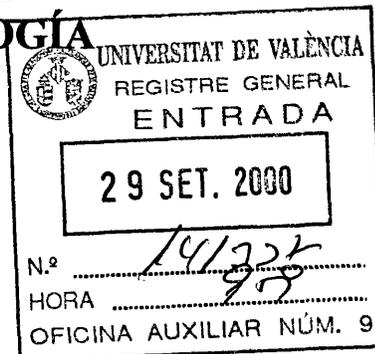


BID.T 4960

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA**



**ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL VALOR
PRONÓSTICO DE DIFERENTES FACTORES
CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS,
MORFOMÉTRICOS, CITOMÉTRICOS E
INMUNOHISTOQUÍMICOS EN NEOPLASIAS
VESICALES PAPILARES UROTELIALES DE
BAJO GRADO HISTOLÓGICO**

Memoria de investigación presentada por D. DAVID RAMOS SOLER

UMI Number: U602955

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U602955

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA DE VALÈNCIA

En el día de hoy se ha procedido a la lectura de la tesis titulada:

Estudio retrospectivo del valor pronóstico de diferentes factores clínicos, histopatológicos, ultrasonográficos, citocentrífugos e inmunohistoquímicos en neoplasias vesicales papilares uroteliales de bajo grado histológico

de D. DAVID RAÑOS SOLER

que ha obtenido la calificación de SOBRESALIENTE CON LAUDA

Firmado El Presidente del Tribunal, Dr. D. AMANDO PEYDRO-OLAYA

El Secretario, Dr. D. SAMUEL NAVARRO FOS

El Vocal Dr. D. FERRAN ALCABA

El Vocal Dr. D. ALFREDO RATILLA VICENTE

El Vocal Dr. D. EDUARDO SOLSONA NARONNA

Valencia 20 de DECIEMBRE de 2020

El Secretario del Tribunal

El Presidente

El Vocal

El Vocal

El Vocal

Firma del Alumno

B10.T 4960

AGRADECIMIENTOS

Al director de la tesis doctoral, el profesor D. Antonio Llombart Bosch, por su paciente dirección y su implicación personal en este trabajo de investigación.

D. Antonio Llombart-Bosch, Catedrático de Anatomía Patológica, Histología y Embriología General del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral, titulada "**Estudio retrospectivo del valor pronóstico de diferentes factores clínicos, histopatológicos, morfométricos, citométricos e inmunohistoquímicos en neoplasias vesicales papilares uroteliales de bajo grado histológico**", ha sido realizada por D. David Ramos Soler bajo mi dirección y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

Esta memoria se encuentra actualmente en condiciones de ser defendida ante el tribunal correspondiente con el fin de optar al Grado Académico de Doctor en Medicina.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Valencia, a veinte de septiembre de dos mil.



Antonio Llombart Bosch

Edo. Prof. Dr. D. Antonio Llombart-Bosch

D. 1251095
L. 1251101



10001251101
Biblioteca Depòsit

Biblioteca Depòsit

AGRADECIMIENTOS

Al director de la tesis doctoral, el profesor *D. Antonio Llombart Bosch*, por su paciente dirección y su implicación personal en este trabajo de investigación.

Al profesor *D. Samuel Navarro Fos* y a *D. Alejo Miguel Sempere* por su inestimable ayuda y su colaboración en el área de Inmunohistoquímica.

A la profesora *Dña. Amparo Ruiz Saurí* por su desinteresada ayuda en el área de Patología Cuantitativa por Análisis de Imagen.

A la profesora *Dña. Luisa Morell Quadreny* por su activa colaboración como patóloga especialista en el área de uropatología.

A *Dña. Elisa Alonso*, *Dña. Laura Martínez*, *Dña. Cristina Mongort* y *D. José García* por su dedicación y buen hacer en la preparación del material histológico de la tesis.

A *D. Luis Gómez* por su colaboración en la obtención del material iconográfico.

A *IDESA CONSULTING S.L* por su participación activa en el estudio estadístico del trabajo de investigación.

A todos mis compañeros del Departamento de Patología por su amistad, su apoyo y sus buenos consejos.



R-903

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. OBJETIVOS**
- 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**
 - 3.1. GENERALIDADES SOBRE LAS NEOPLASIAS VESICALES**
 - 3.1.1. EPIDEMIOLOGÍA**
 - 3.1.2. FACTORES ETIOLÓGICOS**
 - 3.1.2.1. Factores ambientales**
 - 3.1.2.2. Factores genéticos (dependientes del huésped)**
 - 3.1.3. PATOGENIA (HISTORIA NATURAL)**
 - 3.1.3.1. Histogénesis (proceso carcinogénico) / Clonalidad tumoral**
 - 3.1.3.2. Citogenética**
 - 3.1.4. CLÍNICA**
 - 3.1.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS**
 - 3.1.5.1. Cistoscopia y biopsia**
 - 3.1.5.2. Citología**
 - 3.1.5.3. Ecografía (ECO)**
 - 3.1.5.4. Urografía intravenosa (UIV)**
 - 3.1.5.5. Exploración bimanual bajo anestesia (EBBA)**
 - 3.1.5.6. Técnicas complementarias para el diagnóstico de extensión**
 - 3.1.6. CONCEPTO Y TIPOS MORFOLÓGICOS**
 - 3.1.7. CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA**
 - 3.1.7.1. ¿Cómo clasificar?**
 - 3.1.7.2. Grado histológico**
 - 3.1.7.3. Estadio tumoral**
 - 3.1.8. FACTORES PRONÓSTICOS**
 - 3.1.8.1. Grado y estadio**
 - 3.1.8.2. "Status papilar"**
 - 3.1.8.3. Tamaño tumoral**
 - 3.1.8.4. Número de tumores**
 - 3.1.8.5. Localización tumoral**
 - 3.1.8.6. Estado de la mucosa en vecindad**

- 3.1.8.7. Edad
- 3.1.8.8. Sexo
- 3.1.8.9. Diagnóstico previo de tumor vesical
- 3.1.8.10. Forma de crecimiento (margen tumoral)
- 3.1.8.11. Invasión vascular
- 3.1.8.12. Antígenos de grupo sanguíneo (ABO)
- 3.1.8.13. Proliferación celular
- 3.1.8.14. Ploidía (contenido de DNA)
- 3.1.8.15. Morfometría
- 3.1.8.16. Otros antígenos
- 3.1.8.17. Genes implicados en la apoptosis
- 3.1.8.18. Oncogenes tumorales
- 3.1.8.19. Genes supresores tumorales
- 3.1.9. MANEJO CLÍNICO (HISTORIA NATURAL)
 - 3.1.9.1. Actitud terapéutica
 - 3.1.9.2. Seguimiento de los tumores vesicales superficiales (TVS)
 - 3.1.9.3. Problemática actual y perspectivas futuras
- 3.2. MICROSCOPIA CUANTITATIVA
 - 3.2.1. APLICACIONES EN PATOLOGÍA
 - 3.2.1.1. Generalidades
 - 3.2.1.2. Morfometría
 - 3.2.1.3. Citometría estática (CME)
 - 3.2.1.4. Análisis digital de imágenes histológicas
 - 3.2.1.5. Citometría de flujo (CMF)
 - 3.2.2. APLICACIONES EN LAS NEOPLASIAS VESICALES
 - 3.2.2.1. Valor de las técnicas cuantitativas en los sistemas de clasificación por grados
 - 3.2.2.2. Valor pronóstico de la morfometría
 - 3.2.2.3. Valor pronóstico de la ploidía tumoral
- 3.3. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS
 - 3.3.1. GENERALIDADES
 - 3.3.2. NEOPLASIAS VESICALES Y MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR (Ki-67·MIB-1)
 - 3.3.3. NEOPLASIAS VESICALES Y GENES SUPRESORES TUMORALES (P53)
 - 3.3.4. NEOPLASIAS VESICALES Y APOPTOSIS (Bcl-2)

- 3.3.5. NEOPLASIAS VESICALES Y ONCOPROTEÍNAS (C-erbB-2)
- 3.3.6. NEOPLASIAS VESICALES Y EXPRESIÓN DE CITOQUERATINA BASAL (clon MAB 34βE12)

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.2. MÉTODOS

- 4.2.1. REVISIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DE LOS CASOS (ESTUDIO RETROSPECTIVO)
 - 4.2.1.1. Edad y sexo
 - 4.2.1.2. Técnica endoscópica (CISTOSCOPIA)
 - 4.2.1.3. Tamaño y número de tumores
 - 4.2.1.4. Grados clínicos "corregidos" de Parmar
 - 4.2.1.5. Tratamiento adyuvante intravesical (TAI)
 - 4.2.1.6. Seguimiento clínico-patológico
- 4.2.2. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO
 - 4.2.2.1. Grado histológico
 - 4.2.2.2. Estadío tumoral
 - 4.2.2.3. Progresión tumoral
- 4.2.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO
 - 4.2.3.1. Técnica de inmunotinción
 - 4.2.3.2. Control y valoración de los resultados
- 4.2.4. MÉTODOS EN PATOLOGÍA CUANTITATIVA
 - 4.2.4.1. Análisis de imagen
 - 4.2.4.2. Reacción de Feulgen
 - 4.2.4.3. Estudio morfométrico
 - 4.2.4.4. Estudio citométrico
- 4.2.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO
 - 4.2.5.1. Generalidades
 - 4.2.5.2. Análisis descriptivo
 - 4.2.5.3. Análisis bivariante
 - 4.2.5.4. Análisis multivariante

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO GENERAL

5.1.1. DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS

5.1.1.1. Sexo

5.1.1.2. Edad

5.1.1.3. Grado histológico

5.1.1.4. Estadío tumoral

5.1.1.5. Tamaño tumoral

5.1.1.6. Tratamiento adyuvante intravesical (TAI)

5.1.2. DATOS PRONÓSTICOS (FUNCIONES DEL PRONÓSTICO)

5.1.2.1. Seguimiento

5.1.2.2. Recurrencias

5.1.2.3. Intervalo libre de enfermedad o recurrencia (tiempo de supervivencia)

5.1.2.4. Progresión tumoral

5.1.2.5. Grados clínicos "corregidos" de Parmar

5.1.3. DATOS CUANTITATIVOS

5.1.3.1. Morfométricos

5.1.3.2. Citométricos

5.1.4. DATOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

5.1.4.1. P53

5.1.4.2. Bcl-2

5.1.4.3. Ki-67 (MIB-1)

5.1.4.4. C-erbB-2

5.1.4.5. Citoqueratina basal (clon Mab 34βE12)

5.1.4.6. Bcl-2 (+) / p53(15%)

5.1.4.7. CK-basal / Ki-67(MIB-1) distribución 2

5.2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DIFERENTES VARIABLES Y LOS GRUPOS PRONÓSTICOS REALES

5.2.1. ESTUDIO COMPARATIVO SIMPLE (ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL GRADO)

5.2.2. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LA DEFINICIÓN DE LOS GRUPOS PRONÓSTICOS REALES

5.2.2.1. Análisis bivariante para los grupos pronósticos reales

5.2.2.2. Análisis multivariante para los grupos pronósticos reales

5.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES Y EL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD (ILE) O TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

5.3.1. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE KAPLAN-MEIER (ESTUDIO GLOBAL)

5.3.2. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LA PREDICCIÓN DEL (ILE)

5.3.2.1. Análisis bivariante para la variable ILE

5.3.2.2. Análisis multivariante para la variable ILE

5.4. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES Y LA TASA DE RECURRENCIA (TR)

5.4.1. ANÁLISIS BIVARIANTE PARA LA VARIABLE TR

5.4.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE PARA LA VARIABLE TR

5.5. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES Y LA PREDICCIÓN DE PROGRESIÓN TUMORAL (ESTUDIO DESCRIPTIVO)

5.6. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS (ANÁLISIS BIVARIANTE)

5.7. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y LA PLOIDÍA DE LA ZONA TUMORAL MÁS ATÍPICA (Z3) (ANÁLISIS BIVARIANTE)

5.8. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y EL ÁREA NUCLEAR MEDIA DE LA ZONA TUMORAL MÁS ATÍPICA (Z3ANM) (ANÁLISIS BIVARIANTE)

6. DISCUSIÓN

6.1. GENERALIDADES

6.2. DATOS PRONÓSTICOS (FUNCIONES DEL PRONÓSTICO)

6.2.1. Intervalo libre de enfermedad (ILE) o tiempo de supervivencia

6.2.2. Tiempo de seguimiento

6.2.3. Número de recurrencias / tasa de recurrencia (TR)

- 6.2.4. **Progresión tumoral**
- 6.2.5. **Grupos pronósticos "reales"**

- 6.3. **FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS (ANÁLISIS BIVARIANTE)**
 - 6.3.1. **Edad y sexo**
 - 6.3.2. **Tamaño y multiplicidad tumoral**
 - 6.3.3. **Grados clínicos "corregidos" de PARMAR**
 - 6.3.4. **Grado histológico**
 - 6.3.5. **Estadio tumoral**
 - 6.3.6. **Tratamiento adyuvante intravesical (TAD)**

- 6.4. **FACTORES EN PATOLOGÍA CUANTITATIVA POR ANÁLISIS DE IMAGEN (ANÁLISIS BIVARIANTE)**
 - 6.4.1. **Factores morfométricos**
 - 6.4.2. **Factores citométricos**

- 6.5. **FACTORES INMUNOHISTOQUÍMICOS (ANÁLISIS BIVARIANTE)**
 - 6.5.1. **KI-67 (MIB-1)**
 - 6.5.2. **P53**
 - 6.5.3. **Bcl-2 (marcador de apoptosis)**
 - 6.5.4. **C-erbB-2**
 - 6.5.5. **Citoqueratina basal (clon MAB 34βE12)**

- 6.6. **ESTUDIOS COMPARATIVOS ADICIONALES**
 - 6.6.1. **De los distintos factores inmunohistoquímicos (IHQ) entre sí**
 - 6.6.2. **De los factores IHQ con la ploidía tumoral y la morfometría**
 - 6.6.3. **De los distintos factores con la multiplicidad y el tamaño tumoral**

- 6.7. **VALOR PRONÓSTICO DE LOS DISTINTOS FACTORES SEGÚN EL TIPO DE ESTUDIO ESTADÍSTICO (INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS MULTIVARIANTE)**

- 6.8. **ESTUDIO ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE (VALOR PRONÓSTICO INDEPENDIENTE)**

7. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA



1. INTRODUCCIÓN

El nacimiento del pensamiento científico se podría situar probablemente en la Antigua Grecia. Este tipo de pensamiento estaba representado por varias disciplinas denominadas: Lógica, Filosofía, Metafísica, Biología y Medicina. Ese gran florecimiento intelectual se debió, en parte, a la necesidad intrínseca del ser humano de comprender los procesos naturales a través de los sentidos y la labor crítica de la razón.

Aristóteles (384-322 a. de C.) fue la piedra angular que sentó las bases para el desarrollo posterior de la Ciencia. Él, no obstante, no partió de cero. De hecho, Aristóteles era hijo de médico y contó con las aportaciones previas de Pitágoras en ciencias matemáticas y de Hipócrates (460-375 a. de C) en el uso de la observación y de la experiencia aplicadas a la medicina. Hipócrates es considerado actualmente como el Padre de la Medicina.

Aristóteles fue miembro destacado de la Academia de Platón y criticó gran parte de las enseñanzas de éste. Fue, además, un gran sistematizador que ordenó las diferentes ciencias y fundó otras muchas, siendo el creador del lenguaje científico profesional.

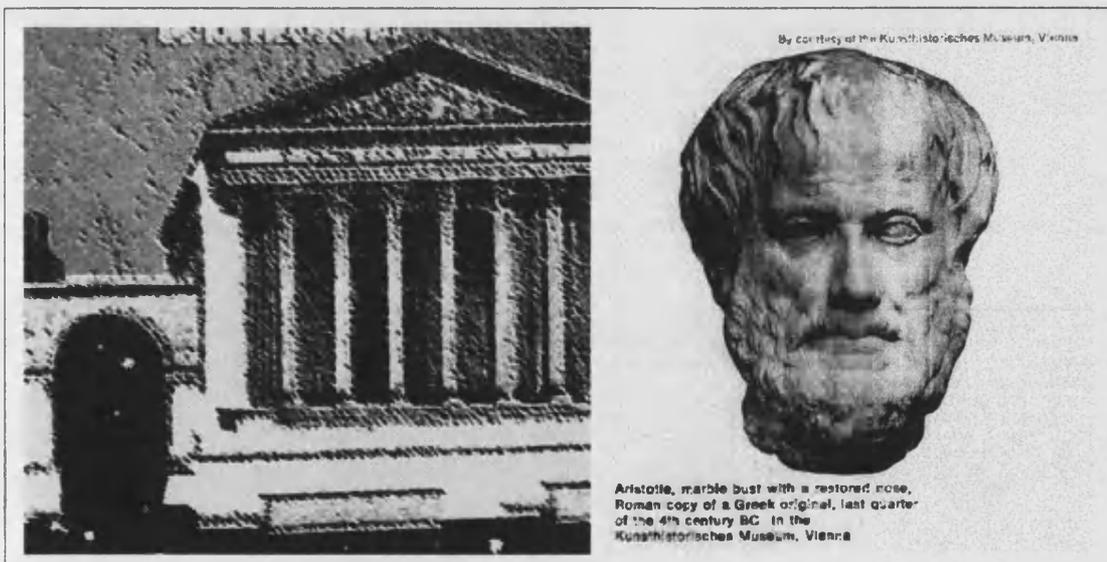


Figura 1.1. Antigua Grecia: cuna de la civilización y del pensamiento científico moderno (Aristóteles)

Aristóteles decidió abordar el conocimiento de la Naturaleza mediante la clasificación y ordenación de todos sus elementos constituyentes. En primer lugar, agrupó todos los elementos naturales en 2 grandes grupos: elementos no animados (*Reino de las cosas inanimadas*) y elementos animados (*Reino de las cosas vivas o animadas*). El criterio diferencial en esta primera clasificación fue la capacidad de cambiar. Con posterioridad, dividió el Reino de las Cosas Vivas en *Reino vegetal* y *Reino de los seres vivos*, en función de su capacidad de movimiento. Y, finalmente, el Reino de los Seres Vivos lo dividió, a su vez, en *Reino animal* y el Ser humano, en función de la capacidad de razonar de éste último. Esta capacidad de pensar él la define como la posibilidad única del hombre de ordenar sus percepciones en diferentes grupos o categorías, es decir, de clasificar aquello que captan los sentidos.

En la actualidad, la Medicina en general y la Anatomía Patológica en particular dedican gran parte de sus esfuerzos a **clasificar** y **ordenar** las distintas enfermedades. Esta clasificación se apoya en la observación e interpretación de signos y síntomas, así como en el desarrollo de avances tecnológicos que proporcionan cada vez un mayor número de datos en relación con los distintos procesos morbosos.

En principio el médico disponía únicamente de sus sentidos y de la razón para entender y clasificar las distintas enfermedades. Sin embargo, el desarrollo tecnológico ha ido aportando nuevos instrumentos que proporcionan al médico un gran abanico de posibilidades que superan al ojo humano en la observación de las lesiones. Así se descubre un nuevo mundo, antes inabordable, que es el **mundo microscópico**.

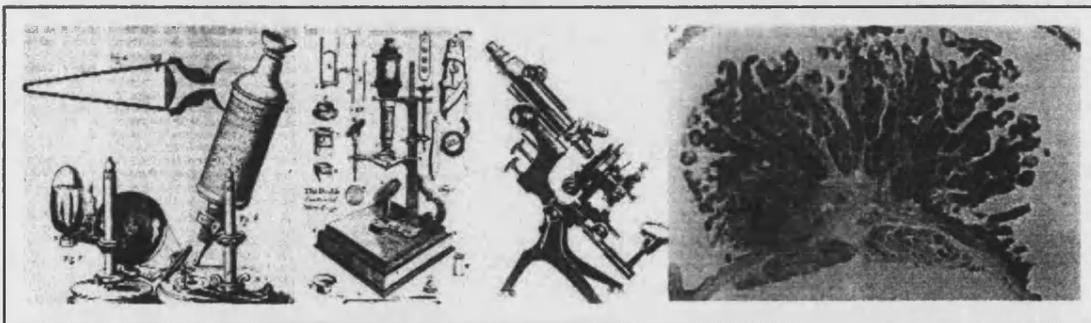


Figura 1.2. A- Microscopio de luz (Robert Hook, 1665). B- Imagen histopatológica de un tumor papilar urotelial vesical

El microscopio ha facilitado en Anatomía Patología el desarrollo de la Microscopía Óptica, de las técnicas Histoquímicas, la Microscopía Electrónica, las técnicas Inmunológicas, la Microscopía Cuantitativa y en los últimos tiempos con el advenimiento de la Biología Molecular (Patología Molecular) y la Citogenética.

Con todas estas técnicas se está consiguiendo "desmontar" completamente la lesión para luego clasificarla dentro de una serie de grupos con valor pronóstico y terapéutico.

Con la Histopatología Clásica se consiguió inicialmente una **clasificación histogenética** de las lesiones en función del tejido a partir del cual se originan. Dentro de las distintas lesiones que estudia la Anatomía Patológica las neoplasias ocupan un mayor protagonismo debido a su curso clínico y a su gran repercusión social. Éstas se clasifican histogenéticamente en: neoplasias epiteliales (originadas en los epitelios), neoplasias mesenquimales (originadas en células estromales: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, etc.), neoplasias del sistema hemolinfático, tumores del sistema nervioso central, etc.

Dentro de las neoplasias de origen epitelial distinguimos aquellas lesiones originadas en los *epitelios de revestimiento* (epidermis, urotelio, etc.) de aquellas originadas en *epitelios glandulares* (glándulas salivares, páncreas, etc.). Además, dentro de cada grupo se distingue entre neoplasias *benignas* (papilomas y adenomas) y *malignas* (carcinomas y adenocarcinomas).

Estos grupos histogenéticos definen el carácter DISCRETO de las lesiones y dentro de cada uno de ellos existe un amplio espectro morfológico que determina en conjunto una gran heterogeneidad. Esta enorme variación en formas celulares y arquitecturales define una escala CONTINUA que va desde lesiones muy parecidas al tejido original hasta lesiones muy alejadas de su origen histológico (grado de diferenciación). Además, se ha observado que las lesiones mejor diferenciadas tienen en general un comportamiento benigno, mientras que las lesiones menos diferenciadas se comportan de forma más agresiva y pueden comprometer la vida del paciente. El carácter discreto de las lesiones tiene, por tanto, valor diagnóstico, mientras su carácter continuo determinará el pronóstico.

Un ejemplo de lesión discreta sería la determinación del origen urotelial de una neoplasia epitelial, es decir, derivada del epitelio transicional de la vía urinaria. Sin

embargo, si se estudia de forma conjunta la morfología de un elevado número de neoplasias vesicales uroteliales se evidencia un gran espectro morfológico continuo, tanto en el ámbito histológico (estructural), como en el citológico (citoplasmático y nuclear).

Dentro de esta escala continua de neoplasias vesicales tenemos en un extremo lesiones benignas (papilomas) y lesiones malignas bien diferenciadas, mientras que en el extremo opuesto encontramos carcinomas progresivamente más indiferenciados.

Las lesiones de carácter DISCRETO son fáciles de clasificar al estar bien definidos los grupos en función de unos criterios de clasificación sencillos y reproducibles por cualquier patólogo. Sin embargo, las lesiones CONTINUAS son, en general, difíciles de clasificar al estar definidos los grupos en función de una serie de criterios subjetivos, complejos y difícilmente reproducibles, sobre todo en aquellos casos situados entre 2 categorías contiguas (Figura 1.3). De hecho, la separación entre los grupos es en cierta medida arbitraria dependiendo del patólogo que aplique los criterios de diferenciación. Ver esquema a continuación:

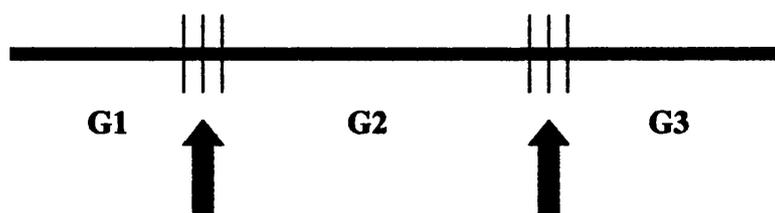


Figura 1.3. Áreas entre 2 categorías consecutivas

Según este esquema la separación entre 2 grupos adyacentes es difícil de determinar de forma objetiva, y ese es un problema inherente a cualquier variable con este carácter CONTINUO. En el caso concreto de las neoplasias vesicales ocurre algo parecido.

Broders en la década de los 20 publicó una serie de sistemas de clasificación de las neoplasias teniendo en cuenta su carácter continuo y lo que se asemejaran histológicamente al tejido original, es decir, según su grado de diferenciación. A este sistema de clasificación histológica lo denominó **clasificación por grados o gradación**, donde cada grado es una categoría independiente definida en función de

una serie de criterios histológicos más o menos subjetivos. Broders define el **grado 1** como las neoplasias mejor diferenciadas, el **grado 4** como las de menor diferenciación y los **grados 2 y 3** como neoplasias moderadamente diferenciadas situadas entre las anteriores. Broders afirma que el grado de diferenciación de las neoplasias define su comportamiento biológico y tiene por tanto un valor pronóstico. De esta forma, el curso evolutivo tumoral será tanto peor cuanto mayor sea el grado histológico.

Aunque este sistema mostró ser eficaz y reproducible evidenció que el problema se encontraba en aquellos tumores situados entre grupos correlativos.

Como alternativa se ideó un segundo sistema de clasificación basado en la extensión de la lesión a través de las capas de la pared vesical o a distancia. Este sistema se denominó **clasificación por estadios o estadiaje** (Jewett-Strong, 1946-52; y Marshall, 1952), el cual mostró desde su inicio gran valor pronóstico; y, aunque ha tenido en general más defensores que detractores, presenta también una serie de inconvenientes como son: la subestadificación o estadificación a la baja si no se procesa todo el tumor, problemas relacionados con las imágenes histológicas de "pseudoinvasión", y problemas derivados de la existencia de una capa muscular propia (músculo detrusor) y otra capa muscular en el seno de la lámina propia ("muscularis mucosae"), las cuales pueden llegar a confundirse y disminuir por tanto la fiabilidad de los resultados.

Ambos sistemas clasificatorios (grado y estadio) han ido evolucionando en una ardua "lucha" por definirse como el sistema o combinación de sistemas con mayor valor predictivo.

Simultáneamente, se han ido introduciendo nuevas técnicas en Patología y nuevos sistemas de cuantificación que han facilitado la creación de criterios clasificatorios cada vez más objetivos y fáciles de reproducir, sobre todo mediante el desarrollo de la **microscopía cuantitativa**. Además, se han descrito múltiples factores pronósticos a partir de **estudios inmunohistoquímicos y moleculares**.

A todo este desarrollo ha contribuido decisivamente la introducción simultánea de programas informáticos y ordenadores acoplados al microscopio. El resultado final es que de cada lesión se obtiene una gran cantidad de datos cualitativos y cuantitativos cuyo análisis necesita de estudios matemáticos y estadísticos complejos. Esta complejidad se ha simplificado bastante con la aplicación del **análisis multivariable**.

Recientemente se han reunido en EEUU un gran número de urólogos y patólogos miembros del Comité de Tumores Urológicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) y miembros de la Sociedad Internacional de Patólogos Urológicos (ISUP). Como resultado de dicha reunión se decide un nuevo sistema de **CLASIFICACIÓN DE CONSENSO DE LA OMS/ISUP (1998)** para las neoplasias vesicales uroteliales. Esta clasificación correlaciona grado y estadio con el pronóstico.

Dicha clasificación consensuada define 2 grandes grupos dentro de las neoplasias vesicales papilares (excluidos los papilomas y las lesiones planas): un primer grupo de **neoplasias de Bajo Grado (NBG)** y otro de neoplasias de Alto Grado (NAG). Las Neoplasias de Bajo Grado se dividen, a su vez, en **neoplasias uroteliales de Bajo Potencial Maligno (BPM)** y **carcinomas uroteliales de Bajo Grado (BG)**. Las neoplasias de bajo grado se corresponden con el grado 1 de la OMS, mientras que las Neoplasias de Alto Grado incluyen carcinomas grados 2 y 3 de la OMS. Esta clasificación por grados se basa en criterios subjetivos obtenidos a partir de estudios morfométricos más objetivos, mejorando así la objetividad de los primeros.

La clasificación consensuada por estadios diferencia asimismo entre neoplasias limitadas a la mucosa, neoplasias con invasión de la lámina propia y aquellas que infiltran la muscular propia. Aconseja, asimismo, diferenciar si la invasión de la lámina propia es focal o difusa.

Las neoplasias papilares uroteliales de la vejiga urinaria son lesiones de incidencia relativamente alta, sobre todo en la población adulta en la quinta o sexta décadas de la vida, afectando con mayor frecuencia al sexo masculino. Los factores etiológicos más estrechamente relacionados con la génesis de estos tumores son la inhalación del humo del tabaco y los trabajadores de industrias de colorantes anilínicos.

Dentro de los tumores vesicales papilares uroteliales, el grupo de neoplasias de bajo grado es con mucho el de mayor frecuencia. En este grupo de neoplasias la herramienta diagnóstica fundamental es sin duda la cistoscopia asociada generalmente a la biopsia, siendo la resección endoscópica transuretral el tratamiento de elección, al

cual se puede asociar o no a un tratamiento adyuvante intravesical consistente en quimioterapia o inmunoterapia.

Tradicionalmente, las neoplasias vesicales se dividieron conceptualmente en tumores vesicales superficiales y profundos, a consecuencia de un distinto curso evolutivo y, por tanto, una diferente actitud terapéutica a adoptar (tratamiento conservador para los tumores vesicales superficiales y tratamiento más agresivo en el caso de tumores profundos). Sin embargo, la nueva clasificación de consenso OMS/ISUP (1998) propone el abandono del concepto de "tumores vesicales superficiales y profundos" en favor de la utilización de los términos: "neoplasias vesicales de alto y bajo grado histológico", además existen numerosas pruebas que demuestran fehacientemente una mejor correlación pronóstica si se estratifican los tumores vesicales papilares de este modo.

La problemática actual del grupo de neoplasias vesicales papilares de bajo grado se centra principalmente en su curso evolutivo que en ocasiones presenta un elevado número de recurrencias y la posibilidad de progresión tumoral en grado y/o estadio. Ésto obliga a un estrecho seguimiento cistoscópico de estos pacientes. Siendo además la cistoscopia una técnica diagnóstica invasiva, molesta y con un elevado coste económico.

En este sentido, diferentes técnicas diagnósticas y de investigación menos invasivas, basadas en la morfología (fenotipo) y en el estudio genético tumoral (genotipo), han aportado información útil en relación con la historia natural de estos tumores, con la actitud terapéutica a adoptar y con la definición de grupos poblacionales de riesgo (predicción de recidivas y de progresión tumoral).

Entre estas técnicas destacan sobre todo las técnicas cuantitativas (morfométricas y citométricas) y las técnicas inmunohistoquímicas (índice proliferativo tumoral, expresión de la proteína p53, variabilidad en la expresión citoplasmática de diferentes tipos de citoqueratinas, etc.). No obstante, el valor pronóstico de los parámetros clásicos clínico-patológicos sigue siendo fundamental, y entre ellos destaca la multiplicidad tumoral, el tamaño, el intervalo libre de enfermedad, el grado histológico y el estadio tumoral.

En concreto, nuestro trabajo de investigación trata de un estudio retrospectivo a cerca del valor pronóstico de diferentes parámetros morfométricos, citométricos e

inmunohistoquímicos frente al valor pronóstico de los parámetros clásicos clínico-patológicos. Este estudio incluye un total de 120 casos de neoplasias vesicales papilares uroteliales de bajo grado histológico (NBG) con un seguimiento medio prolongado y definidos los grupos según los criterios de la nueva clasificación de consenso de la OMS/ISUP, 1998 (neoplasias papilares uroteliales de bajo potencial maligno y carcinomas papilares de bajo grado) y en función de criterios pronósticos objetivos (grupos pronósticos "reales").



2. OBJETIVOS

- 1- Definición de grupos pronósticos "reales" en función de la tasa de recurrencia (TR), el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la existencia o no de progresión tumoral. Utilización de estos grupos pronósticos en las distintas comparaciones realizadas en el estudio estadístico.**

- 2- Estudio del valor pronóstico del grado histológico para las neoplasias vesicales papilares de bajo grado (neoplasias de bajo potencial maligno y carcinomas de bajo grado), definidas según diferentes sistemas de clasificación para el grado histológico. Estudio comparativo con los grupos pronósticos "reales".**

- 3- Estudio del valor pronóstico de los grupos definidos ahora en función de criterios morfométricos nucleares individuales (área, perímetro y factor de forma nuclear).**

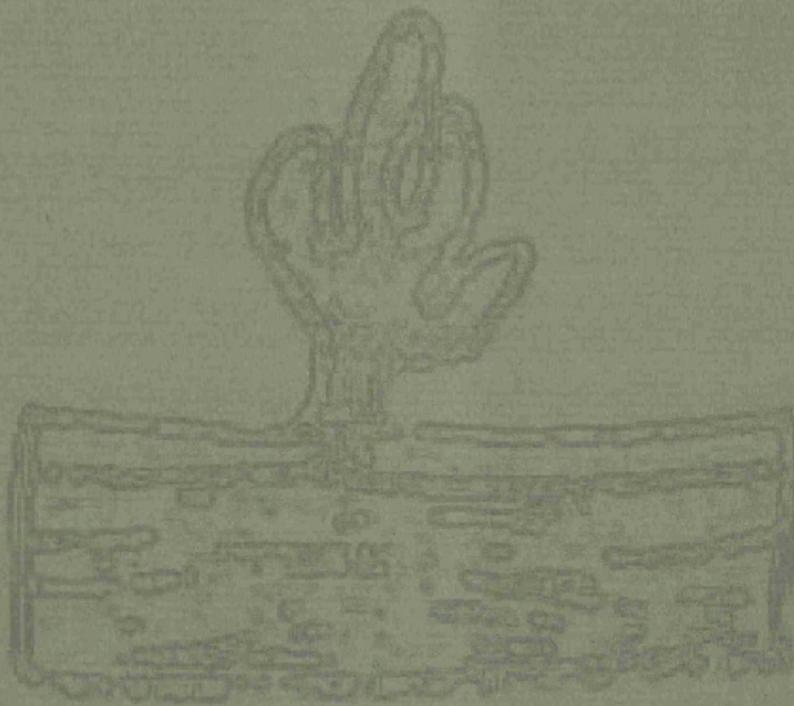
- 4- Valor pronóstico de la ploidía tumoral por análisis de imagen en todo el tumor y en el área tumoral más atípica (10 núcleos más grandes).**

- 5- Valor pronóstico de la expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos (p53, índice Ki-67·MIB-1, c-erbB-2, citoqueratina basal y bcl-2), considerando para ello distintos niveles de corte para la positividad.**

- 6- Valor pronóstico de los parámetros clásicos clínicos y patológicos. Estudio comparativo con el resto de factores pronósticos.**

- 7- Estudio comparativo bivalente del valor pronóstico de los distintos factores en relación con las funciones del pronóstico: el intervalo libre de enfermedad (ILE), la tasa de recurrencia (TR) y la progresión tumoral.**

- 8- Análisis estadístico multivariante de todos los factores pronósticos considerados. Definición de aquellos factores con valor pronóstico independiente del resto.**



3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. GENERALIDADES SOBRE LAS NEOPLASIAS VESICALES

3.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Según **datos epidemiológicos americanos (EEUU)** la incidencia de neoplasia vesical se ha incrementado en las últimas décadas. Sin embargo, la tasa de mortalidad se ha mantenido en los mismos valores, suponiendo un 3-5% de todas las causas de muerte por cáncer. Según este mismo estudio epidemiológico la edad media de presentación oscila entre 64 y 68 años dentro de un periodo más amplio comprendido entre los 50 y los 70 años, siendo muy infrecuente por debajo de los 40 años y en niños. En individuos jóvenes suele tratarse de sarcomas vesicales y neoplasias epiteliales de bajo grado (papilomas y carcinomas de bajo grado). Datos adicionales de ese mismo estudio indican que la relación hombre/mujer es de 2,7:1 y las neoplasias vesicales afectan con mayor frecuencia a personas de raza negra, con una relación 2:1 en comparación con la blanca (Murphy, 1993).

En otro informe epidemiológico americano adaptado de Boring y cols. (1994) las neoplasias malignas de las vías urinarias ocupan en el hombre el cuarto lugar en incidencia global por cáncer, lo que supone un 9% de la incidencia total; y el quinto lugar en tasa de mortalidad (5% del total). En ambos casos superadas por el cáncer prostático. Por otro lado, la mujer presenta una incidencia del 4%, ocupando el sexto lugar en el índice global de incidencia, y el octavo en tasa de mortalidad (3% del total).

En el último estudio epidemiológico americano consultado (Landis y cols., 1998) las neoplasias malignas de las vías urinarias representan en el hombre un 9.3% de incidencia global por neoplasia (cuarto lugar por detrás del pulmón, colon y próstata) y un 5.3% de la tasa global de mortalidad (quinto lugar). De forma que en la mujer supone un 4.6% de la incidencia global (sexto lugar) y un 3.2% de la tasa total de mortalidad (octavo lugar).

Conviene señalar que en estos estudios se engloba en una misma categoría a todos los tumores uroteliales de la vía urinaria procedentes de la vejiga, los uréteres, los cálices renales y la pelvis renal.

Según **datos epidemiológicos europeos** en el periodo entre 1990-1996 la incidencia total del carcinoma de vejiga se sitúa en el quinto lugar en el hombre y el décimo en la mujer (Probert y cols., 1998).

Por lo que respecta a **datos epidemiológicos nacionales**, según el Instituto Nacional de Epidemiología, con datos actualizados al año 1996, la incidencia del carcinoma vesical por 100.000 habitantes era de 23.9 en el hombre (cuarto lugar) y 2.8 en la mujer (octavo lugar). La tasa de mortalidad en este período aumenta ligeramente en el hombre, ocupando el quinto lugar en mortalidad por cáncer, mientras en la mujer se mantienen las cifras o incluso disminuye la tasa de mortalidad, ocupando el vigésimo lugar. Otero y cols. (1998) señalan que el carcinoma vesical ocupa el cuarto lugar en tasa de incidencia en el varón y el octavo en la mujer. En estos estudios el cáncer de vejiga es considerado de forma independiente (ya que se trata del carcinoma urotelial más frecuente). Estos datos tienen, por tanto, un carácter orientativo mientras no se homogeneicen las categorías para los distintos estudios epidemiológicos realizados.

En resumen, en el varón las neoplasias vesicales son el segundo tumor urológico más frecuente tras las neoplasias de próstata en personas de edad media y avanzada, ocupando el cuarto o quinto lugar en tasa de mortalidad. Hemos de tener presente que la mayor parte de neoplasias vesicales se presentan como tumores bien diferenciados con mínima o nula invasión de la pared vesical, de lo contrario estaríamos hablando, probablemente, de una tasa de mortalidad sensiblemente superior.

Por otro lado, el incremento en la tasa de incidencia en el varón en las últimas décadas parece estar relacionado con el aumento progresivo en el hábito tabáquico. Sin embargo, la mujer no presenta este incremento en incidencia, quizás porque su incorporación fue más tardía o quizás porque posee un factor protector frente a esta patología. Además, las neoplasias vesicales, al contrario que el carcinoma de próstata, no suelen ser hallazgos autópsicos casuales (Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

Considerando las neoplasias vesicales en el ámbito mundial, las tasas de Incidencia en Norteamérica y Europa son superiores a las tasas de países orientales como Japón.

En cuanto a su localización en la vejiga, las neoplasias uroteliales son más frecuentes allá donde la mucosa está en contacto más prolongado con la orina. Esta zona se corresponde con el área del trígono vesical, la cual está comprendida entre la desembocadura de ambos uréteres y el cuello de la vejiga.

Aproximadamente la mitad de las neoplasias son menores de 2.5 cm y alrededor del 60% se presentan como lesión única, mientras que el resto (40%) se presenta como múltiples lesiones a lo largo de toda la vía excretora (Murphy, 1993).

3.1.2. FACTORES ETIOLÓGICOS

Las lesiones neoplásicas de la vejiga urinaria han sido un modelo extensamente estudiado en medicina experimental. Sin embargo, su modelo básico de carcinogénesis sigue siendo un enigma en la mayoría de los casos (Grignon, 1997).

La hipótesis más aceptada en la génesis de la transformación neoplásica del urotelio es el desarrollo del proceso mediante la interacción e incorporación de diferentes agentes externos con capacidad carcinogénica sobre un sustrato genético propicio. Estas sustancias exógenas pueden producir este efecto carcinogénico de forma directa o bien ser metabolizadas dando lugar a un segundo compuesto intermedio que será el que ejerza el efecto carcinogénico sobre el urotelio.

Cada una de estos agentes exógenos se conocen como factores de riesgo, agentes causales o agentes carcinogénicos (Probert y cols., 1998). Éstos pueden a su vez ser inhalados o ingeridos y posteriormente son eliminados por el riñón y disueltos en la orina, donde se estancan y permanecen horas en contacto directo con la mucosa vesical, lo cual facilita su efecto carcinogénico (Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

3.1.2.1. Factores ambientales

- **Humo del tabaco**

Los fumadores se estima que tienen un riesgo de desarrollar una neoplasia vesical de 2 a 4 veces superior al de los no fumadores. El riesgo se incrementa a mayor número de cigarrillos, mayor número de años como fumador y al consumo por inhalación. Los fumadores de pipa y puros tienen un riesgo menor. Al dejar de fumar el riesgo va disminuyendo paulatinamente aunque no desaparece del todo. Las sustancias carcinogénicas presentes en el humo del tabaco son las nitrosaminas y la 2-naftilamina (aminas aromáticas). Inicialmente los cambios celulares se producen en las células de las capas basales, hecho demostrado en diversos estudios (Auerbach y Garfinkel, 1989), además se ha observado asociación entre el consumo de tabaco, una mayor agresividad histológica del tumor y un mayor número de recidivas en el curso del seguimiento (Thompson y cols., 1987).

- **Químicos industriales (colorantes)**

El riesgo de estos trabajadores a padecer neoplasias vesicales es de 10 a 50 veces más elevado que el de la población normal. Entre las sustancias implicadas tenemos aminas, benzidinas, hidrocarburos clorados alifáticos, arilamidas, etc. (Grignon, 1997; Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999). Muchos metabolitos secundarios derivados de estos productos proceden del metabolismo del triptófano (Ordoñez y Rosai, 1996).

- **Edulcorantes**

Aunque no se ha demostrado su efecto carcinogénico en animales, parece que en humanos el riesgo de desarrollar neoplasias de vejiga en grandes consumidores de sacarina es nulo o bajo (Grignon, 1997). Otros estudios concluyen que se trata, sin embargo, de un co-carcinógeno (Murphy, 1993).

- **Fármacos**

- **Fenacetina:** Es un derivado de tintes anilínicos y se usa como analgésico. Administrado a dosis altas se ha demostrado mínima asociación con el carcinoma vesical y algo más fuerte con el carcinoma de pelvis renal.
- **Ciclofosfamida:** Ha sido ampliamente documentada la relación entre la ciclofosfamida y el carcinoma vesical desde que fue demostrada en 1971 por Worth, publicándose un riesgo acumulado del 11% a los 12 meses y un periodo de latencia que oscila entre 65 y 141 meses (Pedersen-Bjergaard y cols., 1988). El efecto carcinogénico se produce por un metabolito intermedio ("acroleína"). Se han descrito distintos tipos de carcinoma vesical infiltrante por la administración de ciclofosfamida: carcinomas de células transicionales, carcinomas epidermoides, adenocarcinomas y leiomiomas. No obstante, la patología más frecuente es una cistitis hemorrágica que actuaría como un foco irritativo crónico sensible a la transformación neoplásicas (Grignon, 1997; Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

- **Radiaciones ionizantes**

Se ha descrito el desarrollo de carcinomas vesicales en pacientes sometidos a tratamientos radioterápicos, sobre todo en mujeres con carcinoma de cérvix uterino.

Estas pacientes tienen un riesgo acumulado de 2 a 4 veces superior al de la población normal (Duncan y cols., 1977; Sella y cols., 1989).

- **Café, té y alcohol**

Su efecto carcinogénico es difícil de determinar al tratarse de una población expuesta también al consumo simultáneo de tabaco, lo que dificulta su estudio de forma independiente. La asociación parece, no obstante, débil (Grignon, 1997; Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

Con el consumo de bebidas alcohólicas ocurre algo parecido, aunque en este caso algunos estudios sí han demostrado asociación estadística si se estratifican los diferentes tipos de bebidas. Si se consideran por separado la cerveza, el vino y los licores, se observa una mayor tasa de incidencia de carcinoma vesical en el grupo de grandes consumidores de cerveza, mientras que el vino podría tener un efecto protector (Claude y cols., 1983; Probert y cols., 1998).

- **Virus del papiloma humano (VPH)**

Los estudios de este microorganismo como factor etiológico del carcinoma vesical son contradictorios (Anwar y cols., 1992; Chang y cols., 1994), aunque se puede concluir en general una relación mínima o nula.

- **Cistitis crónica. Esquistosoma.**

Ambas entidades están relacionadas con el desarrollo de neoplasias vesicales. Concretamente el Esquistosoma Haematobium se asocia en países subdesarrollados a una alta incidencia de carcinoma epidermoide vesical (Grignon, 1997).

3.1.2.2. Factores genéticos (dependientes del huésped)

- **Estado acetilador**

Consiste en un polimorfismo determinante del nivel de N-acetil-transferasa en las células del urotelio normal. Los pacientes con este defecto enzimático tienen un mayor riesgo de desarrollar neoplasias vesicales, sobre todo si se trata de pacientes fumadores o trabajadores de industrias químicas, ya que en condiciones normales esta enzima transforma los carcinógenos vesicales en productos no carcinogénicos (Probert y cols., 1998).

- **Herencia**

No existe una asociación fuerte, aunque se han descrito casos de cáncer familiar en relación con el "Síndrome de Muir-Torre" (Grignon y cols., 1987).

- **Estado inmunológico**

Cada vez está más aceptada la teoría del desarrollo de los procesos neoplásicos por el fracaso de la respuesta inmune. Las células neoplásicas surgen constantemente a lo largo de la vida del individuo pero el sistema inmunológico las va eliminando (Carballido y Álvarez-Mon, 1989). Este sistema consta de un componente celular y otro humoral. El componente celular está constituido por linfocitos T y B, células efectoras del sistema monocito-macrófago y células natural "killer" (CNK), mientras que el componente humoral se compone de inmunoglobulinas, proteínas del complemento, linfocinas y monocinas (Nossal, 1987). Las CNK producen interleucinas 1,2 y 3, factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón (IFN).

Se han descrito 3 tipos distintos de interferón desde que fue denominado así por Isaacs y Lindmann en 1957: IFN- α (leucocitos), IFN- β (fibroblastos) e IFN- γ (LT y CNK). A los 2 primeros se les denomina asimismo IFN-1 y al último IFN-2. Su participación en la historia natural de las neoplasias vesicales está siendo objeto de numerosos estudios en la actualidad.

3.1.3. PATOGENIA (HISTORIA NATURAL)

3.1.3.1. Histogénesis (proceso carcinogénico) / Clonalidad tumoral

Para entender la historia natural de las neoplasias vesicales es necesario, primero, comprender sus mecanismos etiopatogénicos concretos.

La histogenia de las neoplasias vesicales se ha estudiado en modelos experimentales en animales y humanos (Grignon, 1997). En estudios en animales se describe un proceso multisequencial de cambios celulares progresivos en el cual se suceden diferentes grados de desdiferenciación dependiendo del tipo histológico tumoral y del tipo de agente carcinogénico empleado. Los cambios iniciales consisten en una hiperplasia urotelial de células basales con atipias leves (Hiperplasia Atípica Urotelial). Estas atipias van siendo progresivamente moderadas y severas, acompañadas de una progresiva irregularidad arquitectural (Displasia Urotelial). Sin embargo, existen varios pasos desconocidos en el desarrollo inicial del carácter autónomo de la lesión.

Los estudios experimentales en humanos han sido menos importantes y se han limitado al estudio de los trabajadores de riesgo en industrias químicas, y de pacientes con neoplasias vesicales ya diagnosticadas en los que se estudia el resto de la mucosa vesical a lo largo del seguimiento. De estos estudios se deduce que el porcentaje de neoplasias uroteliales de bajo grado limitadas a la mucosa (no invasivas) que evolucionan a neoplasias de alto grado con invasión o metástasis es muy reducido, mientras que el número de recidivas tumorales es elevado (Farrow y cols., 1976; Schulte y cols., 1986; Shinka y cols., 1991; Koss, 1992).

La multiplicidad de las neoplasias vesicales ha sido ampliamente estudiada desde un punto de vista histogénico y han ido surgiendo diversas hipótesis que la tratarían de explicar y justificaría la elevada tasa de recurrencia de las neoplasias vesicales de bajo grado.

Schmitz-Dräger y cols. (1996) describen 3 mecanismos distintos como explicación a este elevado número de recurrencias:

- Implantación de células neoplásicas desprendidas del tumor original (hipótesis monoclonal).

- Crecimiento de una nueva neoplasia a distancia de la primaria a consecuencia de cambios simultáneos en diferentes áreas del urotelio (hipótesis policlonal, efecto de campo o lesión de campo).
- Un nuevo crecimiento neoplásico en el mismo lugar que el tumor primario por resección incompleta de la lesión (recidiva local).

La hipótesis de la recidiva local ha sido la más cuestionada. De hecho, autores como Harris y Neal (1992) demuestran que las recurrencias se producen en lugares distintos a los de la neoplasia original. Por su parte, Badalament y Schervish (1996) demuestran que en biopsias realizadas sobre el área cicatricial no se evidenciaban células neoplásicas residuales. En ese mismo sentido, Page y cols. (1978) observan que un 75% de las neoplasias vesicales se originan en un área restringida en torno al orificio de desembocadura de ambos uréteres, pero sólo un 25% de las recurrencias tumorales tienen lugar en esa misma zona (Boyd y Burnand, 1974; y Weldon y Soloway, 1975).

