conjunto de diversos marcadores homogeneizando las características del estudio y dirigiéndolo a un tipo específico de tumor vesical.

La tesis se presenta como un estudio ambispectivo, analítico, de los resultados obtenidos en tumores vesicales uroteliales primarios no músculo-invasivos de grado 2 (OMS 1973) en pacientes tratados por el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia durante el intervalo de tiempo de 1999 a 2008, con un seguimiento medio de 5 años.

Nuestro trabajo es el primero que realiza un análisis de la expresión inmunohistoquímica y de la utilidad clínica de un gran

grupo de marcadores, alguno de ellos no estudiado hasta el momento en el tumor vesical, efectuado de manera específica en el grupo de tumores vesicales de grado 2. En el análisis se incluyen también variables anatomoclínicas clásicas, entre ellas la clasificación del grado según la OMS 2004.

Para el manejo del número de variables a analizar, en total 46, se ha utilizado de manera novedosa dos métodos de análisis multidimensional de la supervivencia, LASSO y RSF.

Al no existir un estudio similar a esta tesis y debido a la heterogeneidad ya comentada que presentan los trabajos publicados, es difícil extraer conclusiones directas mediante la comparación de nuestros resultados con respecto a los demás estudios.

### 1. Factores clínicos clásicos.

La única variable seleccionada ha sido la edad del paciente en el momento de la cirugía y su relación con la supervivencia cáncer-específica.

Con respecto a otras variables como el tabaco o la exposición laboral, al no ser variables de carácter evolutivo obtenidas durante el seguimiento del paciente al estilo “persistencia del tabaco” o “exposición laboral de riesgo activa” se podría justificar su no selección ya que con la finalidad de que todas las variables fueran homogéneas en la metodología, éstas al igual que la determinación



inmunohistoquímica han sido determinadas de modo transversal en el momento de la cirugía.

Actualmente, los mecanismos subyacentes para explicar las diferencias en el sexo, en cierta morbilidad específica como la diabetes o la hipertensión arterial todavía permanecen desconocidas (26). En nuestro estudio no han sido variables significativas.

### 1.1 La edad en la mortalidad cáncer-específica.

La edad está asociada al TVu, ya que este tumor es típico de la senectud, diagnosticándose la gran mayoría después de los 65 años. Esta característica evidencia la resistencia biológica innata de las células de la mucosa vesical a los carcinógenos urinarios y plasmáticos, precisando latencias de varias décadas (26).

Se ha demostrado que la edad del paciente está también asociada a la mortalidad cáncer-específica. *Lujan et al* analizando una serie de 960 pacientes con tumor vesical no músculo-invasivo concluye que la edad es un factor de riesgo en cuanto a la recidiva y progresión (105). *Nishiyama et al* indica en su estudio que los pacientes con edad superior o igual a 70 años con un tumor vesical que no infiltra la muscular tratados con BCG presentan una mayor probabilidad de progresión y de mortalidad cáncer-específica (106).

En nuestro estudio, la edad es una variable que determina la supervivencia cáncer-específica. Se ha postulado que se produce una mayor inestabilidad genómica asociada y un aumento de las mutaciones, por ejemplo del oncogen p53 (el marcador p53 también es indicador en nuestro estudio de una peor supervivencia cáncer-específica, como se verá más adelante) así como de una hipermetilación del ADN de genes supresores tumorales, inactivándolos (18,19).

### 2. Factores anatomopatológicos clásicos:

En nuestro estudio, el número de tumores resecaados y la disposición multicéntrica influyen en los periodos libre de recidiva y progresión, respectivamente. Las características morfométricas (tamaño y volumen tumoral) no han sido seleccionadas.

En cuanto al estadio y grado por separado, el estadio T1 influye en el periodo de supervivencia cáncer-específica. La clasificación del grado según OMS 2004 no ha resultado seleccionada en nuestro análisis.

Cuando se clasifican a los tumores según estadio/grado asociados sí que se observa que los pacientes Ta Bajo grado no presentan progresión ni mortalidad cáncer-específica.

2.1 Número de tumores resecaos y multicentricidad en la recidiva y progresión, respectivamente.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio con respecto al número de tumores en la recidiva y la disposición multicéntrica en la progresión son muy importantes en el pronóstico clínico de los tumores no músculo-invasivos de grado 2 y coinciden con los trabajos publicados y las teorías de oncogénesis del tumor vesical.

En relación a los tumores resecaos, es sabido que el número de ellos tiene mucha importancia en cuanto al pronóstico de recidiva (10,37).

Nuestro trabajo coincide con esta afirmación ya que el número de tumores resecaos es un avariable que determina el pronóstico del tiempo libre de recidiva del tumor, además de observar que presenta una asociación muy fuerte (figuras 21-23).

La disposición multicéntrica también ha sido ampliamente probada como un factor de riesgo en la recidiva y concretamente en la progresión tumoral (34,36,38,40,107-109).

Dos teorías recientes sugieren un modelo de carcinogénesis que explica el efecto negativo de la multicentricidad. El modelo monoclonal afirma que existen unas células transformadas o células madre oncogénicas que son las que al clonarse generan el tumor.

Esta célula puede proliferar y esparcirse por el urotelio mediante una “migración intraepitelial” o mediante una “migración intraluminal”. La otra teoría es el llamado “efecto campo”, en el cual la multifocalidad se explica porque sustancias carcinógenas causan transformaciones independientes en distintas zonas del urotelio vesical susceptibles de ello (54).

Actualmente se cree que son los dos fenómenos los que suceden en el urotelio vesical del paciente y que dicha inestabilidad es permanente estando más o menos acelerada según la severidad del tumor, por ejemplo, tumores que progresan ya presentan características moleculares de enfermedad invasora en su primera manifestación como tumor primario, porque existe una inestabilidad urotelial. Esta situación justifica el analizar el pronóstico clínico del paciente a partir sólo de la primera muestra de tumor obtenida (54,110).

En nuestro trabajo, la multicentricidad es seleccionada como variable de significación en cuanto a la progresión, dicha variable puede que esté muy ligada al número de tumores, ya que deben coexistir más de uno para presentar una disposición multicéntrica (figuras 24-26).

## 2.2 Estadio y grado OMS 2004 en el estudio.

Con respecto a estos factores, existen controversias en cuanto a la utilidad clínica predictiva. Existen trabajos donde encuentran

relación entre el estadio y la recidiva o progresión en el TVu NoMinv (33,38,110). En contrapartida *Millán-Rodríguez et al* analizó 1529 tumores no infiltrantes de la muscular Ta/T1 afirmando que ni el estadio ni la existencia de displasia influyeron en la recidiva, progresión o mortalidad cáncer-específica de su serie (34). *López-Beltrán et al* indica que con respecto al pronóstico clínico es conveniente diferenciar a los T1 en alto o bajo grado según la OMS 2004 y que el tumor Ta Bajo grado sería considerado como una entidad distinta en cuanto a su buen pronóstico (111).

Los resultados de nuestro trabajo coinciden con esta opinión ya que muestran que la variable estadio por separado sólo influye en la supervivencia cáncer-específica y que la variable grado OMS 2004 por separado no ha sido seleccionada con respecto al pronóstico clínico. Pero cuando estas dos variables se combinan entre sí generando 4 grupos histológicos, sí que se observa que los tumores pTaBG presentan mejor pronóstico clínico en cuanto a la progresión y la supervivencia cáncer-específica y que el tumor pT1AG por el contrario, presenta un peor pronóstico (figuras 17-22).

Con respecto al uso de la clasificación del grado OMS 2004 como predictora clínica ocurre la misma situación. Existen trabajos que confirman la utilidad de dicha clasificación en la predicción de la recidiva y/o progresión (112-115). Por otro lado, estudios publicados

como la revisión realizada por *Cheng et al*, llegan a la conclusión que el uso en solitario de la variable grado no es capaz de predecir el comportamiento tumoral en el TVu NoMinv (54).

Ante esta situación hay que remarcar que existe también una gran variabilidad interobservador al utilizar la clasificación OMS 2004 (1,54).

Puede que los grados extremos G1 y G3 son los que confieren la capacidad predictora a las clasificaciones de la OMS tanto 1973 como la 2004, ya que nuestra proporción de tumores vesicales G2 reclasificados como bajo/alto grado es similar a las publicadas (112-116). *Holmäng et al* evidencia que los tumores grado 2 presentan diferencias con respecto a los G3 en cuanto a la expresión de marcadores inmunohistoquímicos y alteraciones cromosómicas, lo que explica que en los trabajos en que se pone de manifiesto la utilidad de la clasificación del grado según la OMS 2004 en cuanto a predecir la recidiva y/o progresión, están incluidos tanto tumores de grado G1 como G2 y G3 (112-115).

*Van Rhijn et al* sugieren la reclasificación de los TVu NoMinv en 4 categorías de acuerdo con las características clínico-biológicas (progresión, Ki67, p53 y p271). Éstas serían: tumores de bajo grado (bajo potencial de malignidad/Bajo grado/G1), dos categorías de grado intermedio (Bajo grado/G2 y Alto grado/G2) y por último una categoría (Alto grado/G3). En su serie no observan que la clasificación OMS 2004 sea capaz de predecir la recidiva, pero sí que predice la progresión (117).

Al analizar en nuestro trabajo la variable clasificación del grado OMS 2004, no ha sido seleccionada ni en la recidiva, ni en la progresión ni en la mortalidad cáncer-específica.

Esta situación no coincide con los trabajos que avalan la utilidad de la clasificación del grado OMS 2004 ya mencionados. Pero ante esto es importante recordar que dichos estudios incluyen tumores tanto G1 como G3 (*van Rhijn et al*) a diferencia de nuestro análisis, donde sólo se estudian los tumores G2. Cabe recordar que un tumor T1G3 presenta peores características clínico-biológicas que los tumores T1G2, como demuestra *Millán-Rodríguez et al*, donde el Grado 3 es la principal variable predictora de progresión y mortalidad cáncer-específica en su estudio y que existen trabajos que demuestran las diferencias genéticas entre los tumores G3 con respecto a los G2, como se ha comentado con anterioridad (34,112).

El resultado obtenido en nuestro trabajo sobre el análisis del estadio y el grado como variables por separado no significa que afirmemos que no sean útiles en el TVu NoMinv grado 2, todo lo contrario. Lo que determina nuestro estudio es que ambas variables (estadio y grado OMS 2004) se deben utilizar combinadas.

La justificación es el distinto comportamiento clínico de los tumores pTaBG con respecto a los restantes. Este hecho se puede observar en las curvas de supervivencia obtenidas en nuestro análisis. Como se ha comentado anteriormente, los tumores pTaBG

no progresan ni presentan mortalidad cáncer-específica, también presentan una mejor curva de supervivencia con respecto al tiempo libre de recidiva (figuras 17-22). El fenómeno contrario ocurre con respecto a los tumores T1 Alto grado. Trabajos como el de *Nishiyama et al* también encuentran diferencias significativas en cuanto a la recidiva y la progresión entre ambos grupos histológicos (115).