Numerosos estudios defienden, sin embargo, la hipótesis monoclonal. Esta teoría se basa en la existencia de un clon celular concreto capaz de llevar a cabo una "siembra" neoplásica en puntos distantes del urotelio. A esta teoría se unen numerosos estudios de Biología Molecular, los cuales demuestran una serie de características citogenéticas comunes para los diferentes tumores de un mismo paciente; diferencias difíciles de explicar si no se tratara de tumores emparentados (Sidransky y cols., 1992; Habuchi y cols., 1993; Xu y cols., 1996; Fadhil-Elmula y cols., 1999). Estos tumores pueden desarrollar diferentes alteraciones citogenéticas que determinan, a largo plazo, un comportamiento biológico más agresivo. Este fenómeno de "siembra" tumoral se ve reforzado con los estudios de Page y cols. (1978) y See y cols. (1989) los cuales consideran que estas células tumorales desprendidas del tumor primario son capaces de anidar en áreas alejadas donde exista una solución de continuidad (lesión) en el urotelio, allí las células son capaces de implantarse mediante una serie de mecanismos trombogénicos en los que participarían las proteínas del complemento. Esta implantación podría prevenirse con fármacos anticoagulantes como la heparina, utilizada como alternativa al tratamiento intravesical convencional (quimioterapia o inmunoterapia), ya que éstos no limitan la movilidad celular (Garden, 1992). Kakizoe

y cols. (1980) y Kenworthy y cols. (1996) apoyan también esta hipótesis monoclonal al afirmar en sus series que el diagnóstico inicial de una neoplasia urotelial en el tracto urinario superior (cálices o uréter) se asocia a un 75% de probabilidad de desarrollar un tumor vesical ("siembra a favor de corriente"), mientras que la probabilidad de que un tumor primario vesical coexista con un tumor de vías urinarias altas es tan sólo del 4%.

Por otro lado, la hipótesis policlonal defiende el origen simultáneo de varias neoplasias debido a un "efecto de campo" por el cual cualquier zona del urotelio está expuesta a una transformación neoplásica en individuos de riesgo. La "lesión de campo" es un concepto introducido por primera vez por Slaughter en 1953 y explicaría el carácter sincrónico de tumores vesicales múltiples, los cuales evolucionarán de diferente forma según sus características citogenéticas concretas (Wolf y cols., 1982; Richie y cols., 1989; y Yao y cols., 1994).

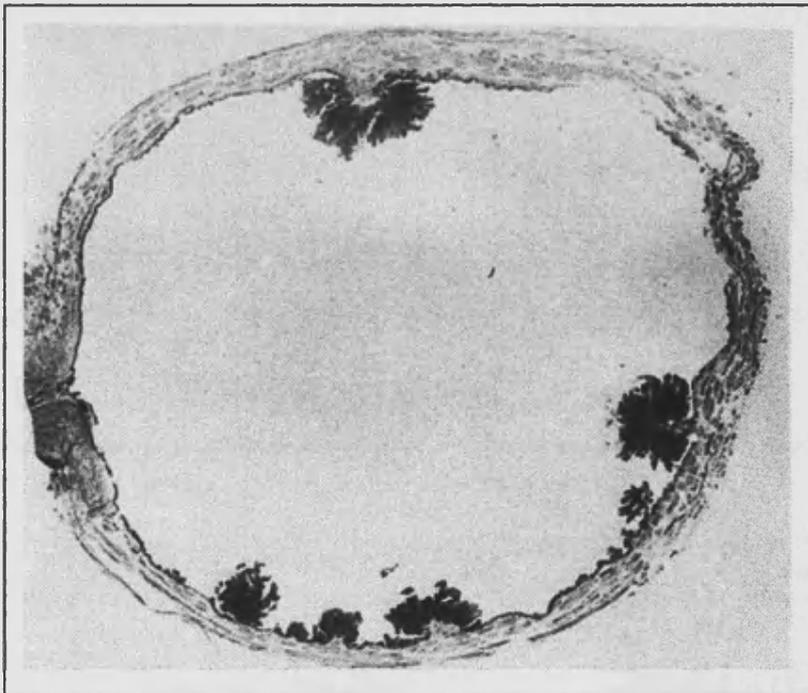


Figura 3.1. Imagen histológica del carácter multifocal de las neoplasias papilares uroteliales de vejiga

3.1.3.2. Citogenética

En los últimos tiempos se han desarrollado enormemente los estudios citogenéticos, tanto los estudios del cariotipo como otras técnicas más precisas en el estudio de anomalías genéticas implicadas en los diferentes procesos carcinogénicos. De esta forma, se ha podido comprobar que para las neoplasias vesicales a mayor grado histológico existe un mayor número de alteraciones cromosómicas.

Con técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH) y estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH) se ha observado que uno de los eventos más precoces es la presencia de deleciones en ambos brazos del *cromosoma 9* (*9p-* y *9q-*). De hecho, son las únicas alteraciones presentes en las neoplasias de bajo grado de malignidad y en ocasiones presentes también en neoplasias planas no invasivas: displasias uroteliales y carcinoma in situ (Cordón-Cardo y cols., 1998-1999). En concreto, la deleción 9p21-afecta al gen supresor **p16 (MTS1, INK4a)** el cual codifica la síntesis de una quinasa dependiente de ciclinas que regula en condiciones normales el ciclo celular. Esta deleción afecta también al gen **p15** relacionado con el anterior (Orlow y cols., 1995; Balazs y cols., 1997).

Un segundo paso en el proceso carcinogénico sería la deleción del brazo corto del *cromosoma 17* que incluye la zona del gen **p53**, cuya alteración favorece la expresión de una proteína anómala (p53) relacionada con la progresión tumoral en los carcinomas papilares y en el carcinoma in situ (Cordón-Cardo C, 1998).

Otras alteraciones cromosómicas afectan a los *cromosomas 1,5,7,11,12,14 y 15*, que van apareciendo progresivamente a mayor grado histológico y determinan una mayor agresividad biológica. Es de destacar la pérdida del *cromosoma Y* en estadios avanzados de la enfermedad y en relación con la mayor incidencia y mortalidad del carcinoma vesical en el varón (Sauter y cols., 1995).

Considerando estas alteraciones algunos autores abogan por un proceso carcinogénico en 2 pasos determinado por las deleciones de los *cromosomas 9 y 17*, mientras que el resto prefiere considerar un proceso múltiple de progresión lineal en varios pasos similar al complejo pólipo-carcinoma de las neoplasias de colon (Marchal-Escalona, 1996), donde se destaca al mismo tiempo el papel primordial del gen TP53 en el paso de TVS a TVP, y de displasia a CIS y a carcinoma invasor.

3.1.4. CLÍNICA

La presencia de una neoplasia vesical se sospechará inicialmente en todo paciente de edad media o avanzada (50-70 años) con hematuria y/o síntomas irritativos vesicales persistentes. La hematuria suele presentarse en el 90% de los casos y suele ser monosintomática, intermitente y caprichosa, y sin relación con el ejercicio.

La intensidad de la hematuria es variable y cuando ésta es franca se producen coágulos vesicales que pueden obstruir la vía excretora y provocar una retención aguda de la orina. (Murphy y cols., 1993; Grignon, 1997; Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

Un dato interesante es el hecho que los pacientes con carcinoma in situ presentan con mayor frecuencia síntomas irritativos y suelen ser tratados de cistitis intersticial o de infección urinaria, lo cual retrasa el diagnóstico durante un periodo de tiempo más o menos largo (Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

Otros síntomas estarían en relación con la obstrucción uni- o bilateral de los uréteres y con los órganos infiltrados en contigüidad por neoplasias invasivas o por la diseminación metastásica del proceso.

3.1.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

3.1.5.1. Cistoscopia y biopsia

La uretro-cistoscopia es una técnica que permite la visión directa de la mucosa vesical. Esta técnica ha de ser necesariamente prolija y describir todas las lesiones neoplásicas o sospechosas de malignidad (Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

Con esta técnica no sólo observamos las características macroscópicas de las neoplasias vesicales, las dimensiones exactas y el número de lesiones, sino que además permite: la resección completa o parcial de la lesión, la biopsia de lesiones sospechosas, biopsias randomizadas del resto de mucosa y el examen citológico de los lavados vesicales. Recordemos ahora que el carcinoma in situ (TIS/CIS) se puede presentar clínicamente como una zona plana eritematosa o como una zona de mucosa aparentemente normal.

En definitiva, la cistoscopia es considerada por la mayoría como la herramienta diagnóstica y terapéutica fundamental tanto en el diagnóstico inicial como en el seguimiento clínico-patológico de los pacientes. Estudios al respecto han demostrado que ninguna otra técnica puede reemplazar a la cistoscopia (Paez-Borda y cols., 1997).

Sin embargo, algunos autores afirman que la combinación de urografía intravenosa (UIV), ecografía (ECO), citología urinaria y otras pueden conseguir resultados equiparables y disminuir así el número de cistoscopias en el seguimiento (Morales-López y cols., 1989; McFarlane y cols., 1996; Paez-Borda y cols., 1997; Ozen, 1999). Las limitaciones de la cistoscopia resultan de ser una técnica invasiva y elevado coste económico, lo cual obliga a que en el estudio inicial del paciente con hematuria se utilicen técnicas más baratas y no invasivas (citología urinaria, biomarcadores, ecografía, etc.). De este modo, se define un grupo de pacientes de riesgo en los que sí estaría indicada la cistoscopia (Bane y cols., 1996).

3.1.5.2. Citología

Las técnicas citológicas se realizan en muestras de orina espontánea (de 24 horas o a mitad de la micción), lavados vesicales, muestras obtenidas por sonda vesical y en el cepillado directo de las lesiones (Koss, 1992). Para las neoplasias

vesicales de bajo grado la fiabilidad de la citología en términos de sensibilidad y especificidad es bastante baja (0-80% según las diferentes series), debido principalmente a que los grupos celulares sospechosos se han de diferenciar de elementos artefactuales, cambios inflamatorios, por litiasis, etc. Esta fiabilidad tan baja mejora con la aplicación de técnicas morfométricas, citométricas (citometría de flujo y estática), así como con el estudio de diferentes biomarcadores tumorales como la HCG, el Ag M344, la alfa-feto-proteína, etc. (Koss, 1992; Ozen y cols., 1999; Raab y cols., 2000).

Por lo que respecta a las neoplasias uroteliales de alto grado histológico (Gil-Salom y cols., 1990) y el carcinoma in situ la fiabilidad de la citología es bastante alta (Raab, 2000), y en este caso se puede considerar una herramienta fundamental en el seguimiento clínico de los pacientes.

3.1.5.3.Ecografía (ECO)

La rentabilidad de esta técnica inocua es muy alta, sobre todo vía abdominal. Será útil, por tanto, en el diagnóstico inicial previo a la cistoscopia, donde se identifican sobre todo lesiones de más de 1cm (Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

3.1.5.4.Urografía intravenosa (UIV)

Es importante en el diagnóstico inicial junto con la ECO y la citología ya que aporta información sobre la vía excretora superior, descartando la existencia de neoplasias sincrónicas en la pelvis renal, cálices y uréteres (Hatch y cols, 1986).

3.1.5.5.Exploración bimanual bajo anestesia (EBBA)

Esta técnica manual tan sencilla aporta datos a cerca de un estadio extravesical del tumor si se palpa alguna masa móvil en el interior de la pelvis con la vejiga vacía (Corral y cols., 1998).

3.1.5.6.Técnicas complementarias para el diagnóstico de extensión

- **Tomografía computerizada (TC):** Aporta datos útiles en tumores mayores de 2 cm y en relación con la extensión tumoral (adenopatías y/o metástasis).

- **Resonancia nuclear magnética (RNM):** En teoría es superior a la TC en el estadiaje de las neoplasias vesicales invasivas.
- **Gammagrafia ósea:** Tiene en general poco valor al tratarse de tumores que no suelen metastatizar en el hueso.

3.1.6. CONCEPTO Y TIPOS MORFOLÓGICOS

Por neoplasia vesical se entiende aquella lesión localizada en la vejiga urinaria que no responde normalmente a los mecanismos de defensa encargados de regular la reproducción, maduración y vida celular.

Según su naturaleza histogenética 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. Del resto de neoplasias no uroteliales (10-25%) en torno al 2-15% son carcinomas epidermoides, 2% adenocarcinomas, 4-6% carcinomas mixtos y 0,5% carcinomas pobremente diferenciados, carcinosarcomas, tumores carcinoides, etc. (Murphy, 1993).

Atendiendo a estos datos no es de extrañar que la mayoría de estudios sobre tumores vesicales se centren en las neoplasias uroteliales, con mucho las de mayor prevalencia.

Según Reuter (1999a) las neoplasias de células transicionales suponen alrededor de un 90-95% de los tumores malignos de vejiga y el 5-10% restante comprende al resto de tumores epiteliales y tumores mesenquimales. Además, la existencia de estos tipos histogenéticos "raros" podría deberse al hecho de que el epitelio transicional posee una naturaleza pluripotencial (Reuter, 1999a).

Eble y Young (1997) definen una serie de variantes infrecuentes de neoplasias uroteliales vesicales con implicaciones pronósticas o terapéuticas:

- 1- Neoplasias uroteliales con diferenciación escamosa o glandular focal (metaplasia), más resistente a la quimioterapia.
- 2- Carcinoma urotelial micropapilar, el cual muestra una citología de alto grado y elevada frecuencia de metástasis.
- 3- Carcinoma urotelial con rasgos de pseudobenignidad: patrón en nidos de von Brunn, patrón túbulo-alveolar, patrón microquístico similar a una cistitis quística y patrón invertido similar a un papiloma.
- 4- Carcinoma urotelial sarcomatoide o fusocelular, similar a un sarcoma aunque con expresión de citoqueratinas e identificación de áreas de carcinoma in situ o áreas de aspecto urotelial.

- 5- Carcinoma urotelial con diferenciación trofoblástica (HCG positivo), variante de pronóstico ominoso.
- 6- Carcinoma urotelial plasmocitoide, también positivo a citoqueratinas.
- 7- Carcinoma urotelial con reacción estromal atípica: de tipo pseudosarcomatoso, con metaplasia ósea o cartilaginosa, de células gigantes tipo osteoclastico, y con infiltrados linfoides prominentes.

Según la forma de crecimiento, las neoplasias vesicales se dividen en:

- Excrecentes o Papilares, con un crecimiento predominantemente exofítico.
- Lesiones Planas, de crecimiento lateral y en profundidad.

Algaba (1991) describe, a su vez, un patrón de crecimiento papilar, un patrón invertido y un patrón sólido.

Según la existencia o no de invasión (Pugh, 1973; Murphy, 1993; Cotran, 1999) existen:

- Neoplasias papilares limitadas a la mucosa (no invasivas).
- Neoplasias papilares con invasión de la lámina propia (en el eje de las papilas o en la base tumoral).
- Neoplasias papilares con invasión de la muscular propia (músculo detrusor).
- Neoplasias planas no invasivas (displasias y carcinoma in situ).
- Neoplasias planas invasivas.

Es conveniente señalar que algunos autores consideran otros tipos exofíticos macroscópicos distintos del patrón papilar (Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999) como es el patrón sesil, el patrón nodular o multinodular y los patrones mixtos, en general todos con un carácter infiltrante y de mal pronóstico.

3.1.7. CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA

3.1.7.1. ¿Cómo clasificar?

Las neoplasias vesicales constituyen un grupo heterogéneo de lesiones con una historia natural incierta aunque estrechamente relacionada con el grado histológico de diferenciación y con el nivel de infiltración de la pared vesical o estadio tumoral. Así pues, la clasificación clínico-patológica de las neoplasias vesicales se realiza sobre la base de 2 sistemas de clasificación distintos pero complementarios como son el **grado** y el **estadio**. Estos métodos han ido evolucionando en busca del sistema o combinación de sistemas mejor correlacionado con el curso evolutivo. Ambos están constituidos por categorías semicuantitativas definidas por el criterio subjetivo del patólogo. Ooms y cols. (1983a) describen que un mismo tumor puede ser gradado de forma distinta, por el mismo patólogo y en momentos distintos, en el 50% de los casos. Asimismo, Tosoni y cols. (2000) señalan la posibilidad de disminuir la variabilidad interobservador si son 2 los patólogos que emiten el diagnóstico.

Gradación: Sistema clasificatorio basado en el grado de diferenciación celular y arquitectural, y en el número de mitosis.

Estadificación: Sistema de clasificación que se fundamenta en una serie de datos clínicos e histológicos que definen el grado de extensión del proceso neoforativo (invasión de la pared vesical, número de ganglios afectos y existencia de metástasis).

3.1.7.2. Grado histológico

¿Por qué gradamos? Para responder a esta pregunta hemos de considerar de nuevo la existencia de lesiones continuas. Gradar un caso concreto consistirá, por tanto, en situarlo en una posición concreta dentro de una escala. Esas categorías pueden ser definidas mediante criterios cualitativos o cuantitativos que han de ser fáciles de comprender y de reproducir por cualquier patólogo medianamente experimentado.

Broders publicó en los años 20 los principios generales de gradación para las neoplasias basándose en el nivel de diferenciación de las mismas. Él definió 4 categorías o grados distintos: G1, G2, G3 y G4, según mostraran un 25, 50, 75 o 100% de componente epitelial indiferenciado. En 1922, describió además el valor pronóstico de este sistema en relación con las neoplasias vesicales (*Broders*, 1922), a las cuales se refería entonces como epiteliomas de los órganos genitourinarios, considerando que el grado 4 (G4) poseía menor tasa de supervivencia que el resto de grados (G1-G2-G3), los cuales mostraban todos una tasa de supervivencia similar.

Hasta el siguiente sistema de gradación nos trasladamos al año 1950 con *Frankson's* (1950), el cual significa el inicio de la tradición escandinava. Su sistema constaba de 7 grupos, considerando a las lesiones papilares como cancerosas sólo si se identifican áreas claras de invasión. Se trataba de un sistema de baja especificidad y con excesivo número de grupos (*Busch*, 1998).

Aparecieron otros sistemas de clasificación por grados: *Dean* 1954, *Marshall y Mostofi* en 1956, *Dukes, Broders y Pugh* en 1959..., aunque todos ellos mostraron gran controversia en cuanto a los criterios utilizados en la definición de los grupos.

La tradición escandinava continúa en 1965 con *Bergkvist y cols.*, los cuales se basan en criterios arquitecturales y sobre todo celulares para la definición de los grupos, de forma que diferenciaban los papilomas (Grado 0) de los carcinomas papilares (Grados 1-4).

Esposti y Zajicek (1972) sugieren una subdivisión dentro del grado 2 a consecuencia de la buena evolución de un 30% pacientes (G2a) frente a otro grupo de tumores que malignizan (G2b). Este sistema clasificatorio (*Sistema de Bergkvist Modificado*) se elaboró a partir de estudios citológicos de orina, y no tuvo correlato histológico hasta 1987 con *Malmström y cols.*

En 1973, la Organización Mundial de la Salud (OMS) decide un sistema de gradación semejante al sistema de *Broders* basado en el grado de anaplasia celular. El sistema propuesto era sencillo y fácil de reproducir al contar tan sólo con 3 categorías o grados (G1-G2-G3), que mostraron buena correlación con la tasa de supervivencia (*Mostofi y cols*, 1973.).

Pauwels y cols. (1988) en un estudio prospectivo demostraron que entre los grados 2a y 2b del sistema de *Berkvist* modificado existían diferencias en la tasa de

recurrencia y progresión, y además sugieren unir los grupos G2a-G1, y los grupos G2b- G3 en sólo 2 categorías al tener una evolución clínica semejante.

Carbin y cols. (1991a y b); señalan que el sistema de la OMS (1973) es fácil de aplicar y de reproducir, sin embargo, consideran que se pierde información útil sobre el pronóstico. Ellos proponen un nuevo sistema obtenido a partir del sistema de Berkvist modificado en el cual se unirían los grupos G1 y G2a en una misma categoría (A), y los grupos G2b y G3 en otra categoría distinta (B) de acuerdo con Pauwels, añadiendo además un grupo (C) para el G3.

En 1994, se introducen las técnicas cuantitativas (Morfometría) para una definición más objetiva de los grupos. Estos métodos se basan en el *análisis de la imagen histológica*. Los parámetros analizados fueron sobre todo objetos individuales (morfometría nuclear) y de relación con objetos vecinos (morfometría contextual). A partir de estos datos se crearon 2 categorías o clases definidas como: **imágenes de bajo grado** que mostraban una impresión general de orden arquitectural y discreta atipia nuclear (G1), e **imágenes de alto grado** (G3) donde predomina el desorden arquitectural y la atipia nuclear. Entre esos grupos se define un tercer grupo intermedio (G2), constituido a su vez por un grupo G2a desplazado hacia G1 y un grupo G2b desplazado hacia G3 (*Jarkrans y cols.*, 1995). Este sistema consta por tanto de 4 grados distribuidos en 2 categorías (bajo y alto grado) con valor pronóstico. Los criterios subjetivos se extrapolaron a partir de los grupos cuantitativos, resultando grupos semejantes a los del sistema de Berkvist modificado.

Ese mismo año *Choi y cols.* publican otro estudio de morfometría textural (textura de la cromatina) y en 1997 describen una serie de factores morfométricos individuales y texturales. De esos estudios se obtuvieron datos similares a los de Jarkrans y se compararon según modelos de análisis multivariable.

La conclusión que se obtiene de todos estos estudios cuantitativos es la consecución de una gran objetividad en el establecimiento de las distintas categorías o grupos a partir de la morfología. Estos estudios sirvieron para la elaboración de la clasificación de consenso de la OMS/ISUP (*Epstein y cols.*, 1998) que se introdujo con posterioridad en el año 1999 (*Mostofi y cols.*, 1999):

- Urotelio normal
- Hiperplasia urotelial (sin atipias): plana y papilar.

- Lesiones planas con atipias: Atipia urotelial reactiva, Displasia urotelial (neoplasia urotelial de bajo grado) y Carcinoma in situ (neoplasia urotelial de alto grado).
- Neoplasias papilares: PAPILOMAS, PAPILOMA INVERTIDO, NEOPLASIAS DE BAJO POTENCIAL MALIGNO, CARCINOMAS DE BAJO GRADO (WHO grado 1), CARCINOMAS DE ALTO GRADO (WHO grados 2 y 3).

Recientemente ha habido una nueva propuesta de clasificación por grados con un **Sistema de gradación en 2 números** similar a los grados de Gleason en la próstata (Cheng y Bostwick, 2000a). Este sistema se basa en la gran heterogeneidad de los tumores vesicales y asigna un grado primario predominante y un grado secundario no predominante que se corresponde con el área tumoral más atípica, con la condición de que este último suponga al menos un 5% del tumor. En ambos casos se asignan 3 valores para cada grado: BPM=1. BG=2. NAG=3, quedando definidos así 5 grupos pronósticos resultado de sumar ambos grados. Estos mismos autores creen incorrecto el término de neoplasias de bajo potencial maligno y proponen incluso su eliminación.

TABLA 3.1. Neoplasias uroteliales papilares de vejiga (evolución histórica del grado histológico)

	PAPILOMA		CARCINOMA			
Broders, 1922			G1	G2	G3	G4
Berkvist, 1965	G0	G1		G2	G3	G4
Esposti, 1972*	G0		G1	G2a	G2b	G3
Malmström, 1987 (Berkvist modificada)*	G0		G1	G2a	G2b	G3
WHO, 1973	G0		G1	G2		G3
Pauwels, 1988	G0		G1- G2a	G2b - G3a		G3b
			[G1]	[G2]		[G3]
Carbin, 1991	G0		A	B		C
Choi / Jarkrans, 1994 (morfometría)	G0		G1-G2a	G2b		G3
			[BG]	[NAG]		
WHO / ISUP, 1998-9 (Consenso)	PAPILOMA		G1a	G1b	G2	G3
			[BPM]-[BG]		[NAG]	
Cheng, 2000	PAPILOMA		1	2		3

BPM: Bajo potencial maligno / BG: Bajo grado / NAG: Alto grado

En definitiva se puede concluir que una característica básica de las neoplasias vesicales es su GRAN HETEROGENEIDAD. De hecho, es habitual encontrar en el seno del tumor clones celulares más indiferenciados que marcan la historia natural del proceso, al igual que es posible encontrar clones bien diferenciados en tumores de alto grado histológico (Colpaert y cols., 1987).

3.1.7.3. Estadío tumoral

Este sistema es, según la mayoría de autores, el de mayor valor pronóstico, sobre todo en el caso de neoplasias vesicales invasivas (Collan y cols., 1979; Kern, 1984; Blomjous y cols., 1989; Hendry y cols., 1990; Greven y cols., 1990; Lipponen y cols., 1991; Angulo y cols., 1993). Sin embargo, otros autores afirman que en los tumores limitados a la mucosa y en muestras de material insuficiente el grado histológico tiene más valor (Kern, 1984; Jordan y cols., 1987; Hendry y cols., 1990; Carbin y cols., 1991b; Angulo y cols., 1993).

Jewett y Strong (1946-1952) demostraron la relación existente entre el nivel de infiltración de la pared vesical y la supervivencia. Estos trabajos fueron la base para la creación del primer sistema de clasificación por estadíos (*Marshall, 1952*), el cual se define mediante las siglas A, B, C y D:

Estadio O: Lesión limitada a la mucosa; Estadio A: Invasión de la lámina propia; Estadio B: Invasión de la capa muscular (B1, mitad interna y B2, mitad externa); Estadio C: Infiltración perivesical; Estadio D1: Invasión de órganos adyacentes o de ganglios regionales y Estadio D2: Metástasis a distancia.

La primera clasificación TNM para las neoplasias vesicales se publicó en 1968 y fue aceptada de forma generalizada en 1974 (*UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer, 1974*). Posteriormente, la clasificación UICC fue revisada en 1978, 1982, y finalmente en 1987, donde se crea una gran controversia por los cambios introducidos y aparecen nuevas propuestas como la de *Angulo y cols. (1993)* y la modificación del *Comité Americano de Unión Contra el Cáncer (AJCC) y la UICC (1992)*. Ésta última distingue entre una clasificación clínica (TNM) y otra patológica (pTNM):

pTIS: Carcinoma in situ (CIS), pT0: Ausencia de tumor, pTa: Limitado a la mucosa, pT1: Invasión de la lámina propia, pT2: Invasión de la mitad superficial de la muscular propia, pT3a: Ídem de la mitad profunda, pT3b: Invasión del tejido

perivesical, pT4: Órganos contiguos, N(1-3): Afectación ganglionar y M(0-1): Ausencia o presencia de metástasis.

Angulo y cols. (1993) proponen una clasificación similar aunque con mayor homogeneidad en la nomenclatura de los grupos (los grupos T2 y T3a se pasaron a denominar IIA y IIB) (*Johansson, 1998*).

Simultáneamente se introducen los conceptos de tumor vesical superficial (TVS) y profundo (TVP) (*Glasham y cols., 1982*). El grupo de TVS incluye los estadios Ta, T1 y CIS; mientras que los TVP incluyen los demás estadios a partir de la invasión de la muscular propia (T2). En un primer momento, Jewett y Marshall consideraron TVS también a los tumores con infiltración superficial de la muscular (B1), aunque con posterioridad fueron rechazados ya que su estudio incluía autopsias y casos sin una adecuada correlación clínico-patológica.

El grupo concreto de carcinomas vesicales con invasión de la lámina propia (pT1) ha sido uno de los más estudiados debido principalmente a su evolución clínica impredecible. De hecho, en torno a un 30% de estos pacientes pueden evolucionar a TVP (*Cheng y cols., 1999a*). Éste es el motivo fundamental por el que han surgido propuestas en relación con el nivel de invasión de la lámina propia. En este sentido, hay autores que consideran 2 ó 3 subestadios: T1a-T1b-(T1c), según la invasión se produzca por encima o por debajo de la muscularis mucosae (*Simon y cols., 1986; Pagano y cols., 1987; Younes y cols., 1990; Hasui y cols., 1994; Angulo y cols., 1995; Platz y cols., 1996; Hermann y cols., 1998*).

Jiménez y cols. (2000) consideran a estos tumores pT1 según la invasión tenga lugar en el estroma conectivo del eje de las papilas o en la base de implantación del tumor. *Cheng y cols (1999a)* proponen, incluso, la medición exacta del nivel de invasión mediante un Micrómetro, de manera que un nivel de invasión mayor o menor de 1.5 mm tendrá valor pronóstico.

En realidad, todas éstas subdivisiones se traducen en un peor curso evolutivo a mayor nivel de infiltración de la pared vesical.

En la **Clasificación de consenso de la OMS/ISUP (1998)** se hacen varias recomendaciones respecto de la estadificación: Primero se aconseja el abandono definitivo del término "tumores vesicales superficiales" (TVS), al incluir éste 3 categorías con cursos evolutivos muy distintos (Ta, T1 y TIS). Segundo, se definen

criterios estrictos de invasión de la lámina propia y se aconseja al patólogo especificar en los informes si ésta es focal o difusa. Tercero, se discute la dificultad diagnóstica planteada entre la invasión de la muscular propia o de la muscularis mucosae, sobre todo si ésta última está hipertrofiada, recomendando al patólogo solicitar en el informe anatómo-patológico una nueva RTU para reestadaje. Y, cuarto, se recomienda también que el nivel concreto de invasión de la muscular propia se ha de señalar sólo en piezas de cistectomía y no en muestras de resección transuretral.

Cheng y cols. (2000b) confirman la tendencia del patólogo a la subestadificación o estadificación a la baja en un elevado porcentaje de casos, sobre todo en relación con la invasión de la lámina propia.

3.1.8. FACTORES PRONÓSTICOS

3.1.8.1. Grado y estadio

Como acabamos de ver la mayoría de estudios consideran estos dos sistemas como los factores con mayor valor pronóstico. De hecho, la mayoría de autores los utilizan en sus series como grupos de referencia, valorando el resto de parámetros en función de las categorías definidas mediante el grado y el estadio.

3.1.8.2. "Status papilar"

De todos los tipos histogenéticos de neoplasias de vía urinaria los tumores uroteliales son los de mejor pronóstico, y dentro de éstos los tumores papilares evolucionan mejor que los no papilares (Vera-Donoso y Jiménez-Cruz, 1999).

3.1.8.3. Tamaño tumoral

Numerosos estudios han demostrado que tumores de gran tamaño suelen recidivar y progresar con mayor frecuencia (Heney y cols., 1983; Kurth y cols., 1995; Allard y cols., 1995 y 1998; Zieger y cols., 1998; Vera Donoso, y Jiménez-Cruz, 1999; Páez-Borda y cols., 1999; Millán-Rodríguez y cols., 2000a); aunque en otros se describe como un factor dependiente de la multiplicidad tumoral (Prout y cols., 1992). En cada estudio varió, no obstante, el grupo de tumores estudiados y el tamaño tumoral considerado (2, 3 ó 5 cm).

Otros prefieren cuantificar el peso tumoral, como es el caso de Fitzpatrick y cols. (1986a) los cuales refieren un peor curso evolutivo en tumores de más de 10 gr; e incluso el diámetro del Pedículo Tumoral (Zaragozá, 1995 y Blasco, 1996), señalando que una base ancha se asocia con un peor curso evolutivo.

3.1.8.4. Número de tumores

La multiplicidad tumoral se asocia íntimamente a una mayor tasa de recurrencia y progresión tumoral, superando al tamaño y a diferentes marcadores biológicos en poder predictivo (Fitzpatrick y cols., 1986a; Parmar y cols., 1989; Prout

y cols., 1992; Reading y cols., 1995; Hölmang y cols., 1999; Páez-Borda y cols., 1999; Millán-Rodríguez y cols., 2000a; etc.).

Son escasos los estudios que concluyen que la multiplicidad carezca de valor pronóstico (Zaragozá, 1995). Sin embargo, son más frecuentes los estudios que demuestran que la multiplicidad no es un factor pronóstico independiente en pruebas de análisis multivariable (Prout y cols., 1992; Blasco, 1996; Zieger y cols., 1998; Hölmang y cols., 1999).

Boccafoschi y cols. (1992) estudian 27 pacientes con TVS (pTa y pT1), y demuestran que en 24 casos se puede predecir el número de recurrencias según el grado, el "status" papilar y la multiplicidad.

3.1.8.5. Localización tumoral

Los tumores localizados en el cuello y en la cúpula vesical tienen peor curso evolutivo y un mayor grado histológico, mientras que los tumores situados en torno a los orificios de desembocadura de los uréteres y en las paredes laterales suelen ser de bajo grado y por tanto de mejor pronóstico (Stephenson y cols., 1990).

3.1.8.6. Estado de la mucosa en vecindad

La coexistencia de displasias y/o carcinoma in situ (CIS) con tumores vesicales papilares se asocia a una mayor tasa de recurrencia y progresión tumoral, sobre todo en el caso del CIS. (Murphy y cols., 1993; Kiemeney y cols., 1993; Grignon, 1997).

3.1.8.7. Edad

En pacientes menores de 40 años las neoplasias vesicales suelen ser tumores de bajo grado y no invasivos (Fitzpatrick y Reda, 1986b). Asimismo, diversos estudios demuestran peor curso evolutivo para edades avanzadas, ya que se trata con frecuencia de tumores múltiples, de alto grado histológico, e invasivos (Páez-Borda y cols., 1997).

3.1.8.8.Sexo

Las neoplasias vesicales no sólo muestran mayor incidencia en el hombre, sino que además recidivan y progresan con más frecuencia. No obstante, en estudios de análisis multivariable la relevancia de este dato queda reducida (Grignon, 1997).

3.1.8.9.Diagnóstico previo de tumor vesical

El haber sido diagnosticado previamente de una neoplasia vesical aumenta el riesgo de una nueva recidiva (Hölmang y cols., 1999).

3.1.8.10.Forma de crecimiento (margen tumoral)

El crecimiento tumoral expansivo con una importante respuesta inflamatoria linfocitaria tiene en general mejor pronóstico (Sarma, 1970).

3.1.8.11.Invasión vascular

La embolización de linfáticos y de vasos sanguíneos se asocia a mal pronóstico en neoplasias infiltrantes (Murphy y cols., 1993; Grignon, 1997). No obstante, la correcta identificación de imágenes histológicas de embolización es difícil y exige la realización de técnicas inmunohistoquímicas con marcadores endoteliales específicos (Ramani y cols., 1991).

3.1.8.12.Antígenos de grupo sanguíneo (ABO)

La pérdida de expresión normal de estos antígenos por parte de las células tumorales se asocia a un mayor grado histológico y al riesgo de progresión en neoplasias no invasivas (Orlow y cols., 1998). Las limitaciones de estos marcadores se deben, en general, a la pérdida de expresión o expresión heterogénea en lesiones de carácter inflamatorio, lo cual dificulta su interpretación (Grignon, 1997).

3.1.8.13.Proliferación celular

El índice proliferativo tumoral se puede determinar con técnicas histológicas convencionales (contaje directo del número de mitosis), morfometría, citometría, técnicas inmunohistoquímicas (Ki-67 y PCNA), etc.

Este apartado se desarrollará con posterioridad. Ver apartado 3.3.2.

3.1.8.14.Ploidía (contenido de DNA)

Este apartado se desarrollará ampliamente con posterioridad. Ver apartado 3.2.2.3.

3.1.8.15.Morfometría

Este apartado se desarrollará con posterioridad. Ver apartado 3.2.2.2.

3.1.8.16.Otros antígenos

Diferentes antígenos detectados inmunohistoquímicamente han demostrado valor pronóstico, sobre todo en los tumores vesicales superficiales. Entre todos ellos destacan: Ag M344, Ag T138 y Ag M19A211 (Allard y cols., 1995), Ag 34βE12 o citoqueratina basal, EMA, CEA y otras citoqueratinas como el Ag LP34 (Sánchez MC, 1992) y la CK20 (Harnden y cols., 1999). También se ha estudiado la pérdida de expresión de la glicoproteína CD44 en relación con el número de recurrencias, encontrando asociación estadística (Toma y cols., 1999).

El Ag 34βE12 o citoqueratina basal (CK-basal) se comentará con detalle posteriormente. Ver apartado 3.3.6.

3.1.8.17.Genes implicados en la apoptosis

Este apartado se desarrollará posteriormente. Ver apartado 3.3.4.

3.1.8.18.Oncogenes tumorales

Este apartado se desarrollará posteriormente. Ver apartado 3.3.5.

3.1.8.19.Genes supresores tumorales

El más estudiado es sin duda el gen TP53. Aunque, los resultados son muchas veces contradictorios en cuanto a su significado como marcador biológico. *Este apartado se discutirá posteriormente. Ver apartado 3.3.3.*

Otro marcador pronóstico en la pérdida del gen supresor Rb (retinoblastoma). Con este marcador existe también controversia. Su correlación inmunohistoquímica es la pérdida de expresión de la proteína Rb en los carcinomas vesicales de alto grado, añadido a la sobreexpresión de p53 (Cordón-Cardo y cols., 1997a-b y 1998).

3.1.9. MANEJO CLÍNICO (HISTORIA NATURAL)

3.1.9.1. Actitud terapéutica

- De lo general...

Para facilitar el manejo clínico de los pacientes con neoplasias vesicales, éstas se dividieron conceptualmente en tumores vesicales superficiales (TVS) y tumores vesicales profundos (TVP). El 75-80% de las neoplasias vesicales uroteliales son TVS: tumores no infiltrantes (Ta y CIS), y tumores con invasión de la lámina propia (T1). El tratamiento de estos TVS consiste en una resección endoscópica transuretral (RTU) y seguimiento endoscópico cada 3-6 meses y luego más espaciado. Junto a la RTU se suelen practicar biopsias randomizadas del resto de la mucosa (recordemos que las displasias y el CIS pueden desarrollarse sobre una mucosa sin lesiones macroscópicas).

Además, un 50-70% de los pacientes con TVS tienen al menos una recidiva en los 3 primeros años, por lo que se suele asociar un tratamiento adyuvante intravesical (TAI) con: quimioterapia (Mitomicina C ·MM-C·, Doxorrubicina, Thiotepa, etc.) o inmunoterapia (Bacilo de Calmette-Guerin atenuado ·BCG·, Interferón, etc.).

Muchos autores han demostrado el valor de este tratamiento adyuvante en la disminución de la tasa de recurrencias aunque sin influir en general en la progresión a TVP, lo cual sucede en un 10-30% de los casos (Wilson y cols., 1994; Bostwick, 1992, Murphy 1993). Existen datos que hablan de progresión de hasta un 44% de tumores pTa (Pyrah y cols., 1964) y 50% de tumores pT1 (England y cols., 1981).

Por otro lado, el tratamiento de los TVP es la cistectomía (radical o simple), la radioterapia, o una combinación de ambas estrategias terapéuticas. La supervivencia media de los pacientes es aproximadamente de un 50% a los 5 años, la cual disminuye si se desarrolla enfermedad metastásica. En casos seleccionados se ha probado la combinación de radio y quimioterapia en lugar de cirugía radical, o bien quimioterapia preoperatoria para la profilaxis de micrometástasis (Wilson y cols., 1994).

Controversia TVS: *¿qué tumores progresan? ¿qué tumores tienen mayor tasa de recurrencia y un ILE más corto? ¿qué tumores responden al TAI?*

Controversia TVP: ¿qué tumores no metastatizan para poder llevar a cabo tratamientos conservadores? ¿qué tumores responden a la quimioterapia?

- **...a lo particular. Grupos de riesgo.**

Actualmente la tendencia es hacia un **tratamiento individualizado** del paciente dentro de una serie de **grupos poblacionales de riesgo** específicos.

Considerando esto último, el primer grupo de riesgo que se consideró fue el del TIS o CIS, ya que un 20-75% de los mismos pueden progresar (Farrow y cols., 1976; Lamm, 1992; Bostwick, 1992; Petrovich y cols., 1998).

Wolf y cols. (1994) publican un estudio a cerca de la historia natural del CIS no tratado y concluyen que un 52% progresan. De hecho, en la actualidad el CIS es considerado una **lesión precursora** de carcinoma invasor, mostrando una excelente respuesta con BCG.

Otros estudios distinguen un CIS primario de un CIS secundario, asociado este último a un tumor papilar. Algunos consideran al CIS primario de peor pronóstico (Petrovich y cols., 1998); sin embargo otras series no confirman este punto. Petrovich y cols. (1998) resaltan la importancia de un seguimiento prolongado y afirman que un 70% de TVS presentarán recurrencias y un 22% progresarán o morirán de cáncer si se sigue a los pacientes durante al menos 20 años.

Una de las aportaciones más importantes en las neoplasias vesicales papilares fue la definición de grupos clínicos de riesgo (Parmar y cols., 1989) basados en el número de tumores y el intervalo libre de enfermedad (ILE):

- Grupo 1 de Parmar, tumor único con ILE >3 meses.
- Grupo 2 de Parmar, tumor único con ILE <3 meses o tumores múltiples con ILE >3 meses.
- Grupo 3 de Parmar, tumores múltiples con ILE <3 meses.

En un estudio posterior el riesgo de recurrencia y de progresión en estos grupos resultó ser bajo, moderado y alto respectivamente (Reading y cols., 1995); excluido, eso sí, el grupo de tumores G3T1. Sin embargo, Arrizabalaga-Moreno y cols. (1997) no encontraron beneficio alguno en la aplicación de estos criterios.

El valor pronóstico de una primera recidiva precoz o intervalo libre de enfermedad (ILE) corto, y la multiplicidad tumoral ha sido contrastado por diversos autores (Fitzpatrick y Reda, 1986; Prout GR y cols., 1992; Leblanc y cols., 1999; Hölmang y cols., 1999 y Millán-Rodríguez y cols., 2000a). En concreto, Fitzpatrick y Reda (1986) afirman que si el periodo libre de recurrencias tumorales es >5 años la probabilidad de no recidivar es del 92%, y la ausencia de tumor en el primer control cistoscópico (3 meses) asegura un curso evolutivo sin recidivas en el 80%.

Muchos autores defienden por tanto la necesidad de un seguimiento clínico prolongado. Así, Leblanc y cols. (1999) informan de una elevada incidencia de recidivas tardías y un riesgo bajo pero permanente de progresión con un seguimiento superior a 5 años. En ese sentido, Hölmang y cols. (1995) demuestran que pacientes seguidos durante 20 años y con 10 ó más recurrencias están en riesgo de desarrollar metástasis pese a un diagnóstico inicial de TVS.

Otros estudios demuestran mayor correlación pronóstica en la existencia de invasión de la lámina propia frente al tamaño tumoral, la multiplicidad o el grado histológico (Zieger y cols., 1998). Sin embargo, Allard y cols. (1998) defienden el valor pronóstico de la multiplicidad, un tamaño >3 cm y del grado (G2 y G3), junto con la invasión de la lámina propia. Así mismo, Millán-Rodríguez y cols. (2000) definen en los TVS un grupo con riesgo de recurrencia en función de la multiplicidad tumoral, un tamaño >3 cm, presencia de CIS y ausencia de respuesta al tratamiento con BCG, mientras que el grupo de riesgo de progresión será para los tumores G3, múltiples, mayores de 3 cm y con CIS asociado.

Recientemente, la clasificación consensuada de la OMS/ISUP (1998) ha introducido dentro del grupo de neoplasias de Bajo Grado (NBG) el subgrupo de neoplasias uroteliales de Bajo Potencial Maligno (BPM) y el de carcinomas de Bajo Grado (BG). Hölmang y cols. (1999) informan de un 35% de recurrencias en el grupo de BPM frente a un 71% en el grupo de BG, señalando, además, que los primeros no progresan por un 2.4% de los tumores de BG que sí lo hacen. Asimismo, Cheng y cols. (1999b) realizan un seguimiento prolongado (10-14 años) de estos 2 grupos y observan que las neoplasias de BPM presentan un riesgo moderado de recurrencia y un riesgo bajo pero real de progresión tumoral, poniendo en entredicho el concepto de bajo potencial maligno en favor de considerar a estas lesiones como verdaderos

carcinomas. Murphy y cols. (1999) responden que este grupo de neoplasias de BPM supone: en primer lugar, un gran beneficio para el paciente al eliminar el término "cáncer" de su historial y abordarlos como un grupo con mayor riesgo a desarrollar cáncer de vejiga que la población normal y, en segundo lugar, una gran ventaja en cuanto al seguimiento clínico, al permitir espaciar las cistoscopias y aplicar un tratamiento menos agresivo que en el grupo de carcinomas de BG.

En ese mismo sentido, se ha comentado la frecuente asociación de los papilomas con neoplasias vesicales de bajo grado y su tendencia, aunque mínima, a la recurrencia tumoral (Epstein y cols., 1998; y Cheng y cols., 1999c).

En la actualidad, la tendencia es hacia la definición de grupos de riesgo sobre la base de parámetros moleculares e inmunohistoquímicos, aunque existen aún defensores de los parámetros clásicos clínico-patológicos frente a los moleculares e inmunohistoquímicos (van der Poel y cols. 1999).

Recientemente, Millán-Rodríguez y cols. (2000b) proponen 3 grupos de riesgo en relación con la tasa de progresión, mortalidad y recurrencia:

- 1- Riesgo bajo: Tumores G1/Ta y tumores únicos G1/T1.
- 2- Riesgo intermedio: Tumores múltiples G1/T1, tumores G2/Ta y tumores únicos G2/T1
- 3- Riesgo elevado: tumores múltiples G2/T1, tumores G3/Ta-T1 y cualquiera asociado a CIS.

3.1.9.2. Seguimiento de los tumores vesicales superficiales (TVS)

La mayoría de estudios demuestran la eficacia en la instilación intravesical de BCG en el tratamiento inicial del CIS, sin embargo en el grupo de TVS papilares la profilaxis de las recidivas con tratamiento adyuvante tras la RTU presenta una gran controversia. Esta terapia adyuvante intravesical (TAI) disminuye en general el número de recurrencias aunque sin influencia sobre la progresión tumoral (Sánchez de la Muela y cols., 1989; Bouffieux y cols., 1995; Krege y cols., 1996; Malmström, 1999). Dentro del grupo de TVS se decide además la estratificación de los tumores por grado y estadio. Algunos autores concluyen que el grupo Ta/G1,2 no se beneficia del TAI (Kurth y cols., 1996-7; Otto y cols., 1999), mientras el resto opta en este grupo de

neoplasias de bajo grado por una instilación única con MM-C (Solsona y cols., 1999) o indistinta con MMC o BCG (Smith Jr y cols., 1999).

Malmström y cols. (1999) en una revisión actualizada concluyen que la mayoría de estudios muestran disminución de la tasa de recurrencia (sin influir en la progresión) en TVS tratados con BCG, aunque con mayor número de efectos secundarios. Bohle y Durek (1999) apuntan, en este sentido, la necesidad de establecer indicadores objetivos de estos efectos indeseables.

Por lo que respecta a la inmunoterapia con Interferón hay autores que lo definen como un fármaco de segunda línea del TAI si falla la BCG o con efecto sinérgico añadido (Beldegrun y cols., 1998), mientras que Schnitz-Drager y Muller (1998) concluyen que es necesario continuar investigando este tipo de tratamiento.

También se ha descrito el posible beneficio de una segunda RTU para los carcinomas en los que exista invasión de la lámina propia y también para neoplasias múltiples no invasivas. Esta segunda resección se realizaría a las 2-6 semanas de la primera (Herr, 1999).

¿Están indicadas las biopsias randomizadas en las cistoscopias de seguimiento? En respuesta a esta pregunta la mayoría de estudios consideran preferible una cistoscopia para identificar lesiones planas (displasias y CIS), sin embargo hay quien señala que no son necesarias debido a que sólo un 1-3% de los TVS de bajo riesgo y un 3-7% de los TVS de alto riesgo se acompañan de CIS, además la citología urinaria ha demostrado en estos casos una gran sensibilidad y especificidad en el diagnóstico (van der Meijden y cols., 1999).

3.1.9.3. Problemática actual y perspectivas futuras

Uno de los pocos aspectos en que coincide la mayoría de autores es que la historia natural de las neoplasias vesicales es difícil de determinar. Ésto se debe a una serie de factores condicionantes:

- Las neoplasias vesicales son con frecuencia lesiones multifocales, con capacidad de diseminación e implantación, sin estar claramente definidos sus mecanismos etiopatogénicos concretos.

- El comportamiento de una neoplasia vesical depende probablemente del clon celular más atípico, el cual, aunque mínimo, puede determinar su comportamiento biológico.
- Con frecuencia el material resecado no es procesado en su totalidad y por tanto grado y estadio pueden no estar correctamente asignados (Cheng y cols., 2000). Sería recomendable, en estos casos, procesar todo el material, si es posible (Ukai y cols., 2000).
- Las neoplasias vesicales entendidas como una lesión continua presentan dificultades en la asignación de aquellos casos situados entre dos grupos consecutivos.
- Los 2 factores pronósticos más fácilmente reproducibles son el grado y el estadio, los cuales estarán sujetos a la subjetividad del observador y a las limitaciones en la técnica histológica.
- Múltiples factores clínicos, histológicos, inmunohistoquímicos, morfométricos, citométricos y moleculares han demostrado valor pronóstico aunque sin estar totalmente definida su importancia relativa en el curso de la enfermedad y en la definición de grupos de riesgo.
- El curso evolutivo indolente de las neoplasias de bajo grado (BPM y BG) obliga a un seguimiento prolongado de estos pacientes.

La evolución clínica, muchas veces impredecible, de los tumores vesicales obliga también a un abordaje terapéutico heterogéneo con diversos niveles de respuesta al tratamiento.

Un paso importante en la solución al problema es la homogeneización de los grupos llevada a cabo en la clasificación de consenso de la OMS/ISUP (1998). Desde este nuevo sistema han de homogeneizarse también los resultados y la respuesta al tratamiento con seguimientos clínicos prolongados.

Las perspectivas futuras según Petrovich y cols. (1998) serían:

- Una mejor comprensión de la historia natural de la enfermedad.
- Determinación del valor pronóstico del inmunofenotipo tumoral.

- Desarrollo de técnicas diagnósticas en la detección precoz de recidivas y en el estudio de extensión del cáncer.
- Mejora en el tratamiento del TIS/CIS.
- Avance en las técnicas quirúrgicas para mejorar la cantidad y calidad de vida.
- Uso amplio y seguro de la terapia adyuvante intravesical junto con la quimioterapia y la radioterapia.

A las cuales Reuter (1999b) añade:

- Necesidad de estandarización en los criterios de selección y en la terminología.
- Estudio comparativo entre las nuevas técnicas y los factores clínico-patológicos clásicos.
- Realización de estudios de carácter prospectivo.
- Análisis multivariable de todos los factores con valor pronóstico en los estudios univariantes.

3.2. MICROSCOPIA CUANTITATIVA

3.2.1. APLICACIONES EN PATOLOGÍA

3.2.1.1. Generalidades

Antes de la era microscópica se puso de manifiesto la urgente necesidad de evaluar objetivamente y de cuantificar en Anatomía Patológica. Antaño fue una práctica común en macropatología comparar los tamaños de las lesiones con los tamaños de alubias, arroz, manzanas y otros frutos. Este sistema comparativo de cuantificación fue reemplazado por el sistema métrico, el cual era mucho más objetivo, reproducible e independiente de condicionantes externos como es la variación en el tamaño de los frutos según las distintas áreas geográficas.

Con la introducción del microscopio se abre ante los ojos del patólogo un gran abanico de formas y tamaños. En principio, se valoró subjetivamente lo alejado que parecía un tejido neoplásico con respecto al tejido original del que procede. Así nacen los sistemas de clasificación neoplásica (Broders, 1920 y 1925) y con ello la urgente necesidad de cuantificar de forma objetiva los cambios celulares y arquitecturales (Mariuzzi y Collan, 1995).

Con el tiempo se han ido introduciendo distintos aparatos de medida que, acoplados al microscopio, sirven de ayuda al patólogo en sus decisiones diagnósticas; sistemas de medida que complementan pero NUNCA reemplazan al cerebro humano en la toma de decisiones (Tosi y Cottier, 1989).

Al desarrollo de las técnicas cuantitativas contribuye de forma decisiva el descubrimiento de Feulgen en 1924, al describir un reactivo cromogénico que reaccionaba específicamente con el ADN nuclear, lo cual posibilita no sólo el estudio morfométrico nuclear, sino también del contenido de ADN (ploidía) en base de las propiedades de absorción nuclear del reactivo.

En 1936, Casperson sienta las bases de la Histocitomorfofometría y afirma que "el paso de una ciencia de la infancia a una ciencia adulta se realiza mediante el paso de lo cualitativo a lo cuantitativo".

Con posterioridad nace la Citometría de flujo, que permite el examen de miles de núcleos en poco tiempo y el Análisis de imagen que, asociado a programas informáticos, permite el control directo de los objetos que se están midiendo, con lo que se mejoran ostensiblemente los resultados de la Morfometría y la Citometría estática en secciones de parafina (Mariuzzi y Collan, 1995).

Finalmente, se llega al momento actual en el que, gracias a la Patología Cuantitativa, un rasgo cualitativo determinado es transformado en una variable numérica, la cual puede ser comparada de forma totalmente objetiva. Este sistema impulsa la creación de sistemas de clasificación por grados para las lesiones continuas (Fleege, 1991; Collan, 1989; Mariuzzi y Montironi, 1986).

Una de las limitaciones más importantes en Patología Cuantitativa es la existencia de diversas **fuentes de error** que pueden influir negativamente en la calidad de los resultados en términos de objetividad y reproducibilidad (Fleege, 1991). Estos errores suelen ser factores externos que condicionan las mediciones realizadas:

- Procesado tisular: problemas con la fijación, el grosor de los cortes histológicos, la temperatura y el ph en los procesos de tinción, etc.
- Instrumentación: calibrado de los aparatos, intensidad de luz y aumentos aplicados al microscopio.
- Selección de los campos histológicos (tallaje y tamaño de las muestras, identificación de zonas concretas del tumor, etc.).
- Interpretación de los resultados (sistemas de análisis estadístico).

Las técnicas en Patología Cuantitativa se utilizan fundamentalmente en dos tipos diferentes de estudios científicos: **estudios de grupo o estadísticos** y **estudios individuales o de diagnóstico** (Collan y cols., 1984-7). Los estudios de grupo se basan en un gran número de casos sobre la base de una serie de criterios homogéneos dentro de un mismo laboratorio, lo cual sirve para controlar los posibles errores internos generados. En cambio, los estudios de diagnóstico son, en general, estudios de casos aislados, lo cual facilita la aparición de errores al variar las condiciones externas de medida entre los diferentes laboratorios. Para solucionar éste problema se ha de medir un gran número de objetos para cada caso concreto (Collan y cols., 1987).

3.2.1.2. Morfometría

Literalmente, la morfometría se define como la descripción cuantitativa de una forma simple, aunque en general el término se aplica también a la descripción cuantitativa de una estructura simple (Baak, 1987).

Clásicamente, la morfometría mide rasgos nucleares aislados como son: el área, perímetro, diámetro y factores de forma (Morfometría individual); rasgos en relación con la textura cromatínica (Morfometría textural); con estructuras tridimensionales tipo volumen nuclear o índice mitótico (Estereología); y en relación con el nivel de organización tisular o la relación de un objeto con los elementos vecinos (Morfometría contextual o Histometría).

A través de todas estas medidas morfométricas aisladas o en combinación se pueden establecer una serie de criterios objetivos para gradar las lesiones continuas y correlacionar ese sistema de clasificación con la evolución clínica posterior de los pacientes, estableciendo así su valor pronóstico (neoplasias de mama, del sistema nervioso central, uroteliales, de endometrio, etc.). También serviría para:

- Disminuir la variabilidad inter- e intraobservador.
- Aumentar la sensibilidad en la identificación de cambios mínimos en los rasgos celulares.
- Procurar una serie de valores estándar para el diagnóstico y la docencia.
- Utilización de estas técnicas en investigación como una herramienta más del patólogo en la observación objetiva de la lesión.
- Disminuir de la variabilidad intra- e interlaboratorio.
- Abaratar el coste del aparataje y de los sistemas informáticos utilizados para aumentar la accesibilidad de cualquier patólogo a cualquiera de estas técnicas cuantitativas (True, 1996).

3.2.1.3. Citometría estática (CME)

Consiste en la cuantificación de una serie de características celulares y tisulares en los cortes histológicos. De esta forma se obtiene el índice de densidad óptica integrada (IOD), a partir del cual se puede hacer una estimación aproximada del contenido de DNA nuclear (índice de DNA o I.D) de una célula o de una población celular concreta, tomando como referencia el I.D de una población celular normal de

contenido diploide (2c) conocido (generalmente linfocitos intratumorales). Así por ejemplo, en tumores ováricos, endometriales y en carcinomas de mama, un contenido de ADN $>2.1-2.5c$ es indicativo de mal pronóstico (Cohen, 1996). Con respecto a las neoplasias vesicales los tumores de bajo grado suelen ser diploides, los de alto grado aneuploides y los tumores con un contenido de ADN $>5c$ (Hemstreet y cols., 1991) o la presencia de una o varias poblaciones aneuploides ($>2.5c$) presentan un riesgo elevado de progresión tumoral (Cohen, 1996).

3.2.1.4. Análisis digital de imágenes histológicas

Consiste en un sistema informático acoplado a una vídeo-cámara, un digitalizador de imágenes y un microscopio. Este sistema simplifica enormemente los análisis de medida de células tumorales mediante la introducción de un sencillo "software" en un banco de datos, lo que posibilita la realización de estudios estadísticos sencillos y la estimación de medidas estereológicas y citométricas (**citometría de imagen: CMI**). Además, este sistema permite el control visual sobre los elementos que se están midiendo (Stenkvisit y Strande, 1990) y permite asimismo la utilización de material almacenado en parafina (Hierro y cols., 1996).

3.2.1.5. Citometría de flujo (CMF)

Consiste en la valoración de la ploidía tumoral sobre material en fresco (citológico o tisular) o congelado, y luego procesado para obtener la medición de gran número de objetos (mucho mayor que con CME). Tiene la ventaja de leer gran número de casos aunque tiene también la desventaja de no poder discriminar visualmente los objetos que se están midiendo (células tumorales, linfocitos, fibroblastos, etc.) y la necesidad de utilizar material en fresco.

Una cuestión fundamental en Patología Cuantitativa es no usarla NUNCA como una "caja negra". El patólogo ha de examinar previamente la lesión en cortes histológicos de hematoxilina-eosina, seleccionar la sección más representativa y dentro de cada campo histológico seleccionar el área tumoral que se desea analizar según una serie de criterios lógicos introducidos por él mismo. Por tanto, la Patología Cuantitativa se ha de entender como una herramienta más dentro del proceso de

diagnóstico o de investigación y nunca como un sustituto del diagnóstico subjetivo del patólogo (Baak, 1984; Fleege, 1991).

Asimismo, True (1996) señala que la falta de estandarización conduce al inevitable rechazo por parte del patólogo, debido sobre todo a la gran variabilidad intra y sobre todo interobservador (Collan y cols., 1986). Para evitar esta falta de estandarización y disminuir la variabilidad se publicó un estudio de los **valores estándar** que hizo más sencilla la reproducción de los resultados con técnicas de imagen (Böcking y cols., 1995). En esta publicación se establece una nomenclatura más homogénea y estandarizada en relación con: la preparación histoquímica de las muestras, la instrumentación necesaria, el control celular interno del número diploide, las escalas métricas, los intervalos de confianza, la interpretación correcta de los histogramas, etc.

3.2.2. APLICACIONES EN LAS NEOPLASIAS VESICALES

3.2.2.1. Valor de la microscopía cuantitativa en los sistemas de clasificación por grados

Para emitir un diagnóstico el patólogo se basa inicialmente en su memoria visual y en la experiencia, aunque hay una serie de factores externos e internos que interfieren en el proceso de asignación de las lesiones a una categoría determinada. Para evitar estos **factores de distracción** se utilizan las técnicas cuantitativas.

En el caso concreto de las neoplasias vesicales los primeros intentos tuvieron lugar a finales de los sesenta (Levi y cols., 1969), aunque los resultados fueron inicialmente poco satisfactorios. Sin embargo, los estudios continuaron y diversos autores correlacionaron el área nuclear media y su desviación estándar con el grado histológico (Kern, 1974; Ooms y cols., 1983b; Blomjous y cols., 1989a y 1989b). De igual forma, se estudió: el factor de forma (Montironi y cols., 1985; Helander, 1986), factores texturales (De Prez y cols., 1990) y el volumen nuclear (Nielsen, 1991). Todos ellos se correlacionaron con el grado y la evolución clínica posterior.

Lipponen y cols. (1989) defienden un sistema de clasificación con 2 grados en lugar de 3 y sientan las bases de estudios posteriores (*Choi y cols., 1993; Jartrans y cols., 1994*). En estos estudios se aplican criterios morfométricos para la elaboración de un sistema de clasificación basado en una impresión general de orden arquitectural (morfometría contextual) y en objetos individuales (morfometría individual), donde se sugiere además un sistema de 2 grados (bajo y alto grado), donde el grado 2a se desplaza hacia el G1 y el grado 2b hacia G3.

Estos trabajos son recogidos posteriormente en la reciente *clasificación consensuada de la OMS/ISUP (1998)* donde se incluye además una categoría adicional en el bajo grado: neoplasias de Bajo Potencial Maligno (BPM), situadas entre los papilomas y los carcinomas de Bajo Grado (BG). La diferenciación entre BG y BPM se realiza sobre todo en función de una serie de parámetros morfométricos individuales (*Busch, 1998*).

3.2.2.2. Valor pronóstico de la morfometría

Al margen del valor de la morfometría en la elaboración de sistemas de clasificación, el valor pronóstico de los diferentes parámetros se estudia por separado.

El **área nuclear** es, probablemente, la variable morfométrica más estudiada. Ooms y cols. (1983b) sentaron las bases para el estudio del **área nuclear media (ANM)** en los tumores vesicales. Ellos estudiaron 3 zonas tumorales: una zona de células basales y otra de células intermedias y superficiales donde se miden más de 100 núcleos, y una tercera zona más atípica (Z10) donde se miden sólo los 10 núcleos más atípicos (Ooms y cols., 1981). El ANM de las 2 primeras zonas se correlaciona bien con el grado, sin embargo no distingue entre G2 y G1. Para la distinción entre esos 2 grupos fueron muy útiles los valores de Z10. En estudios posteriores se demostró la asociación de estos hallazgos con el curso clínico y se determinó también su alta reproductibilidad (Ooms y cols., 1985; Montironi y cols., 1986a).

Montironi y cols. (1986b) publicaron otro estudio de análisis multivariable que incluía 19 parámetros morfométricos indicativos de la anormalidad nuclear y los correlacionaron con el grado histológico, siendo el **perímetro nuclear medio (PNM)** el más correlacionado con el grado y el **factor de forma (FF)** el que menos. También en 1986, Sánchez-Fernández de Sevilla en su tesis doctoral concluye que a mayor grado histológico ocurre un incremento progresivo de la mayoría de parámetros morfométricos (**ANM, PNM, Diámetro máximo, FF, Densidad numérica y volumétrica**) útiles para diferenciar entre tumores G1 y G2. En ese mismo estudio se señala que en el grupo G1 existe una clara diferencia en los valores morfométricos entre la capa de células basales de la papila y las capas superficiales, aunque sin una clara relación con el pronóstico.

Blomjous y cols. (1989b) demuestran que independientemente del grado, aquellos pacientes con TVS y un ANM $>95\mu\text{m}^2$ en Z10 presentaron un peor curso evolutivo requieren un tratamiento más agresivo. En un estudio comparativo de la aplicación del método cuantitativo sobre áreas aleatorias o por el contrario seleccionadas, demuestra que los resultados obtenidos para las **áreas seleccionadas** tienen una mayor relación con el pronóstico (Blomjous y cols., 1989a). En un estudio posterior, se destaca la posibilidad de separar los tumores G2 en 2 grupos según el valor de la media de desviaciones estándar ANM(DE) en Z10 fuera menor (G2a) o

mayor (G2b) de $95\mu\text{m}^2$, ya que las neoplasias del grupo G2b se comportaban como las neoplasias G3 (Blomjous y cols., 1990).

Ese mismo año, Lipponen y cols. (1990a) estudian 265 casos con un seguimiento medio de 10 años. Las conclusiones de ese estudio fueron muy importantes ya que demostraron que el área nuclear media (ANM), su desviación estándar (ANMDE), y el ANM Z10, son los mejores indicadores de supervivencia junto con el grado, el estadio y el "status no papilar". Por otro lado, la **tasa de recurrencia (TR)** se correlacionó con el área de Z10, mientras que el **intervalo libre de enfermedad (ILE)** lo hizo con el crecimiento no papilar, el estadio, el grado, ANM, ANMDE y menos con el ANM Z10. Ese mismo año, Lipponen y cols. (1990b) en otro estudio en el que consideraron los 50 núcleos más atípicos del tumor demostraron que el ANM, ANMDE y el grado no se correlacionaron con la TR ni con el ILE, aunque fueron buenos indicadores de **progresión**, incluso mejores que el grado.

En 1991, Lipponen y cols. demuestran en un estudio multivariable que el factor pronóstico independiente más importante era el estadio, seguido del "status" papilar, el índice mitótico y el ANM Z10. En esa misma línea de investigación, Portillo y cols. (1991-2a) correlacionaron las neoplasias vesicales que presentaran un ANM del área basal $\leq 28\mu\text{m}^2$ con un mejor pronóstico, excepto para las neoplasias G1, cuya evolución clínica no es considerada en términos de progresión sino de **número de recurrencias**. Ese mismo estudio aplicado a tumores vesicales profundos demostró correlación en aquellos tumores con ANM $\leq 30\mu\text{m}^2$ (Portillo y cols., 1992b).

García y cols. (1994) estudiaron 163 pacientes con carcinoma vesical pTa/pT1 (grados G1, G2 y G3) y estudiaron el ANM, comprobando como los tumores con un ANM $\leq 50\mu\text{m}^2$ presentaban mejor pronóstico en relación con la progresión. En este estudio se consideraron los 75 núcleos de las áreas más atípicas.

Fukuzawa y cols. (1995) en un estudio que incluía 156 pacientes con TVS confirmaron mayor valor pronóstico del **volumen nuclear (VN)** en la predicción de recurrencias que el FF y el ANM. En ese mismo estudio, el estadio y el grado no mostraron valor predictivo para las recurrencias. Por otro lado, el VN y el FF estaban relacionados con la progresión tumoral junto con el estadio, mientras que el grado no lo estaba. Ese mismo año, Colombel y cols. demuestran que diversos parámetros

morfométricos y entre ellos el área nuclear media (ANM) estaban correlacionados con la recurrencia y la progresión en TVS pero no en TVP, mientras que van Velthoven y cols. (1995a) afirman que el ANM mostraba asociación significativa con el grado y con el estadio pero sin relación alguna con la predicción del curso evolutivo.

Dalla Palma y cols. (1996) sugieren que para diferenciar las neoplasias vesicales G1 del G2a son válidos el **perímetro nuclear medio (PNM)**, la desviación estándar del ANM (**DEANM**) y del PNM (**DEPNM**), mientras que el FF no tendría utilidad.

Otros métodos morfométricos consisten en el contaje de mitosis. En esta línea de investigación, Haapasalo y cols. (1989) introducen el concepto de índice mitótico corregido por volumen tisular (**índice M/V**). Su valor como factor pronóstico en el carcinoma vesical sólo era superado por el estadio (Lipponen y cols., 1990c-d y 1991b). No obstante, en la actualidad se usan con mayor frecuencia técnicas IHQ (**PCNA, Ki-67**) para la determinación del nivel proliferativo tumoral.

3.2.2.3. Valor pronóstico de la ploidía tumoral

Para las neoplasias vesicales la ploidía tumoral se puede determinar mediante técnicas de **citometría de imagen (CMI)** o de **citometría de flujo (CMF)**. La CMI tiene la ventaja de decidir mediante control visual qué células se seleccionan para el estudio (Goulandris y cols., 1996), es más barata y menos laboriosa que la CMF, y permite realizar simultáneamente otros estudios morfométricos (van der Poel y cols., 1998), aunque tiene la desventaja de estudiar un menor número de células (Clemo y cols., 1993).

Clemo y cols. (1993) realizan un **estudio comparativo** entre CMF y CMI para tumores de células transicionales y concluyen que los resultados obtenidos con ambas técnicas son superponibles, corroborado en otros estudios como el de Colombel y cols. (1994). Asimismo, Cohen (1996) revisa comparativamente ambas técnicas y concluye que según las diferentes series varía entre un 77% y un 100% de coincidencia.

La mayoría coincide también en que la determinación de la ploidía tumoral tiene un importante valor pronóstico (Stöckle y cols., 1987; Malmström y cols., 1989; Hemstreet y cols., 1991; Schapers y cols., 1993; Vaskó, 1994; van Velthoven y cols., 1995b-1996). Por el contrario, muy pocos estudios afirman lo contrario, y en ese

sentido, Levi y cols. (1969) destacan ausencia de relación entre el contenido de ADN y el grado histológico; mientras que Fossa y cols. (1977) señalan ausencia de correlación pronóstica entre el estadio y la ploidía.

La mayoría de autores describen, no obstante, una **gran heterogeneidad intratumoral** en cuanto al contenido de DNA (Sasaki y cols., 1992).

En estudios realizados en este departamento con técnicas de citometría de flujo (CMF) se demuestra que la ploidía tumoral es un factor pronóstico de primer orden para las neoplasias vesicales, de forma que los tumores aneuploides recidivan 4 veces más que los diploides y ningún tumor vesical superficial (TVS) de contenido diploide progresa (Navarro y cols., 1995).

Wheless y cols. (1993) demuestran con CMF que la mayor parte de tumores vesicales G1 son diploides, los G3 son aneuploides y los G2 aproximadamente la mitad son diploides y la otra aneuploides. Estos resultados han sido confirmados esporádicamente con CMI (van Velthoven y cols., 1995a-1996 y Hierro-Martín y cols., 1999), describiéndose una estrecha relación con el grado y débil con el estadio.

Decaestecker y cols. (1996) estudian la posible segregación de los tumores vesicales G2 según el porcentaje de núcleos **hiperdiploides e hipertetraploides**, aunque sin resultados concluyentes.

Hemstreet y cols. (1991) demuestran que las neoplasias vesicales G1 con un contenido **aneuploide** de ADN o una **población >5c** presentan mayor tasa de recurrencia y menor supervivencia. Hallazgos corroborados en estudios posteriores por Schappers y cols. (1993) y Pantazopoulos y cols. (1997).

Ioakim-Liossi y cols. (2000) demuestran en TVS una asociación estrecha entre el contenido de DNA y el número de recurrencias, aunque no con el grado.

Finalmente, van Velthoven y cols. (1995a) hicieron una aportación muy interesante a la explicación de la aneuploidía tumoral en algunas neoplasias vesicales de bajo grado, y, a la inversa, a la existencia de tumores de alto grado con un contenido diploide de ADN. Ellos concluyen que la aneuploidía es reflejo fundamentalmente de la **vejez tumoral**, es decir, de la edad biológica del tumor, siendo el hecho del tiempo prolongado de existencia lo que facilita que pueda expresar toda su malignidad biológica. De ahí que los tumores aneuploides sean con más frecuencia neoplasias de alto grado histológico y no al revés.

3.3. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

3.3.1. GENERALIDADES

Los métodos inmunohistoquímicos (IHQ) comprenden todas aquellas técnicas basadas en reacciones tipo Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) 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 Ag problema se realiza asimismo mediante métodos **directos** o **indirectos** a través de un Ac secundario. De este último sistema se conocen innumerables procedimientos en los que el *Ac secundario* se une al *Ac primario*, y éste se une a su vez al *Ag problema* (Pardo-Mindán y cols., 1997).

Desde finales de los 70 se aplican las técnicas IHQ en Anatomía Patológica. El enzima más usado ha sido la **peroxidasa**, la cual induce una reacción química coloreada detectable con el microscopio óptico.

Los tumores expresan gran número de antígenos (Ags) frente a los cuales se crean Ac primarios de 2 tipos: *Ac Policlonales* y *Ac Monoclonales*. Los Ac Policlonales se obtienen de animales inmunizados frente al Ag problema y tienen el inconveniente de ser poco específicos para el Ag, de obtención laboriosa y limitada, y con respuestas variables de expresión según el animal utilizado. Por esa y otras razones, Köhler y Milstein desarrollaron en 1975 una técnica innovadora de obtención de Ac monoclonales partiendo de "*hibridomas*" (cultivos celulares resultado de la fusión de una célula neoplásica y un linfocito). Estos hibridomas poseen la característica de producción ilimitada de Ac altamente específicos y homogéneos frente a Ag muy concretos (Pardo-Mindán y cols., 1997).

La técnica de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) fue ideada por Sternberg y cols. (1970). Esta técnica consta de 3 pasos: en primer lugar un Ac primario de ratón o conejo frente al Ag problema, posteriormente se añade un Ac secundario "puente" (de cerdo frente a ratón y conejo), y, finalmente, el *complejo PAP* que contiene al enzima *peroxidasa*.

Hoy en día, la técnica más utilizada fue desarrollada por Hsu y cols. (1981), los cuales introducen un método hipersensible por el que se amplifica la "señal". Esta amplificación es absolutamente necesaria para el revelado de los determinantes antigénicos de tejidos incluidos en parafina. Las sustancias más utilizadas son la **avidina** y la **biotina**, las cuales muestran una gran afinidad entre sí. Este método se denomina **ABC** de forma abreviada. Con posterioridad se idearon una serie de métodos de recuperación antigénica de los Ags desnaturalizados en parafina. Esas técnicas consisten en aplicar calor al tejido por medio de un horno microondas (Reynolds y cols., 1994) o un autoclave que incrementa también la presión (Shin y cols., 1991). Una modificación posterior de estos sistemas permite el procesado simultáneo de gran número de preparaciones (Bankfalvi y cols., 1994).

Un problema común a todas las determinaciones IHQ está en relación con las áreas tumorales seleccionadas para el estudio, el tipo de clon de Ac, y la proporción mínima de células positivas necesarias para considerar un inmunofenotipo tumoral concreto (nivel de corte o nivel umbral de positividad).

3.3.2. NEOPLASIAS VESICALES Y MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR (Ki-67·MIB-1)

La determinación del índice proliferativo tumoral cumple un papel muy importante en el estudio de la historia natural de las neoplasias, y especialmente de las neoplasias vesicales.

Dentro de las diferentes técnicas IHQ utilizadas en la detección de células en ciclo tenemos: **Ki-67** y **PCNA**. Estos 2 Ac reaccionan específicamente contra Ag nucleares específicos de las células susceptibles de entrar en ciclo celular.

El Ac **Ki-67** fue introducido en Kiel por Gerdes y cols. (1983). Este Ac se corresponde con una inmunoglobulina G1 (Ac monoclonal murino) y lo expresan las células en cualquier fase del ciclo excepto en G0, aunque presentaba el inconveniente inicial de funcionar únicamente sobre tejido en fresco.

Desde un principio este Ac demostró correlación con el grado y el estadio (Busch y cols., 1991) y diferenciaba, además, 2 grupos pronósticos distintos dentro de las neoplasias vesicales grado 2 (Mulder y cols., 1992).

Por otro lado, el Ag nuclear PCNA fue descrito en 1987 y en un estudio posterior mostró relación estrecha con el Ag Ki-67 (van Dierendonck y cols., 1991).

Cattoretti y cols. (1992) producen un Ac equivalente al Ki-67 denominado **MIB-1** que funcionó sobre material en parafina, siendo en la actualidad la técnica IHQ de elección en la determinación de la actividad proliferativa tumoral.

Desde entonces han sido innumerables los trabajos en los que se comprueba el valor pronóstico de Ki-67(MIB-1), sobre todo en TVS (**G1-G2-G3/Ta-T1**), aunque limitados por la dificultad en la definición de las áreas tumorales donde realizar las mediciones y por el número total de células que han de ser contabilizadas.

En el año 1990, Okamura y cols. demuestran sobre tejido congelado una estrecha asociación entre el índice proliferativo tumoral y el **grado y estadio**, aunque esta relación fue más intensa con éste último, distinguiendo entre estadios Ta y T1, y entre T1 y T2. Además, aquellos tumores con invasión de la muscular mostraron característicamente un índice de Ki-67 $\geq 15\%$, útil para la estimación del potencial maligno y en el abordaje terapéutico.

En el año 1992, Fontana y cols. describen correlación entre la expresión de Ki-67 y el grado, aunque no con el estadio. Además, demuestran que en neoplasias limitadas a la mucosa (Ta) una distribución tumoral apical de las células en proliferación presentó una menor **tasa de recurrencia (TR)**, mientras que una distribución en la base del tumor se asoció a una mayor tendencia a la recidiva. Nakopoulou y cols. (1998) describieron por otro lado una **distribución papilar heterogénea** en la expresión de Ki-67 en tumores Ta no invasivos (distribución en la capa basal o bien en las capas superficiales o de forma difusa), aunque sin un valor pronóstico independiente.

Por otro lado, Krüger y Müller (1995) relacionaron el índice de PCNA y Ki-67 con el **grado** pero no con el estadio y afirmaron que el Ag Ki-67 es más útil que PCNA para diferenciar entre neoplasias vesicales invasivas y no invasivas dentro de los tumores G2, hecho confirmado por Mulder y cols. en 1992. Por lo que respecta a **estadio T1** aquellos con ≥25% de expresión de MIB-1 presentan una mayor TR (Zlotta y cols., 1999).

A diferencia de los estudios anteriores Nakopoulou y cols. (1998) demuestran correlación estadística entre el Ag Ki-67 y el grado y estadio, aunque sin valor pronóstico independiente, mientras que otros autores demuestran un **valor pronóstico independiente** aunque menor que el de parámetros clásicos en la predicción de progresión (Pfister y cols., 1998; Liukkonen y cols., 1999) o la tasa de recurrencias (TR) (Pfister y cols., 1999b). En este último caso se comprobó sólo en tumores **>3cm** sin diferencias significativas dentro de las neoplasias de bajo grado-NBG (neoplasias de bajo potencial maligno -BPM- versus carcinomas de bajo grado -BG-).

Wu y cols. (2000) estudian también el índice de expresión de MIB-1 en **neoplasias de bajo grado (NBG)** y concluyen un valor pronóstico independiente, situando el nivel umbral en 10.9% de núcleos positivos en las áreas más proliferativas, mientras Fontana y cols. (1992) describieron este nivel en el 5.35%.

También se ha estudiado comparativamente la expresión IHQ de **p53** y **Ki-67 (MIB-1)**. Algunos autores demuestran que son marcadores completamente independientes (Pfister y cols., 1998; Wu y cols., 2000), mientras que otros demuestran una estrecha asociación (Wright y cols., 1995; Mellon y cols., 1994;

Liukkonen y cols., 1997), de tal forma que a mayor índice proliferativo mayor nivel de expresión de la p53.

Por lo que respecta a la expresión IHQ de **Ki-67 (MIB-1)** en relación con **bcl-2** y **c-erbB-2**, Chow y cols. (1997) demuestran que un índice elevado de Ki-67 se acompaña de un aumento en la expresión de bcl-2 y relación inversa con el c-erbB-2.

En la experiencia de nuestro departamento Zaragoza (1995) demuestra asociación estadística entre el índice de PCNA y el grado, sobre todo en la predicción de progresión tumoral, aunque menos concluyentes en relación con la TR.

Finalmente, Ogura y cols. (1997) demuestran asociación entre el índice de PCNA y valores morfométricos (**factores de forma nuclear**) para un nivel umbral del 28%.

3.3.3. NEOPLASIAS VESICALES Y GENES SUPRESORES TUMORALES (P53)

El gen TP53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y su expresión fenotípica es la **proteína nuclear p53**, que tiene una vida media muy corta y es la encargada de frenar el ciclo celular impidiendo así la división celular. Mutaciones o deleciones de este gen pueden ser detectadas con técnicas de biología molecular. El producto de esta anomalía es una proteína anómala con 2 variantes distintas: *Mutada* (90%) y *Salvaje* (10%). Esta proteína anómala tiene una vida media más larga y se puede detectar IHQ, sobre todo el tipo mutado. El gen TP53 está implicado en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y otras funciones celulares; de ahí que reciba el apelativo de "guardián del genoma". La consecuencia de esta mutación es la pérdida del freno sobre la proliferación celular (crecimiento y progresión tumoral).

Crawford y cols. (1982) fueron los primeros en describir el Ac contra la proteína p53 humana en el 9% de sueros de pacientes con carcinoma de mama, aunque no se demostró correlación clínica. Posteriormente, Caron de Fromentel y cols. (1983) encontraron esos mismos Ac en el suero de niños con una amplia variedad de procesos neoplásicos (12%), porcentaje que fue del 20% en el Linfoma de Burkitt (Caron de Fromentel y cols., 1987). Estos estudios fueron ignorados hasta la década de los 90, en que se descubre la participación del gen TP53 en la mayoría de procesos neoplásicos.

En la actualidad existen en la literatura numerosos estudios de la p53 en las neoplasias vesicales y los resultados son en general controvertidos. Esta controversia puede deberse en parte a que pocas publicaciones estudian conjuntamente la anomalía génica en el ámbito molecular e inmunohistoquímico (IHQ), también debido a la gran cantidad de mutaciones y a las propias limitaciones de la técnica IHQ (Ferrari y cols., 1997). Además, en **estudios conjuntos (inmunohistoquímicos y moleculares)** se demuestra asociación estadística en la mayoría (Dalbagni y cols., 1992; Esrig y cols., 1993; Cordon-Cardo y cols., 1994; Bernardini y cols., 1999; Gao y cols., 2000), y ausencia de relación en el resto (Vet y cols., 1995).

Los estudios a cerca del valor pronóstico de la p53 en TVS son tan diversos que en algunos centros se contempla dentro de su **algoritmo terapéutico**, mientras que otros autores afirman un valor pronóstico menor que el de los parámetros clásicos

clínico-patológicos (Liukkonen y cols., 1999), o incluso niegan dicho valor pronóstico (Zlotta y cols., 1999; Moreno-Sierra y cols., 1999).

Los estudios IHQ a cerca de la p53 en las neoplasias vesicales se centran fundamentalmente en el grupo de **tumores vesicales superficiales (TVS)**, con la intención de identificar aquellos tumores que progresan a TVP o tendrán una elevada tasa de recurrencia (TR). Esta categoría de TVS incluye una gran heterogeneidad tumoral respecto al grado (G1, G2, G3) y el estadio (Ta, T1), mientras que el TIS se estudia por separado.

La mayor parte de publicaciones demuestran una estrecha relación entre la expresión IHQ de p53 y el **grado histológico y el estadio tumoral**, de modo que a mayor grado y estadio, mayor nivel de expresión del p53 (Sato y cols., 1992; Soini y cols., 1993; Lipponen, 1993a; Burkhard y cols., 1997; Li y cols., 1998). En este mismo sentido, Blasco (1996) demuestra que la sobreexpresión de p53 se asocia con fases tardías en la evolución natural de las neoplasias vesicales. Un reducido número de estudios describe ausencia de relación entre la expresión de p53 y el grado o estadio (Tzai y cols., 1998).

Por lo que respecta a la **progresión tumoral**, hay autores que afirman que la expresión de p53 tiene valor pronóstico (Sarkis y cols., 1993; Soini y cols., 1993; Esrig y cols., 1994; Li y cols., 1995; Vollmer y cols., 1998); mientras que otros autores corroboran este valor predictivo tan sólo en algún grupo tumoral concreto. Así, Cassetta y cols. (1997) demuestran dicha asociación con relación al grupo G1/Ta, con un umbral para la positividad situado en el 0%; mientras que Mellon y cols. (1994) y Vollmer y cols. (1998) lo demuestran en tumores G2 y G3 pero no en G1. Vollmer y cols. (1998) concluyen por su parte que la negatividad para p53 se asocia a buen pronóstico para cualquier grado incluidas las neoplasias G1.

En relación con la predicción de **recurrencia**, Cassetta y cols. (1997) afirman que la positividad de la p53 (>0%) se asocia a una **mayor tasa de recurrencia (TR)** y un **intervalo libre de enfermedad (ILE) más corto** (20 meses por 30 de los casos negativos para p53). Asimismo, Toktas y cols. (1999) demuestran correlación entre la expresión de p53 y ambos índices pronósticos: nº de recurrencias y progresión tumoral, aunque sólo para el grupo de tumores pT1 (invasión de la lámina propia). En este mismo grupo de estudio (pT1/G2-3) se demostró que carecía de valor pronóstico

(Gardiner y cols., 1994), donde se pone de manifiesto, además, la heterogeneidad intratumoral en la expresión de p53.

Pfister y cols. (1999a) demuestran el valor pronóstico de los parámetros clásicos clínico-patológicos y el escaso valor pronóstico de la determinación de p53.

En **estudios multivariable** la detección IHQ de p53 muestra gran controversia en relación con su valor pronóstico independiente (Keegan y cols., 1998). Así, hay autores que sí demuestran información pronóstica independiente (Sarkis y cols., 1994; Serth y cols., 1995; Lacombe y cols., 1996; Casetta y cols., 1997), aunque en la mayoría de estudios se alcanza la conclusión que la p53 no tiene valor pronóstico independiente, siendo en general menor que el poder predictivo de los parámetros clásicos (grado, estadio, "status" papilar, etc.) (Thomas y cols., 1993; Gardiner y cols., 1994; Nakopoulou y cols., 1995-1998; Tétu y cols., 1996; Shiina y cols., 1996a; Inagaki y cols., 1997; Liukkonen y cols., 1997-1999; Koyuncuoglu y cols., 1998; Pfister y cols., 1999a; Wu y cols., 2000; Gao y cols., 2000). Cerdón-Cardo y cols. (1997a) afirman que la p53 por sí sola no tiene valor pronóstico independiente, aunque considerada conjuntamente con la proteína Rb sí que lo tiene. Recientemente, Wu y cols. (2000) estudian neoplasias vesicales de bajo grado y encuentran una tasa de expresión de p53 sorprendentemente alta, aunque sin valor pronóstico independiente.

Estos resultados tan dispares podrían explicarse por los **diferentes niveles de positividad** aplicados (0-5-10-20%), por las **diferentes áreas tumorales** seleccionadas, y por los **distintos clones de Ac** utilizados (DO7, Pab1801, NCL-CM1, etc.) (Keegan y cols., 1998; Cerdón-Cardo, 1999).

Diferentes trabajos estudian también la influencia de la expresión de p53 en la **respuesta al tratamiento** con BCG, indicando, en general, ausencia de correlación (Lebret y cols., 1998 y Zlotta y cols., 1999). Aunque, Fontana y cols. (1999) indican que bajo determinadas circunstancias la BCG podría inducir la activación de proteína p53 salvaje en el urotelio.

La sobreexpresión de p53 se ha correlacionado también con un mayor **contenido de DNA** (Mellon y cols., 1994; Thomas y cols., 1993). Sin embargo, Pfister y cols. (1998) demuestran que la ploidía tumoral es superior a la expresión IHQ de p53 para cualquier grado, mientras al-Abadi y cols. (1998) describen ausencia de relación estadística.

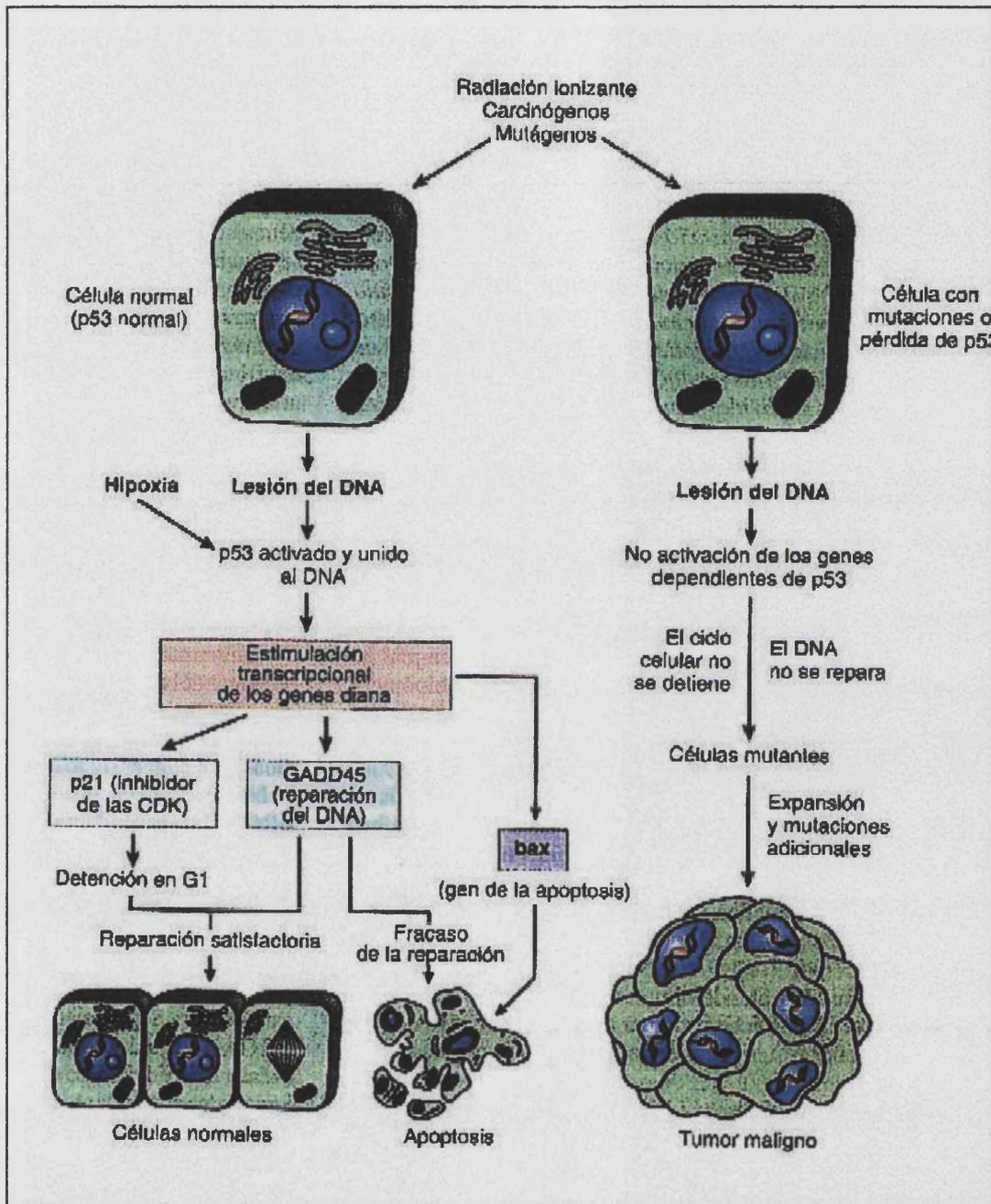


Figura 3.2. Función de la proteína p53 en el mantenimiento de la integridad del genoma

3.3.4. NEOPLASIAS VESICALES Y APOPTOSIS (Bcl-2)

La apoptosis fue reconocida inicialmente en 1972. El término deriva del griego "apostatar" que significa consunción y es una forma de muerte celular programada que se utiliza para eliminar células no útiles para el organismo a través de una serie de mecanismos celulares internos iniciados a nivel génico. La apoptosis se observa en diferentes procesos: desarrollo embrionario, mantenimiento celular, mecanismos de defensa, lesiones celulares por enfermedades y cáncer, y en los procesos de envejecimiento (Cotran y cols., 1999).

El primer gen anti-apoptótico analizado fue el gen **bcl-2** identificado en el cromosoma 18 en los linfomas foliculares, en los que ocurre una traslocación 14-18 que activa dicho gen y se produce una sobreexpresión de la proteína bcl-2, la cual cumple una función inhibidora de la apoptosis, prolongando la vida de los linfocitos tumorales (Cotran y cols., 1999).

Una apoptosis anormal puede promover el desarrollo del cáncer por medio de 2 mecanismos distintos: 1) inhibición de la apoptosis celular y la consiguiente acumulación de células con actividad proliferativa (crecimiento tumoral), y 2) la no eliminación de células con alteraciones génicas de potencial carcinogénico, lo que explicaría el desarrollo neoplásico en lesiones con una baja actividad proliferativa pero con una vida celular prolongada ("eternización celular").

La apoptosis está regulada por diversos proto-oncogenes (**c-myc**, **bcl-2**, **bax**, etc.) y por genes supresores tumorales (**p53**). Alteraciones en estos genes pueden modificar la relación entre inducción y represión de la apoptosis e intervenir en el proceso de transformación neoplásica (Pardo-Mindán y cols., 1997). Dentro de las proteínas que regulan el proceso apoptótico existe un grupo que promueve la apoptosis (**factor de necrosis tumoral -TNF-**, **ras**, **bax**, **myc**, **p53**) y otro constituido por agentes anti-apoptóticos (**bcl-2**).

En condiciones normales, el gen **bcl-2** sintetiza una proteína (**bcl-2**) presente en las membranas mitocondriales, en el núcleo y en el retículo endoplásmico de todas las células hematopoyéticas, linfoides, epiteliales y neuronales.

En **estudios comparativos** con técnicas de Biología Molecular e IHQ se ha confirmado la asociación entre la mutación del gen y la sobreexpresión proteica de bcl-2 (Eissa y Seada, 1998).

Clínicamente, la expresión de bcl-2 se asocia en general con un mal pronóstico en diversos procesos cancerosos (Desoize, 1994); sin embargo, en otros la sobreexpresión de bcl-2 comporta un buen pronóstico (cáncer de mama y tiroides) (Joeensuu y cols., 1994; Viale y cols., 1995).

En estudios de carcinogénesis en el adenocarcinoma colorrectal la expresión de bcl-2 se considera un evento precoz que facilita la progresión tumoral. El mecanismo carcinogénico para las neoplasias vesicales podría ser similar, aunque los estudios realizados hasta la fecha son escasos.

La mayoría de autores coincide en afirmar que existe positividad para bcl-2 en las capas basales del urotelio normal y que a mayor **grado y estadio** se produce sobreexpresión de bcl-2 en capas superficiales y pérdida de expresión en las basales, aunque ésta pérdida es mínima en carcinomas de bajo grado.

Los estudios sobre la expresión aislada de bcl-2 en tumores vesicales son contradictorios. Así, autores como Kirsh y cols. (1998) concluyen que tiene **mal pronóstico**, hecho que niegan otros autores como Shiina y cols. (1996b), Lipponen y cols. (1996) y Li y cols. (1998), los cuales lo asocian a un fenotipo **menos agresivo**.

Por otro lado, Liukkonen y cols. (1997) demuestran que en tumores vesicales con invasión de la lámina propia (pT1) y grado histológico alto (G2 y G3) existe con mayor frecuencia positividad para bcl-2 en las células no basales. Li y cols. (1998) corroboran este hecho y además confirman sobreexpresión de bcl-2 en capas superficiales en procesos neoformativos intraepiteliales a mayor grado de displasia epitelial. Además, Lipponen y cols. (1996) demuestran en **estudios multivariable** una ausencia de valor pronóstico independiente.

Muchos investigadores han estudiado la expresión conjunta de bcl-2 y p53, y de éstos con marcadores de proliferación celular (Ki-67) concluyendo, en general, que la sobreexpresión de bcl-2 y p53 se correlaciona con un pronóstico ominoso (Li y cols., 1998; Kirsh y cols. 1998, Vollmer y cols., 1998) y con elevados índices proliferativos (Liukkonen y cols., 1997; Nakopoulou y cols., 1998). Algunos autores indican, también, buen pronóstico en la expresión aislada de bcl-2 independiente de

p53 y de Ki-67 (Silvestrini y cols., 1994; Joensuu y cols., 1994; Hurlimann y cols., 1995; Vissler y cols., 1996; Vollmer y cols., 1998; Li y cols., 1998).

Wu y cols. (2000) publican un estudio de expresión de bcl-2 en neoplasias vesicales de bajo grado y concluyen que no existe correlación con el n° de recidivas, aunque sí que existe asociación en la expresión combinada de bcl-2 y de p53, de manera que la sobreexpresión de p53 y negatividad de bcl-2 se asocia a mal pronóstico. Vollmer y cols. (1998) ya comentaron el papel DUAL en la expresión de Bcl-2, de manera que su positividad está ligada a un buen pronóstico si existe negatividad simultánea de p53, y a un mal pronóstico si la p53 es positiva, sobre todo en carcinomas vesicales de AG (G2 y G3). No obstante, este papel dual no ha sido demostrado en neoplasias vesicales de bajo grado-NBG (BPM y BG).

Incluso hay autores como Lu y cols. (1997) que asocian la expresión de bcl-2 con el **adenocarcinoma vesical** y no con neoplasias de estirpe urotelial.

En resumen, parece evidente que en el proceso secuencial de displasia leve-moderada-CIS, así como en el proceso carcinoma papilar intraepitelial-carcinoma invasor ocurre una pérdida de expresión de Bcl-2 en las capas basales y sobreexpresión en las superficiales, igual que ocurre en el paso de carcinoma de bajo grado-carcinoma de alto grado.

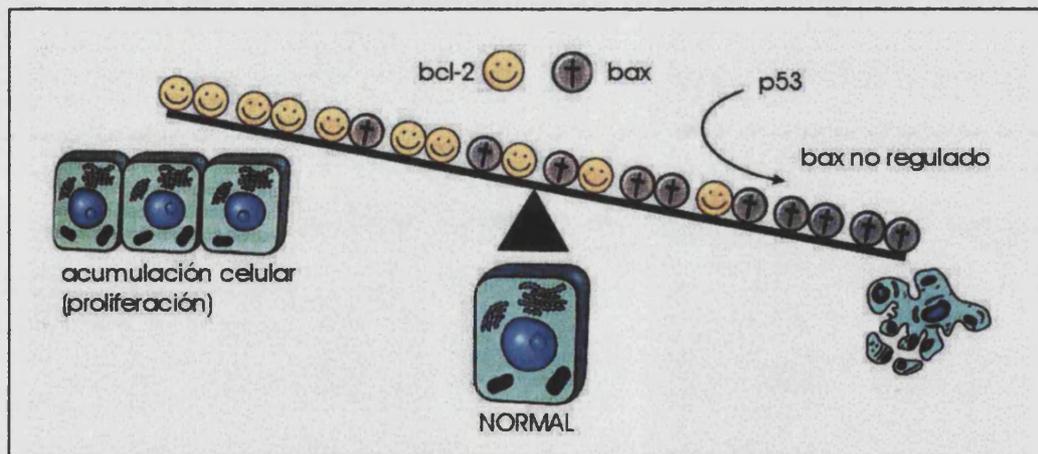


Figura 3.3. Regulación de la muerte celular (bcl-2 / p53)

3.3.5. NEOPLASIAS VESICALES Y ONCOPROTEÍNAS (C-erbB-2)

Los *oncogenes* o "genes causantes del cáncer" derivan de *proto-oncogenes* presentes en condiciones normales en el organismo. Los proto-oncogenes son genes que estimulan el crecimiento y la diferenciación celular. Existen diferentes familias de proto-oncogenes: - Factores de crecimiento, - Receptores de factores de crecimiento (EGFR), - Proteínas implicadas en la traducción de señales (ras, abl), - Proteínas reguladoras nucleares (myc) y - Proteínas reguladoras del ciclo celular (ciclinas).

Dentro de la familia de proto-oncogenes que actúan como receptores de los factores de crecimiento tenemos a los receptores de los factores de crecimiento epidérmico (EGFR), los cuales están constituidos a su vez por 3 proto-oncogenes: **erbB1**, **erbB2** y **erbB3**.

El gen **erbB2 (c-neu)** localizado en el cromosoma 17 se encuentra amplificado en gran número de adenocarcinomas de mama, pulmón, ovario, estómago y glándulas salivares. El resultado es que en estos carcinomas existe sobreexpresión de EGFR y en esas mismas células neoplásicas es posible detectar con técnicas IHQ las oncoproteínas citoplasmáticas resultado de la traducción oncogénica.

En las neoplasias vesicales los diferentes estudios realizados sobre c-erbB-2 resultan por lo general poco concluyentes y en ocasiones contradictorios.

McCann y cols. (1990) describen la sobreexpresión de c-erbB-2 en un 17% de carcinomas de mama, 4% de adenocarcinomas rectales y tan sólo en un 2% de carcinomas vesicales uroteliales.

Los estudios en vejiga se centran sobre todo en el grupo de TVS. La mayoría de autores concluyen que la expresión de c-erbB-2 está incrementada en tumores de alto **grado** y **estadío** (Moriyama y cols., 1991; Sato y cols., 1992), aunque otros no demuestran tal asociación ni constatan ningún valor pronóstico (Lipponen, 1993b, Blasco, 1996; Koyuncuoglu y cols., 1998).

En neoplasias vesicales de **bajo grado** tan sólo un reducido número de tumores expresó c-erbB-2. La sobreexpresión de c-erbB-2 en neoplasias de **alto grado** es entendida por algunos investigadores como un factor pronóstico ominoso en términos de supervivencia (Moriyama y cols., 1991; Sato y cols., 1992), mientras que otros como Vollmer y cols. (1997) señalan que el grupo de tumores vesicales G3 con

expresión de c-erbB-2 presenta una menor probabilidad de invasión que aquellos tumores c-erbB-2 negativos.

Sato y cols. (1992) describen en una serie de TVS (G1-G2-G3) en que la sobreexpresión de c-erbB-2 tiene **valor pronóstico independiente** en relación con la progresión y con el n° de recurrencias.

Orlando y cols. (1996) concluyen en un estudio retrospectivo con **técnicas de biología molecular (PCR)** que la expresión de c-erbB-2 se asocia con grados histológicos y estadios tumorales avanzados, aunque sin relación con el pronóstico; lo cual les lleva a pensar que se trate probablemente de un epifenómeno presente en este subgrupo de mayor agresividad histológica pero sin relación con la evolución clínica de los mismos. No obstante, Lonn y cols. (1995) y Miyamoto y cols. (2000) describen **valor pronóstico independiente** en la **expresión comparada** (genética e inmunohistoquímica) de c-erbB-2.

3.3.6. NEOPLASIAS VESICALES Y EXPRESIÓN DE CITOQUERATINA BASAL (clon MAB 34βE12)

Según los diferentes tipos de tejido las células poseen una serie de filamentos intermedios en su citoplasma: queratina (epitelios), vimentina (mesénquima), desmina (músculo), GFAP o proteína gliofibrilar ácida (Glia) y neurofilamentos (neuronas).