En nuestro estudio también se observa una diferencia en la expresión inmunohistoquímica entre los grupos histológicos pTaBG y pT1AG, ya que el grupo pT1AG presenta más de 10 marcadores de expresión nuclear significativamente más elevados (entre los que están los seleccionados por el modelo estadístico multidimensional) y ambos grupos histológicos difieren en 6 marcadores de expresión citoplasmática y en la distribución topográfica de los marcadores Bcl-2 y citoqueratina 20 (figuras 10-15).

A pesar de que se afirmó que la clasificación OMS 2004 eliminaba el concepto ambiguo del grado 2, en realidad en los tumores no músculo-invasivos sigue existiendo una “zona gris” entre la clasificación de bajo y alto grado, ya que los tumores “intermedios” como el de alto grado pero no invasor de la submucosa (Ta Alto grado) y el de bajo grado pero invasor de ésta (T1 Bajo grado). La pregunta es si estos tipos de “tumores intermedios” son frecuentes y si su comportamiento biológico es diferente.

La clasificación de estos tumores no sólo ocurre en nuestra serie ya que ha sido reflejada en la literatura. *Nishiyama et al* refiere que el grupo pT1BG puede existir, pero es raro. *Cao et al* sólo



encontraró un tumor de estas características entre una muestra de 211 pacientes y *Pan et al* una proporción del 6,8% de la muestra (49,115,118). En nuestro estudio, la proporción de pT1BG es del 12,5%.

En cuanto a su pronóstico clínico, en el último estudio mencionado indican que incluso habiendo invadido la lámina propia, los pT1BG no se diferencian del comportamiento de los pTaBG Bajo, presentando mejor pronóstico que los pTaAG. En este trabajo, *Pan et al* estudió 1515 casos de TVu NoMinv y observó que el comportamiento biológico de los tumores uroteliales puede ser determinado primero por el grado y después por el estadio, si comparamos dos tumores con el mismo grado, ya que a pesar del estadio, los tumores de alto grado son más agresivos que los de bajo grado (118).

En cuanto al Tumor pTaAG, es más frecuente su diagnóstico, pudiendo presentar una incidencia del 3% al 18% aproximadamente (117-119).

Existen estudios como el de *Gontero et al* que consideran a este tipo de tumor como una “categoría intermedia de riesgo” dentro de los tumores no músculo-invasivos, ya que no se puede comparar con los tumores pT1AG (120). En cambio, en la revisión realizada por *Sylvester et al*, los autores afirman que en más de un 75% de los casos de pTaAG hay una imprecisión diagnóstica, recomendando realizar un re-estadiaje ya que estos enfermos pueden progresar a un

estadio infiltrante en un 25% de las ocasiones, siendo recomendable un manejo clínico similar al que se realiza con los pT1AG. Añaden además que las diferencias en las tasas de progresión entre los tumores Ta/T1 de alto grado son muy pequeñas (121).

En la revisión realizada por *Lamm et al*, descubre que un tumor pTaAG tiene un gran riesgo de invasión de la lámina propia y más allá. A largo plazo se puede observar una afectación de la lámina propia en un 40% de los casos, pudiendo presentar un porcentaje de progresión de un 25% (122).

En nuestro estudio no existen diferencias en cuanto a los periodos libres de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica entre los grupos pTaAG y pT1BG (figuras 17-22). A diferencia del estudio de *Pann et al*, nosotros disponemos de una muestra homogénea en el grado OMS 1973, ya que todos son TVu NoMinv G2. En el trabajo mencionado se incluye desde tumores G1 clasificados como neoplasias de bajo potencial de malignidad hasta tumores G3 clasificados como alto grado (118).

Con respecto al estudio de la expresión inmunohistoquímica entre estos dos grupos tumorales (pTaAG y pT1BG), nuestro análisis detectó diferencias de expresión en un 42% de los marcadores, concretamente en 6 marcadores nucleares, en 6 citoplasmáticos y en la distribución topográfica tanto de CK 20 como de Bcl-2.

A diferencia de los que ocurre con respecto a la comparación de los pTaBG con los pT1AG, sólo 4 marcadores de los seleccionados

por el análisis multidimensional están incluidos en el grupo de los que muestran diferencias de expresión (CtIP citoplasmático, p53, VEGFR2 nuclear y GAPDH nuclear) y estas diferencias no están muy bien definidas entre los dos grupos.

El comportamiento clínico-biológico de este grupo intermedio de tumores así como la no existencia de diferencia podría explicar la no selección de las variables estadio y grado OMS 2004 por separado en el análisis multidimensional.

Esta situación reafirma las características de ambos grupos publicadas por los autores comentados con anterioridad (112-120). También existen otros estudios que tras el análisis de múltiples genes y confección de un mapa de expresión corroboran nuestros resultados con respecto a la asociación de estadio/grado OMS 2004 ya que dentro de la heterogeneidad de los tumores vesicales no músculo-invasivos los clasifican en 3 grupos: pTaBG, pT1AG y el resto que suelen ser pTaAG en la mayoría de casos (123).

Como resumen a lo comentado en este apartado de la discusión, en nuestro estudio del TVu NoMinv grado 2, sólo el estadio influye como variable única en la supervivencia cáncer-específica.

Aunque se ha observado que es conveniente la consideración en conjunto del estadio y el grado OMS 2004 ya que la evolución clínica es marcadamente distinta entre los grupos pTaBG y pT1AG, existen los llamados “tumores intermedios” pTaAG y pT1BG que no

presentan diferencias clínicas donde habría que profundizar en su diferenciación con el uso de marcadores inmunohistoquímicos que nos puedan discriminar su comportamiento clínico.

El que no se discrimine el pronóstico utilizando las variables grado o estadio como sucede en nuestro trabajo puede que ocurra por la influencia importante de otros factores pronósticos como es la multiplicidad tumoral, o los factores inmunohistoquímicos. Esta situación ocurre en muestras no muy extensas.

Esto además puede indicar que aunque el grado y el estadio sí que puedan tener influencia en el pronóstico, sobre todo cuando se analizan grandes grupos, es difícil establecer con cierto grado de exactitud un comportamiento individualizado del tumor basado solamente en estos dos criterios. Por este motivo nuestro trabajo intenta establecer criterios que permitan individualizar el comportamiento tumoral más allá del uso del estadio y el grado, estudiando los marcadores inmunohistoquímicos como factores pronósticos.

### *3. Factores inmunohistoquímicos. Pronóstico clínico de los marcadores significativos.*

#### *3.1 Marcadores del ciclo celular.*

Con respecto a esta familia, Ki67 y p53 son los marcadores más estudiados en la literatura y han resultado relevantes en nuestro

estudio (124-138).

Otros marcadores significativos en nuestro estudio han sido la expresión citoplasmática de p16INK4a y la expresión de Ciclina D1 nuclear.

Sobre Ki67 muchos trabajos coinciden en la utilidad como marcador predictor de recidiva, progresión y supervivencia cáncer-específica en los TVu no músculo-invasivos (124-131).

Cabe destacar el estudio realizado por *Seo et al* ya que incluye sólo pacientes tratados de manera adyuvante con Mitomicina C, situación similar a nuestro trabajo, y en el que afirman que el riesgo de progresión en los tumores que expresan de manera significativa Ki67 puede ser tres veces superior a los restantes. Los autores sugieren que puede ser una herramienta útil para decidir el uso de Mitomicina C versus BCG (126).

Otro trabajo interesante es el realizado por *Quintero et al* ya que incluyen en su análisis pacientes Ta/T1, llegando a la misma conclusión con respecto a la recidiva, progresión y supervivencia cáncer-específica (129).

Nuestro trabajo coincide con la mayoría de los estudios publicados en la utilidad del índice proliferativo de Ki67 como marcador predictor de recidiva, progresión y supervivencia cáncer-específica y complementa a los ya publicados en cuanto a la utilidad

clínica de Ki67 en los tumores no músculo-invasivos G2 y la importancia con respecto a otros marcadores y las variables anatomoclínicas clásicas (55,71,124-131).

Con respecto a los trabajos de *Seo et al* y *Quintero et al*, ambos estudios presentan un menor número de pacientes que el nuestro e incluyen tumores de todos los grados de la clasificación de la OMS 1973.

A destacar que el marcador Ki67 es el único que ha resultado útil en todos los intervalos libres de supervivencia. Cuanto más elevada se encuentra su expresión, los intervalos de supervivencia libre de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica son más cortos. También en nuestro trabajo el índice proliferativo de Ki67 ha sido mayor en los grupos tumorales de peor pronóstico anatomopatológico, siendo los tumores pTaBG los que han presentado el menor porcentaje de expresión. Este fenómeno también se observa en los artículos publicados (55,71,124-131).

Otro marcador del ciclo celular significativo y muy estudiado es p53. Numerosos estudios han probado la utilidad del aumento de expresión de p53 como herramienta clínica (66,124,125,127,129,132-136).

El dato más característico con respecto a la expresión de p53 es su asociación con tumores de alto grado o estadio T1. *Lenz et al* y *Goebell P et al* evidenciaron que la expresión significativa de p53 se asocia a un grado histológico elevado y a un estadio tumoral T1 y que

una expresión del marcador débil se asocia a tumores de bajo grado y estadio (132,133). *Tut et al* afirman que p53 se expresa más en tumores T2-T4 (53%) frente a Ta/T1 (31%) y en un mayor porcentaje en los tumores G3 (65%) que en los G1 (5%) (136). Seo et al confirman dichas características ya que encontraron un 90% de expresión de p53 en tumores que no afectaban a la muscular G3 frente a un 42% en los G2, no encontrando diferencias entre el estadio Ta y el T1 (126).

En cuanto a su utilidad clínica, los trabajos publicados no evidencian una utilidad pronóstica en cuanto a la recidiva en los TVu NoMinv, tratados con BCG (127), o si la presentase sería en combinación con Ki67 (124).

Existen publicaciones que evidencian su utilidad con respecto a la progresión. En el trabajo de *Hitchings et al* se analizaron 121 muestras de TVu NoMinv, incluyendo el grado G3 de la OMS 1973, indicando que p53 predice la progresión del tumor (66). *Goebell et al* matizan que dicha progresión se asocia a los tumores T1, pero no en Ta (132). *Quintero et al* evidencian que las alteraciones de p53 en Ta/T1 son poco relevantes como predictoras de la supervivencia cáncer-específica (129). Un trabajo contradictorio frente a la utilidad de p53 como marcador pronóstico es el análisis prospectivo realizado por *Dalbagni et al* en 89 pacientes, donde no observa una utilidad de p53 en cuanto a predecir progresión (135).