Moll y cols. (1982) describen 3 citoqueratinas (CK 7, 8 y 19) en el urotelio humano normal y otros 3 tipos (5, 13 y 18) presentes en menor proporción. No obstante, no describen ningún tipo especial de distribución según las diferentes capas del epitelio.

Asimismo, Summerhayes y Chen (1982) describen una citoqueratina (CK) de **52.000 daltons** presente exclusivamente en la capa basal del urotelio normal y neoplásico, y Ramaekers y cols. (1985) describen también un Ac Monoclonal (CK 18) reactivo en epitelios glandulares pero no en epitelios escamosos, y que en el urotelio normal marca específicamente las células superficiales. En tumores papilares uroteliales la CK18 marca células superficiales en tumores grado 1, mientras que en tumores grados 2 y 3 esta citoqueratina es positiva con mayor frecuencia en células intermedias y basales.

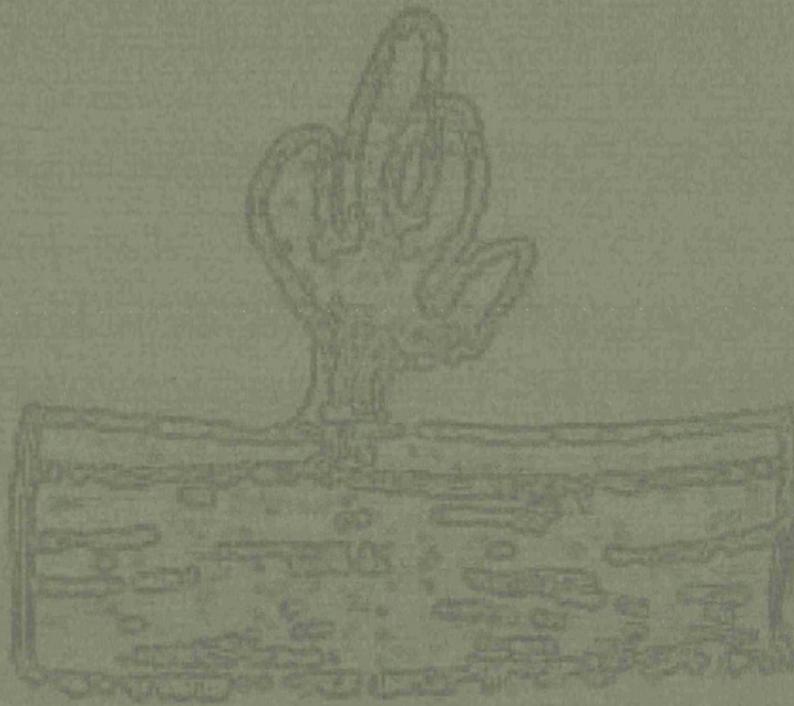
Sánchez y cols. (1992) describen una expresión basal de esta citoqueratina (Ac monoclonal LP-34) en el urotelio normal y en carcinomas vesicales uroteliales bien diferenciados (de bajo grado), y una expresión difusa en carcinomas de alto grado.

En 1999, Helpap y Köllermann utilizan el Ac monoclonal Mab 34βE12 que incluye las CK 1, 5, 10 y 14, las cuales se expresan específicamente en las células basales del urotelio normal. Este tipo de expresión basal se mantiene en neoplasias vesicales bien diferenciadas (pTa) y se hace difusa en tumores de alto grado histológico con invasión de la lámina propia (pT1), hallazgo estrechamente relacionado con el **nº de recurrencias**.

Se describe, además, una importante asociación estadística entre el número de recurrencias tumorales y una expresión difusa combinada de **citoqueratinas** y del Ag **Ki-67 (MIB-1)** (Helpap y Köllermann, 1999-2000).

La CK-basal ha demostrado asimismo su utilidad en la glándula prostática, concretamente en el diagnóstico de lesiones neoplásicas intraepiteliales (PIN), en las

cuales al ir aumentando el grado de atipia aparecen zonas en el epitelio con pérdida de esta tinción basal específica, e incluso desaparece totalmente en el caso de carcinoma infiltrante de próstata (Wojno y Epstein, 1995).



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Nuestro estudio incluyó finalmente un total de **120 casos** de neoplasia vesical papilar urotelial de bajo grado (NBG). Estos tumores fueron diagnosticados íntegramente en el Departamento de Patología del Hospital Clínico Universitario de València (HCUV) entre los años 1984 y 1996. Todo el material histológico procedía del Servicio Clínico de Urología del mismo hospital.

Los estudios se llevaron a cabo sobre material fijado en formaldehído tamponado al 10% e incluido posteriormente en parafina. Cada bloque se acompañaba de dos cortes histológicos de 2-3 micras de espesor, teñidos con la técnica convencional de Hematoxilina y Eosina (H-E).

Con posterioridad, se aplicaron una serie de "**criterios de selección**" para que los casos pudieran entrar en el estudio, y a todos ellos se les exigió, además, una calidad histotécnica mínima.

El estudio se inició en realidad con 188 casos pero tras la aplicación de los criterios de selección quedaron reducidos a 120, lo cual significó que 68 casos fueron excluidos del estudio:

- 16 casos fueron excluidos por material histológico insuficiente (11 casos) o artefactado (5 casos).
- 3 casos fueron excluidos debido a una insuficiente recuperación antigénica en el Estudio Inmunohistoquímico.
- 20 casos no entraron en el estudio cuantitativo al evidenciarse escaso número de papilas cortadas transversalmente o por la presencia de numerosos núcleos artefactados o apoptóticos inadecuados para el Estudio de Imagen.
- 29 casos fueron excluidos por la falta de un seguimiento clínico de al menos 3 años (16 casos), por la existencia de un diagnóstico anatómo-patológico previo de carcinoma papilar urotelial de alto grado (6 casos), o por un diagnóstico anatómo-patológico en la mucosa vesical en vecindad de displasia urotelial (1 caso) o carcinoma in situ (4 casos).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. REVISIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA (ESTUDIO RETROSPECTIVO)

Los datos clínico-patológicos generales y del seguimiento se obtuvieron a partir de las historias clínicas, las cuales fueron consultadas en el Archivo Central de Historias del HCUV. No se consideraron, por información clínica insuficiente, el lugar concreto de asiento en la vejiga de la neoplasia primaria y de las recurrencias, así como tampoco se consideró en el estudio el hábito tabáquico de los pacientes antes del diagnóstico inicial y en el curso del seguimiento.

Sin embargo, a partir de los esquemas gráficos realizados por el urólogo en su informe quirúrgico se puede deducir que la mayor parte de neoplasias recidivaron a distancia del tumor primario.

4.2.1.1. Edad y sexo

La edad se valoró en años desde el momento en que se emitió el informe anatómo-patológico inicial en el que se confirmaba el diagnóstico de neoplasia vesical urotelial papilar de bajo grado.

El sexo fue considerado como una variable dicotómica: 1- Mujer. 2- Varón.

4.2.1.2. Técnica endoscópica (CISTOSCOPIA)

En todos los casos estudiados se llevó a cabo el estudio cistoscópico de toda la mucosa vesical y a partir de dicho estudio se obtuvieron datos en relación con la morfología y el tamaño de las lesiones, y se realizó no sólo una resección total del tumor sino también lavados vesicales y, en ocasiones, un estudio randomizado de la mucosa vesical sana.

4.2.1.3. Tamaño y número de tumores

El tamaño y la multiplicidad tumoral se valoraron sobre la base de los informes cistoscópicos del tumor primitivo. El primero en centímetros y el segundo como tumor

único (1) o múltiple (2). En el caso de neoplasias vesicales múltiples se consideró siempre la de mayor tamaño.

4.2.1.4. Grados clínicos "corregidos" de Parmar

Se valoraron los grados clínicos en función del número de recurrencias y de un intervalo libre de enfermedad (ILE) corto, aunque en nuestro estudio se consideró "corto" de forma arbitraria un tiempo de 9 meses, al ser éste el mejor nivel de corte en la estratificación de los grupos.

4.2.1.5. Tratamiento adyuvante intravesical (TAI)

Se valoró la instilación intravesical de agentes terapéuticos locales (inmunoterapia y/o quimioterapia) en los años posteriores al diagnóstico, sobre todo en los casos con recurrencias múltiples.

4.2.1.6. Seguimiento clínico-patológico

Los datos referentes al seguimiento se obtuvieron fundamentalmente a partir de los estudios cistoscópicos realizados desde el diagnóstico inicial. El período de recogida de datos referentes al seguimiento se cerró definitivamente en marzo del 2000.

- **Recidiva o recurrencia tumoral**

Se consideró recidiva o recurrencia tumoral a la existencia de un nuevo tumor vesical en la misma zona o a distancia del primario, confirmado en el estudio anatomo-patológico realizado tras su identificación y resección endoscópica. Una citología urinaria positiva **no** se consideró recidiva al tratarse de una técnica con un elevado porcentaje de falsos positivos. Asimismo, una imagen cistoscópica tumoral **tampoco** fue considerada como recurrencia sin la confirmación histológica de la misma, debido a la existencia de lesiones excrecentes no tumorales (cistitis, hiperplasias, etc.).

En el transcurso del seguimiento, un diagnóstico de carcinoma in situ (CIS/TIS) o de displasia urotelial excluía automáticamente a los casos del estudio.

- **Tiempo de seguimiento**

Se contabilizó en meses desde el diagnóstico anatómo-patológico (A-P) inicial hasta la última cistoscopia (negativa o positiva).

- **Intervalo libre de enfermedad (ILE), de recurrencia o tiempo de supervivencia**

Se contabilizó también en meses contando desde el diagnóstico anatómo-patológico inicial hasta la confirmación histológica de una recidiva o hasta la finalización del seguimiento si no hubo recidiva tumoral.

- **Tasa de recurrencia (TR), recidiva o nueva recidiva**

Se trata de un coeficiente que se define como el n° de recurrencias confirmadas dividido por los meses de seguimiento y multiplicando la cantidad resultante x100. A la ausencia de recurrencias se le asignó un valor "0" si el seguimiento fue superior a 5 años, y un valor de "0.5" si éste fue menor de 5 años (entre 3 y 5).

4.2.2. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Para cada caso se procedió al estudio histológico exhaustivo de todas las secciones teñidas con H-E. Posteriormente, se revisó la histopatología de las neoplasias primarias y las recidivas a lo largo del seguimiento, valorándose los siguientes parámetros:

4.2.2.1. Grado histológico

En los informes anatómo-patológicos el grado histológico estaba asignado según los **criterios clásicos de la OMS, 1973** (Mostofi y cols., 1973), por 2 patólogos distintos. Inicialmente, se consideraron válidos para el estudio sólo aquellos casos diagnosticados de grado 1 de la OMS, mientras que los casos diagnosticados de grado 2 fueron revisados para seleccionar aquellos tumores mejor diferenciados (grado 2a de Bergkvist). De esta forma, fueron incluidos en el estudio un total de 18 casos grado 2a de Bergkvist, mientras que el resto de tumores "más indiferenciados" (grado 2b de Bergkvist) fueron excluidos del mismo. En definitiva, de los 120 casos totales, 102 eran grado 1 y 18 grado 2 (G2a).

Todos los casos de neoplasia de bajo grado histológico fueron revisados de nuevo por 2 patólogos distintos, los cuales asignaron un nuevo grado histológico conforme a la **clasificación de consenso de la OMS/ISUP (1998-9): neoplasias de Bajo Potencial Maligno (BPM) y neoplasias de Bajo Grado (BG)**. En concreto, uno de los patólogos valoró el grado secundario (diagnóstico 1): grado más elevado del tumor o zona tumoral más atípica, y el otro tuvo en consideración el grado primario (diagnóstico 2): grado predominante en la mayor parte del tumor. Todo ello según los criterios básicos aplicados en el último **sistema de clasificación en 2 números** de Cheng y cols. (2000a).

A partir de estos valores se elaboró indistintamente un **grado conjunto**, resultado de la suma de los 2 grados anteriores (diagnóstico 1+2). La definición de este grado conjunto resultó en 3 categorías distintas que se cuantificaron como: 1+1=2 (grado 1), 2+1/1+2=3 (grado 2) y 2+2=4 (grado 3), en relación con que a las neoplasias de BPM se les asignara un valor igual a 1 y a los carcinomas de BG un valor 2.

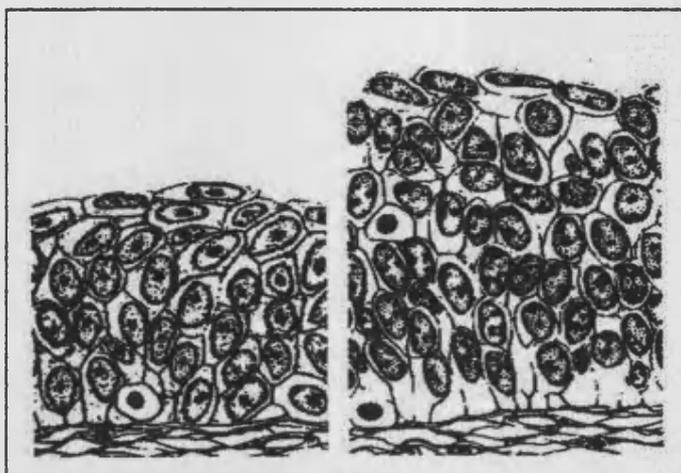


Figura 4.1. Esquema representativo de una neoplasia de bajo potencial maligno (izd.) y un carcinoma de bajo grado (dch.)

4.2.2.2. Estadío tumoral

Los 120 casos de nuestra serie fueron estadificados inicialmente según los **criterios clásicos de Jewett-Marshall (1956)**, y su correlato en la **clasificación de la OMS (1974-1992)**:

- 1- Tumores vesicales limitados a la mucosa (estadío 0 / pTa de la OMS).
- 2- Tumores con invasión de la lámina propia (estadío A / pT1 de la OMS).

Se diferenció entre tumores limitados a la mucosa (1), tumores con invasión focal de la lámina propia (2) y tumores con invasión difusa de la lámina propia (3), según los criterios de la nueva **clasificación consensuada de la OMS/ISUP (1998-9)**.

Ninguno de los casos de nuestro estudio invadía inicialmente la muscular propia de la vejiga (estadío B / pT2-3a).

4.2.2.3. Progresión tumoral

Se consideró progresión tumoral a la presencia en las recidivas neoplásicas de:

- Progresión en estadío con invasión de la capa muscular propia de la vejiga.

- Progresión en grado hasta neoplasias de alto grado (NAG) de la OMS/ISUP (1998), es decir, progresión a un grado superior de desdiferenciación (grados clásicos 2b y 3; OMS grado 2 y 3 de la clasificación de Consenso, 1998).

Inicialmente, la progresión tumoral fue informada subjetivamente por el patólogo en las recidivas tumorales. Sin embargo, mediante técnicas cuantitativas por análisis de imagen se confirmó objetivamente un incremento notable en el área nuclear (ANM y DEANM), el perímetro nuclear (PNM y DEPNM) y la ploidía tumoral en todas las zonas del tumor.

Estos resultados fueron confirmados al compararlos con el promedio de un estudio cuantitativo realizado en 20 casos de carcinomas vesicales de AG (NAG) seleccionados previamente, como puede observarse en la tabla siguiente:

Tabla 4.1. Estudio cuantitativo comparativo según las diferentes zonas tumorales de 20 carcinomas de alto grado (OMS grado 2, 1998) y los 7 casos de nuestro estudio con progresión en el grado histológico

Grado 2(b) (22 casos)	ANM (μm^2)	DEANM	PNM (μm^2)	DEPNM	FF	DEFF	Ploidía
Z1	37.8	8.59	24.9	3.61	0.77	0.09	Diploide (14) Hiperdiploide (8)
Z2	40	8.8	26	3.82	0.76	0.09	Diploide (10) Hiperdiploide (12)
Z3	73.6	11.8	35.5	4.12	0.76	0.08	No diploide (22)
Z4	26.3	4	20.7	2.14	0.79	0.09	Diploide (22)
Progresión en grado (7 casos)	ANM (μm^2)	DEANM	PNM (μm^2)	DEPNM	FF	DEFF	Ploidía
Z1	38.4	10.9	26.1	3.52	0.70	0.08	Diploide (4) Hiperdiploide (3)
Z2	40.9	11.2	26.7	3.88	0.70	0.07	Diploide (5) Hiperdiploide (2)
Z3	71.8	14.2	34.9	4.68	0.69	0.08	No diploide (7)
Z4	29.9	5.1	23.8	1.99	0.77	0.09	Diploide (7)

4.2.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

4.2.3.1. Técnica de inmunotinción

Se seleccionaron en primer lugar las secciones tumorales más representativas en función de que incluyeran las áreas más atípicas, tanto celular como arquitecturalmente.

Se realizaron cortes de 3 micras en los bloques seleccionados.

La técnica empleada fue la técnica de avidina-biotina-inmunoperoxidasa (ABC) descrita por Hsu SM y cols. (1981) aunque con las siguientes modificaciones:

1º) Desparafinización: Consistió en *calentar* las preparaciones 12-24 horas en la estufa de 37°C, y 45 min más en la estufa de 60°C. Posteriormente, se incluyeron dichas secciones en xilol durante 20 min (varios pasos).

2º) Hidratación con *alcoholes* decrecientes (varios pasos) de 90, 80 y 70%, y lavados en agua corriente y destilada.

3º) Pretratamiento de recuperación antigénica: Se utilizó una *solución tampón específica (tampón citrato)* diluida 1/10 en agua destilada, se introdujeron las secciones en esta solución y después en un autoclave ("*Microclave Selecta*") hasta una presión de 1.5 atmósferas durante 5 min. Luego, se llevó a cabo la descompresión y el enfriamiento *lento* de los preparados. Una vez enfriados en un baño con agua corriente, las secciones se lavaron de nuevo con agua destilada.

4º) Inhibición de la peroxidasa endógena con 97 volúmenes de *metanol* al 2% por 3 volúmenes de *agua oxigenada* a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez pasado este tiempo se lavaron de nuevo en agua destilada.

5º) Se secaron los cristales y se cerclaron las preparaciones con "*sigmacote*" (Sigma co) rodeando el corte para evitar así la expansión del anticuerpo (Ac).

6º) Bloqueo de la colágena tisular para evitar la unión de las inmunoglobulinas al estroma. Para ello se utilizaron 2 volúmenes de *suero de caballo* por cada 8 de *suero fisiológico* en una solución final al 20% y se dejó durante 20 min.

7°) Se voltearon los preparados y **sin lavarlos** se añadió el Ac primario, el cual se incubó 45 min a temperatura ambiente.

8°) Se lavaron 3 veces las preparaciones con PBS y se incubó seguidamente con el Ac secundario (dilución 1:100 en suero de caballo al 10%) durante 30 min. El tipo de Ac secundario varió según el origen del Ac Primario fuera "*mouse*" o "*rabbit*" (Tabla 4.2).

9°) Se lavaron las preparaciones 3 veces con PBS y se añadió el complejo ABC durante 30 min (este complejo se preparó con 30 min de antelación).

10°) Se volvieron a lavar las preparaciones 3 veces con PBS y se procedió a continuación al revelado de la reacción mediante una solución de *diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica (DAB)* en un tampón de *tris-clorhídrico* 0.2 M hasta un $\text{pH}=7$. Una vez ajustado el pH se añadió la DAB y por último el *agua oxigenada pura* de 110 volúmenes (para 100 ml de Tris se utilizan 75 mg de DAB y 50 microlitros de agua oxigenada). Durante el revelado las preparaciones se protegieron de la luz en la estufa de 37°C durante 5 min y al acabar el revelado se lavó con agua corriente y se vertió el líquido de revelado en un recipiente con lejía, cuidando de limpiar correctamente todos los instrumentos reutilizables que hubieran estado en contacto con la DAB.

11°) Se contrastaron los núcleos con hematoxilina de Harris durante 30 seg, se deshidrataron los cortes con alcoholes crecientes y finalmente se realizaron varios pasos en xilol y se montaron los cubreobjetos con "*entellan*" (Merck co).

4.2.3.2. Control y valoración de los resultados

La valoración de la positividad de un tumor frente a un Ac determinado depende del tipo de Ac (clon específico utilizado), del valor umbral positivo considerado, etc.

Asimismo, como control de calidad de la muestra se utilizó un control interno (en el tumor o en los tejidos no tumorales incluidos en la muestra) y un control externo (otro tumor de inmunofenotipo conocido).

Para cada Ac se utilizó también un control positivo y un control negativo, ambos de positividad o negatividad conocidas previamente:

Control positivo: Consistió en la realización de la técnica IHQ completa sobre una sección tisular de positividad conocida para cada Ac. De esta forma se facilitó la reproductibilidad del método y aumentó la consistencia de los resultados.

Control negativo: Consistió en incubar una sección tisular idéntica a la del control positivo, omitiendo en unos casos el Ac primario y en otros el Ac secundario, y sustituyéndolos ambos por suero de caballo al 10% en cada caso.

- **Ki-67 (MIB-1)**

Este Ac reacciona específicamente con un epitopo del Ag nuclear Ki-67, el cual se expresa únicamente en las células en ciclo (fases G1, S, G2 y M). Isotipo IgG1 (Cattoretti y cols., 1992). La reactividad es exclusivamente nuclear y de gran utilidad en la investigación de la fracción de crecimiento tumoral o *índice Ki-67·MIB-1*. En nuestro estudio se utilizó la dilución recomendada por BIOMEDA de 1:50 (Tabla 4.2).

Se consideró positiva una reactividad nuclear intensa o moderada, o bien una reactividad débil con un marcaje intenso de los nucleolos. Por el contrario, se consideraron negativos los núcleos arreactivos o con marcaje débil junto a nucleolos débil o moderadamente marcados.

Se contabilizaron las áreas de mayor densidad de núcleos positivos y se valoraron 1000 núcleos por cada caso (500 de la porción vegetante del tumor y otros 500 en la base tumoral).

En el tumor se consideró también la distribución del índice proliferativo dentro de las papilas: 1- proliferación en la capa basal (células basales). 2- proliferación en el resto de capas (células basales y/o superficiales).

Según la tasa global de positividad en ‰ se crearon otras 4 categorías distintas: 1- (0-50‰). 2- (51-100‰). 3- (101-150‰). 4- (≥151‰).

La distribución de áreas proliferativas según las diferentes zonas del tumor fue:

- **Distribución 1** (*Fontana D y cols., 1992*): 1) Distribución apical o vegetante. 2) Distribución mixta o en la base de implantación.
- **Distribución 2** (*Mulder AH y cols., 1992*): 1) Distribución capa basal. 2) Distribución mixta. 3) Distribución superficial o difusa (en todas las capas o en las capas superficiales).

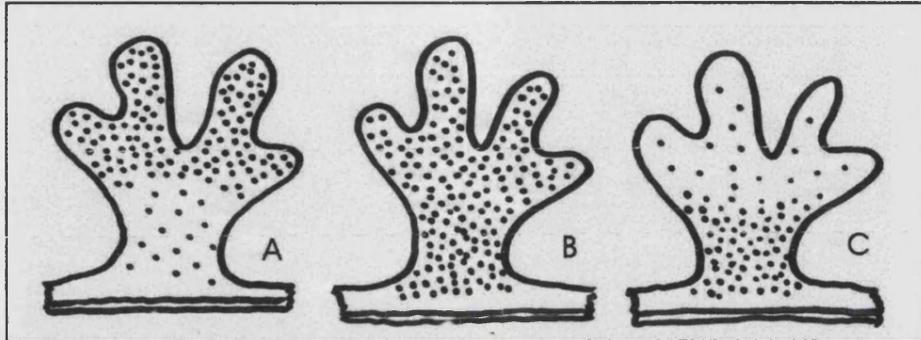


Figura 4.2. Distribución 1: A-Apical o vegetante B-Difusa C-Basal

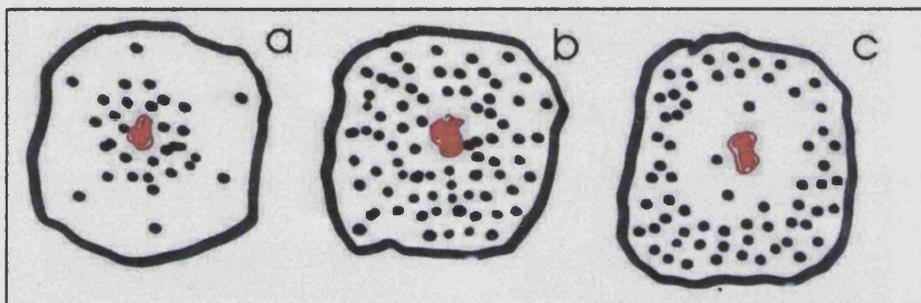


Figura 4.3. Distribución 2: a-Basal. b-Difusa. c-Superficial

- **Proteína p53 (clon DO7)**

Este Ac reconoce un epítipo del extremo amino-terminal de la proteína p53 humana, isotipo IgG2b kappa (Vojtesek y cols., 1992). El Ac reacciona específicamente contra los tipos "salvaje" y "mutante" de la proteína p53, con una reactividad predominantemente nuclear. DAKO recomienda para este Ac una dilución comprendida entre 1:50 y 1:100. En nuestro estudio se utilizó una dilución 1:50 (Tabla 4.2).

Se consideraron positivas las células tumorales con reactividad nuclear intensa o moderada, mientras que los núcleos arreactivos o con reactividad débil se consideraron negativos. Se consideraron, asimismo, diferentes niveles de positividad de acuerdo con estudios anteriores (0, 10 y 20%), preferentemente en las áreas tumorales donde se apreció subjetivamente una mayor densidad de núcleos positivos.

- **Bcl-2 (clon 124)**

Este Ac reacciona de forma específica contra la oncoproteína bcl-2 a nivel citoplasmático. Isotipo IgG1-kappa (Pezzella y cols., 1990). La dilución recomendable según DAKO varía entre 1:40 y 1:80. En el presente estudio se utilizó una dilución 1:50 (Tabla 4.2).

Se consideraron positivas las células tumorales que mostraron reacción citoplasmática moderada o intensa mientras que las células arreactivas, con tinción débil o con reactividad nuclear se consideraron negativas. Se diferenciaron, asimismo, 3 patrones específicos de tinción: 1- Ausencia de reacción. 2- Positividad en la capa basal. 3- Positividad en las capas superficiales no basales (intermedias y apicales). El nivel mínimo de positividad se determinó en el 5% y como control positivo interno se utilizó el urotelio normal y los linfocitos de la submucosa.

- **CerbB-2 (clon CB11)**

Este Ac reacciona específicamente con un péptido en un lugar del dominio interno de la oncoproteína c-erbB-2, siendo un patrón de tinción de membrana y citoplasmático. Isotipo IgG1 (Corbett y cols., 1990). NOVOCASTRA recomienda una dilución 1:40, que fue la misma que se utilizó en nuestro estudio.

Se consideraron positivas las células tumorales con una reactividad de membrana intensa o moderada y negativas las células arreactivas o con positividad débil. Se consideraron 2 niveles de positividad: 0% y 30%.

- **Citoqueratina basal (clon 34BE12)**

Este Ac identifica queratinas de alto peso molecular (66Kd y 57Kd) específicas contra las citoqueratinas 1, 5, 10 y 14 (isotipo IgG1, Kappa). La dilución recomendada por DAKO es entre 1:25 y 1:50. En el presente estudio se utilizó una dilución de 1:40 (Gown y Vogel, 1982).

Se valoró por un lado la distribución de la reactividad en las papilas tumorales, distinguiendo: 1- una distribución basal en las células situadas junto al eje conectivo vascular central, 2- una distribución difusa en todas las capas del urotelio, y 3- una distribución mixta si ocupaba entre el 40 y el 60% del total. Se consideró por tanto que un patrón de positividad era basal o difuso si ocupaba >60% del tumor

No hubo casos negativos y como control positivo interno se observó positividad en las capas basales del urotelio normal.

Tabla 4.2. Relación de los anticuerpos utilizados en nuestro estudio

	Clon	Casa comercial	Dilución	Origen	mw
CK-basal	34βE1,2	DAKO	1/50	monoclonal	sí
C-erbB-2	CB11	NOVOCASTRA	1/40	monoclonal	sí
Bcl-2	124	DAKO	1/50	monoclonal	sí
P53	DO-7	DAKO	1/50	monoclonal	sí
Ki-67-MIB-1	MIB-1	BIOMEDA	1/50	monoclonal	sí

4.2.4. MÉTODOS EN PATOLOGÍA CUANTITATIVA

4.2.4.1. Análisis de imagen

Los estudios cuantitativos (morfométricos y citométricos) se llevaron a cabo mediante el sistema de *análisis de imagen CUE-2 (Olympus)*. Este sistema se compone de los siguientes elementos:

1. Un dispositivo de captación de la imagen (cámara de vídeo CCD).
2. Un dispositivo para la visualización de imágenes (monitor de vídeo).
3. Un procesador digital de imágenes que transforma la imagen inicial en otra imagen digitalizada que facilita su posterior manipulación.
4. Un microscopio Olympus modelo BH-2 con tubo adaptador para la cámara de vídeo.
5. Un ordenador equipado con un "software" para el análisis, manipulación, almacenaje y transmisión de la imagen.

En concreto, el análisis digital de imágenes histológicas es un proceso continuo que consta de diferentes pasos:

- Adquisición de la imagen: CAPTACIÓN de los campos histológicos más representativos que posteriormente son transformados en una imagen digitalizada. La imagen se descompone en 512 intervalos, puntos o "pixels" a lo largo de 512 líneas horizontales y verticales en una escala de grises que va desde el negro (nivel 0) al blanco (nivel 255). Se utilizó siempre el **objetivo de 50x**.
- Procesado de la imagen: MAQUILLADO, REALCE o RESTAURACIÓN de la imagen digitalizada. Se mejora el contraste regulando la escala de grises y el nivel de luz del microscopio, y se elimina el "ruido de fondo" o interferencias generadas en la transmisión de la señal.
- Segmentación de la imagen: Se define un VALOR UMBRAL o "thresholding" en la escala de grises, de forma que los valores o pixels por encima de ese umbral son considerados parte constituyente del objeto y los valores por debajo se entienden como "ruido de fondo".

En el proceso de segmentación semiautomática se seleccionan los objetos a estudiar y se individualizan los elementos vecinos evitando el solapamiento.

Se delimitan, asimismo, los límites nucleares y la intensidad de luz, tomando como referencia un núcleo "ideal" dentro del conjunto de núcleos que se observan dentro de cada campo histológico.

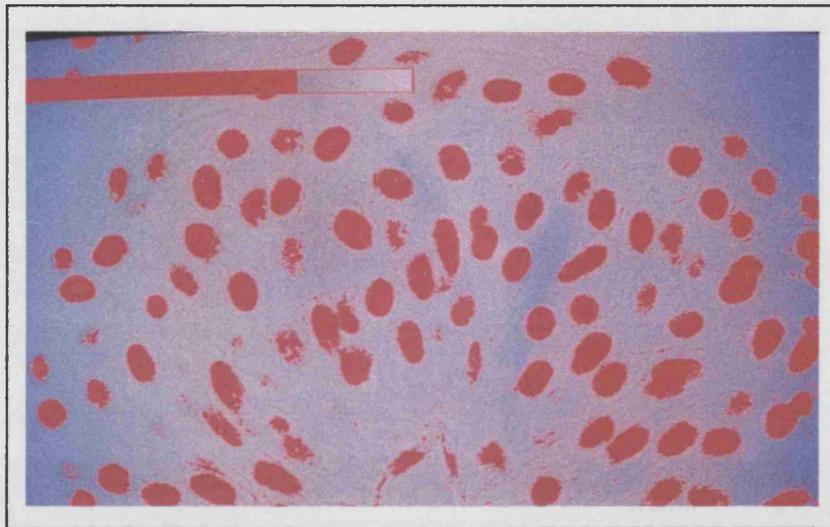


Figura 4.4. Definición gráfica del valor umbral o "thresholding"

- **Análisis de los objetos seleccionados:** Es el momento en que se realiza el VERDADERO ESTUDIO MORFOMÉTRICO de los casos. Los resultados obtenidos se almacenan en un banco de datos del ordenador y con posterioridad estos datos son filtrados y elaborados por un programa informático, quedando excluidos del estudio los casos que no cumplen una serie de criterios preestablecidos en el diseño inicial del trabajo y en relación con los datos recogidos en los distintas series publicadas previamente (Wells y cols., 1992; Hamilton y Allen, 1995).

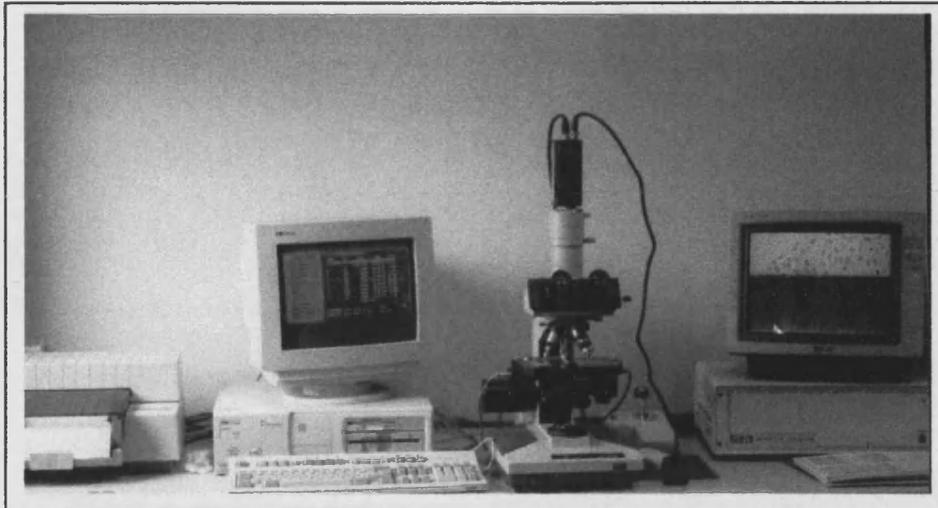


Figura 4.5. Analizador de imagen (Olympus)

4.2.4.2. Reacción de Feulgen.

Esta técnica histoquímica es el método más extendido en la realización de estudios morfométricos y citométricos. La reacción comprende 2 pasos fundamentales:

- Hidrólisis ácida del puente de purina (N-C1-desoxirribosa) presente únicamente en el ADN. En esta reacción se generan en potencia grupos aldehídos.
- Demostración química de los grupos aldehídos. Las purinas se disocian y los grupos C1-hidroxilo aparecen en las moléculas de desoxirribosa. Estos grupos se colorean con el "reactivo de Schiff", color magenta de la cromatina (Bancroft y Cook, 1994).

MÉTODO DE FEULGEN:

- 1- Desparafinar las secciones en la estufa de 37°C durante 24 horas y después en 3 pasos consecutivos en xilol.
- 2- Hidratar con alcoholes decrecientes (90-80-70%).
- 3- Lavar con agua destilada.
- 4- Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 3.5N a 37°C durante 40 min.
- 5- Lavar con agua corriente y destilada.
- 6- Añadir el "reactivo de Schiff" durante 30-60 min.

- 7- Lavar con agua corriente y destilada.
- 8- Deshidratar con alcoholes crecientes (70-80-90%).
- 9- Montar el cubreobjetos con "entellan" (Merck co).

4.2.4.3. Estudio morfométrico

Con técnicas de análisis de imagen se realizó un estudio morfométrico de planimetría y densitometría, en el cual se analizaron 4 parámetros distintos:

- Área nuclear media (ANM) \pm la desviación estándar (DE).
- Perímetro nuclear medio (PNM) \pm DE.
- Factor de forma (FF) o redondez \pm DE.
- Densidad óptica integrada (IOD) \pm DE.

Previamente, se habían seleccionado las áreas neoplásicas para el estudio. Se eligieron siempre las áreas tumorales subjetivamente más atípicas y dentro de éstas se consideraron, a su vez, las siguientes zonas:

- ZONA 1 (Z1): Se corresponde con los núcleos de las células de capas intermedias en papilas cortadas transversalmente, sin considerar las células más superficiales o "células paraguas".

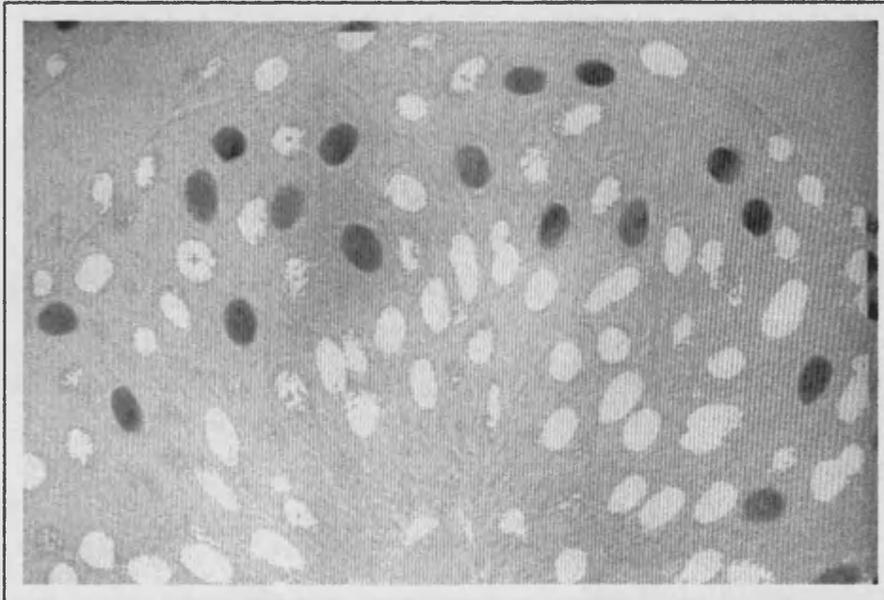


Figura 4.6. Zona papilar externa o zona 1 (Z1)

- **ZONA 2 (Z2):** Dentro de las mismas papilas cortadas transversalmente se midieron los núcleos de las células basales y parabasales.

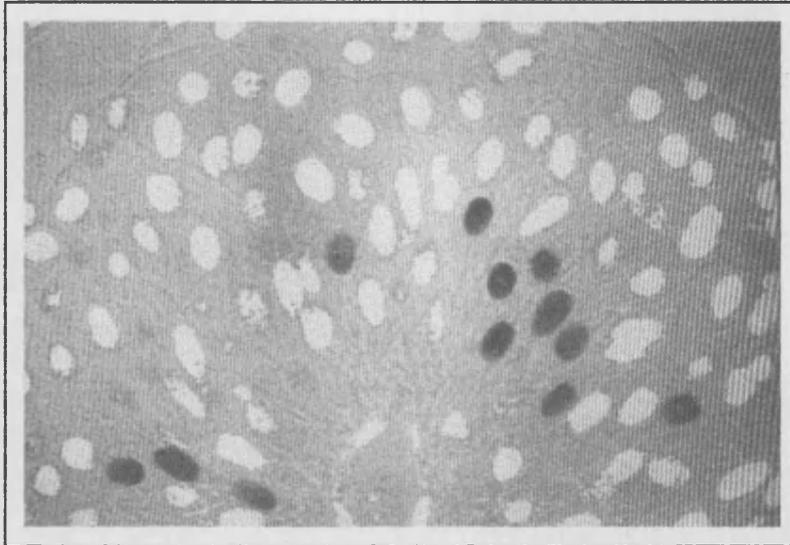


Figura 4.7. Zona papilar interna o zona 2 (Z2)

- **ZONA 3 (Z3 ó Z10a):** Se corresponde con los 10 núcleos más atípicos, independientemente de su localización y de cómo estuviera orientada la sección de la papila (transversal, longitudinal u oblicua). Se rechazaron las "células paraguas" de las capas más superficiales.

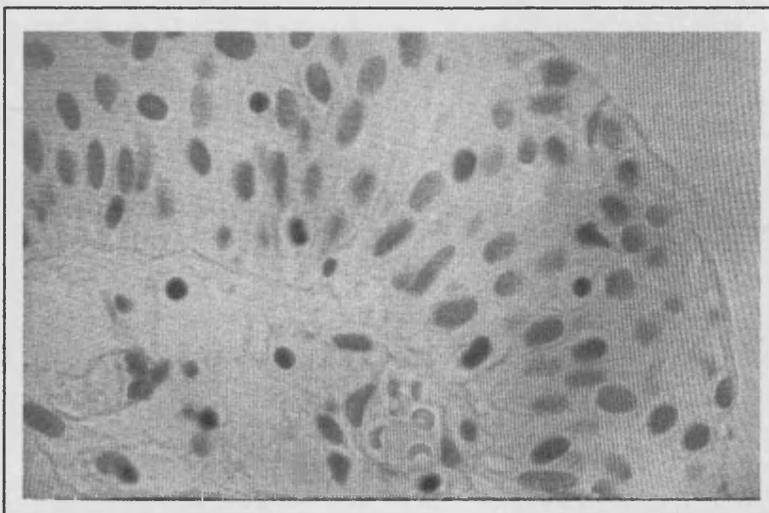


Figura 4.8. Zona papilar atípica, zona 3 o Z10 (Z3)

- **ZONA 4 (Z4 ó z10b):** Correspondiente a los 10 núcleos de menor tamaño independientemente de cómo estuvieran cortadas las papilas.

Los resultados de todas las áreas morfométricas se compararon, asimismo, con las medidas control de 7 PAPILOMAS y de 25 muestras de UROTELIO NORMAL:

Papiloma (7 casos)	ANM	DEANM	PNM	DEPNM	FF	DEFF	Ploidía
Z1	26.1	4.94	21	2.73	0.76	0.09	Diploide (7)
Z2	27.5	5.06	21.5	2.76	0.76	0.09	Diploide (7)
Z3	39.1	6.41	26.3	3.22	0.74	0.09	Diploide (1) Hiperdiploide (6)
Z4	19.2	2.20	17.4	1.24	0.8	0.05	Diploide (7)
Urotelio Normal (25 casos)	25.1	4.27	20.5	2.53	0.76	0.09	Diploide (25)

**En el caso concreto del urotelio normal se consideró únicamente una zona, aunque se rechazaron de nuevo las células más superficiales.*

4.2.4.4. Estudio citométrico

Es el estudio de la CANTIDAD DE DNA, ÍNDICE DE DNA (I.D) o PLOIDÍA TUMORAL. La ploidía se determinó en nuestro estudio a partir de los valores densitométricos (IOD) de las zonas 1, 2 y 3. Como valor diploide interno de referencia se midieron 50-70 linfocitos intratumorales y se les adjudicó el valor "1". El factor de corrección del valor diploide era incluido automáticamente por el programa informático.

Para cada caso se cuantificó el I.D de 100-150 núcleos en Z1 y Z2, escogiendo las áreas subjetivamente más atípicas y mejor conservadas. Se cuantificó, asimismo, el I.D de los 10 núcleos más atípicos (Z3), los cuales resultaron ser también los de mayor área; y de los 10 núcleos de menor tamaño (Z4).

La sistemática utilizada fue dividir el valor del canal problema por el valor del canal diploide de referencia en función del IOD. El resultado obtenido se valoró según los criterios definidos por Bocking y cols. (1984) y recogidos en la "Reunión de consenso de métodos en Patología Cuantitativa" (Böcking y cols., 1995):

- 1- **Valor Diploide (2c):** I.D = 0.9 > 1.10.
- 2- **Valor Hiperdiploide:** I.D = 1.11 > 1.39.
- 3- **Valor Triploide (3c):** I.D = 1.40 > 1.60.
- 4- **Valor Hipertriploide:** I.D = 1.61 > 1.89.
- 5- **Valor Tetraploide (4c):** I.D = 1.90 > 2.10.
- 6- **Valor Hipertetraploide:** I.D = 2.11 > 2.39.
- 7- **Valor >5c:** I.D > 2.40.

Para facilitar el manejo de los resultados en ocasiones se utilizó el término Aneuploide para definir aquellos casos que no eran diploides ni tetraploides; aunque, con mayor frecuencia lo que se hizo fue considerar en una misma categoría a los valores diploides e hiperdiploides y en otra al resto de valores con I.D no diploide ni hiperdiploide.

4.2.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

4.2.5.1.Generalidades

Se realizaron estudios estadísticos de tipo bivariante (univariante) y multivariante (multivariable) con ayuda de un programa informático para Windows.

Los resultados fueron introducidos en una hoja de cálculo "Excel", donde los datos se dispusieron en tablas según una serie de variables codificadas con caracteres numéricos (variables cuantitativas y semicuantitativas):

<u>Variable</u>	<u>Subdivisiones</u>
1. Edad	(años)
2. Sexo	1.Mujer 2.Varón
3. Grado histológico	1.Grado 1 2.Grado 2a
4. Estadío tumoral	1.Limitado mucosa 2.Invasión focal LP 3.Invasión difusa LP
5. Diagnóstico 1	1.BPM 2.BG
6. Diagnóstico 2	1.BPM 2.BG
7. Tratamiento adyuvante	1.No 2.Sí (MMC/Thiotepa/BCG)
8. Tamaño tumoral	(centímetros)
9. Tiempo de seguimiento	(meses)
10.Número recurrencias	(variable numérica cardinal)
11.Tasa de recurrencia (TR)	(variable numérica con decimales)
12.Intervalo libre enfermedad (ILE)	(meses)
13.Progresión tumoral	1.No 2.Sí
14.Número de tumores	1.Único (1) 2.Múltiple (2 ó más)
15.Grados clínicos de Parmar	1.Único y recurrencia tardía 2.Único y recurrencia precoz / múltiple y recurrencia tardía 3.Múltiple y recurrencia precoz
16.Z1-ANM	(variable numérica con decimales)
⇩	⇩

↓	↓
39.Z4-FFDE	(variable numérica con decimales)
40.Z1-Ploidía	1.Diploide 2.Hiperdiploide 3.Triploide 4.Hipertriploide 5.Tetraploide 6.Hiperploide 7. >5c
41.Z2-Ploidía	(ídem)
42.Z3-Ploidía	(ídem)
43.Citoqueratina basal	1.Distribución basal 2.Mixta 3.Distribución difusa
44.Bcl-2	1.Negativo 2.Positivo células basales 3.Positivo resto de capas
45.C-erbB-2	1.Negativo (< 30%) 2.Positivo (≥30%)
46.C-erbB-2	(%)
47.P53	(%)
48.P53	1.Negativo (< 10%) 2.Positivo (≥10%)
49.P53	1.Negativo (< 20%) 2.Positivo (≥20%)
50.Ki-67 (MIB-1)	(%)
51.Ki-67 (MIB-1)	1.Distribución apical o vegetante 2.Distribución base tumoral o difusa
52.Ki-67 (MIB-1)	1.Distribución capa células basales 2.Distribución mixta 3.Distribución resto de capas

A continuación se representa el modelo técnico de ficha empleado en nuestro estudio de investigación:

DATOS GENERALES

PACIENTE EDAD SEXO

1 69 2

Grado Histológico 1 Estadio Tumoral 1

Patólogo 1 2

Tamaño 1.5

Patólogo 2 2

Tratamiento 2(MMC)

DATOS PRONÓSTICOS

Seguimiento 128

Tasa Recurrencia 1.56

n° recurrencias 2

ILE 36

Progresión 1

Parmar 1

ESTUDIO CUANTITATIVO

Z1-ANM	34	Z1-SDANM	5.7	Z3-ANM	60	Z3-ANMSD	6
Z1-PNM	22	Z1-SDPNM	1.9	Z3-PNM	30	Z3-PNMSD	2
Z1-FF	0.9	Z1-SDFF	0.06	Z3-FF	0.9	Z3-FFSD	0.07
Z2-ANM	35	Z2-ANMSD	5.5	Z4-ANM	25	Z4-ANMSD	4
Z2-PNM	22	Z2-PNMSD	1.8	Z4-PNM	19	Z4-PNMSD	1
Z2-FF	0.9	Z2-FFSD	0.05	Z4-FF	0.9	Z4-FFSD	0.05

Z1-Ploidía 1

Z2-Ploidía 1

Z3-Ploidía 4

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

CKbasal 3

Cerb-2 (0%) 2

P53 (%) 5

BCL-2 2

Cerb-2(30%) 40

P53(10%) 1

P53(20%) 1

Ki-67(MIB-1) 103

Ki-67(distr-1) 2

Ki-67(1-4) 3

Ki-67(distr-2) 1

Finalmente, se procedió a la definición exacta de los **grupos pronósticos o reales** de forma retrospectiva a partir de los datos obtenidos del seguimiento. A estos 2 grupos se les denominó: Bajo Potencial Maligno *real* (**BPMr**) y Bajo Grado *real* (**BGr**):

- **BPMr**: Se define así a aquellos tumores que presentan una TR < 1, ILE >9 meses, y ausencia de progresión tumoral.
- **BGr**: Se define así a los tumores que no cumplan alguna de las condiciones anteriores.

4.2.5.2. Análisis descriptivo

Este análisis contiene, en formato de tablas, la distribución de frecuencias de todos los factores registrados en el estudio, sobre todo la media y la desviación estándar (DE).

4.2.5.3. Análisis bivariante

Se utilizaron técnicas estadísticas PARAMÉTRICAS y NO PARAMÉTRICAS en función de cada comparación y el tamaño de las muestras:

- **Prueba χ^2 de Pearson**: Prueba de asociación o dependencia entre 2 variables categóricas. Por ejemplo, contrastar el nivel de dependencia de la variable n° de tumores respecto a los grupos pronósticos reales.
- **Prueba U de Mann-Whitney**: Se usa para muestras independientes y contrasta la Homogeneidad en la distribución de una variable (cuando menos ordinal). Por ejemplo, contrastar si los pacientes del grupo pronóstico BPMr presentan diferencias significativas respecto a los de BGr.
- **Test de la t-Student**: Contrasta la igualdad de la media de una variable de distribución normal en 2 muestras independientes. Por ejemplo, comprobar si la distribución de los grupos BPMr y BGr depende de la edad.

4.2.5.4. Análisis multivariante

- **Prueba de la Normalidad de Kolmogorov-Smirnov:** Sirve para contrastar si una variable sigue o no una distribución normal.
- **Estudio de regresión logística:** Predice una variable binaria dependiente desde un conjunto de variables independientes, para determinar así la probabilidad de un determinado suceso. Por ejemplo, se usa para determinar la influencia de los factores independientes sobre los grupos pronósticos reales, los cuales son entre sí variables binarias dependientes. Este modelo logístico expresa el "odds" como una función exponencial de las variables independientes, es decir, la razón entre la probabilidad (p) de tener un BPMr o un BGr.
- **Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier:** Estudia el comportamiento de los diferentes factores pronósticos (ILE, TR y progresión) para comprobar si la distribución de algún otro factor independiente genera o no curvas de supervivencia significativamente distintas. Concretamente, se utiliza el test del logaritmo del rango o probabilidad de que un paciente llegue libre de enfermedad a un determinado tiempo desde la primera intervención.
- **Análisis de regresión de Cox:** Permite la estimación de parámetros relacionados con el riesgo que tiene un paciente por tener unas características clínico-patológicas determinadas. Se usa el "Método de Selección paso a paso hacia delante", con criterios de máxima verosimilitud, es decir, que inicialmente todas las variables significativas están fuera del modelo y en cada interacción se incorpora una variable al mismo. El proceso se detiene cuando no quedan más variables que incorporar.
- **Regresión lineal múltiple:** Se utiliza para predecir el valor de una variable continua (por ejemplo la TR) como función lineal de una serie de covariables independientes. Con este modelo se identifica la relación lineal exacta que liga

las variables, y se obtiene una expresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$, donde Y es la variable dependiente de interés (TR) y la X_i son los factores independientes. El parámetro β es el coeficiente de regresión que estimará el modelo. Para la estimación de la bondad del ajuste utilizaremos el valor del coeficiente de determinación R^2 . Asimismo, se aplicará una validación de los residuos del modelo para verificar las hipótesis del modelo lineal teórico (normalidad, heterocedasticidad).

En todos estos estudios se consideró un nivel "p" de significatividad del 5% ($\alpha=0.05$), de manera que valores con **$p < 0.05$** indica una relación estadísticamente significativa.

Algunas de las variables estudiadas han sido recodificadas en 2, 3, ó 4 categorías o intervalos para evitar la dispersión de los resultados al cruzar las distintas variables. Además, así se facilita la interpretación de los mismos y se aumenta la fiabilidad en la aplicación de los tests.

Si alguno de los cruces incluía un número reducido de casos se tuvo que acudir necesariamente a las tablas del estudio estadístico descriptivo ya que, en ese caso, no es posible aplicar con confianza los tests.



5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO GENERAL

Mediante este estudio se obtiene una distribución simple de las frecuencias de todas las variables (medias, desviaciones estándar, etc.).

5.1.1. DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS

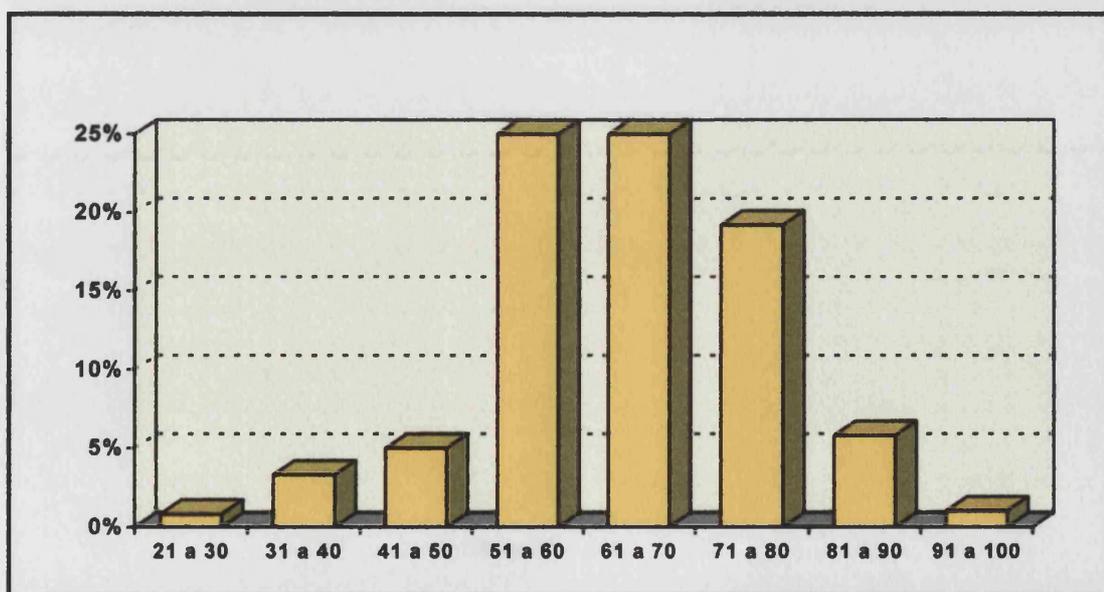
5.1.1.1. Sexo

De los 120 casos de nuestro estudio 101 pacientes (84%) eran varones y 19 (16%) mujeres. Por tanto, la distribución es favorable al sexo masculino con una relación aproximada de **5:1**.

5.1.1.2. Edad

La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico fue de **63.6 años** (DE: 11.7), siendo ligeramente superior en la mujer (66.4 ± 11) que en el varón (63.1 ± 11.8). La mayor parte de los casos se situó en el intervalo comprendido entre los 51 y los 80 años (*Gráfica 5.1*).

Gráfica 5.1. Distribución del número total de recurrencias según la EDAD



5.1.1.3. Grado histológico

Según el **grado histológico clásico** (Mostofi y cols., 1973), 102 casos fueron diagnosticados de G1 (85%) y 18 casos (15%) de G2 (G2a de la clasificación escandinava).

De acuerdo con la nueva **clasificación de consenso OMS/ISUP (1998)** y el **sistema de clasificación en 2 grados (Cheng y cols., 2000a)** el **diagnóstico 1** se basó en el grado tumoral más atípico (grado secundario), con el cual se diagnosticaron 45 casos (37.5%) de Bajo Potencial Maligno (BPM) y 75 casos (62.5%) de Bajo Grado (BG). Por su parte, el **diagnóstico 2** se basó en el grado primario o predominante y con éste se diagnosticaron 54 casos (45%) de BPM y 66 casos (55%) de BG. Por lo tanto, hubo coincidencia en el diagnóstico en 91 casos (75.8%) y discrepancia en los 29 restantes (24.2%), en los que existía un clon celular más indiferenciado (*Figuras 5.1 y 5.2*).

5.1.1.4. Estadío tumoral

Según las recomendaciones de la **clasificación de consenso OMS/ISUP (1998-9)** 88 casos (73.3%) eran tumores no invasivos limitados a la mucosa (Ta), 28 casos (23.3%) infiltraban focalmente la submucosa (T1f), y únicamente 4 (3.3%) mostraron infiltración difusa (T1d) (*Figura 5.3*).

5.1.1.5. Tamaño tumoral

El tamaño tumoral varió entre los 0.4 cm del tumor más pequeño y los 6 cm del más grande. El tamaño medio para los 120 casos fue de 2.19 ± 1.21 cm.

5.1.1.6. Tratamiento adyuvante intravesical (TAI)

De los 120 casos totales, en 64 (53.3%) no se constató ningún tipo de tratamiento a lo largo del seguimiento, y a los 56 restantes (47.7%) se les administró TAI con BCG (bacilo Calmette-Guerin) (20 casos), MMC (mitomicina C) (35 casos) o Thiotepa (1 caso).

5.1.2. DATOS PRONÓSTICOS (FUNCIONES DEL PRONÓSTICO)

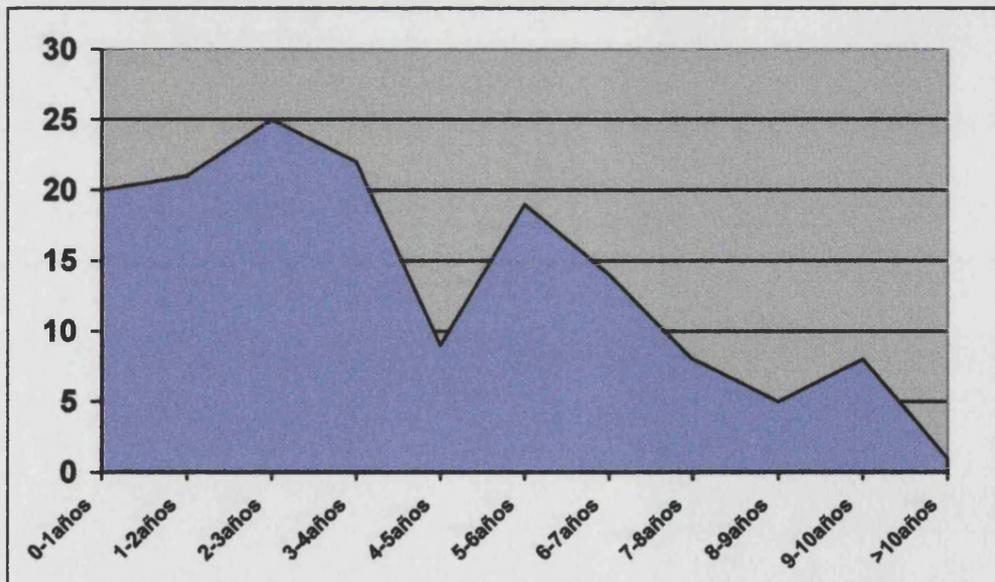
5.1.2.1. Seguimiento

El seguimiento clínico-patológico mínimo desde el diagnóstico inicial fue de 3 años, el caso con seguimiento más prolongado fue de 168 meses (14 años) y el seguimiento medio de los 120 casos fue de **76.6 meses (~6.5 años)**.

5.1.2.2. Recurrencias

Un total de 43 casos (35.8%) no presentaron recurrencias durante el seguimiento, y de éstos, 25 (58.1%) tuvieron un seguimiento superior a 5 años. Por otro lado, los 77 casos restantes (64.2%) presentaron al menos una recurrencia, con un promedio de 1.27 recurrencias en 6.3 años de seguimiento medio. La tasa de recurrencia (TR) media de los 120 casos fue de **1.69%**, y hubo **152 recurrencias totales**, que se distribuyeron según la siguiente gráfica (*Gráfica 5.2*):

Gráfica 5.2. Distribución temporal del número total de recurrencias



5.1.2.3. Intervalo libre de enfermedad (ILE), de recaída o recurrencia (tiempo de supervivencia)

El tiempo medio de Supervivencia de los pacientes fue de **42 meses**, dentro de un intervalo de confianza del 95% entre los 45 y los 58 meses. El tiempo de Supervivencia más corto fue de 3 meses y el más largo de 99 meses.

5.1.2.4. Progresión tumoral

De los 120 pacientes del estudio, **11 (9.16%)** mostraron progresión tumoral; y, de éstos, **7 (5.83%)** progresaron en grado hasta tumores de alto grado, y **4 (3.33%)** lo hicieron en estadío, con invasión de la capa muscular propia.

5.1.2.5. Grados clínicos "corregidos" de Parmar

En relación con éste parámetro clínico, 73 casos (60.84%) fueron diagnosticados como tumores Parmar grado 1 (tumor único con ILE>9 meses), 42 casos (35%) Parmar grado 2 (tumor único con ILE<9 meses, o bien tumor múltiple con ILE>9 meses), y sólo 5 casos (4.16%) fueron Parmar grado 3 (tumor múltiple con ILE<9 meses).

5.1.3. DATOS CUANTITATIVOS

5.1.3.1. Morfométricos

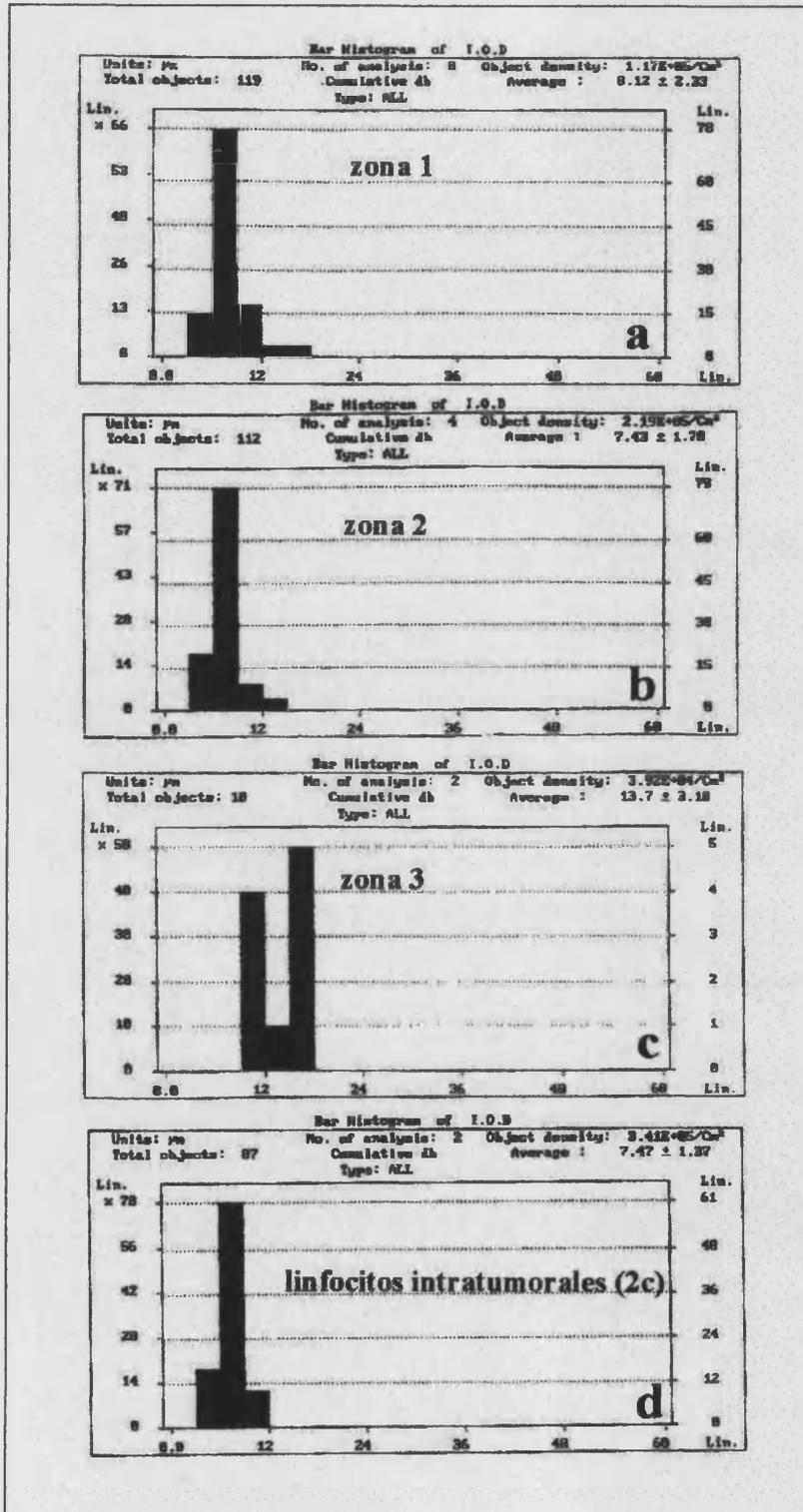
La media (M) y la desviación estándar (DE) de los 120 casos, así como la media de las DE (MDE) y su DE (DEMDE) se expresan en la siguiente tabla, donde se consideran 4 zonas tumorales distintas: Z1 y Z2 (porciones externa e interna de la papila), Z3 (10 núcleos más atípicos) (*Figura 5.4*), y Z4 (10 núcleos más pequeños). Estos valores se comparan con los promedios correspondientes a muestras de urotelio normal (25 casos), papilomas (7 casos) y carcinomas vesicales de alto grado (grado 2b de la clasificación escandinava o G2 de la OMS) (22 casos):

NBG (BPM/BG)	ANM±DE	DEANM±DE	PNM±DE	DEPNM±DE	FF±DE
Zona 1 (Z1)	30.3±6.36	4.17±1.69	22.7±3.25	2.41±1.28	0.75±0.09
Zona 2 (Z2)	31.8±6.64	4.46±1.90	23.5±3.57	2.54±1.35	0.74±0.10
Zona 3 (Z3)	55.3±8.14	8.66±3.11	30.9±3.32	3.04±1.05	0.74±0.09
Zona 4 (Z4)	21.3±2.62	3.00±0.95	18.6±1.70	3.00±0.95	0.79±0.08
Urotelio Normal	25.1±4.3		20.5±2.5		0.76±0.09
Papilomas					
Z1	26.1±4.9		21±2.7		0.76±0.09
Z2	27.5±5.1		21.5±2.8		0.76±0.09
Z3	39.1±6.4		26.3±3.22		0.74±0.09
Z4	19.2±2.2		17.4±1.2		0.8±0.05
Carcinomas AG					
Z1	37.8±8.6		25±3.6		0.77±0.09
Z2	40±8.8		26±3.8		0.76±0.09
Z3	73.6±11.8		35.5±4.1		1.8±0.08
Z4	26.3±4		21±2.1		0.79±0.09

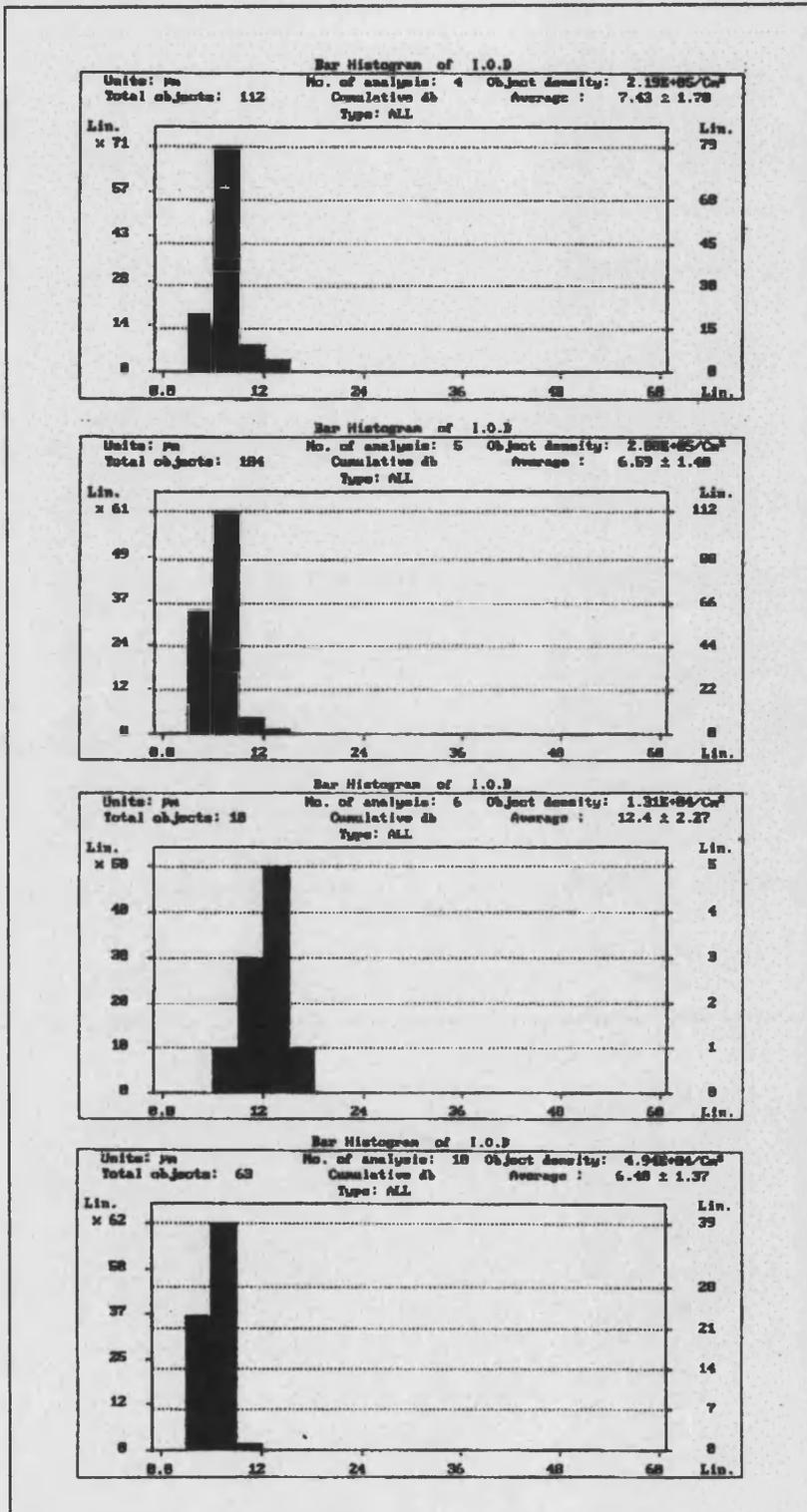
5.1.3.2. Citométricos

Por lo que respecta a los valores citométricos obtenidos por *citometría de imagen (CMI)*, las zonas tumorales 1 y 2 mostraron en general un contenido diploide de DNA, de hecho, sólo 9 casos (7.5%) de la zona 1 y 12 casos (10%) de la zona 2 presentaron un índice de DNA (I.D) superior a la diploidía. En cuanto a la zona 3 correspondiente a los 10 núcleos más atípicos, 109 casos (90.8%) mostraron un contenido no-diploide, mientras que sólo 11 casos (9.2%) fueron diploides (*Gráficas 5.3 a 5.6*).

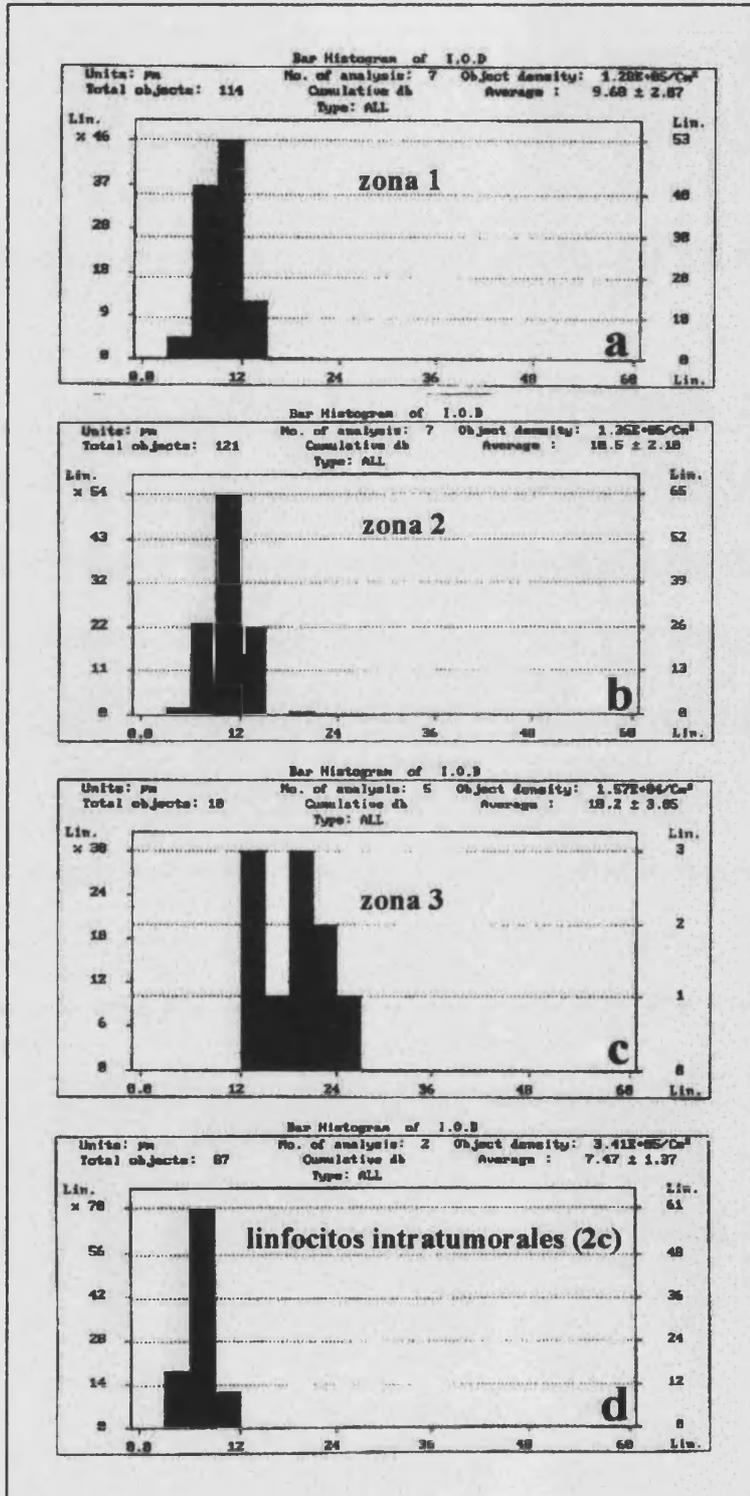
Gráfica 5.3. Histograma representativo del índice de integridad óptica integrada (I.O.D) perteneciente a un caso diploide en la zonas tumorales 1 y 2 (a y b), hipertriploide en Z3 (c), y linfocitos con índice de DNA (2c) conocido (d)



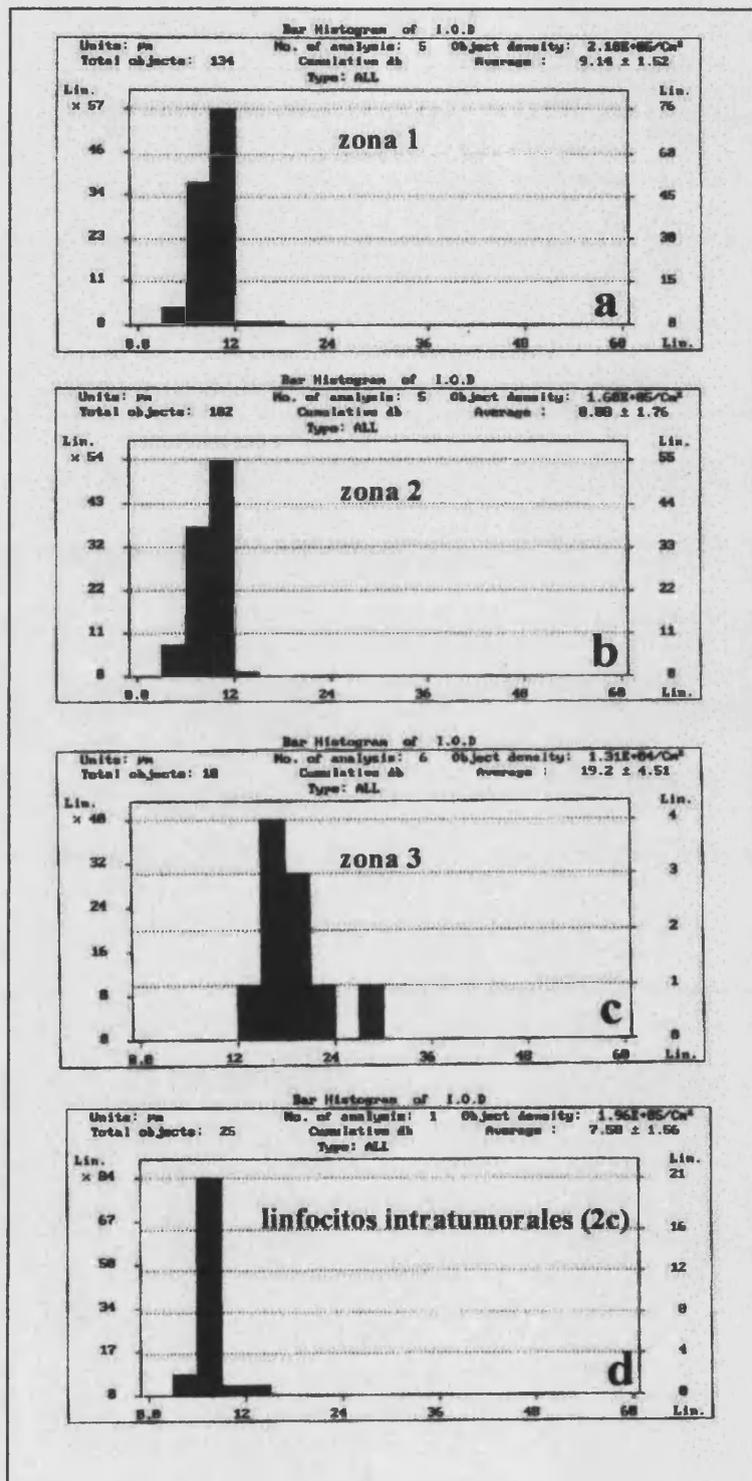
Gráfica 5.4. Histograma representativo del índice de integridad óptica integrada (I.O.D) perteneciente a un caso diploide en la zonas tumorales 1 y 2 (a y b), tetraploide en Z3 (c), y linfocitos con índice de DNA (2c) conocido (d)



Gráfica 5.5. Histograma representativo del índice de integridad óptica integrada (I.O.D) perteneciente a un caso hiperdiploide en Z1 (a), triploide en Z2 (b), hipertetraploide en Z3 (c), y linfocitos con índice de DNA (2c) conocido (d)



Gráfica 5.6. Histograma representativo del índice de integridad óptica integrada (I.O.D) perteneciente a un caso hiperdiploide en Z1 y Z2 (a y b), contenido de DNA >5c en Z3 (c), y linfocitos con índice de DNA (2c) conocido (d)



5.1.4. DATOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

5.1.4.1.P53

De los 120 casos estudiados, 39 (32.5%) mostraron ausencia total de reactividad (reactividad 0%), mientras que los 81 casos restantes (67.5%) mostraron alguna reactividad (>0%) (Figura 5.5).

La media global de positividad de los 120 casos fue de 6.78%.

Situando el nivel de positividad en el 10%, 36 casos (30%) resultaron positivos y 84 (70%) negativos, con el corte en el 20% sólo 15 casos (12.5%) fueron positivos, mientras que con el punto de corte en el 15% resultaron positivos 25 casos (20.8%).

5.1.4.2.Bcl-2

Del total de casos, 83 (69.2%) presentaron negatividad para Bcl-2, 25 casos (20.8%) mostraron positividad en células basales y los 12 casos restantes (10%) fueron positivos en células no-basales (capas intermedias y superficiales).

Por tanto, 37 casos (30.8%) mostraron algún tipo de positividad para bcl-2 (Figura 5.6).

5.1.4.3.Ki-67 (MIB-1)

La media y la desviación estándar para el índice proliferativo Ki-67(MIB-1) fue de 107.6±50%.

Considerando los grupos definidos en 4 categorías (0-50, 51-100, 101-150, >150) resultó que 12 casos (10%) pertenecían a la *primera categoría*, 49 casos (40.8%) a la *segunda*, 34 casos (28.3%) a la *tercera* y 25 (20.8%) a la *última categoría* con más del 15% (150%) de núcleos en división.

Si los grupos se definen según la distribución 1, 38 casos (31.7%) mostraron mayor índice proliferativo en el *área apical o vegetante* y 82 (68.3%) en la *base tumoral o de forma difusa* por todo el tumor. Finalmente, según la distribución 2, 65 casos (54.1%) mostraron proliferación en las *células basales*, 26 casos (21.7%) en el *resto de células* y 29 casos (24.2%) presentaron una *distribución mixta* (Figura 5.7).

5.1.4.4.C-erbB-2

Si se considera la tasa total de células positivas (nivel de corte en el 0%), sólo 10 casos (8.3%) presentaron ausencia total de expresión y los 110 casos restantes (91.7%) mostraron una expresión variable de c-erbB-2 (Figura 5.8).

Teniendo en cuenta un nivel de corte del 30%, 77 casos resultaron negativos (64.2%) y 43 positivos (35.8%).

5.1.4.5.Citoqueratina basal (clon Mab 34βE12)

De los 120 casos, 21 (17.5%) mostraron una expresión basal, 82 casos (68.3%) expresión difusa y 17 casos (14.2%) expresión mixta (Figura 5.9).

5.1.4.6.Bcl-2 (+) / P53(15%)

Considerando únicamente los 37 casos positivos para Bcl-2, 25 (67.6%) presentaron positividad en la capa de células basales y de éstos 21 (84%) fueron negativos para p53 y 4 (16%) fueron positivos.

Por otro lado, de los 12 casos (32.4%) que mostraron positividad para bcl-2 en células no basales, 8 (66.6%) fueron negativos para p53 y 4 (33.3%) fueron positivos:

<i>Bcl-2 (+) / P53</i>	P53 (-)	P53(+)	Total
Bcl-2 (+) Basal	21 (84%)	4 (16%)	25 (100%)
Bcl-2 (+) No Basal	8 (66.6%)	4 (33.3%)	12 (100%)
Total	29 (100%)	8 (100%)	37 (100%)

5.1.4.7.CK basal / Ki-67 (MIB-1) distribución 2

Una vez excluidos los casos con una distribución imprecisa de Ki-67 (distribución 2 de tipo mixto), nos quedaron 79 casos en los que se comprobó alguna de las siguientes combinaciones posibles: 11 casos (13.9%) presentaron distribución basal de CK y Ki-67, 17 casos (21.5%) mostraron distribución difusa de ambos Ac, 5 casos (6.32%) presentaron distribución basal de CK y difusa de KI-67, y, finalmente, 46 casos (58.2%) mostraron distribución basal de Ki-67 y difusa de CK.

<i>CK / Ki-67 dist. 2</i>	CK basal-basal	CK basal-difusa	Total
Ki-67·MIB-1 basal	11 casos (13.9%)	46 casos (58.2%)	57 casos (73.1%)
Ki-67·MIB-1 difusa	5 casos (5.4%)	17 casos (21.5%)	22 casos (26.9%)
Total	16 casos (21.3%)	63 casos (79.7%)	79 casos (100%)

5.2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DIFERENTES VARIABLES Y LOS GRUPOS PRONÓSTICOS REALES

Los grupos pronósticos reales se definieron a partir de los datos obtenidos en el seguimiento:

- Neoplasias de bajo potencial maligno real (BPMr): $TR \leq 1$ / ILE > 9 meses / No Progresión. Es decir, casos con buen curso evolutivo.
- Carcinomas de bajo grado (BGr): $TR > 1$ y/o ILE ≤ 9 meses y/o Progresión. Es decir, casos que evolucionaron mal.

La tasa de Recurrencia media (TRM) de los 120 casos del estudio fue de **1.69%**.

En el caso concreto del ILE (intervalo libre de enfermedad), 16 casos (13.3%) tenían un ILE ≤ 9 meses pero ninguno de ellos tuvo una $TR \leq 1$ (TRM para el ILE fue de **3.61%**).

Respecto a la progresión, 11 casos progresaron en grado o estadio pero ninguno de ellos tuvo una $TR \leq 1$ (TRM para la progresión fue de **2.98%**).

5.2.1. ESTUDIO COMPARATIVO SIMPLE (ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL GRADO)

Al comparar los grupos pronósticos reales con los grupos de la antigua clasificación por grados de Mostofi (1973) y la posterior modificación escandinava (G1-G2a) se obtuvieron los resultados que aparecen en la tabla. Según estos datos, un 3.3% de casos G2a mostraron buena evolución y un 48.3% de casos G1 evolucionaron mal:

	BPMr	BGr	Total
G1	44 (36.7%)	58 (48.3%)	102 (85%)
G2a	4 (3.3%)	14 (11.7%)	18 (15%)
Total	48 (40%)	72 (60%)	120 (100%)

Asimismo, se compararon los grupos pronósticos con el grado asignado según la nueva clasificación de consenso de la OMS/ISUP (1998) y la clasificación en 2 números de Cheng y cols. (2000). Según este sistema el diagnóstico 1 se corresponde con el grado secundario más atípico y el diagnóstico 2 con el grado primario o predominante. En nuestro estudio al aplicar el diagnóstico 1 hubo discordancia en un 12.5% de diagnósticos de neoplasias de bajo potencial maligno (BPM), que evolucionaron mal y en un 15% de carcinomas de bajo grado (BG), que presentaron un buen curso evolutivo; mientras que al aplicar el diagnóstico 2 se erró en un 24.2% de diagnósticos de BPM y en un 19.2% de diagnósticos de BG:

diagnóstico 1	BPMr	BGr	Total	diagnóstico 2	BPMr	BGr	Total
BPM-1	30 (25%)	15*(12.5%)	45 (37.5%)	BPM-2	25 (20.8%)	29*(24.2%)	54 (45%)
BG-1	18*(15%)	57 (47.5%)	75 (62.5%)	BG-2	24*(19.2%)	42 (35.8%)	66 (55%)
Total	48 (40%)	72 (60%)	120 (100%)	Total	48 (40%)	72 (60%)	120 (100%)

Comparando ambos diagnósticos con los grupos pronósticos reales, según se aplique el grado secundario o primario, se advirtió que hubo una discordancia del 27%

y el 43% respectivamente. Asimismo, ambos diagnósticos coincidieron en 91 casos (75.8%) donde no se identificó un clon celular más atípico y difirieron en 29 casos (24.2%), en los cuales sí que existía un clon celular más atípico en el seno del tumor.

Con objeto de encontrar un índice que se ajustara más a los grupos pronósticos reales se asignó un grado conjunto con 3 valoraciones, obtenido a partir de los diagnósticos individuales (1 y 2). De esta forma, el grado conjunto 1: (BPM-1+BPM-2), el grado conjunto 2: (BPM-1+BG-2/BG-1+BPM-2) y el grado conjunto 3: (BG-1+BG-2):

Diagnóstico 1+2	BPMr	BGr	Total
Grado 1	24 (50%)	11 (15.3%)*	35 (29.2%)
Grado 2	7 (14.6%)	22 (30.6%)	29 (24.2%)
Grado 3	17 (35.4%)*	39 (54.2%)	56 (46.7%)
Total	48 (100%)	72 (100%)	120 (100%)

Cuando el diagnóstico real del estudio fue BPMr (buen curso evolutivo), el grado conjunto asignado fue 1 ó 2 en el 64.6% de los casos, y grado 3 en el 35.4%. Por otra parte, si el diagnóstico del estudio es BGr (peor curso evolutivo), un 85% de los casos fue grado 2 ó 3, aunque hasta un 15% fueron grado 1.

No se observa, por tanto, un nivel elevado de asociación cuando el grado fue asignado de forma conjunta.

5.2.2. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LA DEFINICIÓN DE LOS GRUPOS PRONÓSTICOS REALES

5.2.2.1. Análisis bivalente para los grupos pronósticos reales

Se evaluó a continuación la relación existente entre las distintas variables independientes y los grupos pronósticos reales, es decir, la fuerza que tienen las distintas variables en la definición de los grupos reales (BPMr y BGr).

Para las variables de tipo continuo con una distribución normal se utiliza el test de la t-Student de comparación de medias, para las variables ordinales el χ^2 (Chi-cuadrado) y para el resto se usa el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Se considera que las variables con $p < 0.05$ tienen asociación estadística significativa, es decir, valor en la definición de esos grupos pronósticos. Asimismo, las variables con $p < 0.001$ se consideraron las de asociación más fuerte, mientras que aquellas con una $p > 0.05$ se consideraron variables sin asociación estadística con los grupos pronósticos reales.

Tabla 5.1. Valores "p" de las distintas variables comparadas.

P<0.001	0.001<P<0.05	P>0.05
Parmar	Tamaño Tumoral	Edad
ANM Z3 y Z4	Multiplicidad	Sexo
DEANM Z3 y Z4	Diagnóstico 1 (grado)	Grado (1, 2a)
PNM Z3 y Z4	Estadío	Diagnóstico 2 (grado)
Ploidía Z3	ANM Z1 y Z2	Resto datos morfométricos
P53 (15%)	DEANM Z1 y Z2	Bcl-2
Ki-67·MIB-1 (%)	PNM Z1 y Z2	C-erbB-2 (0 y 30%)
Ki-67·MIB-1 (1-4)	DEPNM Z2, Z3 y Z4	
Ki-67·MIB-1 (dist. 1)	Ploidía Z2	
Ki-67·MIB-1 (dist. 2)	P 53 (10%-20%)	
Ki-67 (dist. 2) / CK basal	CK basal	
	P 53 (15%) / Bcl-2 (+)	

DESGLOSE

- **Grupos pronósticos y multiplicidad tumoral**

El resultado del estudio es que los pacientes que se presentan inicialmente con múltiples tumores tienen una probabilidad mucho mayor de tratarse de un caso de BGr y evolucionar mejor que el del grupo de pacientes con un único tumor (*Gráfica 5.7*).

- **Grupos pronósticos y tamaño tumoral**

Los pacientes con BPMr tienen un tamaño tumoral significativamente menor (**1.8cm**) que el de los pacientes con BGr (**2.5cm**). El punto de corte más eficaz en la definición de los grupos reales se situaría en torno a **2cm** (*Gráfica 5.8*).

- **Grupos pronósticos y estadio tumoral**

La mayoría de tumores con infiltración focal o difusa de la lámina propia son de BGr, mientras que los tumores limitados a la mucosa (no infiltrantes) se reparten entre ambos diagnósticos (*Gráfica 5.9*). No obstante, de los 4 casos con infiltración difusa de la lámina propia uno de ellos (25%) evolucionó bien (BPMr).

- **Grupos pronósticos y grado histológico**

Tanto el grado clásico (G1-2a) como el grado primario o predominante (diagnóstico 2) de la clasificación de consenso OMS/ISUP (1998) no se asocian significativamente con los grupos pronósticos reales, sin embargo el grado secundario más atípico (diagnóstico 1) sí que está significativamente asociado con el curso evolutivo de la enfermedad (*Gráfica 5.10*).

- **Grupos pronósticos y grados de Parmar**

Los pacientes grado 1 de Parmar se reparten entre ambos diagnósticos al 50%, pero a medida que aumenta el grado crece el número de diagnósticos de BGr, siendo del 79% en los tumores Parmar grado 2 y del 100% en el Parmar grado 3 (*Gráfica 5.11*).

- **Grupos pronósticos e ILE**

La tendencia es que los pacientes del grupo de buen pronóstico (BPMr) tardan más meses en recurrir (mayor tiempo de supervivencia) que los pacientes del grupo de BGr. De hecho, el ILE del grupo de BGr es más del doble que el del grupo BPMr.

Hemos de recordar que el ILE era un criterio caracterizador de los grupos pronósticos, aunque al existir sólo 16 casos con $ILE \leq 9$ meses, este parámetro es el menos potente en la definición de estos grupos que la TR (*Gráfica 5.12*).

- **Grupos pronósticos y tasa de recurrencia**

Las neoplasias de BPMr tienen una tasa de recurrencia media de 0.3%, por 2.6% de los carcinomas de BGr. No obstante, este parámetro está incluido en la propia definición de los grupos pronósticos reales (*Gráfica 5.13*).

- **Grupos pronósticos y zona 1 (Z1) del tumor**

En la zona 1, el área nuclear media (ANM), la desviación estándar (DEANM) y el perímetro nuclear medio (PNM) están significativamente asociadas con el pronóstico, es decir, definen correctamente los grupos pronósticos. El grupo de BGr se asocia, sin embargo, con valores más elevados en las 4 categorías comparadas (*Gráfica 5.14*).

- **Grupos pronósticos y Z2**

En la zona 2, se relacionan con un buen curso evolutivo el ANM, la DEANM, el PNM y la DEPNM (*Gráfica 5.15*).

- **Grupos pronósticos y Z3**

En la zona 3, el ANM, la DEANM, el PNM y la DEPNM están asociadas significativamente con el pronóstico. En concreto, destaca la fuerza en la asociación del ANM Z3 (*Gráfica 5.16*).

- **Grupos pronósticos y Z4**

En la zona 4, el ANM, la DEANM, el PNM y la DEPNM están significativamente asociadas con el pronóstico. El factor de forma (FF) presenta diferencias mínimas, aunque no significativas, en la definición de los grupos pronósticos reales (*Gráfica 5.17*).

- **Grupos pronósticos y ploidía tumoral (*Gráfica 5.18*)**

En la zona 1, la ploidía roza la significatividad ($p=0.065$), sin embargo se ha incluido en el estudio ya que en la zona 2 sí que es claramente significativa. De hecho, a medida que aumenta la ploidía en las zonas 1 y 2 (considerando los casos hiperdiploides como no diploides) aumentan las probabilidades de un diagnóstico de BGr, siendo del 100% en los casos triploides, aunque se ha de considerar también el reducido nº de casos no diploides en estas 2 zonas (~10%).

En la zona 3, la ploidía está asociada significativamente con el pronóstico. De hecho, a medida que aumenta el grado de ploidía en esta zona aumenta la probabilidad de un diagnóstico de BGr. Esta probabilidad es muy alta en los casos triploides y del 100% del nivel tetraploide en adelante (casos con peor curso evolutivo). En esta zona tumoral de núcleos más atípicos (Z3) los casos hiperdiploides se consideran junto con los diploides.

- **Grupos pronósticos e índice Ki-67(MIB-1)**

La variable Ki-67(MIB-1) es una de las que incide con mayor fuerza en el pronóstico. Los pacientes con BPMr tienen una tasa proliferativa media de **71.4%**, mientras que los pacientes con BGr tienen un valor medio de **131.7%** (*Gráfica 5.19*).

Según las distribuciones de Ki-67(MIB-1) una distribución de la proliferación en la **porción vegetante del tumor (distribución 1)** o en la **capas basales de la papila (distribución 2)** comporta un buen pronóstico y por tanto una mayor probabilidad de un diagnóstico de BPMr (*Gráfica 5.20*).

- **Grupos pronósticos y p53**

El promedio en la expresión IHQ de p53 es significativamente menor en el grupo de BPMr (**2.7%**) que en el grupo de BGr (**9.5%**). En general, cuanto mayor es la expresión de p53 mayor es la probabilidad de diagnosticar correctamente un caso de BGr. Si se considera la tasa global de p53 el mejor nivel de corte para la positividad es del **15%**, de forma que los pacientes con $p53=0$ son en su mayor parte tumores de BPMr, mientras que los pacientes con expresión de $p53>15\%$ son en su inmensa mayoría casos de BGr (*Gráfica 5.21*).

- **Grupos pronósticos y CK-basal**

Los pacientes con una distribución difusa de CK tienen un **70.7%** de probabilidad de ser un BGr, mientras que los pacientes con una distribución basal serán casos de BPMr en un **67%** de los casos (*Gráfica 5.22*).

El valor pronóstico de la expresión de esta CK aumenta considerablemente al considerarla conjuntamente con la expresión basal o difusa (distribución 2) de Ki-67·MIB-1 (valor de "p"<0.001):

<i>Ki-67 dist.2 / CK-basal</i>	BPMr	BGr	Total
Ki-67 Basal / CK Basal	9 (11.4%)	2 (2.5%)	11 (13.9%)
Ki-67 Difusa / CK Basal	2 (2.5%)	3 (3.8%)	5 (6.3%)
Ki-67 Basal / CK Difusa	29 (36.7%)	17 (21.5%)	46 (58.2%)
Ki-67 Difusa / CK Difusa	1 (1.3%)	16 (20.3%)	17 (21.6%)
Total	41 (51.9%)	38 (48.1%)	79 (100%)

• **Grupos pronósticos y bcl-2**

La expresión aislada de bcl-2 no muestra asociación estadística con los grupos pronósticos. Sin embargo, considerada conjuntamente con la expresión de p53, sobre todo con un nivel de corte en el 15%, los tumores positivos para bcl-2 presentan peor curso evolutivo que los negativos.

Además, una expresión basal mostrará mal pronóstico en relación con aquellos tumores que eran positivos también para p53, mientras que los casos con expresión difusa en células intermedias y superficiales mostrarán mal pronóstico independientemente de la expresión de la proteína p53:

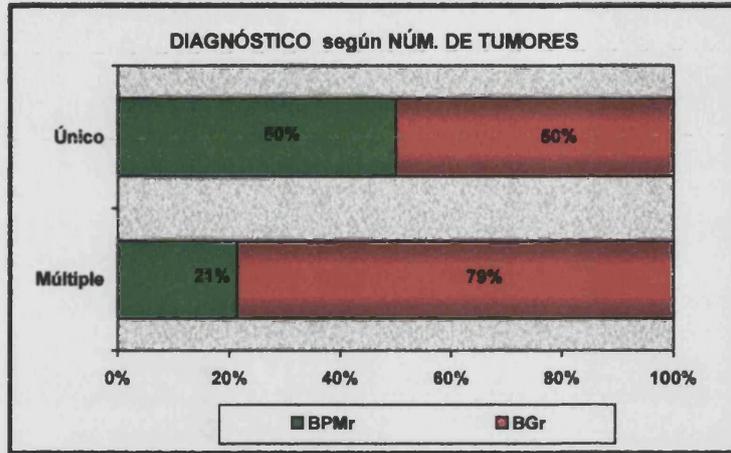
<i>P53(15%) / bcl-2(+)</i>	Bcl-2(+) basal	Bcl-2(+) difuso	Total
P53(-) < 15%	21 casos (56.8%) 13 BPMr / 8 BGr	9 casos (24.3%) 3 BPMr / 6 BGr	30 casos (81.1%) 16 BPMr / 14 BGr
P53(+) > 15%	4 casos (10.8%) 0 BPMr / 4 BGr	3 casos (8.1%) 0 BPMr / 3 BGr	7 casos (18.9%) 0 BPMr / 7 BGr
Total	25 casos (67.6%) 13 BPMr / 12 BGr	12 casos (32.4%) 3 BPMr / 9 BGr	37 casos (100%) 16 BPMr / 21 BGr

En resumen, en el estudio univariante (bivariante) las variables que mejor definen los grupos pronósticos reales y por tanto el curso evolutivo de este grupo de tumores son: los factores morfométricos correspondientes a las zonas tumorales extremas (Z3 y Z4, o lo que es lo mismo los 10 núcleos más grandes y los 10 núcleos más pequeños), la ploidía del área tumoral más atípica (Z3), los grados clínicos corregidos de Parmar, la expresión tumoral de la proteína p53(15%) y el índice proliferativo tumoral (índice y distribuciones 1 y 2 de Ki-67·MIB-1).