En nuestro estudio hemos observado también que los niveles más elevados de p53 los han expresado los grupos histológicos de alto grado (Ta/T1 Alto grado).

La mayoría de los resultados publicados concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo en cuanto a la no utilidad pronóstica de p53 con respecto a la recidiva y con respecto a Dalbagni et al con respecto a la no utilidad en la progresión (66,124,125,127,129,132-138).

La explicación de que en nuestro estudio p53 sí sea significativo en la supervivencia cáncer-específica y no ante el tiempo libre de progresión podría estar basada en la existencia de otras variables o marcadores como Ki67 y Survivina (se comentará posteriormente) que presentan mayor peso explicativo que p53.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos hacen plantear que el papel predictor del marcador p53 en el estudio del TVu NoMinv grado 2 debe ser analizado con mayor profundidad. Importante recalcar que la mayor parte de los trabajos han analizado la utilidad clínica pronóstica de la progresión en el tumor vesical infiltrante y en tumores de mayor agresividad (T1G3) (132-138).

Con respecto a la expresión de Ciclina D1 y p16INK4a, la mayor parte de los estudios publicados incluyen el análisis de tumores vesicales de todos los tipos de estadio y grado de la OMS 1973 (65,66,139-144).

El predominio de expresión inmunohistoquímica de Ciclina D1



en los trabajos no sólo está confinado al núcleo, ya que también se puede observar un patrón heterogéneo de tinción núcleo/citoplasma, esto podría ser explicado por la diversidad de las muestras (141).

La sobreexpresión de Ciclina D1 y su relación con el TVu NoMinv fue evidenciada ya en 2003 por Khan et al. El autor afirmó que la sobreexpresión de Ciclina D1 podría jugar un papel importante en los eventos tempranos de progresión ya que se sobreexpresa en tumores no infiltrantes con respecto a los que lo son (142). En un estudio más reciente, realizado por *Kopparapu et al*, donde determinaron la expresión de Ciclina D1 en 34 tumores no músculo-invasivos y en 170 infiltrantes, observaron una expresión elevada de Ciclina D1 en el tumor vesical con respecto tejido control y una mayor expresión del marcador en los tumores no músculo-invasivos con respecto a los infiltrantes. El autor abre la puerta al uso y estudio de Ciclina D1 como marcador en el TVu NoMinv (140).

Los trabajos publicados se centran principalmente en valorar la capacidad predictiva de Ciclina D1 en cuanto la progresión y la supervivencia cáncer-específica (141,143). En el estudio realizado por *Tut et al* en una muestra de 150 pacientes, no encontraron significación entre la expresión nuclear de Ciclina D1 y la recidiva, hecho que sí que ocurre en nuestro estudio. Este trabajo no encuentra correlación con respecto a los niveles de expresión de Ki67 (136).

En el metaanálisis publicado por *Ren et al*, se evidencia que los estudios publicados sobre la determinación inmunohistoquímica de Ciclina D1 sólo encuentran significación como factor pronóstico en la progresión y no en la recidiva, recalcando la heterogeneidad en los estudios, ya comentada (141).

En nuestro análisis no existen diferencias entre los grupos histológicos en cuanto a la expresión nuclear de Ciclina D1, esto podría ser debido a que tenemos, comparado con otros estudios, una muestra más homogénea en cuanto al grado y que no incluimos tumores G3 o T2.

También hemos observado que la expresión elevada de Ciclina D1 nuclear predice un periodo libre de recidiva corto.

Con los resultados obtenidos pensamos que Ciclina D1 podría ejercer un papel importante en el TVu NoMinv como marcador pronóstico de recidiva y que posiblemente sólo sea útil como marcador de progresión dentro del análisis de tumores infiltrantes o de alto grado OMS 1973 (136,139,140).

La determinación de p16INK4a se ha incluido en diversos trabajos que han analizado la expresión inmunohistoquímica de los marcadores del ciclo celular. Ocurre de manera similar que con Ciclina D1, ya que los estudios presentan una heterogeneidad en cuanto a las muestras anatomopatológicas incluidas ya que en el mismo análisis existen tumores de distintos estadios o de distintos

grados OMS 1973 (65,66,131).

Los distintos trabajos coinciden en que la expresión débil o baja en citoplasma se relaciona con el tejido tumoral y especialmente en los tumores G1-G2. En cuanto al estadio, es en los tumores T1 donde una expresión alterada del marcador puede estar relacionada con la recidiva (66).

Este hecho puede que ocurra en nuestro trabajo ya que existe un predominio de tumores T1 pudiendo explicar que ante un tumor G2 la ausencia de expresión citoplasmática pueda influir en la recidiva. En nuestro estudio, un aumento de expresión citoplasmática de p16INK4a está ligado a un mayor periodo de supervivencia libre de recidiva.

En referencia a que en nuestro trabajo exista un mayor número de marcadores del ciclo celular analizados con respecto a otras familias en donde sólo hay un marcador estudiado, se explica porque los marcadores del ciclo celular han sido los más estudiados, observando que actúan en múltiples pasos e interrelacionándose con otros mecanismos dentro de la oncogénesis (138,139,141).

### 3.2 Marcadores reguladores de la apoptosis.

Dos son los marcadores de este grupo que han resultado

significativos en nuestro estudio, la baja expresión citoplasmática de CtIP en la recidiva y la elevada expresión de Survivina nuclear en la progresión.

Con respecto a CtIP, estudios afirman su papel como regulador de la reparación del ADN en la inestabilidad de los microsatélites pero también se le aporta una función reguladora del ciclo celular, luego sería un marcador que podría incluirse en las dos rutas oncogénicas (83).

En nuestro estudio se ha incluido en los reguladores de la apoptosis, al igual que la Telomerasa humana.

No hay hasta el momento ninguna publicación que asocie la inmunoexpresión de este enzima endonucleasa y el cáncer vesical. En nuestro caso la expresión citoplasmática de CtIP no ha resultado uniforme en los 4 grupos histológicos y en cuanto al comportamiento clínico, una ausencia de expresión citoplasmática se asoció a un periodo libre de recidiva más corto.

La Survivina es una proteína multifuncional, ya que tiene capacidad de inhibir la apoptosis, de regular la división celular y de facilitar la angiogénesis (145). Se ha observado su ausencia en urotelio no dañado y una considerable expresión en el TVu NoMinv, siendo su intensidad de expresión directamente proporcional al empeoramiento del estadio y el grado tumoral (146)

Se ha discutido qué tipo de expresión (nuclear, citoplasmática o ambas) tiene relación con el comportamiento clínico. En la mayor parte de los estudios es la expresión nuclear la que está más relacionada con la progresión clínica, como demostró el estudio multicéntrico de *Fristrup et al* donde se observó la asociación entre la expresión nuclear de Survivina en el TVu NoMinv y la progresión a infiltrante (145).

En el trabajo de *Chen et al*, la expresión de Survivina nuclear se correlaciona con tumores vesicales que no alcanzan a la muscular de alto grado e incluso puede reducir la variabilidad interobservador que existe al clasificar a los tumores según el grado OMS 2004 (147).

*Yin et al* observaron que es sólo útil la expresión nuclear de Survivina y que un aumento de dicha expresión está asociada significativamente a un peor estadio, grado y empeora el pronóstico de los TVu NoMinv Ta/T1 (148).

El metaanálisis realizado por *Jeon et al*, confirma que la sobreexpresión de Survivina predice la recidiva, progresión y supervivencia cáncer-específica en el tumor vesical. En este estudio los autores llaman la atención sobre la diversidad de puntos de corte publicados para definir la sobreexpresión de Survivina (149).

En nuestro estudio, con respecto a su expresión, los niveles más elevados de Survivina nuclear los ha presentado el grupo de

peor pronóstico histológico (pT1AG). No ha habido diferencias en cuanto a la expresión citoplasmática del marcador (figuras 10-12,15).

Hemos encontrado que Survivina es un marcador cuya expresión nuclear está muy directamente relacionada con el tiempo libre de progresión en el TVu NoMinv grado 2, con una fuerte asociación, coincidiendo con los estudios comentados (figuras 26-28).

### 3.3 Marcadores moduladores de la angiogénesis.

El marcador analizado en nuestro trabajo dentro de esta categoría ha sido la expresión (tanto nuclear como citoplasmática) de VEGFR2.

VEGFR2 es el receptor donde se une VEGF para inducir la proliferación y migración celular. Aunque los receptores del VEGF se encuentran expresados en las células endoteliales, muchas células neoplásicas incluidas las correspondientes al tumor vesical transicional también los expresan (150).

No existen muchos trabajos publicados en la literatura donde analicen la utilidad clínica de la expresión de VEGFR2 y el tumor vesical. *Xia et al*, observó que el aumento de expresión citoplasmática de VEGFR2 en muestras de tumor vesical obtenidas de cistectomías estaba relacionada con una progresión de la enfermedad (150). Los tumores vesicales analizados en este trabajo eran infiltrantes.

En el trabajo publicado por *Quentin et al* observaron que la

expresión citoplasmática del marcador englobado en “hot spots” o áreas donde las células tumorales presentan un citoplasma con gran intensidad de tinción, pertenecen a tumores de bajo grado o bajo estadio (151). *Chen et al* analizaron 72 TVu NoMinv encontrando que el marcador VEGF estaba relacionado con la recidiva tumoral y que en combinación con Ki67 podía mejorar la predicción de progresión (125).

En nuestra serie hemos encontrado la expresión nuclear de VEGFR2 significativamente más aumentada en los tumores T1 con respecto a los Ta.

En cuanto al comportamiento clínico, una baja expresión citoplasmática y/o una elevada expresión nuclear de VEGFR2 se asociaron con un periodo libre de recidiva más corto. En nuestro caso, el resultado es similar a lo publicado a pesar de haber analizado sólo los tumores G2 y utilizar un marcador relacionado con VEGF, su receptor.

El estudio realizado por *Kopparapu et al* presentó unos resultados similares a los nuestros ya que observaron que los TVu NoMinv presentaron mayor expresión citoplasmática que los infiltrantes. Al analizar el tiempo libre de recidiva observaron que el aumento de tinción citoplasmática de VEGF y de VEGFR1 en los tumores se asociaba a un periodo libre más corto. Con la expresión citoplasmática de VEGFR2 sucedió lo contrario, a menor expresión

peor pronóstico en la recidiva, hecho que también ocurre en nuestro trabajo (152).

No hemos encontrado publicaciones que asocien la tinción nuclear de VEGFR2 con el pronóstico clínico en el TVu NoMinv. En nuestro análisis el aumento de expresión nuclear está relacionado con un periodo libre de recidiva corto.

Sería interesante en futuros estudios analizar si existe relación inversa entre la expresión citoplasmática y la nuclear del VEGFR2, en cuanto las características anatomopatológicas y el comportamiento clínico del tumor vesical.

#### 3.4 Marcadores moduladores de transducción de señales y del metabolismo celular

No hay hasta el momento ninguna publicación que relacione la expresión de GAPDH con el tumor vesical transicional.

En otros tejidos neoplásicos, la expresión de GAPDH se encuentra aumentada (92,93).

En nuestro trabajo la expresión nuclear aumentada de GAPDH ha estado relacionada con un periodo de supervivencia cáncer-específica corto en nuestro trabajo.

Como ha ocurrido con el marcador VEGFR2, parece que la expresión nuclear está más asociada a un peor pronóstico y el aumento en la expresión citoplasmática asociada a un mayor periodo



libre sin que ocurra el suceso. No hemos observado un predominio de expresión citoplasmática o nuclear en los distintos grupos anatomopatológicos.

Podemos concluir esta parte de la discusión con respecto a la expresión inmunohistoquímica de marcadores que nuestro estudio coincide con una gran cantidad de trabajos publicados con respecto a la utilidad clínica de Ki67, Survivina nuclear y VEGFR2 nuclear también específicamente en el TVu NoMinv grado 2.

Otros marcadores como p53, Ciclina D1 o p16INK4a deben ser estudiados más detenidamente. Proponemos la utilidad de marcadores que no han sido analizados en el tumor vesical en estudios previos como la expresión citoplasmática de CtIP y la expresión nuclear de GAPDH.

Por último, hemos demostrado en este estudio que no por el hecho de que existan diferencias de expresión de un marcador entre grupos histológicos distintos significa que ese marcador tenga pronóstico clínico.

El uso combinado de las variables seleccionadas, tanto marcadores inmunohistoquímicos como las anatomoclinicas clásicas, formando grupos de riesgo, ha permitido estratificar según el comportamiento clínico de manera más óptima a los pacientes en comparación con la clasificación obtenida por los subgrupos

tumorales estadio/grado OMS 2004 y la puntuación de la EORTC (variables anatomoclínicas clásicas). En relación al marcado buen pronóstico en cuanto al periodo libre de progresión y mortalidad cáncer-específica de los tumores pTaBG, se ha considerado a este subgrupo como un estrato diferenciado.

#### 4.Consideraciones generales del estudio.

Parte de nuestro estudio es un análisis retrospectivo, y como tal presenta unos posibles sesgos de selección y de información.

El sesgo de selección consistiría principalmente en el error no sistemático al elegir a los pacientes que han intervenido en el estudio dentro del banco histológico del Servicio de Anatomía patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Para reducirlo o evitarlo la selección fue aleatoria (153).

El sesgo de información estaría representado principalmente por el esquema de tratamiento que en aquel periodo de tiempo se administraba de manera adyuvante a los pacientes del estudio, ya que difiere con el utilizado en la actualidad. También podría generarse por la ausencia de control de las variables, ya que la mayor parte de ellas ya estaban originadas. Algunos de los pacientes ya habían fallecido cuando se inició el estudio, otros pacientes puede que abandonaran el seguimiento realizado en el área sanitaria del hospital. Para evitar cometer dicho error se eliminaron los pacientes que desaparecieron del seguimiento por causas no justificadas.

Por otro lado, la parte ambispectiva del estudio implica a que un porcentaje de los pacientes se estaba siguiendo en tiempo presente, por ese motivo el estudio se cerró a finales de 2012.

Con respecto al esquema de tratamiento actual tras la resección transuretral en los tumores de aspecto no infiltrante, se suele administrar una instilación vesical de Mitomicina C en el postoperatorio inmediato, así como existe también una tendencia en el uso de BCG en los tumores T1G2 (10).

Estas dos opciones terapéuticas no eran del uso habitual en el tratamiento del tumor primario en el intervalo de tiempo en el que fueron intervenidos los pacientes. Por ese motivo para evitar que el tratamiento fuera una variable de confusión, todos los pacientes del estudio fueron tratados con el mismo esquema de Mitomicina C adyuvante seguido por el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia (1999-2009) (anexo 1).

También es importante comentar el “efecto centro” producido por los factores relacionados con el hospital y el personal sanitario que pudiera condicionar los tiempos libres de supervivencia de los enfermos generando que una variable que tiene significación pronóstica para nuestra muestra en verdad no lo es para la población global o viceversa (154). Pensamos que no ha ocurrido con ninguna de nuestras variables ya que los resultados son parecidos a los publicados, pero sería necesaria una validación externa de nuestro método (154).

Una vez descrita la relación de nuestros resultados con respecto a la expresión inmunohistoquímica de marcadores es importante recordar que la interpretación de los datos obtenidos es cualitativa y a priori menos precisa que la cuantificación mediante biología molecular del gen productor de la proteína que fundamenta el marcador inmunohistoquímico. En contraposición a pesar de que la determinación inmunohistoquímica está supeditada a un mayor sesgo interobservador, ya que se considera una interpretación de un fenómeno, no un cálculo, ésta es un método más económico y fácilmente reproducible en la práctica clínica habitual (66).

La interpretación cualitativa de la expresión inmunohistoquímica también puede haber presentado un error sistemático, no obstante, para evitarlo dicha determinación se realizó en cada tumor por duplicado (153). El mismo anatomopatólogo experto en Urología fue el que interpretó todas las muestras, sin conocer la historia clínica de los pacientes.

Ha sido muy importante definir los criterios tanto de recidiva como de progresión y de mortalidad cáncer-específica.

Con respecto a la recidiva, las limitaciones que pueden presentar los estudios estriban en que pueden existir casos con presencia de una enfermedad multifocal que origine un tratamiento incompleto que la expresión de ciertos marcadores. Por este motivo algunos autores abogan que la verdadera utilidad de los marcadores

se centre en la posibilidad de predecir la progresión (155).

Los criterios de exclusión de nuestro estudio intentan mejorar el análisis pronóstico de la recidiva, ya que no se incluyen tumores cuya recidiva sea antes de los 3 meses desde la primera resección y se descarta a los pacientes que no hayan seguido el esquema clásico de tratamiento adyuvante del TVu NoMinv Ta/T1 G2 del Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario (1999-2009). También hemos considerado que toda recidiva debe haber sido demostrada mediante un diagnóstico anatomopatológico, en contrapartida a algunos trabajos que consideran recidiva ya el hecho de observar una lesión tumoral localizada en vejiga (143).

En cuanto a la definición de progresión de la enfermedad, hay dos tipos de consideraciones. Algunos autores refieren progresión a cualquier avance en el estadio del tumor primario, ya sea un tumor primario Ta que recidiva a un T1 o un tumor T1 que recidiva a T2. Esta determinación tiene en cuenta el concepto del tumor T1 como invasor de la microvascularización de la lámina propia y muscularis mucosae (66,129,122). Otros autores abogan más por considerar progresión a una infiltración muscular (T2) o la existencia de metástasis tanto loco-regionales como a distancia (139).

En nuestro estudio hemos considerado progresión sin duda a toda recidiva vesical que infiltrase la muscular (T2) y a toda metástasis a distancia o locorregional confirmada por biopsia, pero

también hemos considerado progresión a la recidiva vesical T1 G3/Cis y al tumor de urotelio superior T1 de alto grado, ya que en los pacientes diagnosticados de estos dos últimos tipos tumorales también cambió la estrategia terapéutica a un abordaje más agresivo y el pronóstico clínico empeora notablemente. Por este motivo hemos querido darle importancia a esta situación clínica, luego no se ha considerado progresión al paso de un tumor primario TaG2 a T1G2 en la recidiva vesical ya que en la revisión retrospectiva se ha observado que el tratamiento pautado en aquel momento fue similar para ambos tumores (mitomicina G intravesical).

Con respecto a la terminología, estamos de acuerdo con no utilizar el término “tumor superficial”, indicativo de la posibilidad de realización de una resección transuretral completa. Dentro del tumor superficial clásicamente utilizado, se englobaba a los tumores (Ta, Tis, T1), obviando el distinto comportamiento biológico de cada uno de ellos (156).

Por ello hemos utilizado como criterio de inclusión aquellos tumores que no invaden la capa muscular, son los llamados “sin invasión de la muscular propia”, dentro de este grupo está el tumor Ta y el tumor T1 que es considerado como invasor, pero de la lámina propia. Por ello también es importante el diferenciar el tumor sin invasión de la muscular (lámina propia /T1) del tumor infiltrante (muscular/T2).

La no separación en el análisis de los dos estadios va en contra de la corriente que reafirma la importancia de la invasión

microvascular de la lámina propia, como indica el IBCG (*International bladder cancer group*) y que los tumores vesicales T1 presentan unas características moleculares y clínicas muy distintas de los Ta (122,157). Por ese motivo, nuestro trabajo ha analizado la variable estadio compuesta por Ta y T1, con la finalidad de encontrar el diferente comportamiento clínico de los dos estadios también dentro del TVu NoMinv grado 2.

No hemos incluido dentro de los tumores que no invaden la muscular el Tis por su contrastado comportamiento clínico-biológico distinto, considerándolo por nuestra parte, como una entidad propia y como progresión de la enfermedad ante una recidiva (121,156).

Al definir la mortalidad cáncer-específica en el estudio, intentamos evitar el fenómeno de muerte por riesgos competitivos explicado en material y métodos. Considerando la mortalidad por otros motivos ajenos al TVu NoMinv y los supervivientes al final del seguimiento como ausencia del evento a estudio (158,159).

Con respecto al análisis estadístico, el manejo simultáneo de tantas variables y su relación con tiempos de supervivencia ha sido posible gracias al uso de los métodos estadísticos explicados: RSF y LASSO. Estos test no dan como resultado una estimación de un p-valor bajo un nivel de significación, ya que utilizan coeficientes restrictivos o de importancia ponderal (99,100).

No hemos optado por utilizar el análisis de regresión temporal de Cox ya que no es recomendable su uso con un gran número de variables, ya que así evitamos el fenómeno de sobresaturación (*overfitting*) que genera ajustar un modelo con muchos predictores que pueden presentar asociaciones complejas entre los predictores y la respuesta, que como consecuencia genere una predicción con asociaciones falsas del evento, obteniendo resultados aparentemente importantes independientemente de su existencia o no en la población. Se han propuesto un límite de 10-15 variables para los modelos de supervivencia con el fin de evitar este fenómeno (160). Nuestro estudio triplica ese número límite de variables.

Como se ha observado en las gráficas generadas por el análisis RSF, un fenómeno biológico no se presenta de manera proporcional. Cuando se utiliza el análisis Cox se está asumiendo que así ocurre ya que calcula riesgos proporcionales, luego dicho fenómeno es menos representativo de la realidad que la tendencia reflejada en los RSF (99,100).

Para la confección de los grupos clínicos de riesgo y la construcción de las curvas de supervivencia hay que incurrir en la categorización de las variables. La mayor parte de las variables biológicas son continuas, categorizar estas variables de forma arbitraria puede no ajustarse a la realidad (129).