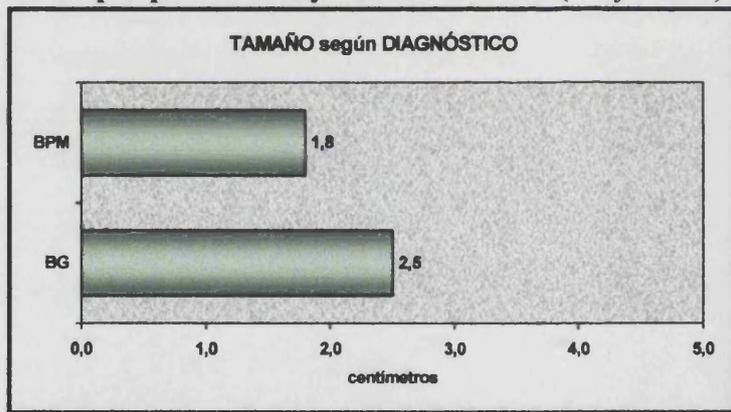
GRÁFICAS

Influencia de las variables en la predicción del curso evolutivo (grupos pronósticos reales)

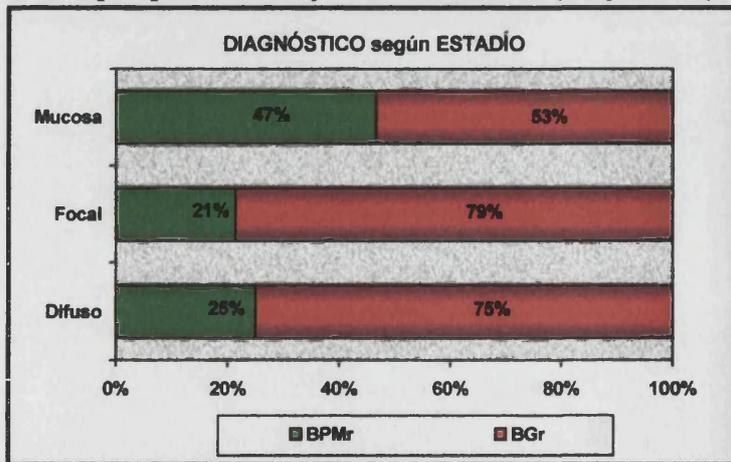
Grupos pronósticos y número de tumores (Gráfica 5.7)



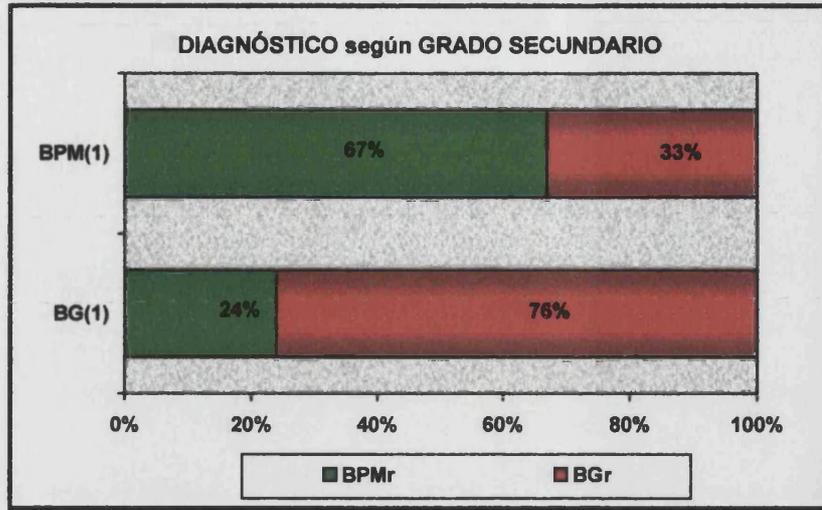
Grupos pronósticos y tamaño tumoral (Gráfica 5.8)



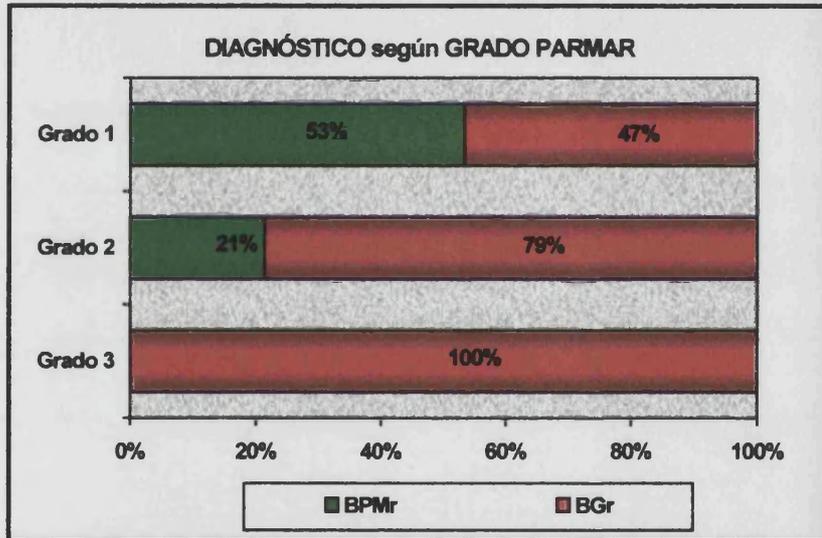
Grupos pronósticos y estadio tumoral (Gráfica 5.9)



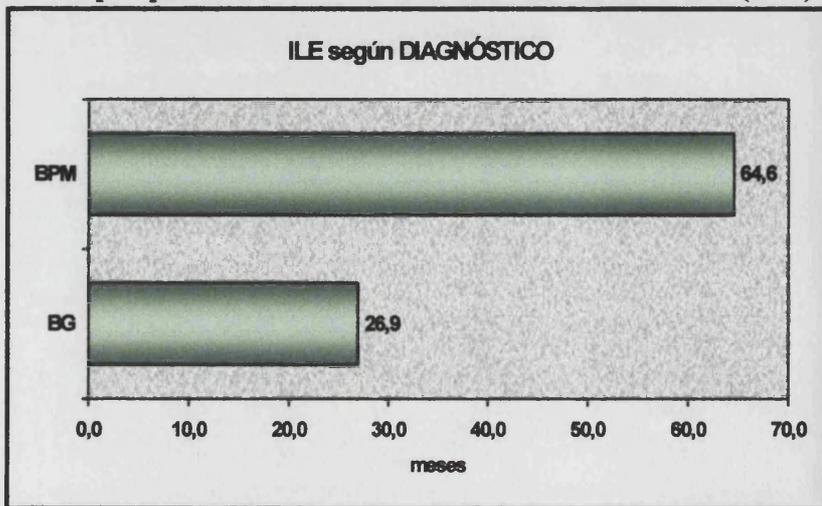
Grupos pronósticos y diagnóstico 1 (grado secundario) (Gráfica 5.10)



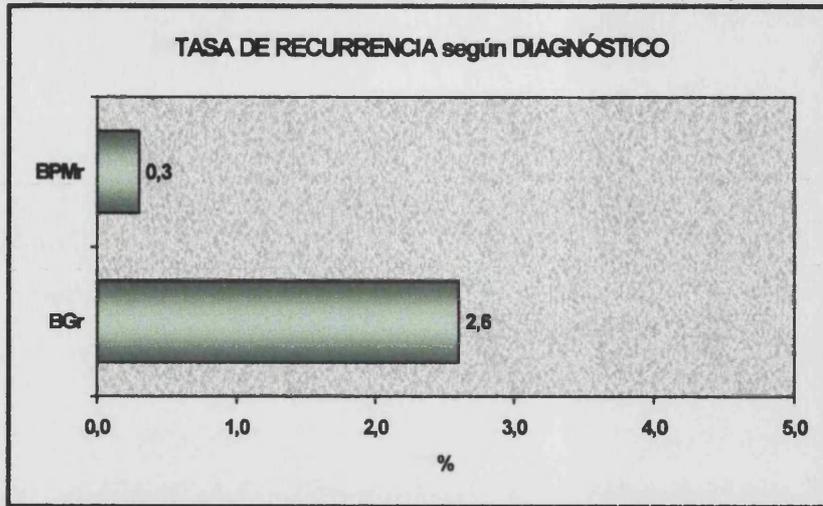
Grupos pronósticos y grados "corregidos" de Parmar (Gráfica 5.11)



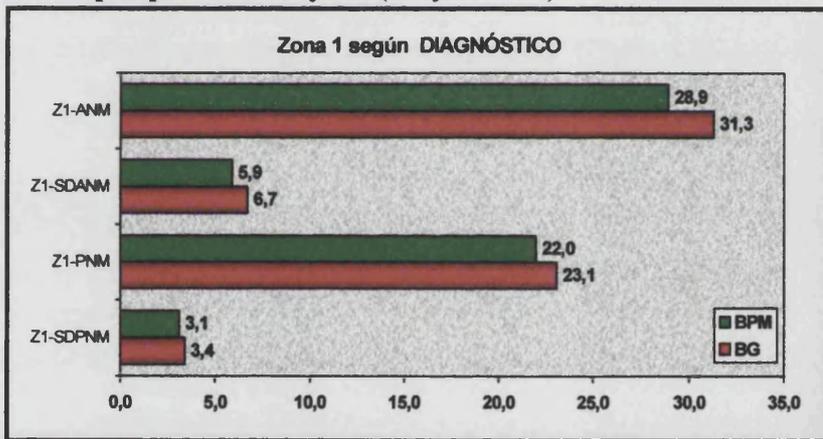
Grupos pronósticos e intervalo libre de enfermedad (ILE) (Gráfica 5.12)



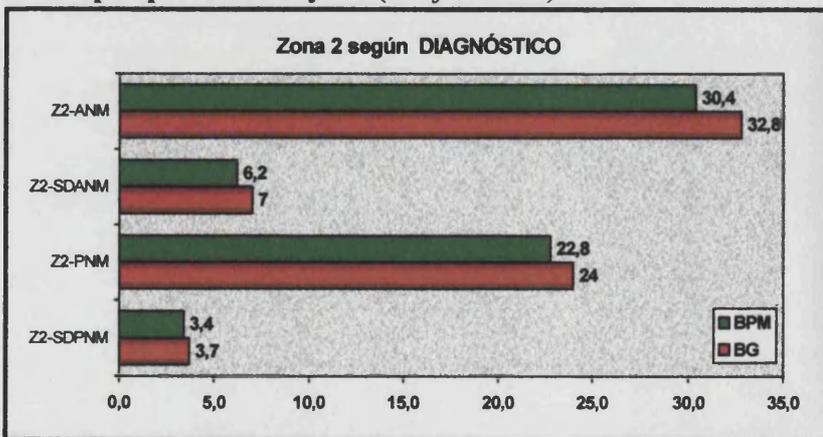
Grupos pronósticos y tasa de recurrencia (TR) (Gráfica 5.13)



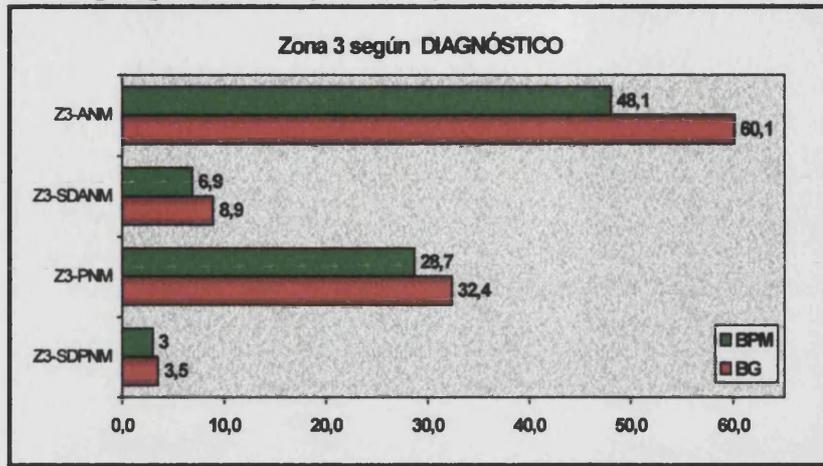
Grupos pronósticos y Z1 (Gráfica 5.14)



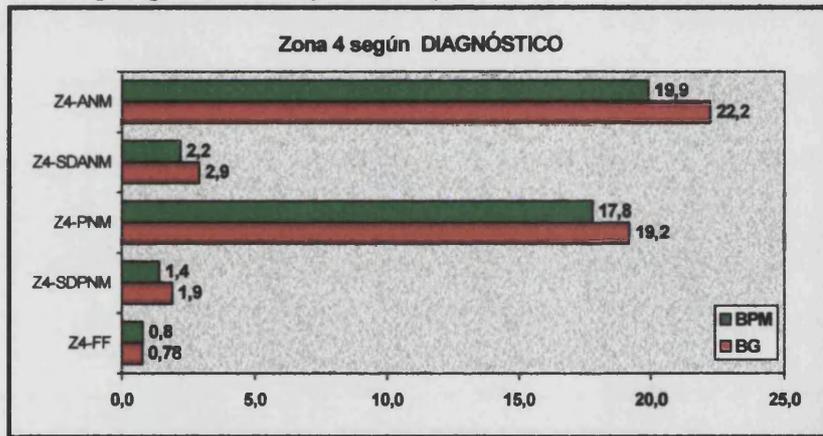
Grupos pronósticos y Z2 (Gráfica 5.15)



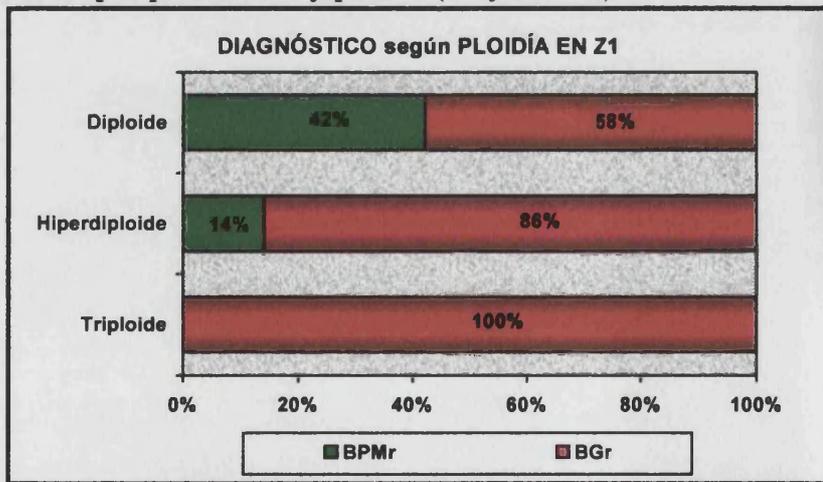
☑ Grupos pronósticos y Z3 (Gráfica 5.16)

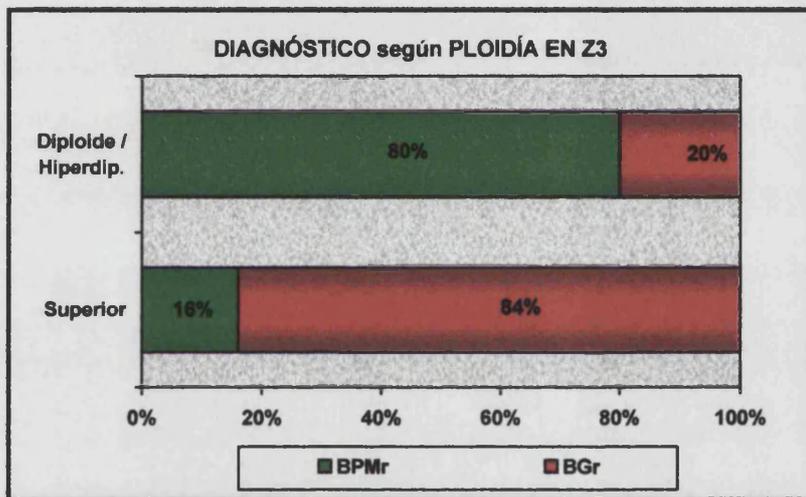
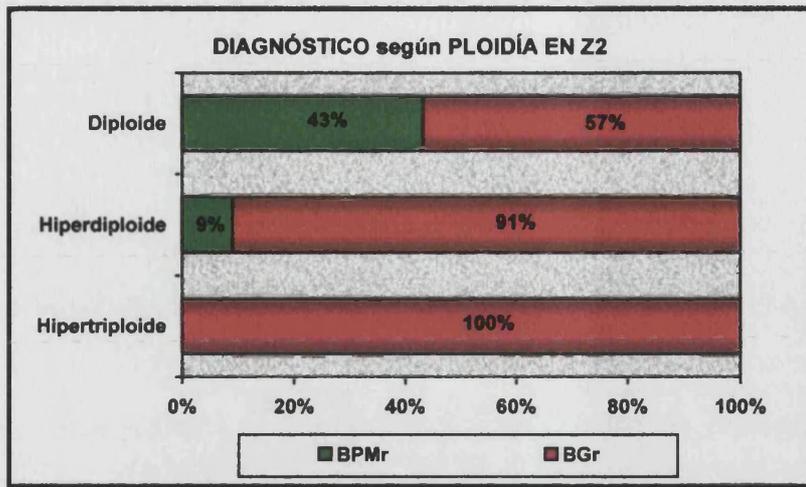


☑ Grupos pronósticos y Z4 (Gráfica 5.17)

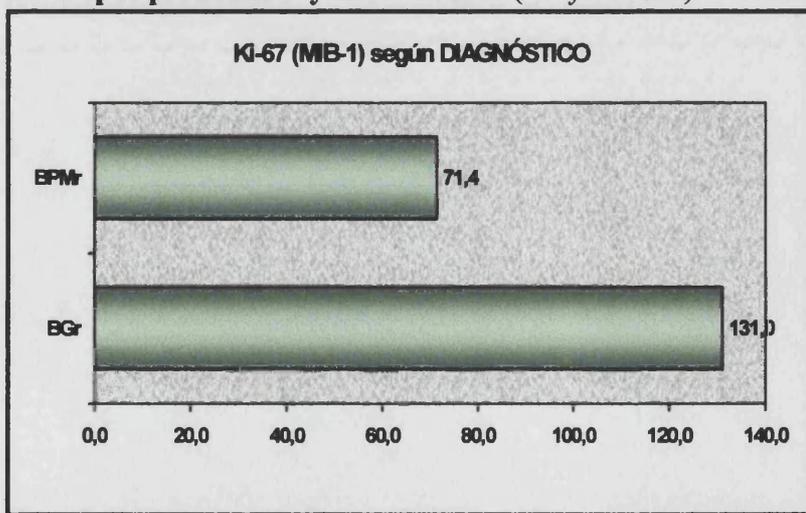


☑ Grupos pronósticos y ploidía (Gráfica 5.18)

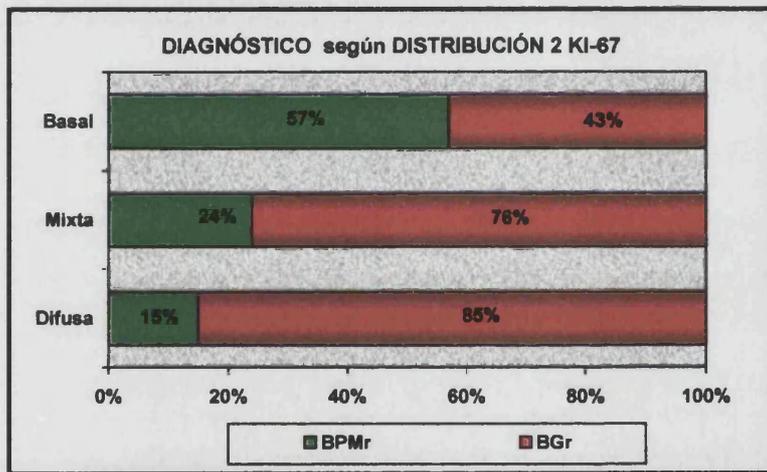
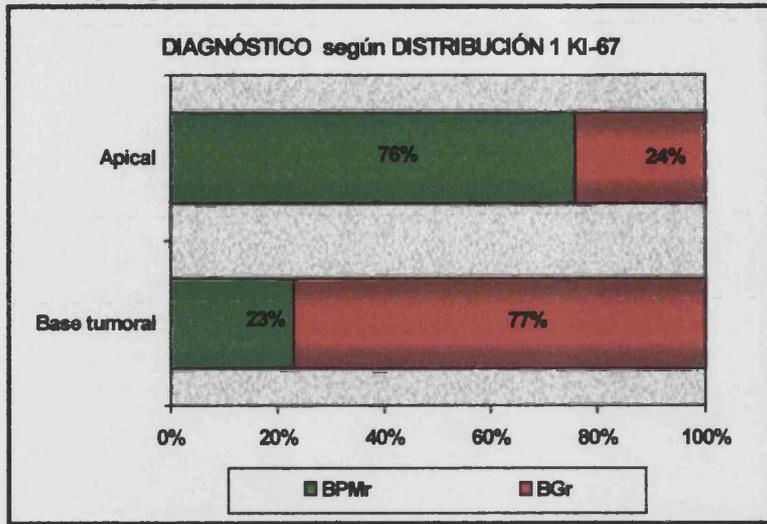




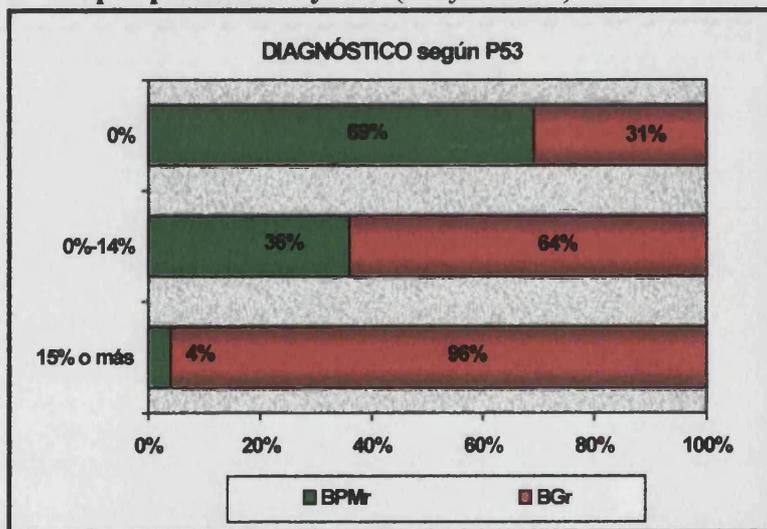
Grupos pronósticos y Ki-67·MIB-1 (Gráfica 5.19)



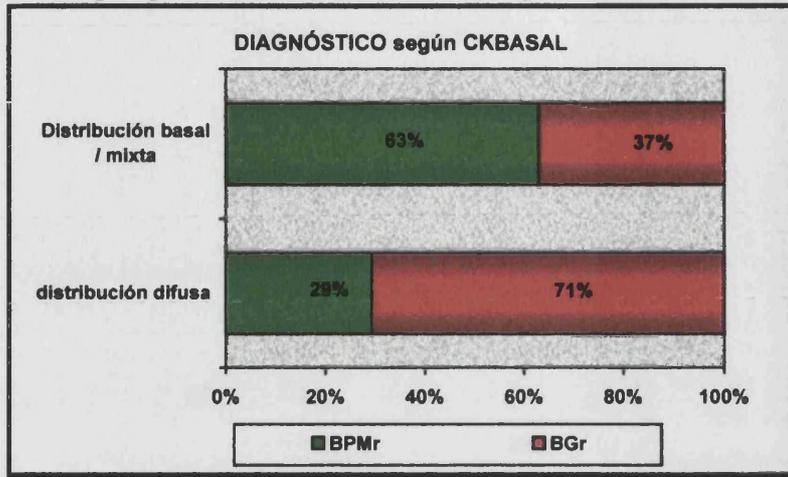
Grupos pronósticos y distribuciones de Ki-67·MIB-1 (Gráfica 5.20)



Grupos pronósticos y P53 (Gráfica 5.21)



Grupos pronósticos y CK-basal (Gráfica 5.22)



5.2.2.2. Análisis multivariante para los grupos pronósticos reales

Para este estudio se aplicó el análisis de regresión logística, con el que se puede afirmar que la variable o combinación de variables que mejor definen estos grupos pronósticos son el ANM Z3 y el índice Ki-67 (MIB-1).

Variable ↓	Beta ↓	p-valor ↓	Exp(beta) ↓
Z3 ANM	0.3261	<0.0001	1.3856
Ki-67 (MIB-1)	0.0340	0.0005	1.0346

La ecuación de regresión logística para el modelo presente es:

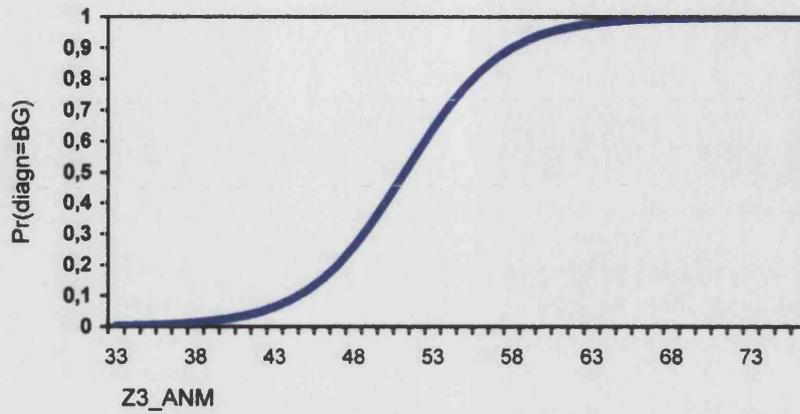
$$\text{Odds} = p / 1-p = e^{-20.3592+0.3261*Z3ANM+0.034*K167}$$

El significado concreto de estos datos es que el incremento en una unidad del ANM Z3 influye significativamente en la probabilidad de tener un BGr. Concretamente, el incremento en una unidad supone un incremento del odds en un 39%, mientras que el incremento de 10 unidades de Ki-67 (MIB-1) supone un incremento del odds del 30%.

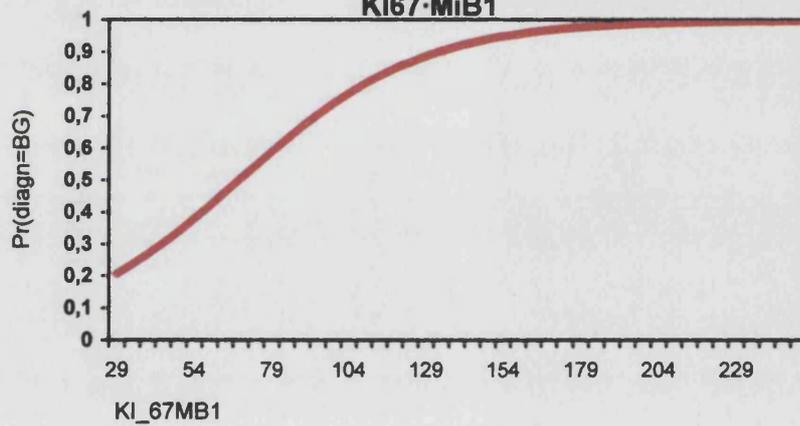
El odds calculado a partir de las medias de ambas variables es 3.7924 (media ANM Z3=55.3058, media Ki-67-MIB-1=107.5583). Con estos valores la posibilidad de que un sujeto tenga un tumor de BGr es del 79.1%. Si lo que queremos es una seguridad de acierto del 90% hemos de conseguir una probabilidad asociada > 50%, es decir, una "p" asociada >0.5.

El primer gráfico (*Gráfica 5.24*) muestra como se incrementa la probabilidad de diagnosticar correctamente un tumor de BGr con un valor fijo de Ki-67(MIB-1)=107.55(media). Este incremento es máximo a partir del valor 52 para el ANM Z3. La segunda gráfica (*Gráfica 5.23*) representa la probabilidad complementaria con un valor fijo para el ANM Z3=55.3(media). La probabilidad es máxima a partir del valor 79% para la Ki-67 (MIB-1). El último gráfico (*Gráfica 5.25*) muestra de forma conjunta el efecto de ambas variables sobre los grupos pronósticos. Para ello se muestra la evolución de la probabilidad de presentar un diagnóstico de BGr según ANM Z3 con varios niveles de Ki-67 (MIB-1).

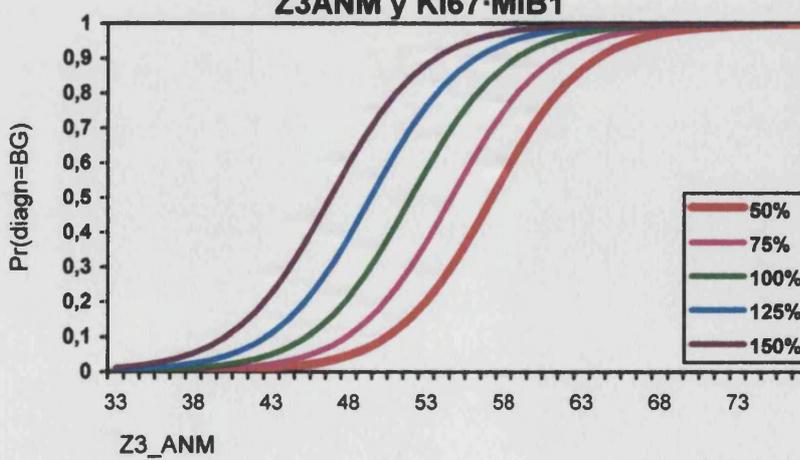
Gráfica 5,23, Probabilidad BGr según Z3ANM



Gráfica 5,24, Probabilidad BGr según KI67·MiB1



Gráfica 5,25, Probabilidad BGr según Z3ANM y KI67·MIB1



Se realizaron, así mismo, 2 regresiones logísticas adicionales:

- En la primera se introdujeron todos los factores que habían resultado significativos en el análisis bivariante. Los resultados mostraron una capacidad de predicción del 95%, superior lógicamente al del modelo antes estudiado, sin embargo, ese incremento del 5% no justifica la inclusión de tantas variables ("principio de la parsimonia").
- En la segunda, se incluyen todos los factores morfométricos y citométricos correspondientes a la zona 3, resultando una capacidad predictiva del 86%, inferior incluso a la capacidad predictiva del modelo anterior que incluía tan solo 2 variables.

5.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES Y EL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD (ILE) O TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

5.3.1. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE KAPLAN-MEIER (ESTUDIO GLOBAL)

La curva de supervivencia representa la probabilidad de que un paciente llegue libre de enfermedad a un determinado tiempo desde la primera intervención. Las probabilidades se calculan en el instante preciso en que ocurre la recidiva.

En la muestra hay 3 pacientes que recidivan a los 3 meses de la primera intervención, por lo que la probabilidad de no recidivar en ese momento es el número de pacientes que permanecen sin recidivar sobre el total de pacientes al comienzo del estudio, esto es, $117/120 = 0.975$. El siguiente paciente es el 4º, y recidiva un mes más tarde, por lo que la probabilidad de no recidivar en ese instante es la probabilidad de no haber recidivado antes (0.975) multiplicada por la probabilidad de no recidivar en el período transcurrido entre la recidiva de los 3 primeros pacientes y el 4º ($116/117=0.991$), el resultado ahora es de 0.966. De esta forma se va calculando la probabilidad de no recidivar en función del tiempo.

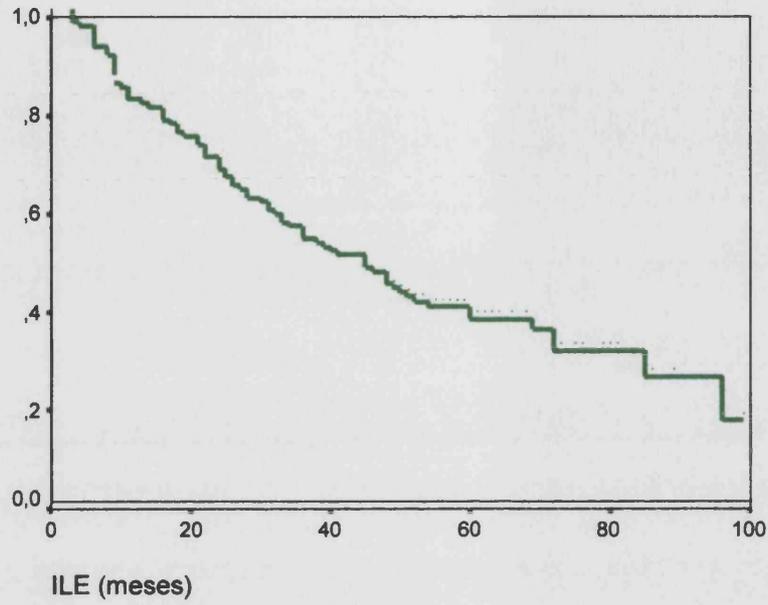
Función de supervivencia

Hasta los **55 meses** de seguimiento las probabilidades de estar libre de enfermedad decrecen a un ritmo constante, el cual se ralentiza a partir de ese momento (*Gráfica 5.26*).

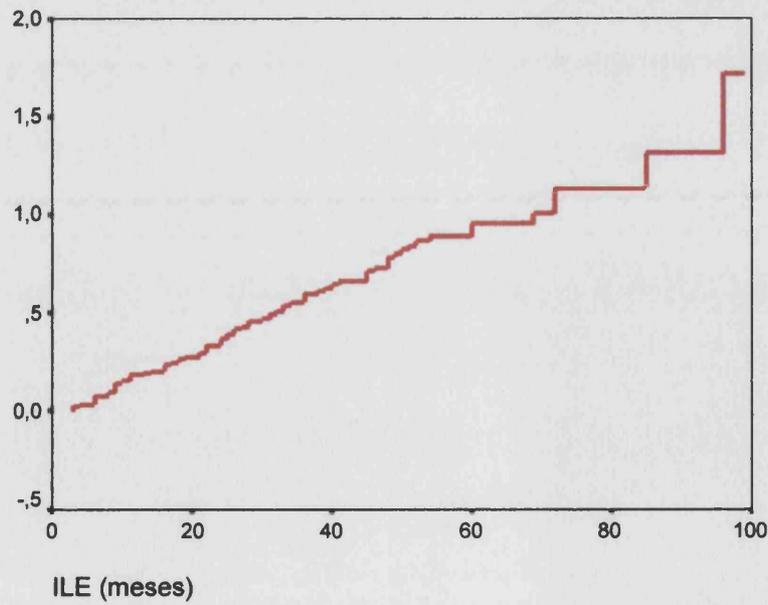
Curva de impacto

Se trata de la imagen invertida de la anterior, más fácil de asimilar al referirse a la probabilidad de recurrir en un momento determinado del seguimiento. Observándose cómo la probabilidad de recurrencia va aumentando progresivamente y se estabiliza a partir de los **55 meses** (*Gráfica 5.27*).

Gráfica 5.26. Función de supervivencia



Gráfica 5.27. Curva de impacto



5.3.2. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES EN LA PREDICCIÓN DEL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD (ILE)

5.3.2.1. Análisis bivariante para el ILE

Tabla 5.2. Valores "p" de las distintas variables comparadas.

P<0.001	0.001<p<0.05	p>0.05
Multiplicidad	Diagnóstico 1 (grado)	Edad
Tamaño	Estadío	Sexo
Parma (propia definición)	Grado (1-2a)	Diagnóstico 2 (grado)
Progresión / TR*	DEPNM Z2, Z3 y Z4	Resto valores morfom.
ANM Z3 y Z4	DEANM Z3 y Z4	Ploidía Z1
PNM Z3	PNM Z2	Bcl-2
Z3 Ploidía	Z2 Ploidía	C-erbB-2
P53 (15%)	P53 (15%) / Bcl-2(+)*	
Ki-67·MIB-1 (1-4)	CK basal	
Ki-67·MIB-1 (79%)		
Ki-67 (distribución 1)		
Ki-67 (distribución 2)		
CK basal / Ki-67dist.2*		

DESGLOSE

- **Grado histológico e ILE**

El grado clásico (G1-G2a) incide de forma significativa en el ILE. El tiempo medio de supervivencia para los tumores grado 1 es de 54 meses, mientras que para los tumores grado 2a es de 31 meses (*Gráfica 5.28*). Por lo que respecta al grado del sistema de clasificación en 2 números el diagnóstico 1 (grado secundario más atípico) se asocia significativamente con el ILE, mientras que el diagnóstico 2 (grado primario predominante) no lo hace.

- **Estadío tumoral e ILE**

El estadio incide también de forma significativa en el ILE. Concretamente, el menor tiempo de supervivencia se corresponde con los tumores que infiltran la submucosa de forma focal o difusa (38 meses), mientras que el ILE de los tumores no invasivos limitados a la mucosa es de 57 meses (*Gráfica 5.29*).

- **Multiplicidad tumoral e ILE**

El tiempo medio de supervivencia para los casos con tumor único fue de 60 meses, mientras que para aquellos casos con tumores múltiples el ILE fue de 37 meses.

- **Tamaño tumoral e ILE**

El tamaño también incide significativamente en el ILE. Concretamente, el menor ILE se correspondió con aquellos pacientes que presentaron un tamaño tumoral superior a 3cm. Los casos con tumores <2cm y entre 2-3cm mostraron, sin embargo, un ILE muy similar (59 y 58cm, respectivamente). En este caso el punto de corte ideal fue de 3cm (*Gráfica 5.30*).

- **Grados clínicos "corregidos" de Parmar e ILE**

Hubo asociación entre estos grados clínicos y el ILE. Además, éste formaba parte en la propia definición de este factor clínico-evolutivo (*Gráfica 5.31*).

- **Progresión tumoral e ILE**

Los pacientes que experimentaron progresión tumoral tuvieron además un ILE medio de 19 meses, mientras que los casos sin progresión tuvieron un ILE de 55 meses. Hemos de considerar, no obstante, el reducido número de casos que presentaron progresión (11 casos), lo que significa un tamaño muestral insuficiente para poder aplicar con confianza las pruebas estadísticas.

- **TR e ILE**

Los pacientes con una TR<1% presentaron un ILE mucho mayor que los pacientes con una TR>1%, y a la inversa los pacientes con un ILE<40 meses mostraron una TR=2.8% por 0.7% de los pacientes con un ILE>40 meses.

- **PNM Z2 e ILE**

El perímetro nuclear medio (PNM) de la zona 2 se asocia significativamente con el ILE, concretamente el nivel de corte se sitúa en el valor $23\mu\text{m}^2$, de manera que

un valor $<23\mu\text{m}^2$ tiene un ILE medio de 62 meses, mientras que un valor $\geq 23\mu\text{m}^2$ se corresponde con un ILE medio de 44 meses (*Gráfica 5.32*).

- **ANM Z3 e ILE**

El área nuclear media (ANM) de la zona 3 se correlaciona estrechamente con el tiempo de supervivencia, con el punto de corte en el valor $55\mu\text{m}^2$, concretamente los valores de ANM $<55\mu\text{m}^2$ tienen un ILE medio de 75 meses, mientras que los valores $\geq 55\mu\text{m}^2$ se corresponden con un ILE medio de tan sólo 30 meses (*Gráfica 5.33*).

- **DEANM Z3 e ILE**

La media de la desviación estándar (DE) del ANM en la zona tumoral más atípica (Z3) se asocia significativamente con el ILE, situándose el nivel de corte en el valor $7.5\mu\text{m}^2$. Así, los casos con un valor <7.5 tienen un ILE medio de 62 meses y aquellos con valores ≥ 7.5 se corresponden con un ILE de 42 meses (*Gráfica 5.34*).

- **PNM Z3 e ILE**

El PNM de la zona 3 incide de forma significativa en el ILE. Concretamente, el menor tiempo ILE corresponde a aquellos pacientes con mayor valor de PNM, situándose en nivel de corte en el valor $31\mu\text{m}^2$. Así, un valor $<31\mu\text{m}^2$ significa un ILE medio de 67 meses y un valor $\geq 31\mu\text{m}^2$ con un ILE medio de 36 meses (*Gráfica 5.35*).

- **DEPNM Z3 e ILE**

La media de desviaciones estándar (DE) en la zona 3 se asocia también con el ILE con el punto de corte en el valor $3\mu\text{m}^2$, de forma que valores <3 tienen un ILE medio de 57 meses y valores ≥ 3 tienen un ILE medio de 44 meses (*Gráfica 5.36*).

- **Ploidía Z2 e ILE**

Aunque en esta zona son escasos los valores no diploides, se comprueba que éstos se corresponden con un ILE medio de 22 meses, mientras que el ILE medio de los casos diploides es de 54 meses.

- **Ploidía Z3 e ILE**

La ploidía en esta zona incide notablemente en el ILE. Concretamente, el ILE más prolongado (59 y 64 meses) se corresponde con los pacientes con contenido diploide o hiperdiploide de DNA respectivamente, mostrando el resto de niveles (triploide, hipertriploide, tetraploide e hipertetraploide) un ILE muy corto (37, 37, 25 y 23 meses respectivamente) (*Gráfica 5.37*).

- **Citoqueratina basal (CK-basal) e ILE**

Los pacientes con una expresión difusa de CK tienen un ILE medio de 44 meses, significativamente inferior que el ILE de los casos con expresión basal (71 meses) o mixta (66 meses) (*Gráfica 5.38*).

- **P53(15%) e ILE**

Los pacientes con una expresión de $p53 < 15\%$ tienen un ILE medio de 59 meses, mientras que aquellos con una expresión $p53 > 15\%$ tienen un tiempo de supervivencia de tan sólo 25 meses (*Gráfica 5.39*).

- **Ki-67·MIB-1 (79%) e ILE**

Los casos con índice proliferativo $< 79\%$ tienen un ILE medio de 78 meses, por 37 meses de los casos con índice $> 79\%$ (*Gráfica 5.40*).

- **Ki-67·MIB-1 (1-4) e ILE**

Los casos que presentaron un índice proliferativo $\leq 50\%$ y entre el 51-100% tuvieron un ILE medio de 77 y 70 meses, mientras que los casos con un índice proliferativo entre 101-150%, y $> 150\%$ tuvieron un ILE medio significativamente inferior (39 y 19 meses respectivamente) (*Gráfica 5.41*). Es decir, que teniendo en cuenta este tipo de distribución el nivel de corte se situaría en torno al **100%**.

- **Ki-67·MIB-1 (distribución 1) e ILE**

Una distribución apical del área proliferativa del tumor muestra un ILE medio de 77 meses, mientras una distribución del área proliferativa en la base tumoral o de forma difusa presenta un ILE medio de 38 meses (*Gráfica 5.42*).

- **Ki-67·MIB-1 (distribución 2) e ILE**

Una distribución de las áreas proliferativas en la capa basal muestran un ILE de 65 meses, mientras que una distribución mixta o difusa de células en proliferación (en todas las capas celulares) muestran ILE medios de 41 y 28 meses respectivamente (*Gráfica 5.43*).

- **P53 (15%) / Bcl-2(+) e ILE**

La expresión conjunta de bcl-2 (+) y de p53(15%) se asocia significativamente con la variable ILE con un valor $p=0.014$. Sin embargo, caben una serie de consideraciones específicas reflejadas en la siguiente tabla:

<i>Bcl-2 (+)</i> (37 casos)	P53(-) (30 casos)	P53(+) (7 casos)
*Bcl-2 (+) células basales (25 casos)	48.4 meses	32.2 meses
<i>Bcl-2 (+) células no basales (12 casos)</i>	27.9 meses	32.3 meses

• **CK-basal / Ki-67 dist.2* e ILE**

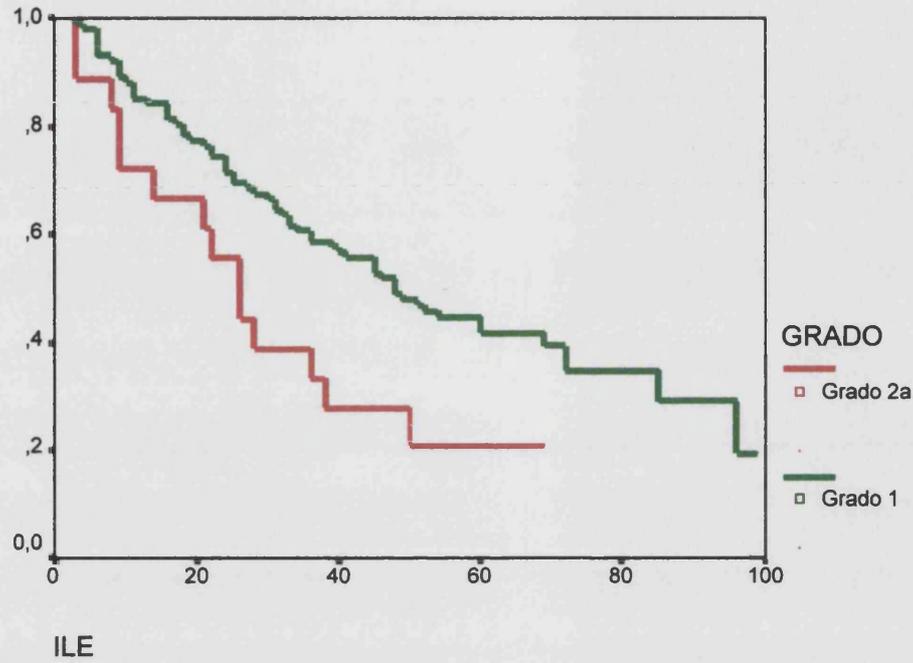
La expresión conjunta de CK-basal y Ki-67 distribución 2 se asocia significativamente con la variable ILE con una $p < 0.001$. Las 4 categorías resultantes se consideran por separado en la siguiente tabla explicativa:

79 casos (100%)	Ki-67 basal (57 casos)	Ki-67 difusa (22 casos)
CK basal (16 casos)	11 casos (13.9%)	5 casos (6.33%)
CK difusa (63 casos)	46 casos (58.2%)	17 casos (21.5%)

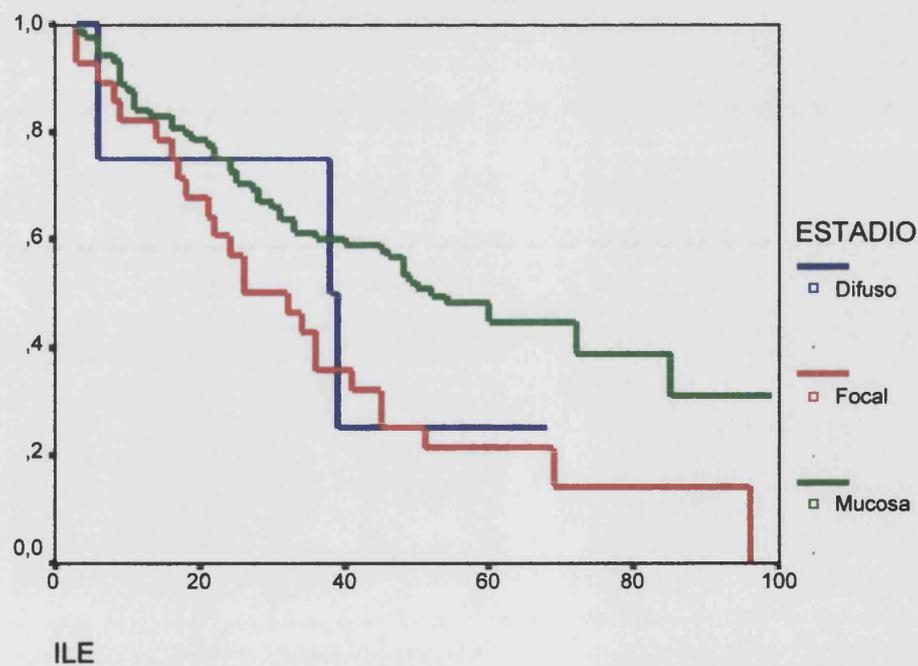
En resumen, en el estudio comparativo bivalente respecto al intervalo libre de enfermedad (estudio de supervivencia), los parámetros con mayor valor pronóstico fueron: los valores morfométricos y citométricos correspondientes a las zonas tumorales extremas (Z3 y Z4, es decir, los 10 núcleos más grandes y los 10 más pequeños), los grados clínicos corregidos de Parmar, la multiplicidad y el tamaño tumoral, la expresión inmunohistoquímica de p53(15%) y el índice proliferativo tumoral (índice Ki-67·MIB-1), y las distribuciones 1 y 2 de las áreas proliferativas intratumorales.

GRÁFICAS: Influencia de las distintas variables en el intervalo libre de enfermedad (ILE): Funciones de supervivencia.