Esta situación errónea es observada en la mayoría de las publicaciones analizadas ya que la mayor parte de los trabajos



publicados “eligen” su punto de corte “a ciegas”, justificándolo mediante la media aritmética o por criterios bibliográficos (punto de corte utilizado por autores anteriores).

Para evitar este fenómeno hemos elegido los puntos de corte observando la tendencia y los puntos de inflexión generados por las curvas obtenidas en el análisis RSF, fenómeno biológico ocurrido en nuestra muestra (validez interna). De todos modos la categorización de un fenómeno y la comprobación de la respuesta clínica necesitan una validez externa para comprobar que los grupos de riesgo generados se comportan de la misma manera en otras muestras distintas a la nuestra.

##### 5. Proyecciones del estudio. Perspectivas futuras.

El análisis realizado de los resultados de nuestro estudio confirma la utilidad de determinados marcadores inmunohistoquímicos en la predicción del comportamiento clínico de los tumores no músculo-invasivos grado 2, coexistiendo con el papel que juega la clasificación anatomopatológica del tumor asociando el estadio con el grado según la clasificación de la OMS 2004.

Nuestro estudio sirve de criba y tamiz para indicar qué marcadores pueden ser de utilidad en estudios prospectivos futuros y cuales podrían ser utilizados en la práctica clínica

Por ese motivo este trabajo invita por un lado a realizar un

estudio prospectivo de pacientes con diagnóstico de un TVu NoMinv grado 2 para comprobar si los marcadores aquí seleccionados siguen siendo predictores del comportamiento clínico que suceda. Siendo necesaria una estandarización de los métodos de determinación de los marcadores, así como un consenso en los niveles de corte para afirmar la positividad de una prueba y así ser reproducible, ya que en la actualidad, el no cumplir estas condiciones conlleva a ver reflejados resultados controvertidos de un mismo marcador (161).

Con respecto a los grupos de riesgo generados en este estudio, sería interesante la validación externa del “fenotipo de marcadores generado” y la implementación de nuevos sistemas de puntuación o la modificación de los ya existentes, añadiendo los marcadores significativos, como el estudio realizado por Ding et al que ha añadido la determinación de Ki67 a la escala de puntuación de la EORTC en su revisión retrospectiva (162). Con ello la generación y validación externa de sistemas de puntuación en el que se incluya dicha batería de marcadores añadidos a las variables anatomoclínicas clásicamente utilizadas mejoraría la estrategia terapéutica, como ocurre en el manejo clínico de otros tumores, por ejemplo el cáncer de mama (163,164).

Otra utilidad de la determinación inmunohistoquímica de los marcadores o de los grupos de riesgo generados podría estar basada en indicar un tratamiento más agresivo, como por ejemplo el utilizar la terapia intravesical BCG en el TVu NoMinv. En nuestro país se

diagnostican al año alrededor de 20.000 casos de cáncer vesical, de éstos el 76% de los pacientes son carcinomas no músculo-infiltrantes susceptibles de tratamiento adyuvante quimio o inmunoprolifáctico con BCG. En este momento existe una situación de desabastecimiento mundial por problemas en la producción del medicamento lo que ha obligado a la Asociación de Urología Española a realizar un análisis de previsiones y unas recomendaciones para la restricción del uso de BCG. En el documento se aconseja sólo el uso de BCG en pacientes con TVu NoMinv G3 (OMS 1973), excluyendo a los pacientes T1G2 y a los tumores Ta/G1-G2 multicéntricos de gran tamaño y muy recidivantes (obtención de puntuaciones altas en la tabla de la EORTC), recomendados por las guías Europeas y el *International Bladder Cancer Group* (10,165-168).

En esta situación podría ser útil el uso de los perfiles de riesgo generados en este trabajo o el uso de los marcadores que han presentado utilidad pronóstica, como son Ki67 y Survivina nuclear, para seleccionar dentro del grupo de pacientes descritos anteriormente a los candidatos al tratamiento con BGC.



## Conclusiones

### En relación a las variables anatomoclínicas clásicas:

1. Las variables que han resultado significativas en nuestro estudio han sido: la edad, el número de tumores resecaos, la disposición multicéntrica del tumor y la invasión del tejido conectivo subepitelial (estadio pT1).
2. A mayor número de tumores resecaos, el periodo libre de recidiva en nuestra muestra es más corto. La disposición multicéntrica de los tumores condiciona un periodo libre de progresión corto. Un estadio pT1 y la edad avanzada se asocian a una supervivencia cáncer-específica también más corta.
3. La clasificación del grado tumoral OMS 2004 tiene utilidad clínica cuando se asocia también al estadio del tumor. En nuestra serie, los pacientes con tumores pTa bajo grado no progresan ni sufren una muerte cáncer-específica.

En relación a los marcadores inmunohistoquímicos:

4. La construcción de un gráfico tridimensional permite una visión integrada de la expresión inmunohistoquímica de los diferentes marcadores.
5. Existen un total de 16 marcadores (un 69,5 % de los analizados) con diferencias de expresión entre los tumores pTa Bajo grado y pT1 Alto grado y otros 15 (65,2%) entre los tumores pTa Alto grado y pT1 Bajo grado, lo cual no implica necesariamente que tengan valor pronóstico.
6. Existen tres fenotipos de expresión inmunohistoquímica con carácter pronóstico: el aumento del índice proliferativo de Ki 67, de la expresión nuclear de ciclina D1 y de VEGFR2 junto con la ausencia de expresión citoplasmática de p16INK4a, de VEGFR2 y CtIP, condicionan la presencia de un periodo libre de recidiva más corto. El aumento en el índice proliferativo de Ki 67 y un aumento en la expresión nuclear de Survivina se asocian a un periodo libre de progresión más corto. El tercer fenotipo correspondería a un aumento del índice proliferativo de Ki67 que con la expresión nuclear de la proteína mutada p53, de Survivina y de GAPDH se relacionan significativamente con el acortamiento de la supervivencia cáncer-específica.

7. El índice proliferativo de Ki67 demostró ser el marcador que más influye en el pronóstico de los pacientes en nuestra serie, ya que su elevada expresión está fuertemente asociada a un acortamiento de los periodos libres de recidiva, progresión y mortalidad cáncer-específica.
8. Los grupos de riesgo generados a partir de las variables anatomoclínicas y los marcadores inmunohistoquímicos significativos han mejorado notablemente el pronóstico clínico comparado al obtenido al usar las tablas de puntuación de la EORTC.
9. La utilidad clínica de los marcadores mencionados, especialmente el índice proliferativo de Ki 67 y el aumento en la expresión nuclear de survivina, observada en nuestro estudio puede dar pie a la elaboración futura de estudios prospectivos con la finalidad de aplicar su determinación en la práctica clínica en el tumor vesical urotelial no músculo-invasivo grado 2 OMS (1973).





## Bibliografía

- 1) Van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, Witjes JA, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol*. 2009 Sep; 56 (3): 430-42.
- 2) Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*. 2009 Jun;27(3):295-300.
- 3) Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(18):1315-30.
- 4) Globocan Project International Agency for Research on Cancer <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> [10.10.2014].
- 5) Bernal-Pérez M, Souza DL, Romero-Fernández FJ, Gómez-Bernal G, Gómez-Bernal FJ. Estimación de las proyecciones del cáncer de vejiga en España. *Actas Urol Esp*. 2013 May;37(5):286-291
- 6) Messing EM., Tumores uroteliales de la vejiga. En: Wein, Kavoussi, Novic, Partin, Peters. *Campbell-Walsh Urología*. . 9ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 2008. p. 2407-2446.
- 7) Sylvester RJ. Natural history, recurrence, and progression in superficial bladder cancer. *ScientificWorldJournal*. 2006 Mar 27;6:2617-25.
- 8) Amin MB, McKenney JK, Paner GP, Hansel DE, Grignon DJ, Montironi R, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Pathology. *Eur Urol*. 2013 Jan;63(1):16-35.
- 9) Sauter G, Algaba F, Amin MB, Busch C, Chevillet J, Gasser t, et al. Tumours of the urinary system: Non-invasive urotelial tumours. *Pathology and Genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. WHO-International Agency for Research on Cancer IARC. Lyon 2004.*: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. P. 110-123.

- 10) Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Compérat E, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2013. *Eur Urol*. 2013 Oct;64(4):639-53.
- 11) Ramos D. Estudio retrospectivo del valor pronóstico de diferentes factores clínicos, histopatológicos, morfométricos e inmunohistoquímicos en neoplasias vesicales papilares uroteliales de bajo grado histológico, Tesis Doctoral. Universitat de València, 2000.
- 12) Alvarez Kindelán J, Campos Hernández JP, López Beltrán A, Requena Tapia MJ. [The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary]. *Actas Urol Esp*. 2007 Oct;31(9):978-88.
- 13) Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol*. 2004 Aug;46(2):170-6.
- 14) Montironi R, Cheng L, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A. How much do you know about benign, preneoplastic, non-invasive and invasive neoplastic lesions of the urinary bladder classified according to the 2004 WHO scheme? *Diagn Pathol*. 2011 Apr 7;6:31.
- 15) Hansel DE, Amin MB, Comperat E, Cote RJ, Knüchel R, Montironi R, et al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol*. 2013 Feb;63(2):321-32.
- 16) Van den Bosch S, Alfred Witjes J. Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: a systematic review. *Eur Urol*. 2011 Sep;60(3):493-500.
- 17) Burger M, Oosterlinck W, Konety B, Chang S, Gudjonsson S, Pruthi R, et al. International Consultation on Urologic Disease-European Association of Urology Consultation on Bladder Cancer 2012. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2013 Jan;63(1):36-44.
- 18) Shariat SF, Milowsky M, Droller MJ. Bladder cancer in the elderly. *Urol Oncol*. 2009 Nov-Dec;27(6):653-67.
- 19) Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int*. 2010 Feb;105(3):300-8.