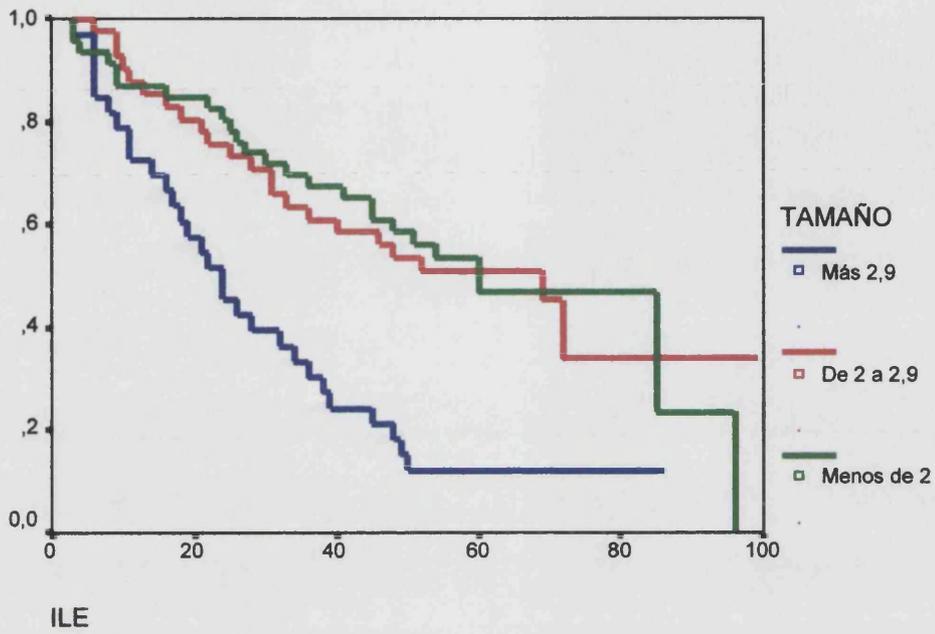
Gráfica 5.28. Grado clásico e ILE



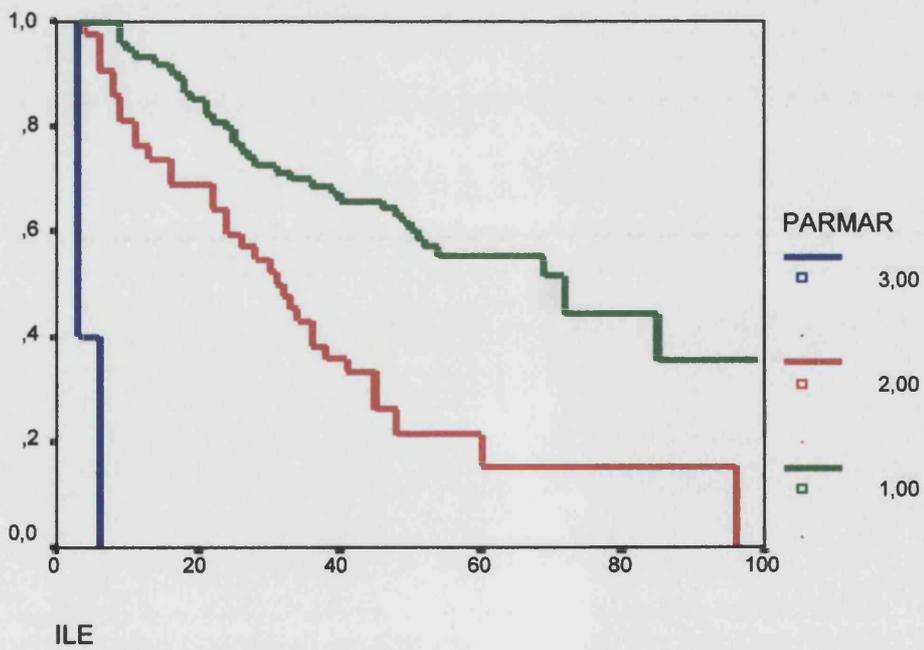
Gráfica 5.29. Estadío tumoral e ILE



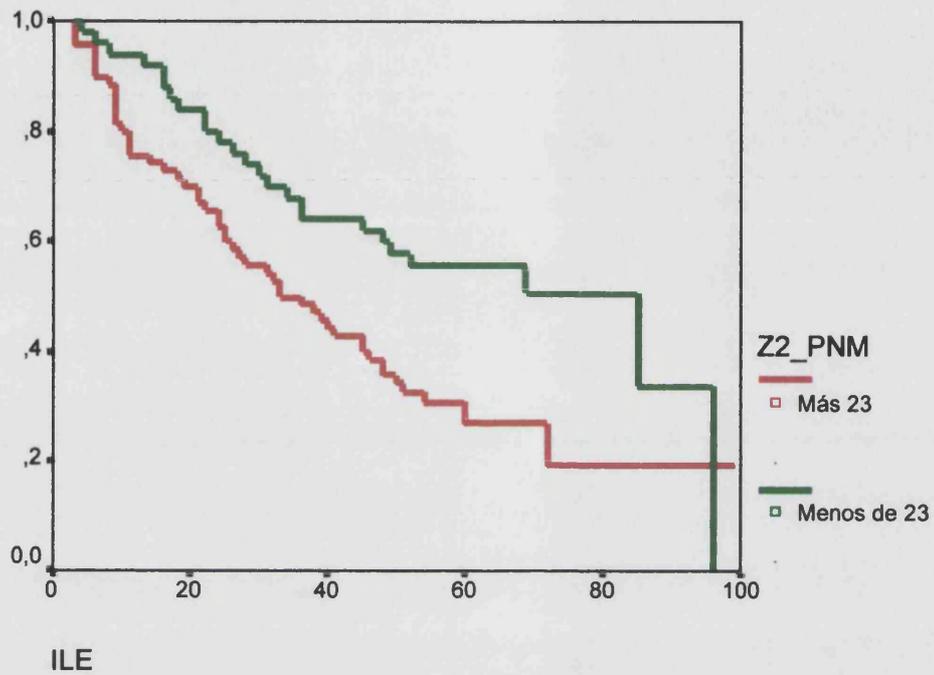
Gráfica 5.30. Tamaño tumoral e ILE



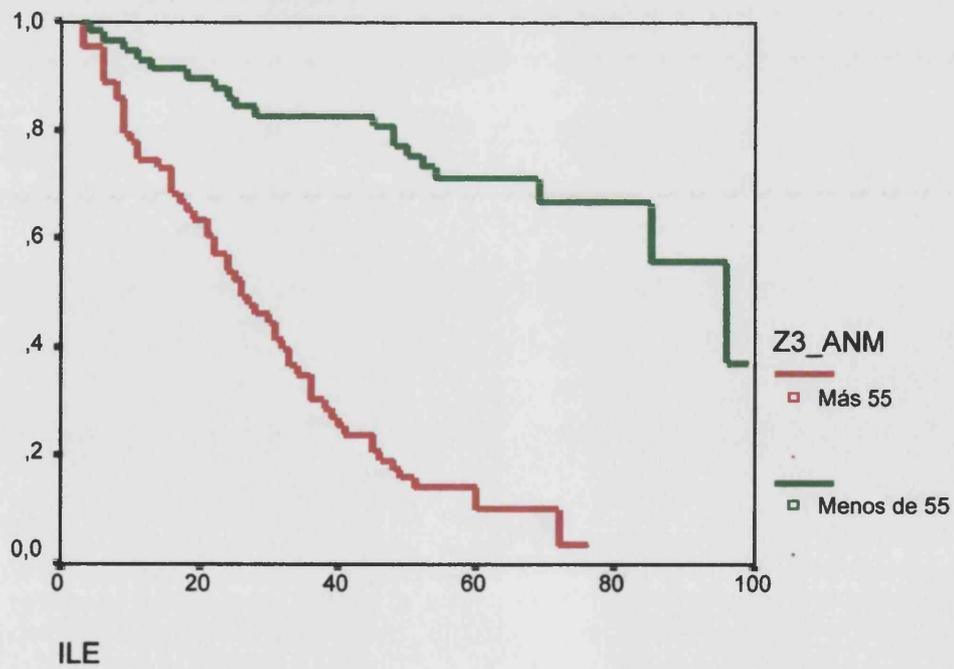
Gráfica 5.31. Grados de Parmar e ILE



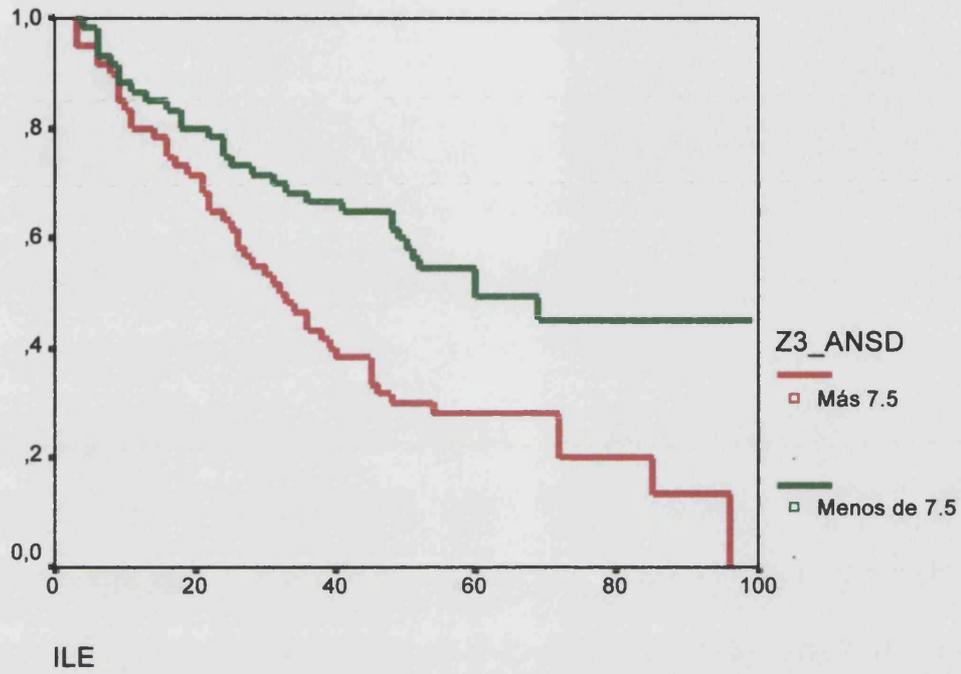
Gráfica 5.32. PNM Z2 e ILE



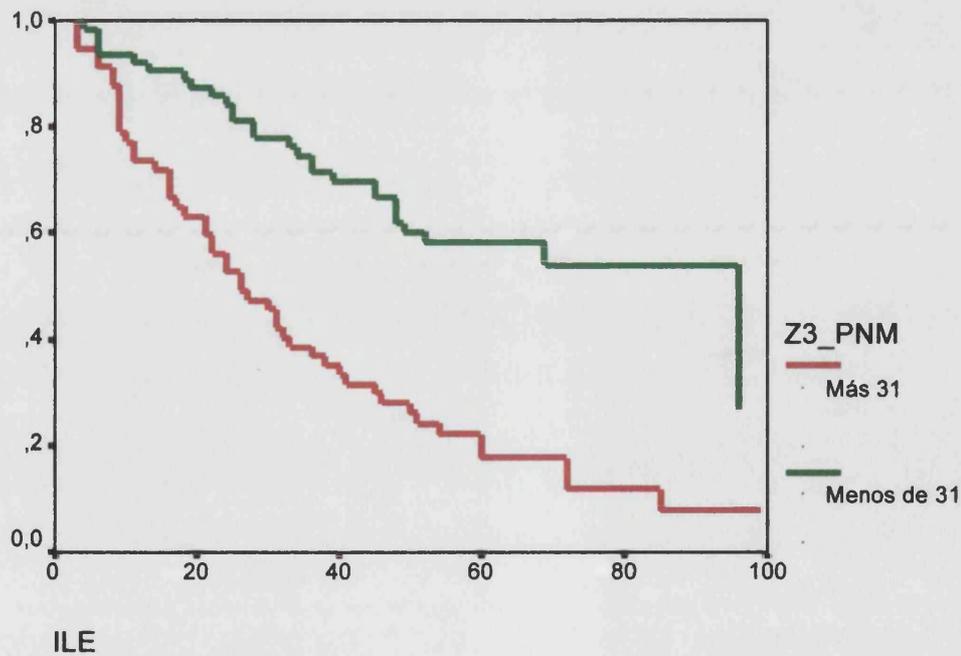
Gráfica 5.33. ANM Z3 e ILE



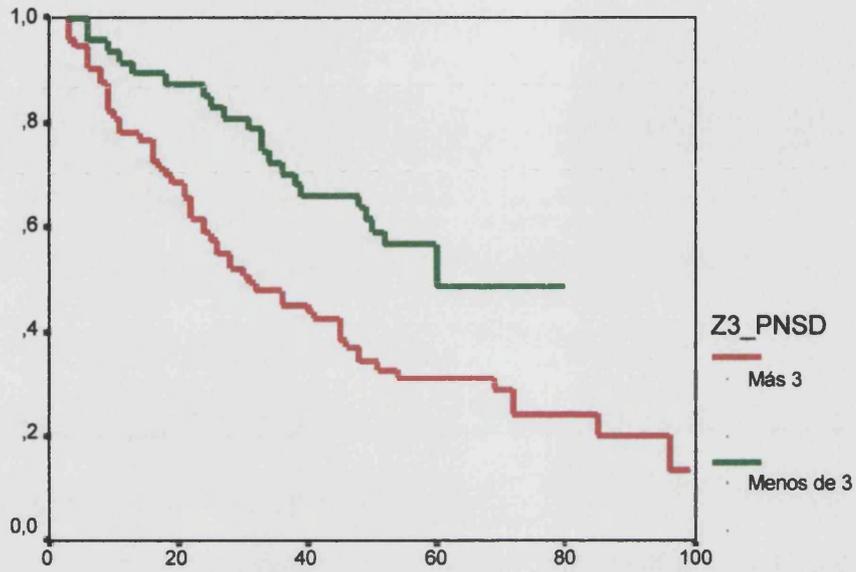
Gráfica 5.34. ANMDE Z3 e ILE



Gráfica 5.35. PNM Z3 e ILE

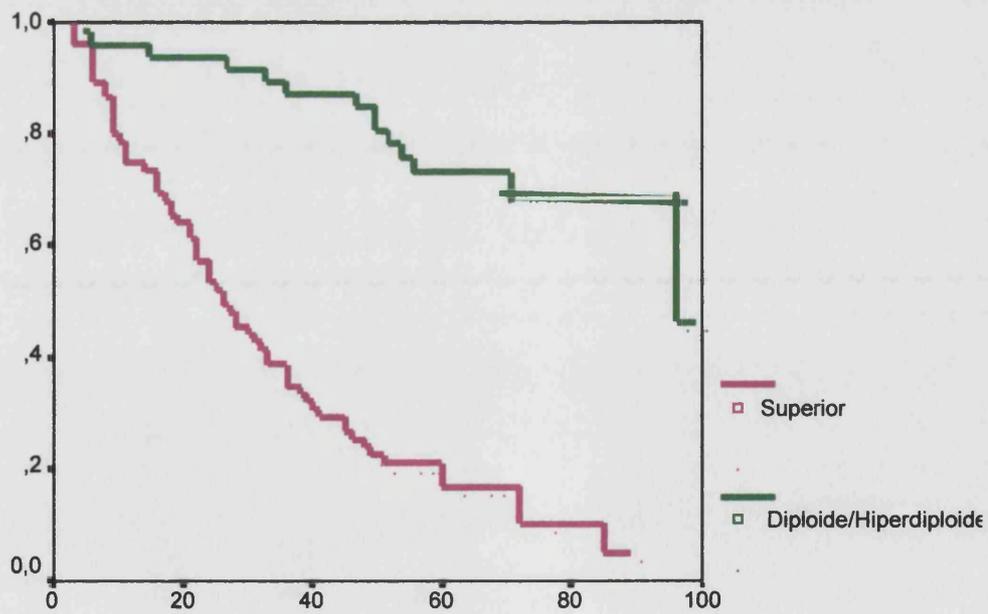


Gráfica 5.36. PNMDE Z3 e ILE

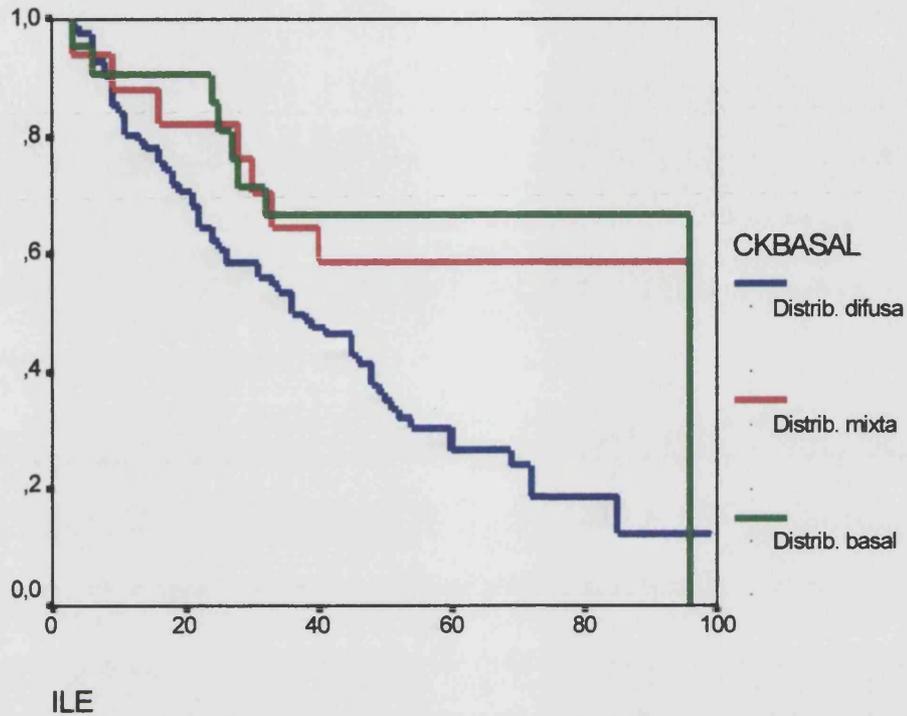


ILE

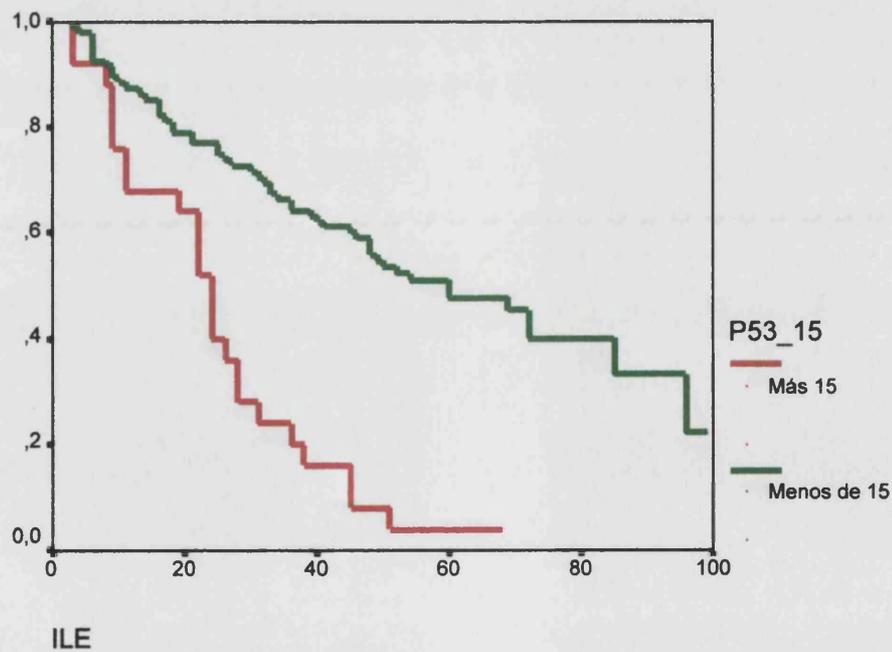
Gráfica 5.37. Ploidía Z3 e ILE



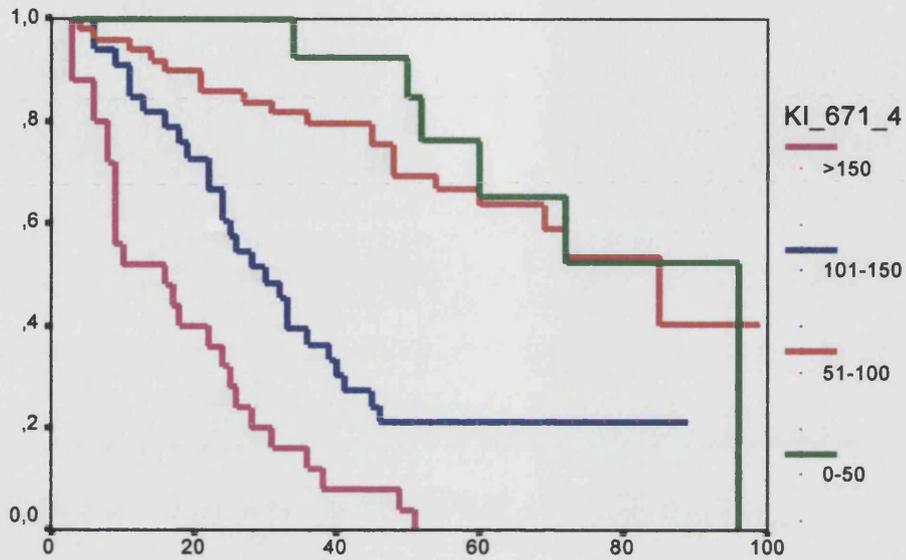
Gráfica 5.38. CK basal e ILE



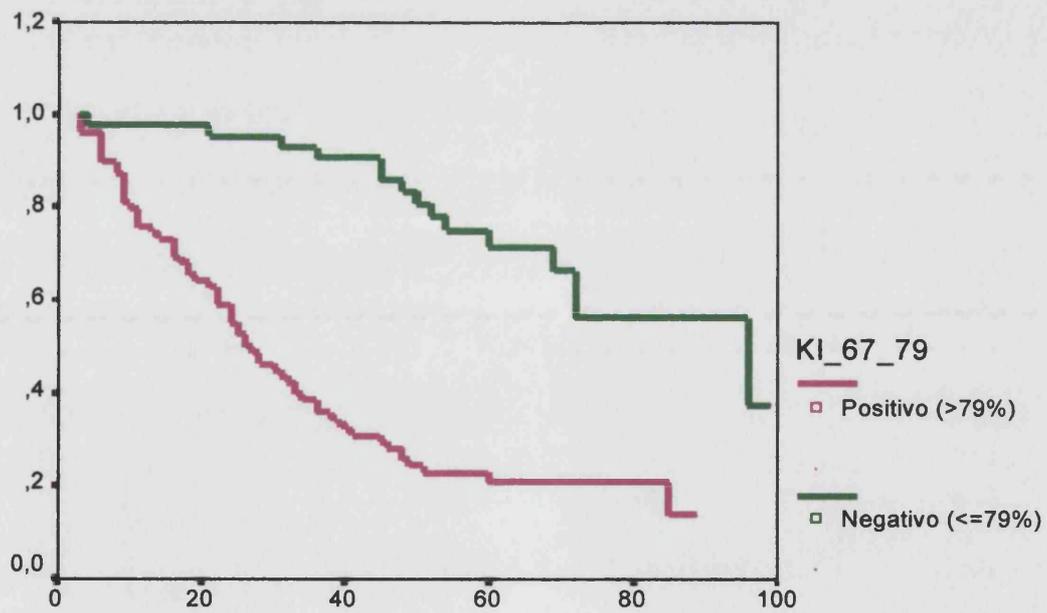
Gráfica 5.39. P53(15%) e ILE



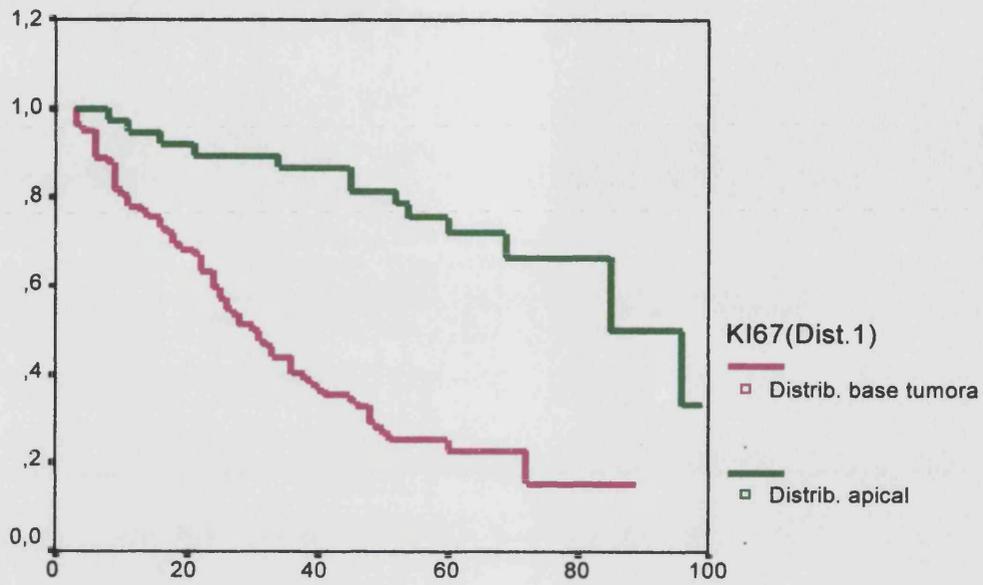
Gráfica 5.40. Ki-67(1-4) e ILE



Gráfica 5.41. Ki-67(79%) e ILE

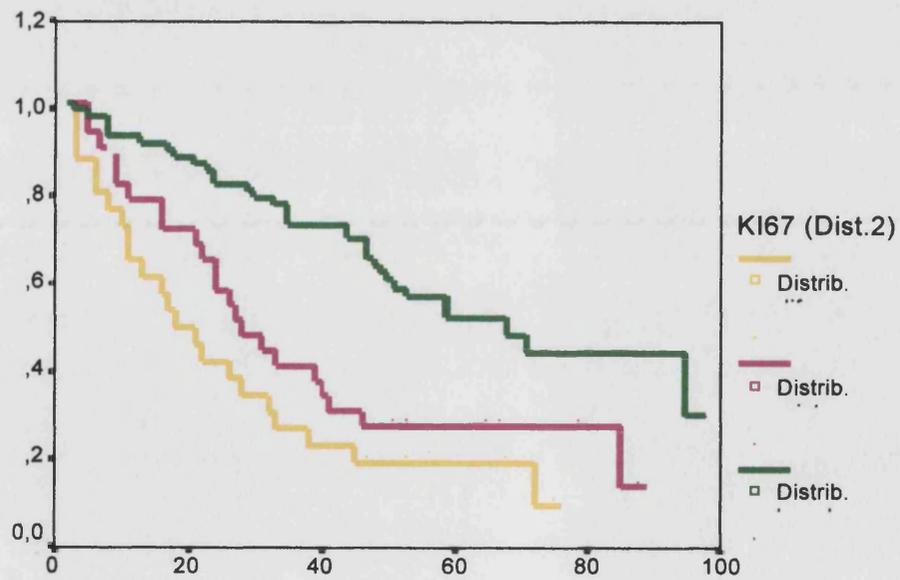


Gráfica 5.42. Ki-67 distr. 1 e ILE



ILE

Gráfica 5.43. Ki-67 dist. 2 e ILE



ILE

5.3.2.2. Análisis multivariante para el ILE

Para este estudio se aplicó el test de Cox, en el cual se consideran factores independientes aquellos que producen curvas de supervivencia para el ILE significativamente distintas, exceptuando el grado clásico (G1, G2a) y los grados clínicos de Parmar, los cuales son valoraciones subjetivas y poco reproducibles. La ecuación de Cox modeliza la función de Impacto del ILE respecto de los factores independientes. Los resultados han detectado como aspectos significativos el **Z3 ANM**, el **índice Ki-67 (MIB-1)** y la **distribución 1 de Ki-67·MIB-1**.

La siguiente tabla muestra la estimación del parámetro asociado, la significatividad del mismo y el riesgo estimado:

Variable ↓	Beta ↓	p-valor ↓	Exp (Beta) ↓
Z3 ANM	0.1054	<0.0001	1.1111
Ki-67 (MIB-1)	0.0110	0.0003	1.0110
Ki-67 dist.1	0.7561	0.0331	2.1300

La ecuación de la regresión de Cox para el modelo presente es:

$$H(t) = H_0(t)1.075^{Z3ANM}1.008^{Ki-67}2.13^{Ki-67dist.1}$$

La variable Z3 ANM produce diferencias significativas en la función de Impacto del ILE. Concretamente, cada incremento en una unidad en el ANM de los núcleos supone un incremento del 11% en la función de impacto.

El índice Ki-67 (MIB-1) o índice proliferativo tumoral también es significativo. Así, cada incremento en 10 unidades de este valor aumenta la función de impacto en un 11.6%.

Por último, un paciente con una distribución de Ki-67 en la base del tumor o de forma difusa multiplica su impacto por 2 respecto a otro con distribución del área más proliferativa en la porción apical o vegetante del tumor.

5.4. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES Y LA TASA DE RECURRENCIA (TR)

5.4.1. ANÁLISIS BIVARIANTE PARA LA VARIABLE TASA DE RECURRENCIA (TR)

Tabla 5.3. Valores "p" para las distintas variables comparadas

P<0.001	0.001<P<0.05	P>0.05
Diagnóstico 1 (grado)	Grado (1, 2a)	Sexo
Parmar	Diagnóstico 2 (grado)	Edad
ILE / Progresión*	Estadío	Resto valores morfom.
ANM Z3 y Z4	Multiplicidad	C-erbB-2
PNM Z3	Tamaño	Ploidía Z1
Ploidía Z3	ANMZ2	
P53 (15%)	PNM Z2	
Ki67·MIB-1 (79%)	DEPNM Z3 y Z4	
Ki-67·MIB-1 (1-4)	Ploidía Z2	
Ki-67 (distribución 1)	Ki-67 (distribución 2)	
CK basal / Ki-67 dist.2*	Bcl-2 (+)	
	CK-basal	
	P53 / Bcl-2(+)*	

DESGLOSE

• **TR y tamaño tumoral**

Las diferencias son significativas considerando un tamaño tumoral de 3cm, de manera que aquellos casos con tumores ≥ 3 cm tienen una TR=2.4%, por 1.5% de los tumores de entre 2-2.9 cm y 1.4% de los tumores < 2 cm (*Gráfica 5.44*).

Recordemos que el punto de corte para el ILE fue de 3cm, y para los grupos reales era de 2cm.

- **TR y multiplicidad tumoral**

Si el tumor extirpado es multifocal la TR media fue de 2.4%, mientras que en los tumores únicos fue de 1.3% (*Gráfica 5.45*).

- **TR y grado histológico**

Respecto al grado clásico de la OMS, 1973; la TR media para el grado 2a fue de 2.6%, frente a 1.5% cuando el tumor fue grado 1 (*Gráfica 5.46*).

En cuanto al sistema de gradación en 2 números, el grado secundario (diagnóstico 1) asignado por el patólogo en función del área tumoral más atípica se asoció estrechamente con la tasa de recidiva tumoral, mientras que grado primario o predominante (diagnóstico 2) se asoció con un nivel de significatividad muy inferior al anterior.

- **TR y estadio tumoral**

Los pacientes con invasión de la lámina propia (pT1) tienen una TR similar, y en ambos casos (infiltración focal o difusa) ésta fue significativamente superior (2.3% y 2%) a la TR de los tumores (pTa) limitados a la mucosa (1.5%) (*Gráfica 5.47*).

- **TR y grados clínicos "corregidos" de Parmar**

Los grados clínicos de Parmar se asocian a una mayor TR, siendo esta relación estadísticamente significativa. Así, Parmar grado 1 (TR=1.2%), Parmar grado 2 (TR=2.3%) y Parmar grado 3 (TR=3.8%) (*Gráfica 5.48*).

- **TR e ILE**

Los pacientes con ILE<40 meses tienen una TR media de 2.8%, mientras que en los pacientes con ILE>40 meses es de 0.7%. Por lo tanto, quienes antes recidivan son los que a lo largo del seguimiento tendrán más recurrencias.

- **TR y progresión**

La existencia de progresión tumoral en grado o estadio se asocia a una mayor TR (3%) que la ausencia de progresión (1.6%).

- **TR y tratamiento adyuvante**

Esta asociación **no** es casual, ya que son los precisamente los tumores que recidivan los que reciben habitualmente la terapia adyuvante.

- **TR y Z2**

Se detecta asociación significativa entre el área nuclear media de la zona 2 del tumor (ANM Z2) y la TR, de forma que un área $<30\mu\text{m}^2$ se corresponde con una TR 1.2% mientras que un área $>30\mu\text{m}^2$ lo hace con una TR de 1.9% (*Gráfica 5.49*).

- **TR y Z3**

La mayor parte de los parámetros medidos en esta zona tumoral (10 núcleos más atípicos) influyen decisivamente en la tasa de recurrencia. En concreto, el área, el perímetro y las desviaciones estándar de ambas medidas están relacionadas significativamente con la TR, con niveles de corte en $55\mu\text{m}^2$ para el ANM, $7.5\mu\text{m}^2$ para la DEANMZ3, $31\mu\text{m}^2$ para el PNM y $3\mu\text{m}^2$ para DEPNM, siendo el ANM el factor asociado con más fuerza (TR de 0.7 y 2.6% respectivamente) (*Gráfica 5.50*).

- **TR y Z4**

En esta zona tumoral (10 núcleos más pequeños) están asociadas significativamente con la tasa de recurrencia el ANM y la DEPNM, con los niveles de corte situados en $20\mu\text{m}^2$ y $2\mu\text{m}^2$ respectivamente (*Gráfica 5.51*).

- **TR y ploidía**

Se ha detectado asociación significativa entre la ploidía de las zonas tumorales Z2 y Z3 y la TR, de forma que índices de DNA (I.D) elevados se asocian con una mayor TR en ambas zonas del tumor. En concreto, en Z3 un I.D diploide o hiperdiploide presenta una TR=0.5%, mientras que un contenido triploide o superior de DNA muestra una TR=2.4% (*Gráfica 5.52*).

- **TR y P53(15%)**

El nivel ideal de corte se sitúa en el 15%, y así se dobla el valor de la TR en los pacientes con expresión de p53>15% (TR=2.8%) con respecto a los pacientes con p53<15% (TR=1.4%) (*Gráfica 5.53*).

- **TR y Ki-67 (MIB-1)**

Todas las variables consideradas para esta prueba muestran relación con la TR. En concreto, el nivel ideal de corte para la tasa proliferativa global del tumor es del 79%, mientras que los otros 2 tipos de distribución de las zonas proliferativas 1 y 2 (en el tumor y en la papila) muestran también asociación estadísticamente significativa. En cuanto a la tasa definida en 4 categorías el nivel de corte se situaría en torno al 100% (*Gráfica 5.54*).

- **TR y Bcl-2 (+)**

Una distribución **positiva difusa** de bcl-2 (en todas las capas celulares) es **significativamente superior** (2.4%) que una **marcaje positivo tan sólo en la capa basal** (1.2%), o que un **marcaje negativo** (1.8%) (*Gráfica 5.55*).

- **TR y CK-basal**

Si la expresión de esta citoqueratina es de **tipo basal o mixto** la TR es 1.2%, mientras que si esta expresión es de **tipo difuso** la TR es de 1.9% (*Gráfica 5.56*).

- **TR y P53(15%)/Bcl-2 (+)**

La expresión conjunta de **bcl-2 (+) y p53(15%)** con la variable TR está asociada **significativamente** con un valor $p=0.007$.

Sin embargo, caben las consideraciones específicas expresadas en la siguiente tabla:

Bcl-2 (+) (37 casos)	P53(-) (30 casos)	P53(+) (7 casos)
(+) células basales (25 casos)	0.94%	2.91%
(+) células no basales (12 casos)	2.22%	2.82%

- **TR y CK-basal / Ki-67(MIB-1) distribución 2**

La expresión conjunta de CK-basal y de la distribución 2 de Ki-67(MIB-1) **presentó una serie de particularidades** reflejadas en la tabla siguiente:

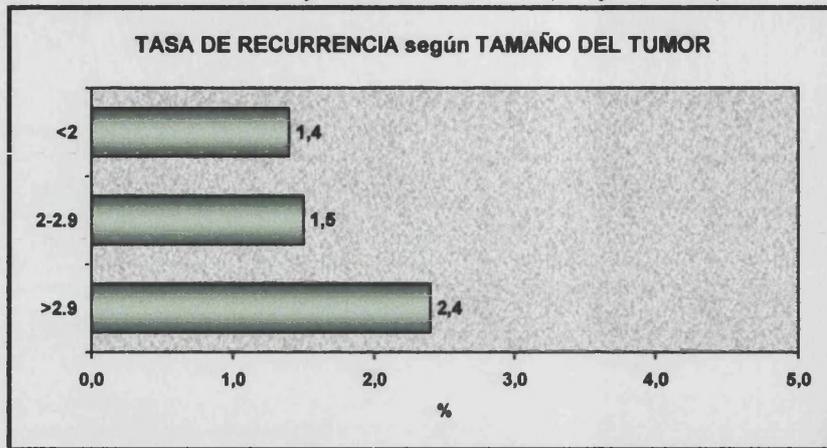
79 casos (100%)	Ki-67 basal (57 casos)	Ki-67 difusa (22 casos)
CK basal - basal (16 casos)	0.71% (11 casos) 2 casos / 3 recur.	2.21% (5 casos) 3 casos / 7 recur.*
CK basal - difusa (63 casos)	1.73% (46 casos) 30 casos / 52 recur.	2.43% (17 casos) 16 casos / 39 recur.*

* categorías que presentan un mayor n° de recurrencias por caso, al margen de la TR global en la que se consideran también los casos sin recidiva tumoral.

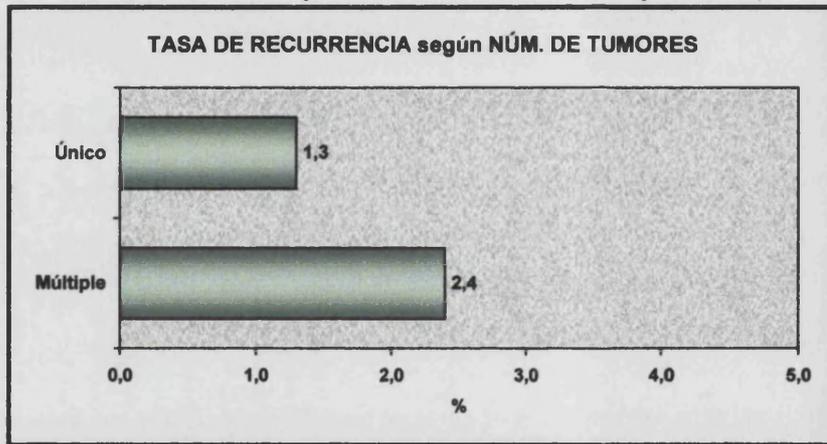
En resumen, las variables que mejor definen la tasa de recurrencia (TR) tumoral son el grado histológico secundario o diagnóstico 2, los grados clínicos "corregidos" de Parmar, las variables morfométricas de las áreas tumorales extremas (Z3 y Z4, o lo que es lo mismo los 10 núcleos más grandes y más pequeños), la ploidía de los 10 núcleos más atípicos (Z3), la expresión de p53(15%), el índice proliferativo tumoral (Ki-67·MIB-1), la distribución 1 de Ki-67·MIB-1, y la expresión conjunta de citoqueratina basal y la distribución 2 de Ki-67·MIB-1.

GRÁFICAS: Influencia de las variables en la tasa de recurrencia (TR)

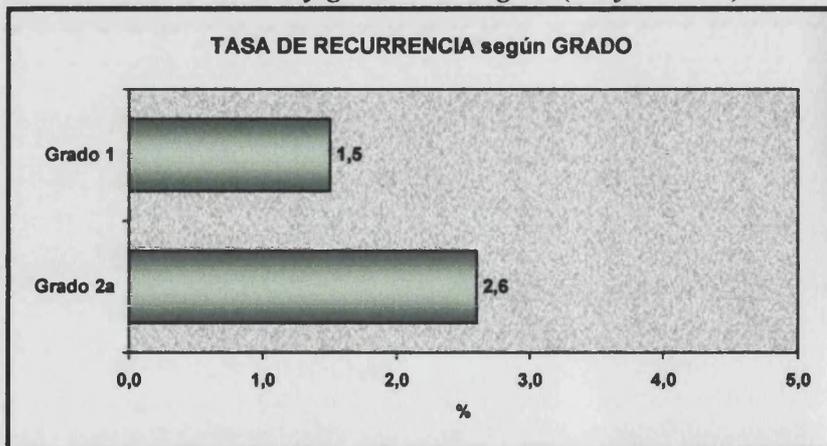
Tasa de recurrencia y tamaño tumoral (Gráfica 5.44)



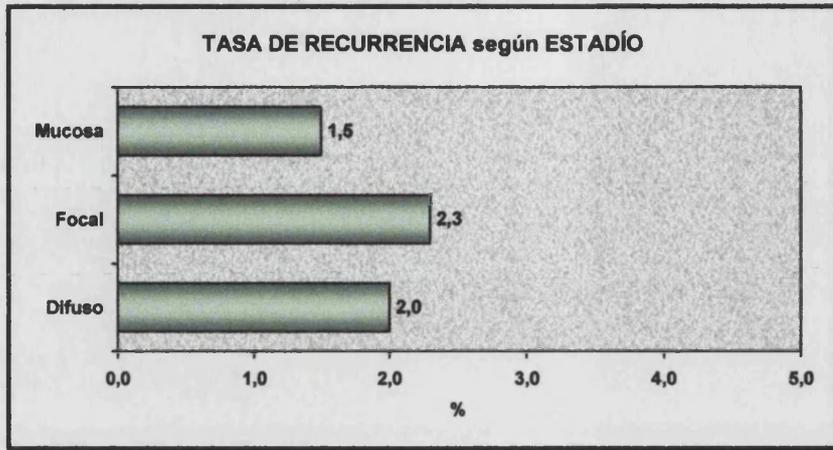
Tasa de recurrencia y número de tumores (Gráfica 5.45)



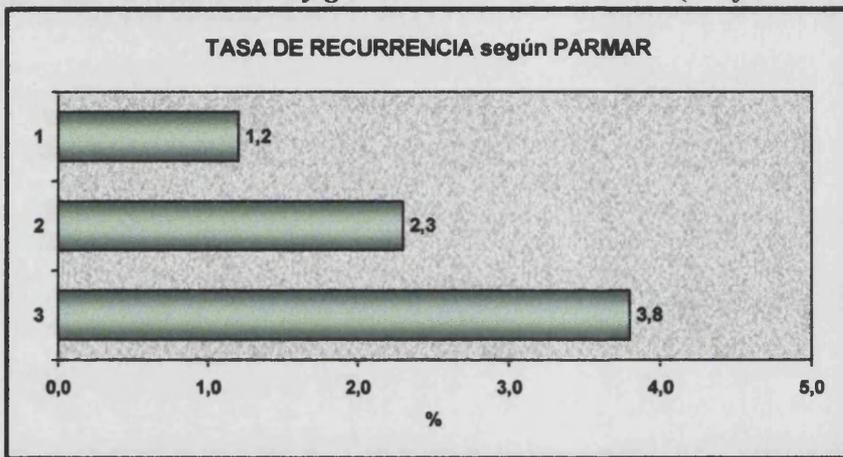
Tasa de recurrencia y grado histológico (Gráfica 5.46)



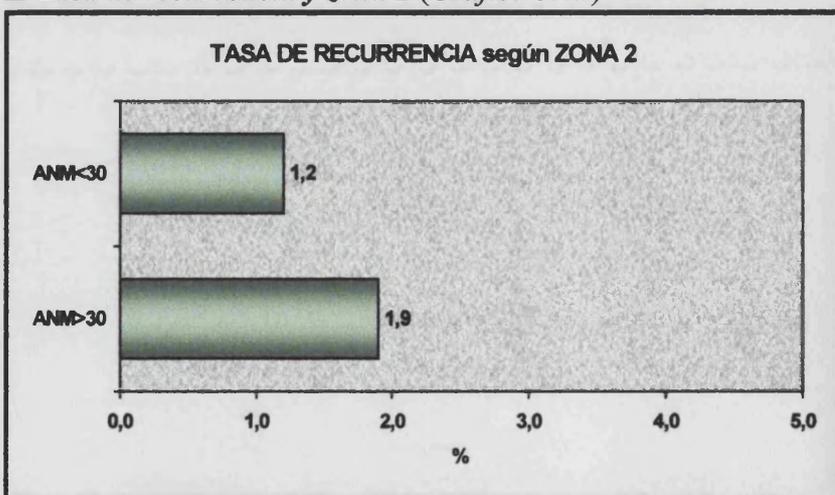
☑ *Tasa de recurrencia y estadio (Gráfica 5.47)*



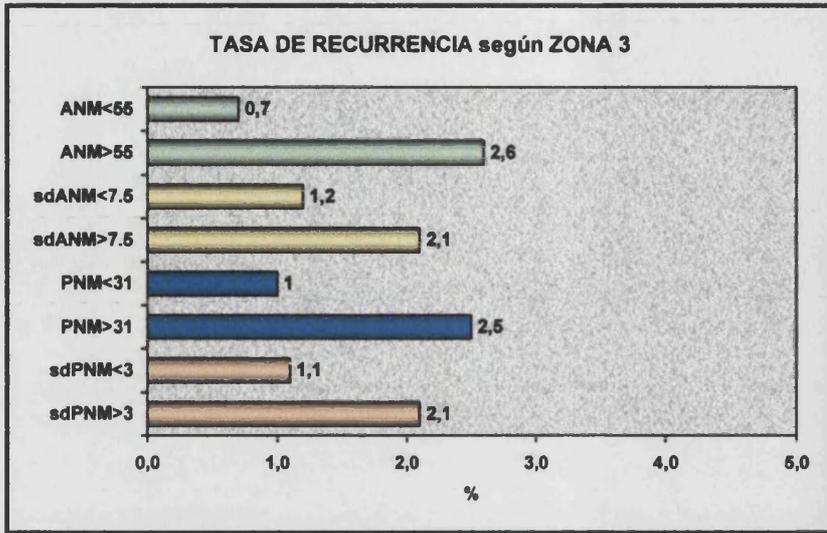
☑ *Tasa de recurrencia y grados clínicos de Parmar (Gráfica 5.48)*



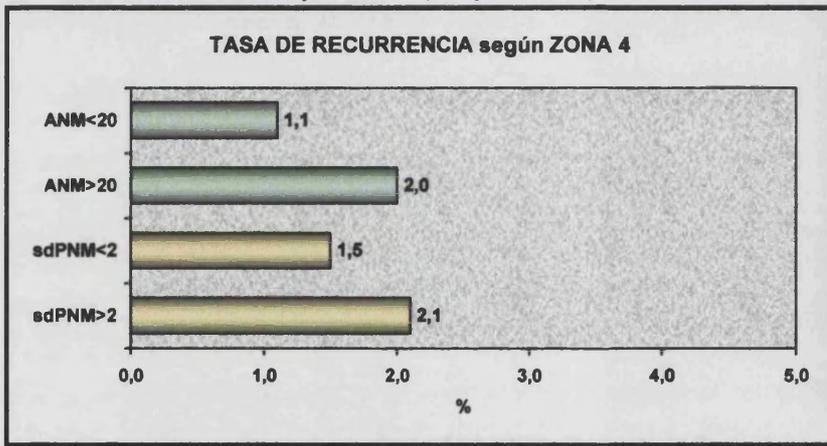
☑ *Tasa de recurrencia y zona 2 (Gráfica 5.49)*



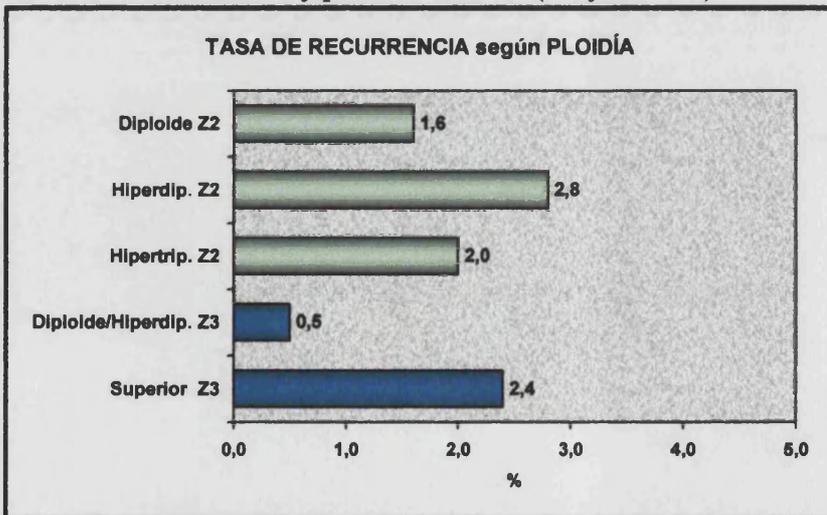
☑ *Tasa de recurrencia y zona 3 (Gráfica 5.50)*



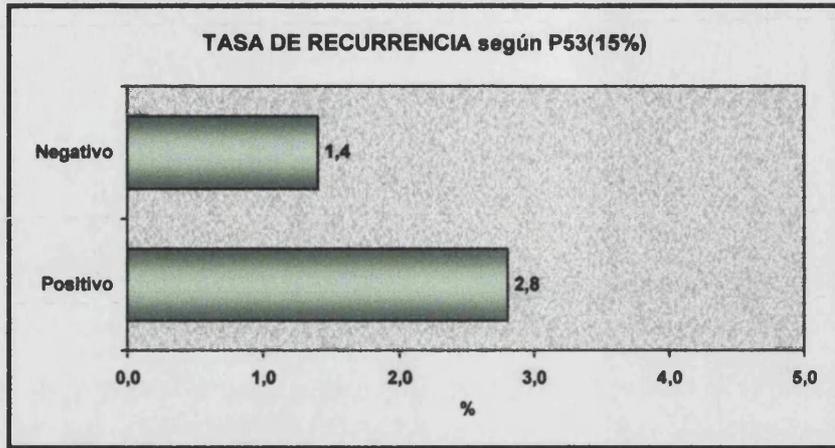
☑ *Tasa de recurrencia y zona 4 (Gráfica 5.51)*



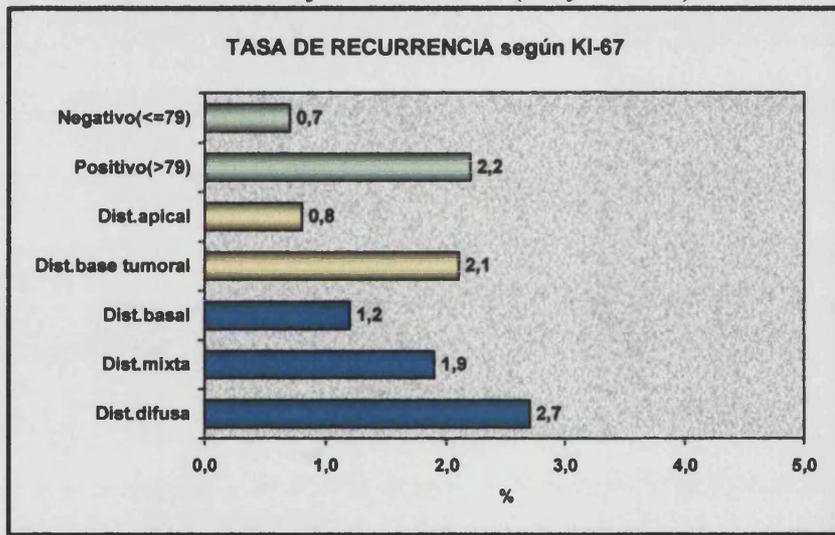
☑ *Tasa de recurrencia y ploidía tumoral (Gráfica 5.52)*



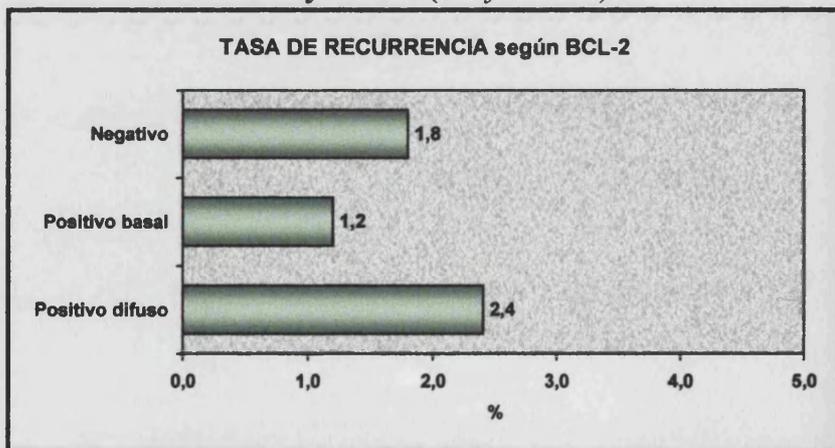
☑ *Tasa de recurrencia y P53(15%) (Gráfica 5.53)*

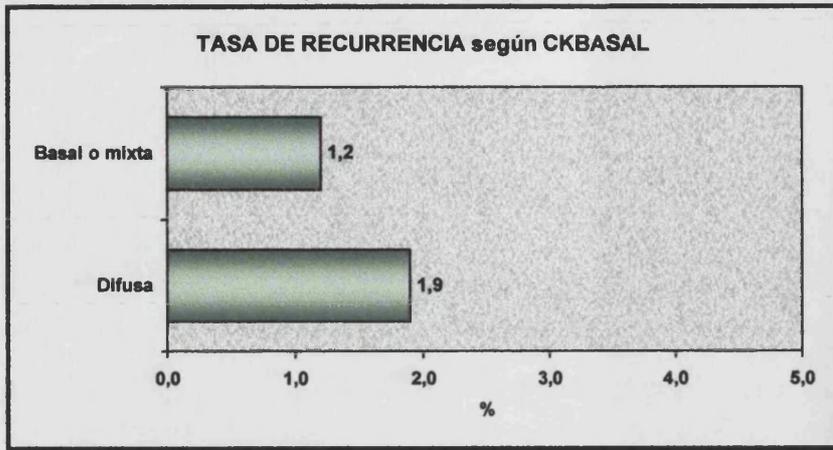


☑ *Tasa de recurrencia y KI-67·MIB-1 (Gráfica 5.54)*



☑ *Tasa de recurrencia y BCL-2 (Gráfica 5.55)*



☑ Tasa de recurrencia y CK-basal (Gráfica 5.56)

5.4.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE PARA LA VARIABLE TASA DE RECURRENCIA (TR)

Para este estudio se aplicó el test de regresión lineal múltiple. Con este modelo se pretende detectar qué factores influyen significativamente en la TR. Por la peculiar distribución de esta función pronóstica en la muestra (muchos pacientes toman valores discretos 0 ó 0.5) se hace necesario transformar la TR en otra variable que haga posible la aplicación del modelo, en concreto se considera la nueva variable $\log_nep(tasa+1)$. Este modelo selecciona como factores independientes los siguientes:

Variable	Beta	Error típico	p-valor	Exp(beta)
Constante	-1.381	0.28	< 0.001	0.505
Z3ANM	0.00305	0.005	< 0.001	1.003
Ki-67 dist.1 apical	0.236	0.071	0.001	1.266
Z3-ploidía	0.264	0.083	0.002	1.302
CK basal	0.198	0.066	0.003	1.218
Di-67 dist.2 difusa	0.18	0.076	0.02	1.197
Bcl-2 (+) difuso	0.216	0.1	0.033	1.241

La ecuación modelo es:

$$\text{Log_nep}(tasa+1) = -1.381 + 0.00305 (\text{Z3ANM}) + 0.236 (\text{Ki-67dist.1}) + 0.264 (\text{Z3ploidía}) + 0.198 (\text{CK basal}) + 0.18 (\text{Ki-67dist.2}) + 0.216 (\text{Bcl-2}).$$

$$\text{TR} = e^{-1.381 + 0.00305 (\text{Z3ANM}) + 0.236 (\text{Ki-67dist.1}) + 0.264 (\text{Z3ploidía}) + 0.198 (\text{CK basal}) + 0.18 (\text{Ki-67dist.2}) + 0.216 (\text{Bcl-2})} - 1.$$

La variable área nuclear de la zona tumoral más atípica o zona 3 (Z3 ANM) es la que más influye en la tasa de recurrencia (TR). Concretamente, cuando la Z3 ANM se incrementa en una unidad, la nueva TR = TR antigua x (1.003 + 1.003) -1. Así mismo se hace para todas y cada una de las variable, aunque cambian las partes aditiva y multiplicativa de la fórmula.