- 20) Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, et al. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J Urol.* 2011 Aug;29(4):457-63
- 21) Palou J, Sylvester RJ, Faba OR, Parada R, Peña JA, Algaba F, et al. Female gender and carcinoma in situ in the prostatic urethra are prognostic factors for recurrence, progression, and disease-specific mortality in T1G3 bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* 2012 Jul;62(1):118-25.
- 22) Gakis G, Stenzl A. Gender-specific differences in muscle-invasive bladder cancer: the concept of sex steroid sensitivity. *World J Urol.* 2013 Oct;31(5):1059-64
- 23) Hwang EC, Kim YJ, Hwang IS, Hwang JE, Jung SI, Kwon DD, et al. Impact of diabetes mellitus on recurrence and progression in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma: a retrospective cohort study. *Int J Urol.* 2011 Nov; 18 (11): 769-76.
- 24) Tseng CH. Insulin Use and Smoking Jointly Increase the Risk of Bladder Cancer Mortality in Patients With Type 2 Diabetes. *Clin Genitourin Cancer.* 2013 Dec;11(4):508-14.
- 25) Jiang X, Castela JE, Yuan JM, Groshen S, Stern MC, Conti DV, et al. Hypertension, diuretics and antihypertensives in relation to bladder cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Nov; 31 (11): 1964-71.
- 26) Ferris J, García J, Berbel O, Ortega JA. Factores de riesgo constitucionales y ocupacionales asociados al cáncer vesical. *Actas Urol Esp.* 2013; 37(8): 513-522
- 27) Zeegers MP, Swaen GM, Kant I, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med.* 2001 Sep; 58 (9):590-6.
- 28) Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013 Feb;63(2):234-41.
- 29) Rink M, Furberg H, Zabor EC, Xylinas E, Babjuk M, Pycha A, et al. Impact of smoking and smoking cessation on oncologic outcomes in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2013 Apr;63(4):724-32.

- 30) Pietzak EJ, Malkowicz SB. Does quantification of smoking history correlate with initial bladder tumor grade and stage? *Curr Urol Rep.* 2014 Jul;15(7):416.
- 31) Pelucchi C, Galeone C, Tramacere I, Bagnardi V, Negri E, Islami F, et al. Alcohol drinking and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Ann Oncol.* 2012 Jun; 23(6): 1586-93.
- 32) Oosterlinck W, Solsona E, Akaza H, Busch C, Goebell PJ, Malmström PU, et al. Low-grade Ta (noninvasive) urothelial carcinoma of the bladder. *Urology.* 2005 Dec;66(6 Suppl 1):75-89.
- 33) Trias I, Orsola A, Español I, Vidal N, Raventós CX, Bucar S. Bladder urothelial carcinoma stage T1: substaging, invasion morphological patterns and its prognosis significance. *Actas Urol Esp.* 2007 Oct;31(9):1002-8.
- 34) Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol.* 2000 Jan; 163(1): 73-8.
- 35) De La Peña E, Hernández V, Blázquez C, Martin MD, Díaz FJ, Capitán C, et al. Weight of the resected specimen after transurethral resection as a new predictive variable for recurrence of non-muscle-invasive bladder tumour. *BJU Int.* 2013 Apr;111(4 Pt B):E196-201.
- 36) Fernandez-Gomez J, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, Hernandez R, et al. Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO). Prognostic factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: multivariate analysis of data from four randomized CUETO trials. *Eur Urol.* 2008 May; 53(5): 992-1001.
- 37) Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7.
- 38) Jancke G, Rosell J, Jahnsen S. Impact of tumour size on recurrence and progression in Ta/T1 carcinoma of the urinary bladder. *Scand J Urol Nephrol.* 2011 Dec;45(6):388-92.
- 39) Malmström PU. Bladder tumours: time for a paradigm shift? *BJU Int.* 2011 May;107(10):1543-5.

- 40) MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol.* 2007 Apr;51(4):889-97
- 41) Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Ojea A, et al. Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico. The EORTC tables overestimate the risk of recurrence and progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: external validation of the EORTC risk tables. *Eur Urol.* 2011 Sep;60(3):423-30.
- 42) Hernández V, De La Peña E, Martín MD, Blázquez C, Díaz FJ, Llorente C. External validation and applicability of the EORTC risk tables for non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol.* 2011 Aug;29(4):409-14.
- 43) Van Rhijn BW, van Leenders GJ, Ooms BC, Kirkels WJ, Zlotta AR, Boevé ER, et al. The pathologist's mean grade is constant and individualizes the prognostic value of bladder cancer grading. *Eur Urol.* 2010 Jun;57(6):1052-7.
- 44) Pillai R, Wang D, Mayer EK, Abel P. Do standardised prognostic algorithms reflect local practice? Application of EORTC risk tables for non-muscle invasive (pTa/pT1) bladder cancer recurrence and progression in a local cohort. *ScientificWorldJournal.* 2011 Apr 5;11:751-9.
- 45) Yang TB, Zeng FH, Sun ZQ. Prognostic factors for primary superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a retrospective cohort study. *Chin Med J (Engl).* 2006 Nov 5;119(21):1821-8.
- 46) Xu T, Zhu Z, Zhang X, Wang X, Zhong S, Zhang M, et al. Predicting Recurrence and Progression in Chinese Patients With Nonmuscle-invasive Bladder Cancer Using EORTC and CUETO Scoring Models. *Urology.* 2013 Aug;82(2):387-93.
- 47) May M, Brookman-Amis S, Roigas J, Hartmann A, Störkel S, Kristiansen G, et al. Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. *Eur Urol.* 2010 May;57(5):850-8.
- 48) Pellucchi F, Freschi M, Ibrahim B, Rocchini L, Maccagnano C, Briganti A, et

- al. Clinical reliability of the 2004 WHO histological classification system compared with the 1973 WHO system for Ta primary bladder tumors. *J Urol*. 2011 Dec;186(6):2194-9.
- 49) Cao D, Vollmer RT, Luly J, Jain S, Roytman TM, Ferris CW, et al. Comparison of 2004 and 1973 World Health Organization grading systems and their relationship to pathologic staging for predicting long-term prognosis in patients with urothelial carcinoma. *Urology*. 2010 Sep;76(3):593-9.
- 50) Otto W, Denzinger S, Fritsche HM, Burger M, Wieland WF, Hofstädter F, et al. The WHO classification of 1973 is more suitable than the WHO classification of 2004 for predicting survival in pT1 urothelial bladder cancer. *BJU Int*. 2011 Feb;107(3):404-8.
- 51) Chen Z, Ding W, Xu K, Tan J, Sun C, Gou Y, et al. The 1973 WHO Classification is more suitable than the 2004 WHO Classification for predicting prognosis in non-muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e47199.
- 52) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- 53) Matsushita K, Cha EK, Matsumoto K, Baba S, Chromecki TF, Fajkovic H, et al. Immunohistochemical biomarkers for bladder cancer prognosis. *nt J Urol*. 2011 Sep;18(9):616-29.
- 54) Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol*. 2011 Apr;42(4):455-81.
- 55) Ramos D, Lopez-Guerrero JA, Ruiz A, Navarro S, Llombart-Bosch A. Prognostic markers in low-grade papillary urothelial neoplasms of the urinary bladder. *Curr Diang Pat*. 2005 11, 141-150.
- 56) Shariat SF, Karam JA, Lerner SP. Molecular markers in bladder cancer. *Curr Opin Urol*. 2008 Jan;18(1):1-8.
- 57) Kim EJ, Lee YS, Kim YJ, Kim MJ, Ha YS, Jeong P, et al. Clinical implications and prognostic values of topoisomerase-II alpha expression in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Urology*. 2010 Jun;75(6):1516.
- 58) Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, Clark PE, Svatek RS, Hegarty N, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening,

- diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol.* 2013 Jan;63(1):4-15.
- 59) Zhao L, Samuels T, Winckler S, Korgaonkar C, Tompkins V, Horne MC, et al. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol Cancer Res.* 2003 Jan;1(3):195-206.
- 60) Van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, et al. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64(6):1911-4.
- 61) Queipo Zaragoza JA, Ruiz Cerdá JL, Palmero Martí L, Rubio Martínez LA, Vera Sempere F, Jiménez Cruz JF. Prognostic value for progression of the regulating proteins of the cellular cycle in PT1G3 bladder tumours. *Actas Urol Esp.* 2005 Mar;29(3):261-8.
- 62) Vallmanya Llena FR, Laborda Rodríguez A, Lloreta Trull J, Cortadellas Angel R, Placer Santos J, Mas Gelabert A. Immunohistochemical expression of p53, p21, p16, and cyclin D1 in superficial bladder cancer. A tissue microarray study. *Actas Urol Esp.* 2006 Sep;30(8):754-62.
- 63) Queipo-Zaragoza JA, Ruiz-Cerda JL, Vera-Donoso CD, Vera-Sempere F, Budia-Alba A, Jimenez-Cruz JF. Prognostic value of p53, Ki-67, microstaging and microvessel density in pT1G3 bladder tumors: creation of risk groups for progression. *Scand J Urol Nephrol.* 2007;41(4):283-9.
- 64) Schulz WA. Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *Int J Cancer.* 2006 Oct 1;119(7):1513-8.
- 65) Nakazawa K, Murata S, Yuminamochi T, Ishii Y, Ohno S, Nakazawa T, et al. p16(INK4a) expression analysis as an ancillary tool for cytologic diagnosis of urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2009 Nov;132(5):776-84.
- 66) Hitchings AW, Kumar M, Jordan S, Nargund V, Martin J, Berney DM. Prediction of progression in pTa and pT1 bladder carcinomas with p53, p16 and pRb. *Br J Cancer.* 2004 Aug 2;91(3):552-7.
- 67) Vallmanya Llena FR, Laborda Rodríguez A, Lloreta Trull J, Cortadellas Angel

R, Placer Santos J, Mas Gelabert A. Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16, Ciclina D1 en el cáncer de vejiga superficial. Estudio en un soporte de tissue microarray. *Actas Urol Esp.* 2006 Sep;30(8):754-62.

- 68) Chi XZ, Kim J, Lee YH, Lee JW, Lee KS, Wee H, et al. Run-related transcription factor RUNX3 is a target of MDM2-mediated ubiquitination. *Cancer Res.* 2009 Oct 15;69(20):8111-9.
- 69) Nakopoulou L, Zervas A, Lazaris AC, Constantinides C, Stravodimos C, Davaris P, et al. Predictive value of topoisomerase II alpha immunostaining in urothelial bladder carcinoma. *J Clin Pathol.* 2001 Apr;54(4):309-13.
- 70) Koren R, Kugel V, Dekel Y, Weissman Y, Livne PM, Gal R. Human DNA topoisomerase-IIalpha expression as a prognostic factor for transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU Int.* 2003 Apr;91(6):489-92.
- 71) Wang L, Feng C, Ding G, Ding Q, Zhou Z, Jiang H, et al. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol.* 2014 Apr;35(4):2989-95.
- 72) Bozlu M, Orhan D, Baltaci S, Yaman O, Elhan AH, Tulunay O, et al. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and nucleolar organizer region in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol.* 2002;33(1):59-66.
- 73) Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.* 2007 Nov 22;450(7169):509-14.
- 74) Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T, et al. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4401-6.
- 75) Pan CX, Yang XJ, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Eble JN, Koch MO, et al. c-kit Expression in small cell carcinoma of the urinary bladder: prognostic and therapeutic implications. *Mod Pathol.* 2005 Mar;18(3):320-3.
- 76) Gonzalez-Campora R, Davalos-Casanova G, Beato-Moreno A, Garcia-Escudero A, Pareja Megia MJ, Montironi R, et al. BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma. *Cancer Lett.* 2007 Jun 8;250(2):292-9.
- 77) Mavrommatis J, Mylona E, Gakiopoulou H, Stravodimos C, Zervas A, Giannopoulos A, et al. Nuclear hTERT immunohistochemical expression is



- associated with survival of patients with urothelial bladder cancer. *Anticancer Res.* 2005 Jul-Aug;25(4):3109-16.
- 78) Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett.* 2007 Apr 28;249(1):49-60.
- 79) Yan P, Benhattar J, Seelentag W, Stehle JC, Bosman FT. Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues. *Histochem Cell Biol.* 2004 May;121(5):391-7.
- 80) Chen HH, Yu CH, Wang JT, Liu BY, Wang YP, Sun A, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol.* 2007 Feb;43(2):122-9.
- 81) Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):881-90.
- 82) Hemmaid KZ, Awadalla A, Elsayy E, Hussein AA, Abdel-Aziz A, Shokeir AA, et al. Impact of Hepatitis C Virus (HCV) infection on biomolecular markers influencing the pathogenesis of bladder cancer. *Infect Agent Cancer.* 2013 Jun 28;8(1):24.
- 83) Chinnadurai G. CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminaries. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Jan;1765(1):67-73.
- 84) Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T, et al. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4401-6.
- 85) Ramos D, Abba M, López-Guerrero JA, Rubio J, Solsona E, Almenar S, et al. Low levels of WWOX protein immunoexpression correlate with tumour grade and a less favourable outcome in patients with urinary bladder tumours. *Histopathology.* 2008 Jun;52(7):831-9.
- 86) Barbisan F, Santinelli A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, et al. Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer.* 2008 Feb 1;112(3):636-44.
- 87) Ramos D, Navarro S, Villamón R, Gil-Salom M, Llombart-Bosch A.

Cytokeratin expression patterns in low-grade papillary urothelial neoplasms of the urinary bladder. *Cancer*. 2003 Apr 15;97(8):1876-83.

- 88) Shariat SF, Youssef RF, Gupta A, Chade DC, Karakiewicz PI, Isbarn H, et al. Association of angiogenesis related markers with bladder cancer outcomes and other molecular markers. *J Urol*. 2010 May;183(5):1744-50.
- 89) Miyata Y, Kanda S, Ohba K, Nomata K, Hayashida Y, Eguchi J, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):800-6.
- 90) Santos L, Costa C, Pereira S, Koch M, Amaro T, Cardoso F, et al. Neovascularisation is a prognostic factor of early recurrence in T1/G2 urothelial bladder tumours. *Ann Oncol*. 2003 Sep;14(9):1419-24.
- 91) Hammam OA, Aziz AA, Roshdy MS, Abdel Hadi AM. Possible role of cyclooxygenase-2 in schistosomal and non-schistosomal-associated bladder cancer. *Medscape J Med*. 2008 Mar 11;10(3):60.
- 92) Guo C, Liu S, Sun MZ. Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor. *Clin Transl Oncol*. 2013 Mar;15(3):167-72.
- 93) Nicholls C, Pinto AR, Li H, Li L, Wang L, Simpson R, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) induces cancer cell senescence by interacting with telomerase RNA component. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 14;109(33):13308-13.
- 94) Gunia S, May M, Scholmann K, Störkel S, Hoschke B, Koch S, et al. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase correlates with histopathologic grading in noninvasive bladder cancer. *Virchows Arch*. 2008 Aug;453(2):165-70.
- 95) Kömhoff M, Guan Y, Shappell HW, Davis L, Jack G, Shyr Y, Koch MO, et al. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas. *Am J Pathol*. 2000 Jul;157(1):29-35.
- 96) Salinas MF. Modelos de regresión VI. Análisis de supervivencia. *Ciencia & Trabajo* 2008, 10(28): 75-78.
- 97) Keegan PE, Matthews JN, Lunec J, Neal DE. Statistical problems with 'optimal' thresholds in studies of new prognostic factors in urology. *BJU Int*. 2000 Mar;85(4):392-7.

- 98) Cumsille F, Bangdiwala S. Categorización de variables en el análisis estadístico de datos: consecuencias sobre la interpretación de resultados. *Pan Am J Public Health* 2000, 8 (5): 348-354
- 99) Ishwaran H, Kogalur UB. Consistency of Random Survival Forests. *Stat Probab Lett.* 2010 Jul 1;80(13-14):1056-1064.
- 100) Mogensen, U.B, Ishwaran H, Gerds TA. Evaluating random forests for survival analysis using prediction error curves, *J. Statist. Software* 2012, 50(11): 1-23.
- 101) Simon N, Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Cox's Proportional Hazards Model via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software* 2011. 39(5), 1-13. URL <http://www.jstatsoft.org/v39/i05/>.
- 102) Domenech JM, Navarro JB. Análisis de la supervivencia y modelo de riesgos proporcionales de Cox. Metodología de la investigación en ciencias de la salud. Barcelona: Signo; 2007.
- 103) Sanguedolce F, Bufo P, Carrieri G, Cormio L. Predictive markers in bladder cancer: do we have molecular markers ready for clinical use? *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2014 Oct;51(5):291-304.
- 104) Nguyen CT, Kattan MW. How to tell if a new marker improves prediction. *Eur Urol.* 2011 Aug;60(2):226-8; discussion 228-30.
- 105) Luján S, Santamaría C, Pontones JL, Ruiz-Cerdá JL, Trassierra M, Vera-Donoso CD, et al. Risk estimation of multiple recurrence and progression of non muscle invasive bladder carcinoma using new mathematical models. *Actas Urol Esp.* 2014 Dec;38(10):647-654.
- 106) Nishiyama N, Kitamura H, Hotta H, Takahashi A, Yanase M, Itoh N, et al. Construction of predictive models for cancer-specific survival of patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: results from a multicenter retrospective study. *Jpn J Clin Oncol.* 2014 Nov;44(11):1101-8.

- 107) Ali-El-Dein B, Sooriakumaran P, Trinh QD, Barakat TS, Nabeeh A, Ibrahim el-HI. Construction of predictive models for recurrence and progression in >1000 patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) from a single centre. *BJU Int.* 2013 Jun;111(8):E331-41.
- 108) Ajili F, Manai M, Darouiche A, Chebil M, Boubaker S. Tumor multiplicity is an independent prognostic factor of non-muscle-invasive bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Ultrastruct Pathol.* 2012 Oct;36(5):320-4.
- 109) Kobayashi H, Kikuchi E, Mikami S, Maeda T, Tanaka N, Miyajima A, et al. Long term follow-up in patients with initially diagnosed low grade Ta non-muscle invasive bladder tumors: tumor recurrence and worsening progression. *BMC Urol.* 2014 Jan 8;14:5.
- 110) Birkhahn M, Mitra AP, Williams AJ, Lam G, Ye W, Datar RH, et al. Predicting recurrence and progression of noninvasive papillary bladder cancer at initial presentation based on quantitative gene expression profiles. *Eur Urol.* 2010 Jan;57(1):12-20.
- 111) Lopez-Beltran A, Cheng L, Mazzucchelli R, Bianconi M, Blanca A, Scarpelli M, et al. Morphological and molecular profiles and pathways in bladder neoplasms. *Anticancer Res.* 2008 Sep-Oct;28(5B):2893-900.
- 112) Holmäng S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol.* 2001 Apr;165(4):1124-8; discussion 1128-30.
- 113) Chen Z, Ding W, Xu K, Tan J, Sun C, Gou Y, et al. The 1973 WHO Classification is more suitable than the 2004 WHO Classification for predicting prognosis in non-muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One.* 2012;7(10):e47199.
- 114) Otto W, Denzinger S, Fritsche HM, Burger M, Wieland WF, Hofstädter F, et al. The WHO classification of 1973 is more suitable than the WHO classification of 2004 for predicting survival in pT1 urothelial bladder cancer. *BJU Int.* 2011 Feb;107(3):404-8.
- 115) Nishiyama N, Kitamura H, Maeda T, Takahashi S, Masumori N, Hasegawa T, et al. Clinicopathological analysis of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: prognostic value and clinical reliability of the 2004 WHO

- classification system. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Nov;43(11):1124-31.
- 116) Kobayashi H, Kikuchi E, Mikami S, Maeda T, Tanaka N, Miyajima A, et al. Long term follow-up in patients with initially diagnosed low grade Ta non-muscle invasive bladder tumors: tumor recurrence and worsening progression. *BMC Urol*. 2014 Jan 8;14:5.
- 117) Van Rhijn BW, Musquera M, Liu L, Vis AN, Zuiverloon TC, van Leenders GJ, et al. Molecular and clinical support for a four-tiered grading system for bladder cancer based on the WHO 1973 and 2004 classifications. *Mod Pathol*. 2014 Nov 28.
- 118) Pan CC, Chang YH, Chen KK, Yu HJ, Sun CH, Ho DM. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urothelial tumors of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 1,515 cases. *Am J Clin Pathol*. 2010 May;133(5):788-95.
- 119) Lazica DA, Roth S, Brandt AS, Böttcher S, Mathers MJ, Ubrig B. Second transurethral resection after Ta high-grade bladder tumor: a 4.5-year period at a single university center. *Urol Int*. 2014;92(2):131-5.
- 120) Gontero P, Gillo A, Fiorito C, Oderda M, Pacchioni D, Casetta G, et al. Prognostic factors of 'high-grade' Ta bladder cancers according to the WHO 2004 classification: are these equivalent to 'high-risk' non-muscle-invasive bladder cancer? *Urol Int*. 2014;92(2):136-42.
- 121) Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, et al. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology*. 2005 Dec;66(6 Suppl 1):90-107.
- 122) Lamm, R. Persad, M. Brausi, R. Buckley, J. A. Witjes, J. Palou, A, et al. Colombel and M. Soloway. Defining progression in nonmuscle invasive bladder cancer: it is time for a new, standard definition. *J Urol*. 2014 Jan;191(1):20-7. doi: 10.1016/j.juro.2013.07.102. Epub 2013 Aug 22.
- 123) Blaveri E, Simko JP, Korkola JE, Brewer JL, Baehner F, Mehta K, et al. Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 1;11(11):4044-55.

- 124) Wang L, Feng C, Ding G, Ding Q, Zhou Z, Jiang H, et al. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol*. 2014 Apr;35(4):2989-95.
- 125) Chen JX, Deng N, Chen X, Chen LW, Qiu SP, Li XF, et al. A novel molecular grading model: combination of Ki67 and VEGF in predicting tumor recurrence and progression in non-invasive urothelial bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(5):2229-34.
- 126) Seo HK, Cho KS, Chung J, Joung JY, Park WS, Chung MK, et al. Prognostic value of p53 and Ki-67 expression in intermediate-risk patients with nonmuscle-invasive bladder cancer receiving adjuvant intravesical mitomycin C therapy. *Urology*. 2010 Aug;76(2):512.
- 127) Ding W, Gou Y, Sun C, Xia G, Wang H, Chen Z, et al. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol*. 2014 Jan;32(1):42.
- 128) Oderda M, Ricceri F, Pisano F, Fiorito C, Gurioli A, Casetta G, et al. Prognostic factors including Ki-67 and p53 in Bacillus Calmette-Guérin-treated non-muscle-invasive bladder cancer: a prospective study. *Urol Int*. 2013;90(2):184-90.
- 129) Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Gonzalez-Campora R, Requena MJ, Montironi R, et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol*. 2006 Jan;59(1):83-8.
- 130) Behnsawy HM, Miyake H, Abdalla MA, Sayed MA, Ahmed Ael-F, Fujisawa M. Expression of cell cycle-associated proteins in non-muscle-invasive bladder cancer: correlation with intravesical recurrence following transurethral resection. *Urol Oncol*. 2011 Sep-Oct;29(5):495-501.
- 131) Santos L, Amaro T, Costa C, Pereira S, Bento MJ, Lopes P, et al. Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer*. 2003 Jun 10;105(2):267-72.
- 132) Lenz P, Pfeiffer R, Baris D, Schned AR, Takikita M, Poscablo MC, et al. Cell-cycle control in urothelial carcinoma: large-scale tissue array analysis of tumor tissue from Maine and Vermont. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Sep;21(9):1555-64.

- 133) Goebell PJ, Groshen SG, Schmitz-Dräger BJ; International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC). p53 immunohistochemistry in bladder cancer--a new approach to an old question. *Urol Oncol*. 2010 Jul-Aug;28(4):377-88.
- 134) Masters JR, Vani UD, Grigor KM, Griffiths GO, Crook A, Parmar MK, et al. MRC Superficial Bladder Cancer Group Mitomycin-C Trial Collaborators. Can p53 staining be used to identify patients with aggressive superficial bladder cancer? *J Pathol*. 2003 May;200(1):74-81.
- 135) Dalbagni G1, Parekh DJ, Ben-Porat L, Potenzoni M, Herr HW, Reuter VE. Prospective evaluation of p53 as a prognostic marker in T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int*. 2007 Feb;99(2):281-5. Epub 2006 Nov 28.
- 136) Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *Br J Cancer*. 2001 Jan;84(2):270-5.
- 137) George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, et al. p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 1;25(34):5352-8.
- 138) Shariat SF, Zlotta AR, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Cooperative effect of cell-cycle regulators expression on bladder cancer development and biologic aggressiveness. *Mod Pathol*. 2007 Apr;20(4):445-59.
- 139) Frstrup N, Birkenkamp-Demtröder K, Reinert T, Sanchez-Carbayo M, Segersten U, Malmström PU, et al. Multicenter validation of cyclin D1, MCM7, TRIM29, and UBE2C as prognostic protein markers in non-muscle-invasive bladder cancer. *Am J Pathol*. 2013 Feb;182(2):339-49.
- 140) Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, Downes M, Gudas LJ, Mongan NP, et al. Expression of cyclin d1 and its association with disease characteristics in bladder cancer. *Anticancer Res*. 2013 Dec;33(12):5235-42.
- 141) Ren B, Li W, Yang Y, Wu S. The impact of cyclin D1 overexpression on the prognosis of bladder cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2014 Mar 6;12:55.

- 142) Khan AA, Abel PD, Chaudhary KS, Gulzar Z, Stamp GW, Lalani EN. Inverse correlation between high level expression of cyclin E and proliferation index in transitional cell carcinoma of the bladder. *Mol Pathol*. 2003 Dec;56(6):353-61.
- 143) Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Requena MJ, et al. Prognostic factors in survival of patients with stage Ta and T1 bladder urothelial tumors: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27Kip1, cyclin D1, and cyclin D3), proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Am J Clin Pathol*. 2004 Sep;122(3):444-52.
- 144) Stepan A, Simionescu C, Mărgăritescu C, Ciurea R. P16, c-erbB2 and Ki67 immunoexpression in urothelial carcinomas of the bladder. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):653-8.
- 145) Frstrup N, Ulhøi BP, Birkenkamp-Demtröder K, Mansilla F, Sanchez-Carbayo M, Segersten U, et al. Cathepsin E, maspin, Plk1, and survivin are promising prognostic protein markers for progression in non-muscle invasive bladder cancer. *Am J Pathol*. 2012 May;180(5):1824-34.
- 146) Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Urology*. 2007 Sep;70(3):482-6.
- 147) Chen YB, Tu JJ, Kao J, Zhou XK, Chen YT. Survivin as a useful marker for the grading of papillary urothelial carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Feb;132(2):224-31.
- 148) Yin W, Chen N, Zhang Y, Zeng H, Chen X, He Y, et al. Survivin nuclear labeling index: a superior biomarker in superficial urothelial carcinoma of human urinary bladder. *Mod Pathol*. 2006 Nov;19(11):1487-97. Epub 2006 Aug 4.
- 149) Jeon C, Kim M, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Oct 18;8(10):e76719



- 150) Xia G, Kumar SR, Hawes D, Cai J, Hassanieh L, Groshen S, et al. Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. *J Urol*. 2006 Apr;175(4):1245-52.
- 151) Quentin T, Schlott T, Korabiowska M, Käthei N, Zöller G, Glaser F, et al. Alteration of the vascular endothelial growth factor and angiopoietins-1 and -2 pathways in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. *Anticancer Res*. 2004 Sep-Oct;24(5A):2745-56.
- 152) Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, Downes M, Gudas LJ, Mongan NP, et al. Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer. *Anticancer Res*. 2013 Jun;33(6):2381-90.
- 153) Hernández-Avila M, Garrido F, Salazar-Martínez E. Sesgos en estudios epidemiológicos. *Actualización Salud pública de México* 2000 Sept; 42 (5): 439-46.
- 154) Fernández M, Abraira V, Quereda C, Ortuño J. Curvas de supervivencia y modelos de regresión: errores y aciertos en la metodología de aplicación. *Nefrología* 1996 16 (5): 383-88.
- 155) van Rhijn BW. Combining molecular and pathologic data to prognosticate non-muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol*. 2012 Jul-Aug;30(4):518-23.
- 156) Soloway MS. It is time to abandon the "superficial" in bladder cancer. *Eur Urol*. 2007 Dec;52(6):1564-5.
- 157) Bryan RT, Wallace DM. 'Superficial' bladder cancer - time to uncouple pT1 tumours from pTa tumours. *BJU Int*. 2002 Dec;90(9):846-52.
- 158) Lorca J, Delgado-Rodríguez M. Riesgos competitivos de muerte. *Gac Sanit* 1999;13(5):399-406.
- 159) Porta Bleda N. Interval-censored semi-competing risks data a novel approach for modeling bladder cancer. Tesis Doctoral.España. Universidad politécnica de Catalunya;2010.

- 160) Núñez E, Steyerberg EW, Núñez J. Regression modeling strategies. *Rev Esp Cardiol.* 2011 Jun;64(6):501-7.
- 161) Lorenzo Gómez MF, Schroeder G. The role of tumor markers in prognosing transitional bladder cancer. *Actas Urol Esp.* 2003 Jul-Aug;27(7):501-12.
- 162) Ding W, Gou Y, Sun C, Xia G, Wang H, Chen Z, et al. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol.* 2014 Jan;32(1):42.e13-9.
- 163) Sjö Dahl G, Lövg M, KLauss M, Patschan O, Gudjonsson S, Chebil G, et al. Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *Am J Pathol.* 2013 Sep;183(3):681-91.
- 164) Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet GP, Grossman HB, Schalken JA, et al. Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology.* 2005 Dec;66(6 Suppl 1):64-74.
- 165) Miñana B, Cózar JM, Palou J, Unda Urzaiz M, Medina-Lopez RA, Subirá Ríos J, et al. Bladder cancer in Spain 2011: population based study. *J Urol.* 2014 Feb;191(2):323-8.
- 166) Fernandez-Gomez JM, Carballido-Rodriguez J, Cozar-Olmo JM, Palou-Redorta J, Solsona-Narbon E, Unda-Urzaiz JM. Tratamiento del tumor vesical no musculo infiltrante frente al problema de disponibilidad de bacilo de Calmette-Guerin. Consenso de un panel de expertos. *Actas Urol. Esp.* 2013; 37(7): 387-394.
- 167) Kamat AM, Witjes JA, Brausi M, Soloway M, Ali-El-Dein D, Persad R, et al. Defining and treating the spectrum of intermediate risk nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol.* 2014 Aug;192(2):305-15.
- 168) Brausi M, Witjes JA, Lamm D, Persad R, Palou J, Colombel M, et al. A review of current guidelines and best practice recommendations for the management of nonmuscle invasive bladder cancer by the International Bladder Cancer Group. *J Urol.* 2011 Dec;186(6):2158-67.

## Documentación anexa



## **Servicio de Urología HCU Valencia.**

### **HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE**

El grupo de investigación del Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia está iniciando la recogida de datos tanto clínicos como anatomo-patológicos para el desarrollo de una línea de investigación biomédica de interés científico enfocada al mejor conocimiento del tumor vesical.

Su colaboración en este estudio permitirá determinar si existe relación en la expresión inmunohistoquímica de marcadores (medidos en su muestra tumoral operada y guardada en el Servicio de Anatomía Patológica correspondiente al hospital

Durante el seguimiento se tomarán los datos pertinentes de su evolución clínica, sin que esto influya en su seguimiento y protocolo de actuación terapéutica frente al tumor vesical que realiza el Servicio de Urología. Puede que tuviéramos que utilizar sus datos de dirección, teléfono para ponernos en contacto con usted.

Según lo dispuesto en la Ley Orgánica de Protección de datos (15/1999 de 13 de diciembre), puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación y cancelación de sus datos en cualquier momento, sin que su relación con el equipo médico que le atiende se vea afectada. El equipo médico y los investigadores implicados en el proyecto se comprometen a tratar de forma confidencial sus datos personales. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y, eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

## HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información, y en tales condiciones

Doy mi consentimiento, tras haber sido informado por el médico Dr/Dra.....para que los datos que se recojan en mi historia clínica sean utilizados para el proyecto de investigación

“Utilidad clínica de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en el tumor vesical urotelial sin invasión de la muscular propia (pTa/pT1) grado 2”

Doy mi consentimiento para que se pongan en contacto conmigo para recoger información sobre mi estado de salud. Si fuera necesario

Fdo: D/Dña (firma del paciente o familiar autorizado, nombre y apellidos)

Firma

En presencia del Dr./Dra. (nombre y apellidos).....

Firma

En Valencia, a ..... de ..... de 20.....

**Servicio de Urología HCU Valencia.**