El valor del **coeficiente de determinación R²** sirve para determinar la "bondad" del ajuste del modelo utilizado. Este coeficiente se interpreta como el

porcentaje de varianza de la variable dependiente (TR) explicada por los 6 factores incluidos en el modelo en ese orden de importancia. En nuestro caso resulta ser de 0.698, es decir, aproximadamente el 70% de la varianza, lo cual sin ser un resultado perfecto es perfectamente aceptable para el estudio.

Para validar las hipótesis teóricas del modelo de Regresión Lineal Simple se han desarrollado gráficos de probabilidad normal de los "residuos", resultando éstos totalmente normales.

5.5. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES Y LA PREDICCIÓN DE PROGRESIÓN TUMORAL (ESTUDIO DESCRIPTIVO)

El estudio a cerca de la progresión tumoral se llevó a cabo desde una perspectiva meramente descriptiva, ya que solamente 11 de los 120 casos estudiados (9.2%) presentaron progresión tumoral en grado (7 casos) y/o en estadio (4 casos), frente a los 109 casos restantes que no progresaron (90.8%). Esta desproporción, añadida al reducido tamaño muestral, invalida la aplicación fiable de cualquier tipo de contraste estadístico, con lo cual nos limitaremos como hemos dicho a describir las tablas descriptivas pero sin realizar ninguna prueba de contraste.

Es interesante destacar el hecho que de los 11 casos que progresan, 6 (54.5%) estaban inicialmente limitados a la mucosa y los 5 (45.5%) restantes mostraron infiltración focal de la lámina propia, aunque ninguno de los casos mostraba infiltración difusa. Asimismo, de los 11 casos con progresión, 7 pertenecían al grado 1 de Parmar, 3 casos al grado 2 y sólo 1 caso era Parmar grado 3.

Los 11 casos que progresaron mostraban un contenido aneuploide de DNA en Z3: hipertriploide (5 casos), tetraploide (3 casos) e hipertetraploide (3 casos). El tamaño tumoral fue discretamente superior en los tumores que progresan (2.9cm) respecto de aquellos que no lo hacen (2.1cm). En el grupo de tumores que progresan la TR fue más elevada y el ILE fue más corto (menor tiempo de supervivencia).

Dentro de los valores morfométricos es de destacar el ANM, la DEANM, el PNM y la DEPNM, los cuales fueron significativamente más altos en el grupo de tumores con progresión.

Finalmente, dentro de los factores inmunohistoquímicos, la expresión de p53 fue de 6.1% en los tumores que no progresaron y de 13.9% en los que sí lo hicieron, mientras que el índice proliferativo Ki-67·MIB-1 de los tumores que progresaron fue significativamente más alto que el de los tumores sin progresión (160% por 102.3%); y, por último, la expresión de c-erbB-2 fue ligeramente más alta en el grupo de pacientes con progresión tumoral (42.3%) frente a la expresión en el resto de tumores que no progresan (35.2%).

5.6. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS (ANÁLISIS BIVARIANTE)

En este apartado se analizaron las posibles asociaciones entre los resultados de los diferentes estudios IHQ (P53, Ki-67·MIB-1 y CK basal). Los contrastes estadísticos arrojaron los siguientes resultados:

Variables IHQ	Valores "p"
P53 (10%) / CK basal	0.791
P53 (15%) / CK basal	0.160
P53 (20%) / CK basal	0.554
Ki-67·MIB-1 (1-4) / CK basal	0.842
Ki-67 (distribución 1) / CK basal	0.053
Ki-67 (distribución 2) / CK basal	0.814
Ki-67·MIB-1 (1-4) / P53 (10%)	<0.001
Ki-67 (distribución 1) / P53 (10%)	0.061
Ki-67 (distribución 2) / P53 (10%)	0.058
Ki-67·MIB-1 (1-4) / P53 (15%)	0.002
Ki-67 (distribución 1) / P53 (15%)	0.059
Ki-67 (distribución 2) / P53 (15%)	0.036
Ki-67·MIB-1 (1-4) / P53 (20%)	<0.001
Ki-67 (distribución 1) / P53 (20%)	0.027
Ki-67 (distribución 2) / P53 (20%)	0.051
Bcl-2 / P53	0.628
Bcl-2 / Ki67·MIB-1 (1-4)	0.339

Las únicas variables asociadas significativamente fueron el índice proliferativo y distribuciones de Ki-67·MIB-1 y la expresión de p53, de manera que si aumenta la expresión de la proteína p53 se produce un incremento proporcional en el índice proliferativo o en el tipo de distribución de las áreas de proliferación tumoral.

DESGLOSE

- **CK-basal y Ki-67·MIB-1**

Aunque no es estadísticamente significativa existe una fuerte asociación entre la **distribución 1 de Ki-67·MIB-1** y la expresión de **citoqueratina basal** ($p=0.053$). Concretamente, cuando el área proliferativa se localiza en el área vegetante del tumor la citoqueratina tiene una expresión predominantemente basal, mientras que si el tumor está proliferando en su base de implantación la expresión de esta citoqueratina es de forma difusa o mixta (no basal).

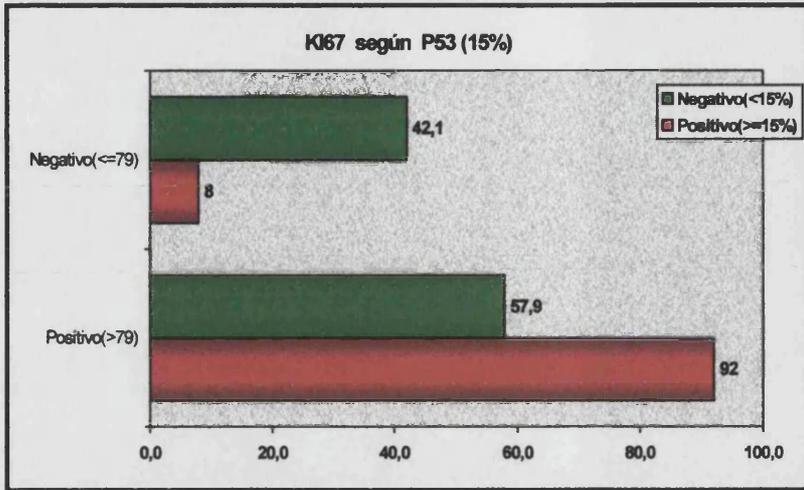
- **P53 y Ki-67·MIB-1**

Existe relación estadísticamente significativa entre el **índice proliferativo tumoral** y la expresión de **p53**. En primer lugar, si la expresión tumoral de p53 es positiva (nivel de corte **10%**) el 80% de los pacientes presentan un índice proliferativo superior al 100%, mientras que si es negativo sólo el 35% superaron este valor. Con un nivel de corte para la positividad en el **20%**, si la expresión de p53 es positiva el 93% de pacientes tuvieron un índice proliferativo tumoral mayor del 100%, mientras que con negatividad para p53 sólo el 42% superó este valor. Sin embargo, si se considera un nivel de corte para p53 en el **15%** (*Gráfica 5.57*) el valor p de la asociación es inferior ($p=0.002$) que con los niveles correspondientes al 10 y 20% ($p<0.001$).

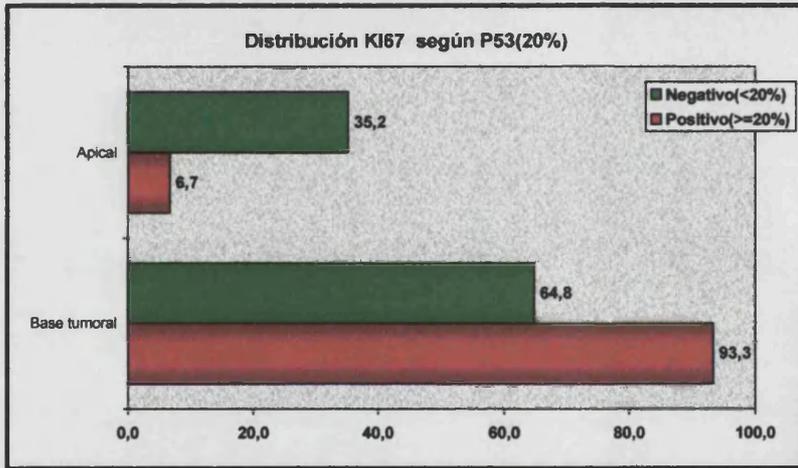
Se detecta, asimismo, que la **distribución 1 de Ki-67** depende significativamente únicamente del resultado de la **p53(20%)**, con una $p=0.027$. Así, si la p53 resultó positiva, prácticamente todos los valores de la Ki-67 mostraban una distribución en la base tumoral (93.3%), frente a un 64.8% si la p53 era negativa. Por otro lado, si la porción proliferativa del tumor se correspondía con la porción vegetante o apical, un 35.2% (84%) de los casos eran negativos y sólo un 6.7% (16%) eran positivos. Este valor de corte para p53 en el 20% supera a los valores 10 y 15% en este caso concreto (*Gráfica 5.58*).

Por lo que respecta a la **distribución 2 de Ki-67·MIB-1** ésta depende significativamente del resultado de **p53(15%)**, de forma que con una expresión de $p53>15\%$ el 60% de los valores de Ki-67·MIB-1 son de distribución mixta o difusa (*Gráfica 5.59*).

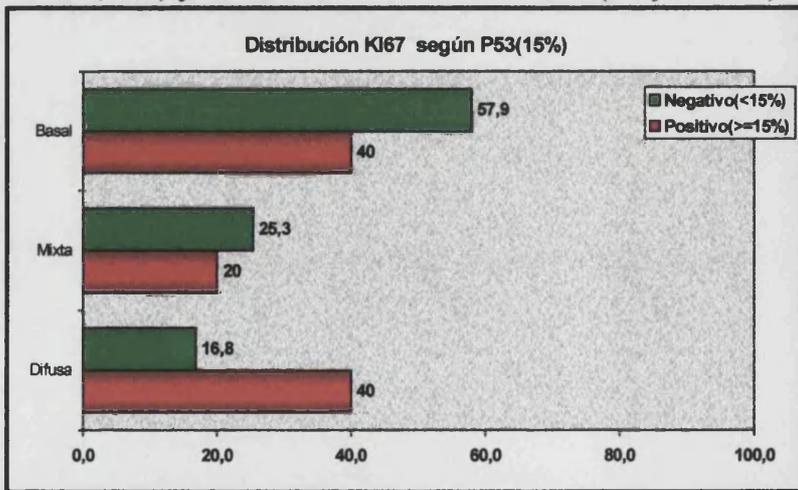
☑ **P53 (15%) y KI67·MIB-1 (79%)** (Gráfica 5.57)



☑ **P53 (20%) y distribución 1 de KI67·MIB-1** (Gráfica 5.58)



☑ **P53 (20%) y distribución 2 de KI67·MIB-1** (Gráfica 5.59)



5.7. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS DISTINTOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y LA PLOIDÍA DE LA ZONA TUMORAL MÁS ATÍPICA (Z3) (ANÁLISIS BIVARIANTE)

Variables	Valores "p"
Bcl-2	0.190
CK basal	0.415
P53 (10%)	0.001
P53 (15%)	0.001
P53 (20%)	0.005
Ki-67·MIB-1 (1-4)	<0.001
Ki-67 (distribución 1)	0.001
Ki-67 (distribución 2)	0.001

DESGLOSE

• **P53 y ploidía Z3**

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica de p53 con cualquier nivel de corte de la positividad (10-15-20%) y la ploidía tumoral en la zona tumoral más atípica (Z3). En concreto, es evidente que a mayor grado de ploidía mayor nivel de expresión de p53. De hecho, ningún caso positivo para p53 tuvo un contenido diploide de DNA y un reducido número presentó un contenido hiperdiploide (*Gráfica 5.60*).

• **Ki-67·MIB-1 y ploidía Z3**

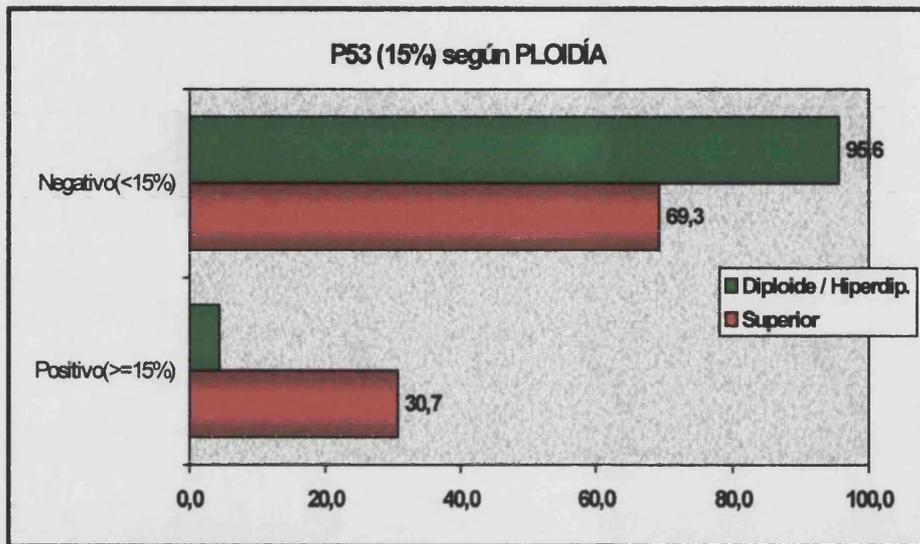
Por lo que respecta al índice proliferativo de Ki-67·MIB-1 también está estrechamente vinculado al grado de ploidía del área tumoral más atípica. Concretamente, a mayor grado de ploidía en Z3 se observa un mayor índice proliferativo (*Gráfica 5.61*).

Según la **distribución 1** del Ki-67·MIB-1, cuando el área proliferativa se localiza en la porción apical del tumor predominan los casos diploides e

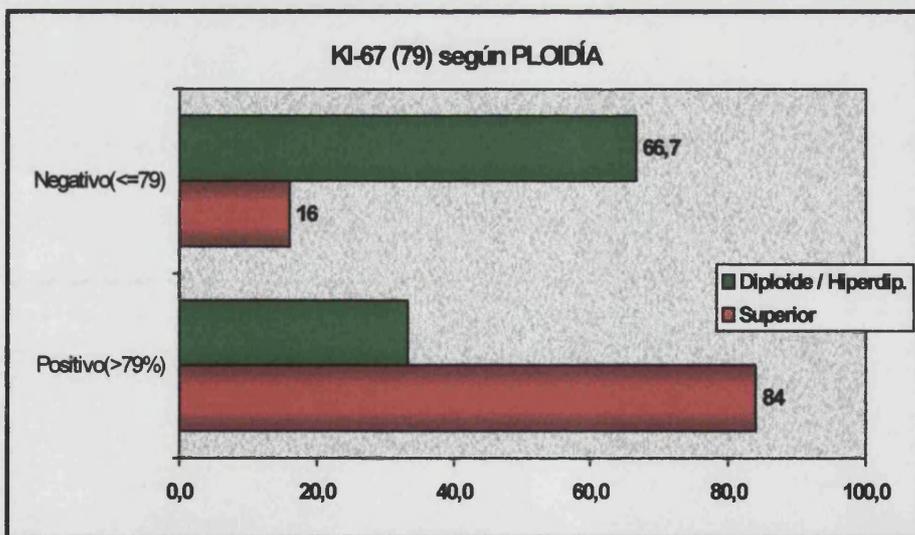
hiperdiploides, mientras que una distribución en la base tumoral significa un predominio de casos triploides, hipertriploides y tetraploides (*Gráfica 5.62*).

En relación con la **distribución 2 de Ki-67-MIB-1**, observamos que cuando se incrementa el grado de ploidía en Z3 ocurre una distribución difusa y mixta de Ki-67, mientras que la distribución de Ki-67 en las capas basales se asocia a un menor índice de DNA (*Gráfica 5.63*).

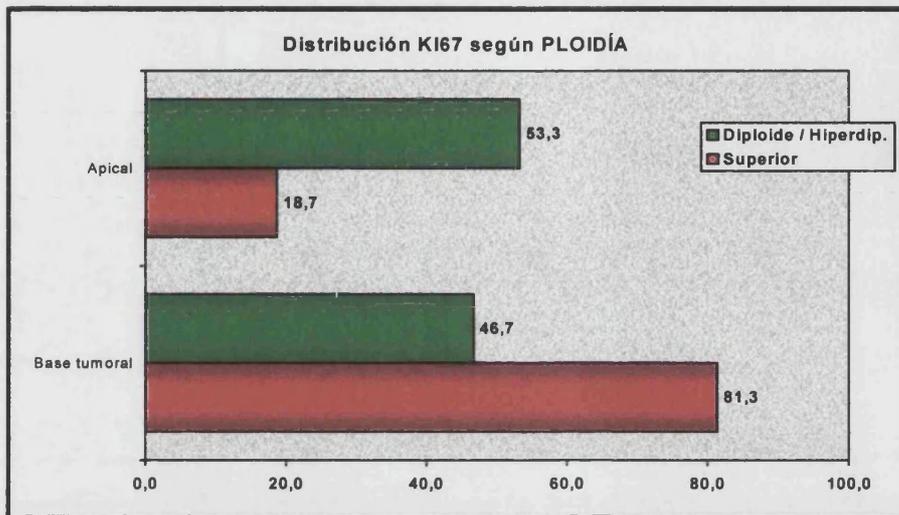
☑ **P53 (15%) y PLOIDÍA** (Gráfica 5.60)



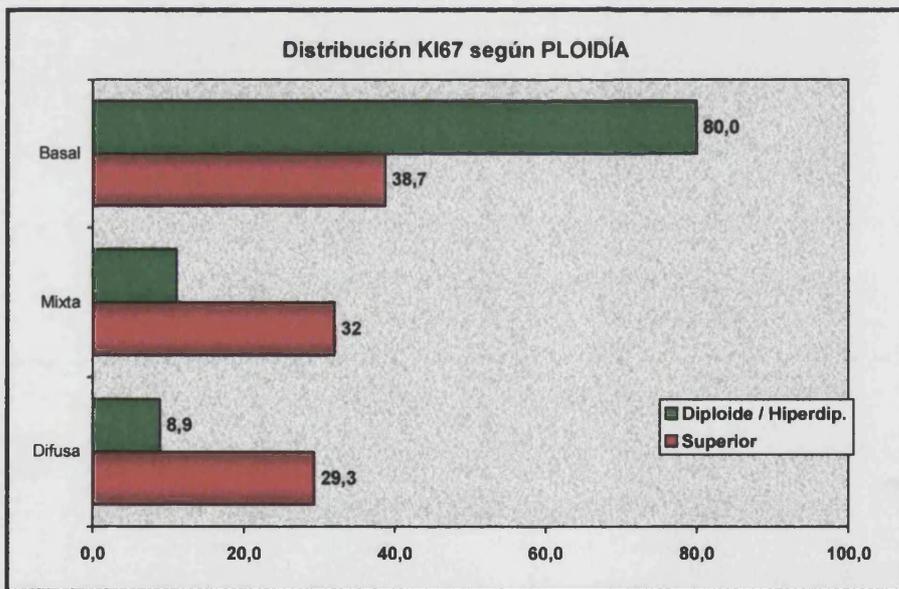
☑ **KI 67 (79%) y PLOIDÍA** (Gráfica 5.61)



☑ *Distribución 1 de KI67-MIB-1 y PLOIDÍA (Gráfica 5.62)*



☑ *Distribución 2 de KI67-MIB-1 y PLOIDÍA (Gráfica 5.63)*



5.8. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y EL ÁREA NUCLEAR MEDIA DE LA ZONA TUMORAL MÁS ATÍPICA (Z3ANM) (ANÁLISIS BIVARIANTE)

Una nueva batería de contrastes compara los resultados de las pruebas inmunohistoquímicas y el área nuclear media de la zona 3 (Z3 ANM). Excepto la CK-basal, cuya significatividad está al límite, el resto de pruebas se relacionan de forma significativa con el ANM del área Z3.

Variables	Valor de "p"
CK-basal	0.053
P53 (10%)	0.043
P53 (15%)	0.001
P53 (20%)	0.005
Ki-67·MIB-1 (1-4)	<0.001
Ki-67 (distribución 1)	<0.001
Ki-67 (distribución 2)	<0.001

DESGLOSE

- **Citoqueratina (CK)-basal y Z3 ANM**

El patrón de inmunotinción de esta CK estuvo cerca de ser significativa en relación con el área nuclear de la zona 3 del tumor (Z3 ANM) (*Gráfica 5.64*).

- **P53 y Z3 ANM**

En la zona tumoral más atípica (Z3), el **área nuclear media (ANM)** se asocia significativamente con el nivel de expresión de p53, de hecho, independientemente del nivel de corte para la positividad de p53 (10-15-20%), la asociación estadística es muy fuerte (*Gráfica 5.65*).

Con un nivel de corte para p53 en un 15% los casos negativos para p53 (p53<15%) mostraban un Z3 ANM de $53.7\mu\text{m}^2$, mientras que los casos positivos

(p53>15%) presentaban un Z3 ANM de $61.5\mu\text{m}^2$. De forma análoga ocurre con los otros 2 niveles de positividad p53(15-20%), aunque la asociación más fuerte se consigue con un nivel de corte para p53 del 15%.

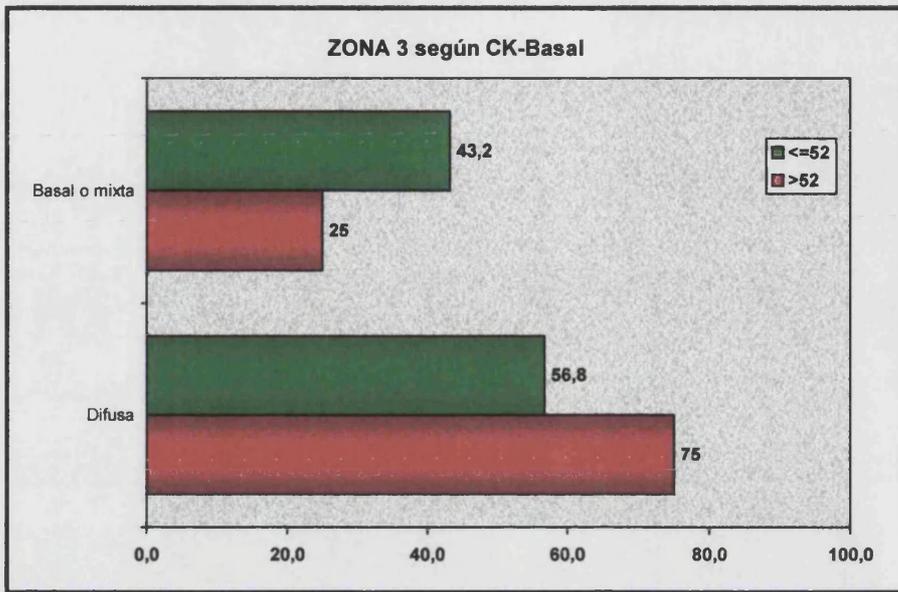
- **Ki-67 (MIB-1) y Z3 ANM**

El índice proliferativo de Ki-67·MIB-1 (1-4) está significativamente asociado con el Z3 ANM, de manera que cuanto mayor es este índice mayor es el promedio del área nuclear (*Gráfica 5.66*).

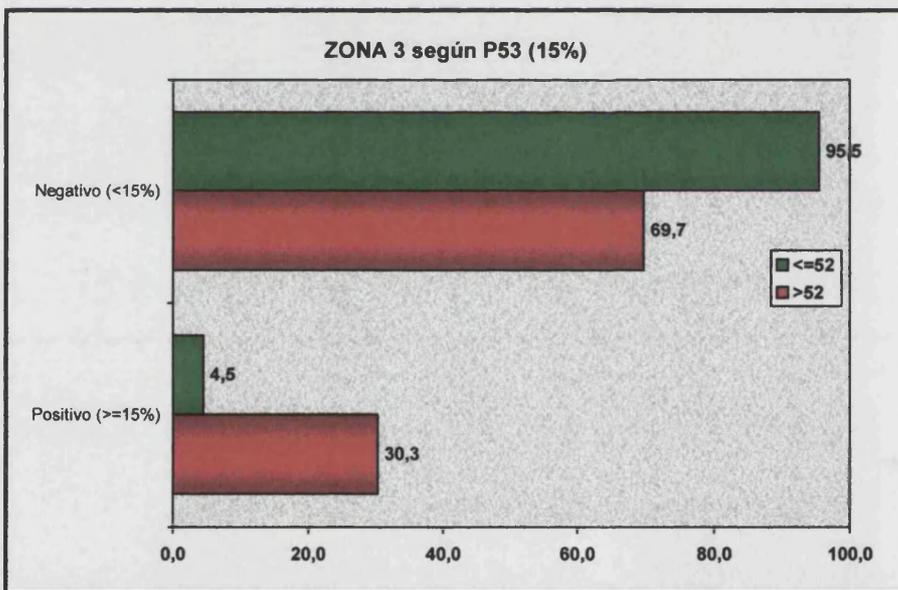
Con la **distribución 1 de Ki-67·MIB-1** ocurre algo semejante (*Gráfica 5.67*), de forma que una distribución apical se corresponde con un Z3 ANM de $50.6\mu\text{m}^2$, mientras que para una distribución difusa o en la base tumoral el Z3 ANM es de $57.5\mu\text{m}^2$.

Asimismo, la **distribución 2 de KI-67·MIB-1** muestra un promedio de $52.5\mu\text{m}^2$ si la distribución es basal, de $60.4\mu\text{m}^2$ en el resto de capas, y de $56.9\mu\text{m}^2$ si es la distribución es mixta (valor situado entre los 2 anteriores) (*Gráfica 5.68*).

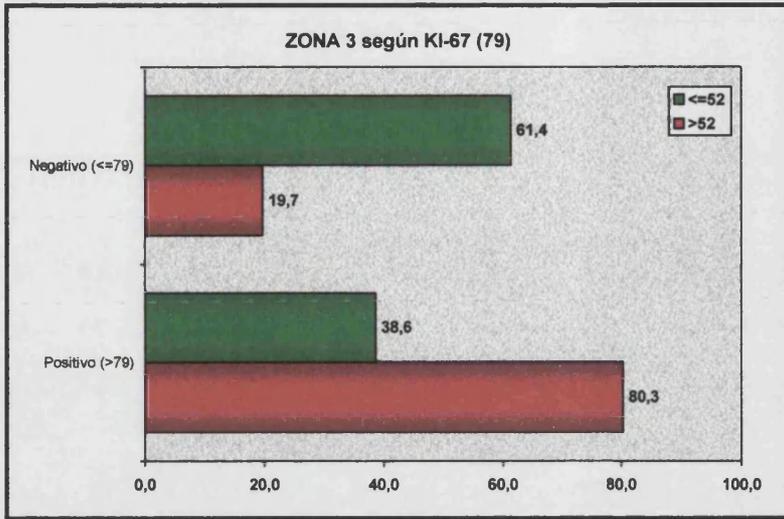
☑ *CK-basal y Z3 ANM (Gráfica 5.64)*



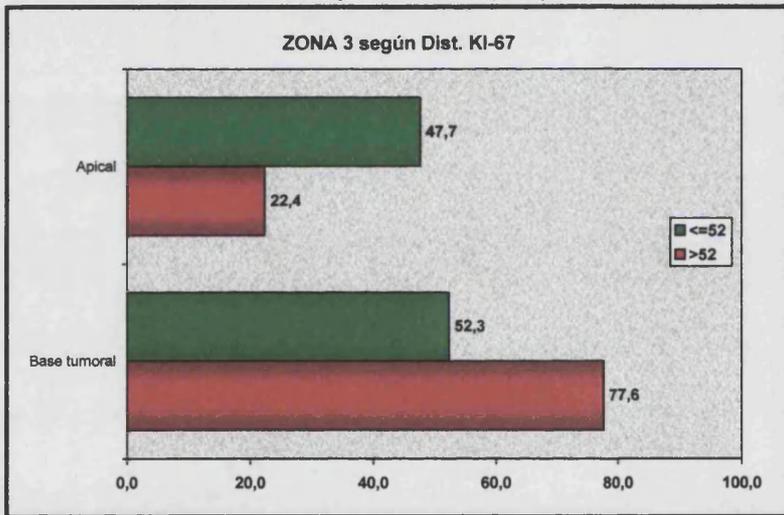
☑ *P53 (15%) y Z3 ANM (Gráfica 5.65)*



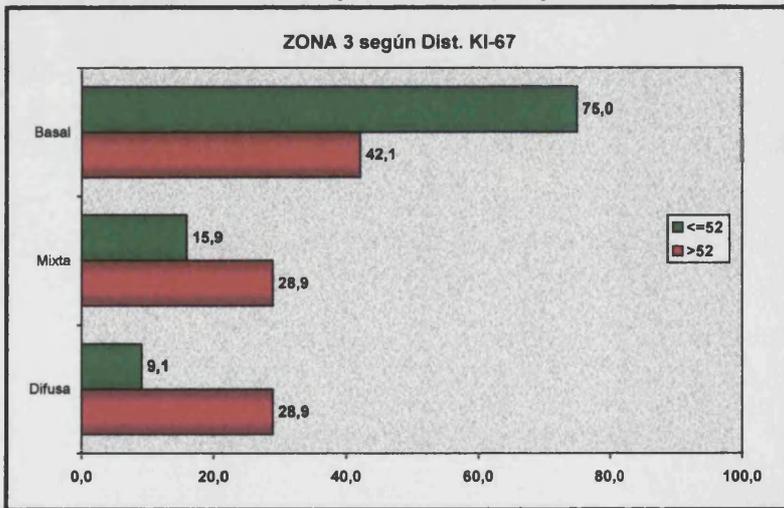
☑ **KI-67 y Z3 ANM (Gráfica 5.66)**



☑ **Distribución 1 de KI67 y Z3 ANM (Gráfica 5.67)**



☑ **Distribución 2 de KI67 y Z3 ANM (Gráfica 5.68)**



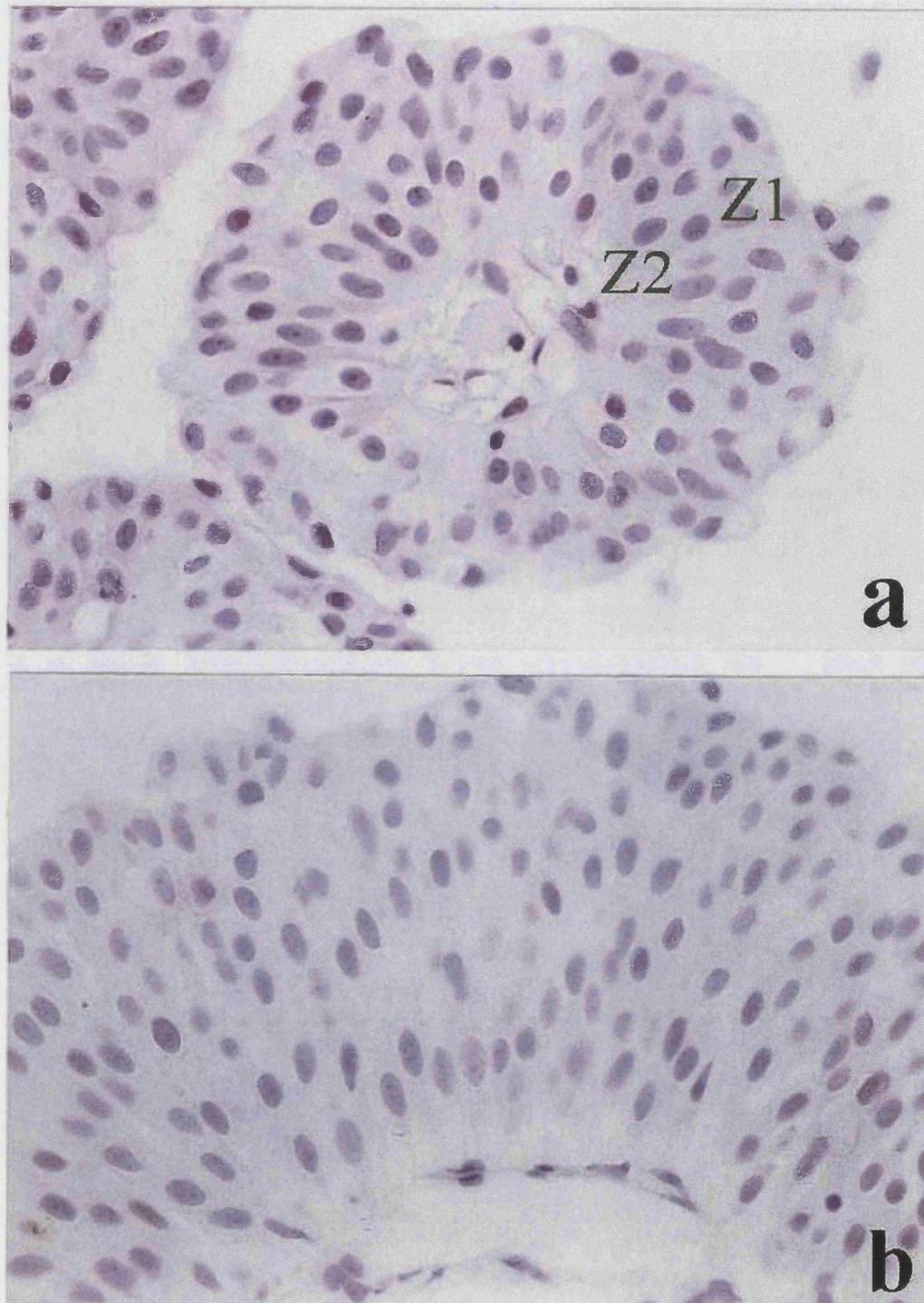


FIGURA 5.1. Imagen histológica de una neoplasia vesical de bajo potencial maligno (BPM): a- sección transversal con las zonas externa (Z1) e interna (Z2) de la papila (H-E, 20x); b- sección longitudinal (H-E, 20x)

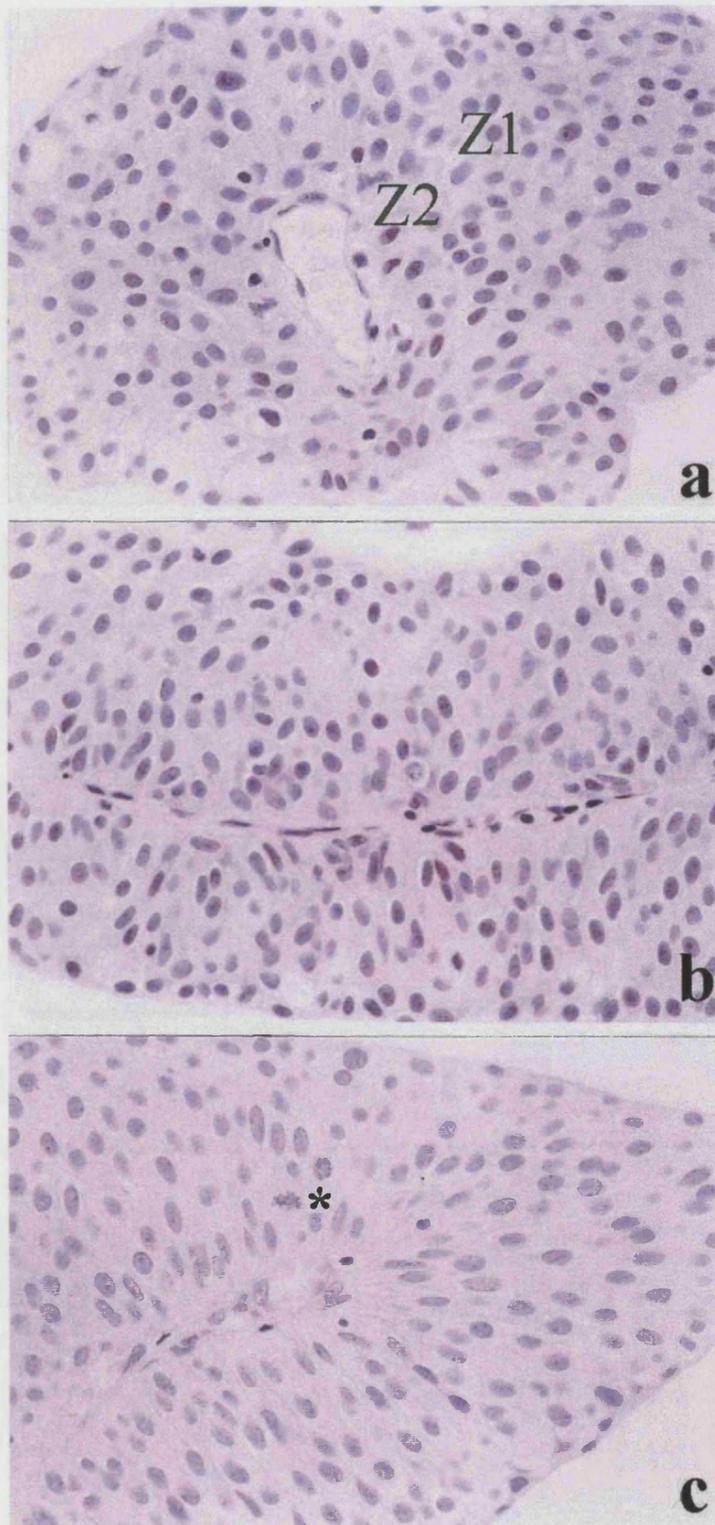


FIGURA 5.2. Imagen histológica de un carcinoma vesical de bajo grado (BG): a- sección transversal con la zona externa (Z1) e interna de la papila (Z2); b- sección longitudinal; c- presencia de figuras mitóticas (*) en las capas basales (H-E, 20x)

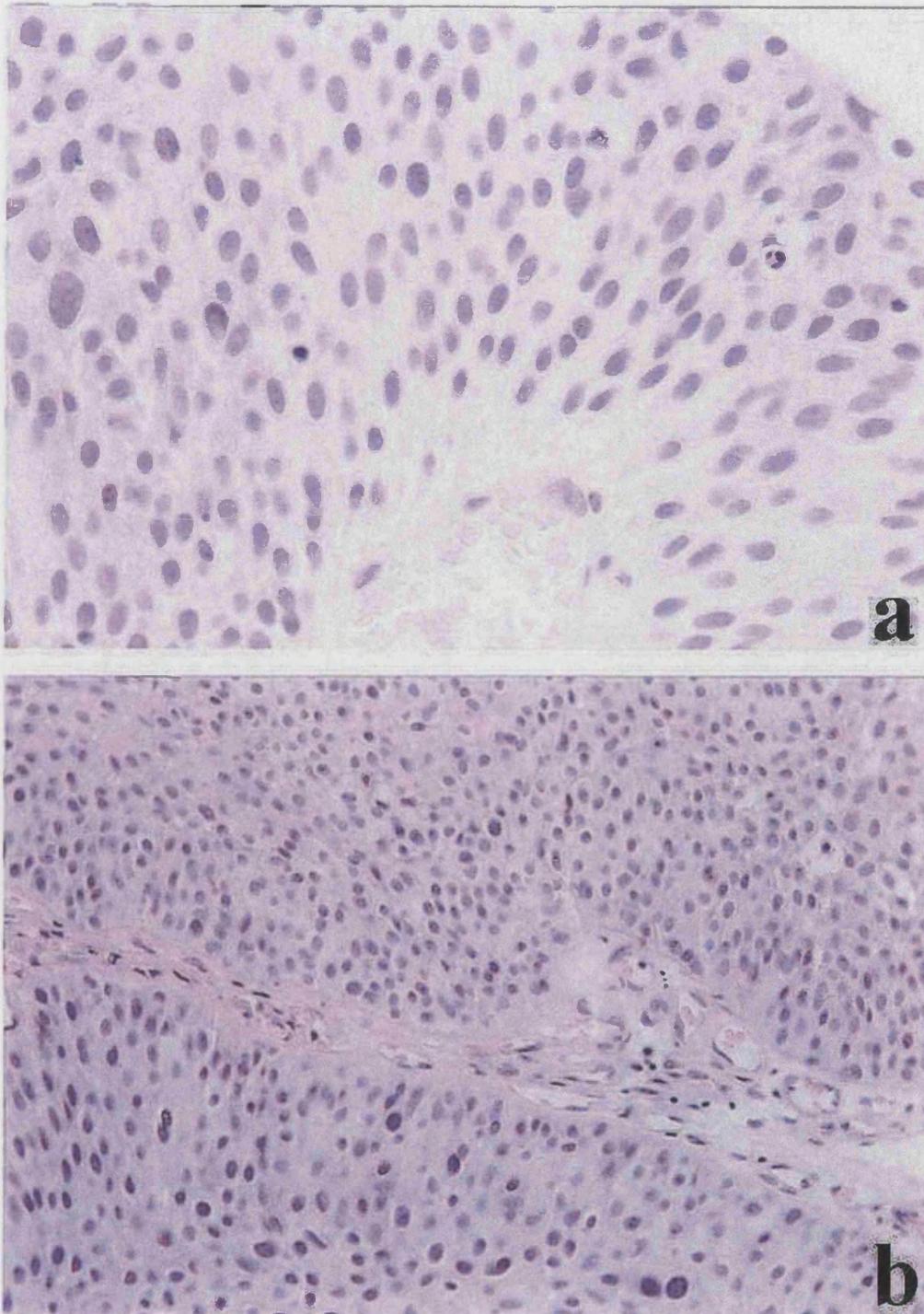


FIGURA 5.3. Imagen histológica de la zona tumoral más atípica (Z3) en un carcinoma vesical de bajo grado (BG): a- núcleos atípicos en el área izquierda de la imagen (H-E, 40x); b- ídem en la parte inferior de la imagen (H-E, 10x)

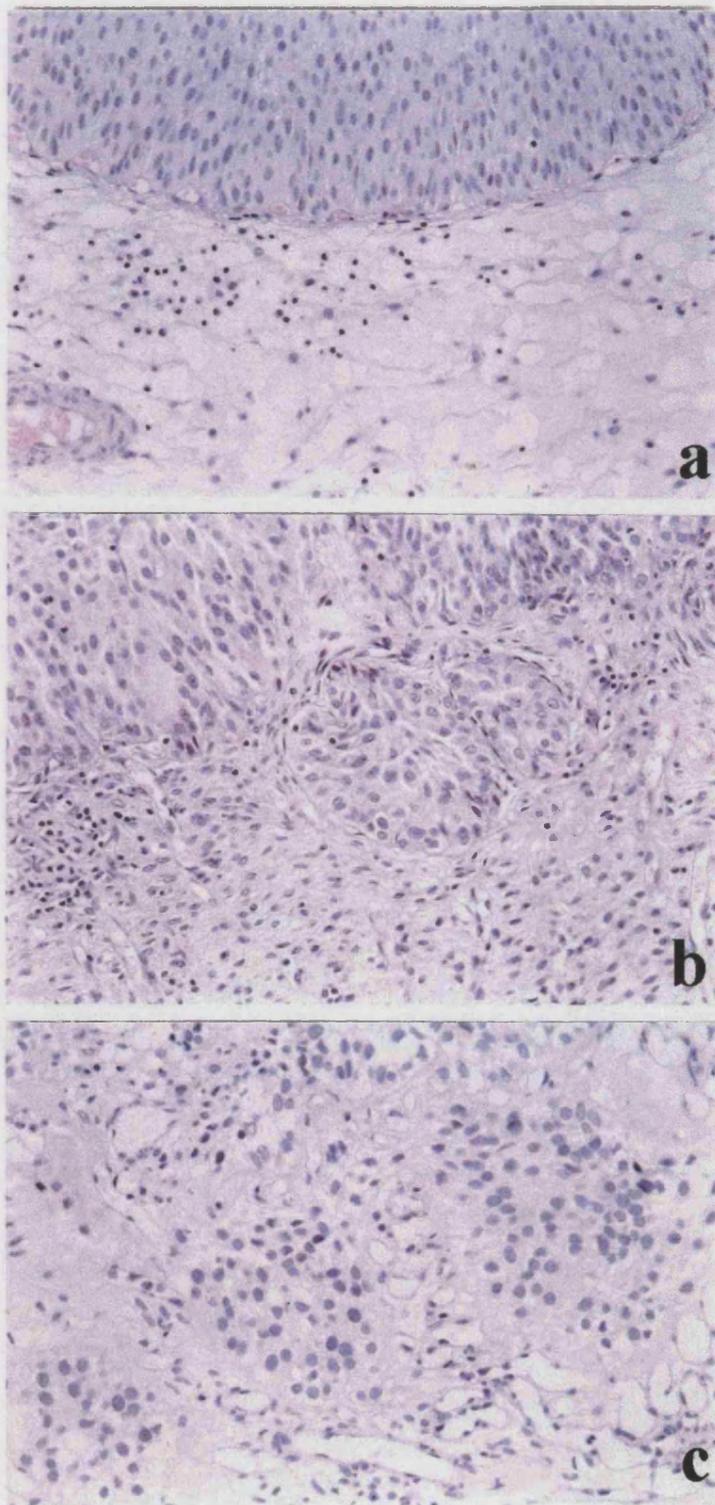


FIGURA 5.4. Imagen histológica ilustrativa del estadio tumoral: a- tumor limitado a la mucosa (H-E, 10x); b- invasión focal de la lámina propia (H-E, 20x); y c- invasión difusa de la lámina propia (H-E, 20x)

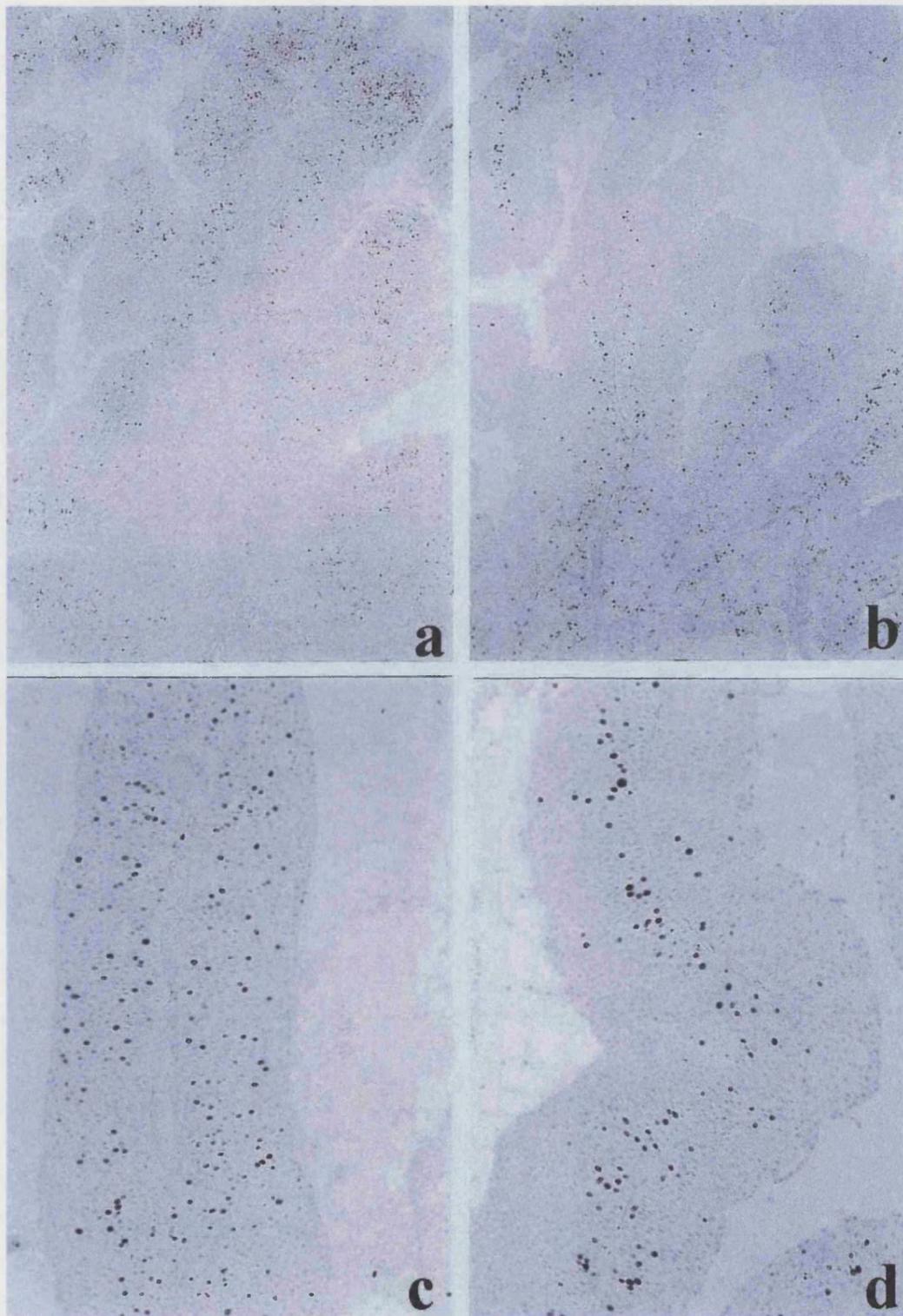


FIGURA 5.5. Expresión inmunohistoquímica de la actividad proliferativa tumoral (índice Ki-67·MIB-1). Distribución apical (a) y en la base tumoral (b). Distribución de tipo difuso (c) o de tipo basal (d) de las células en ciclo en el seno de la papila (peroxidasa-antiperoxidasa, 4x y 10x)

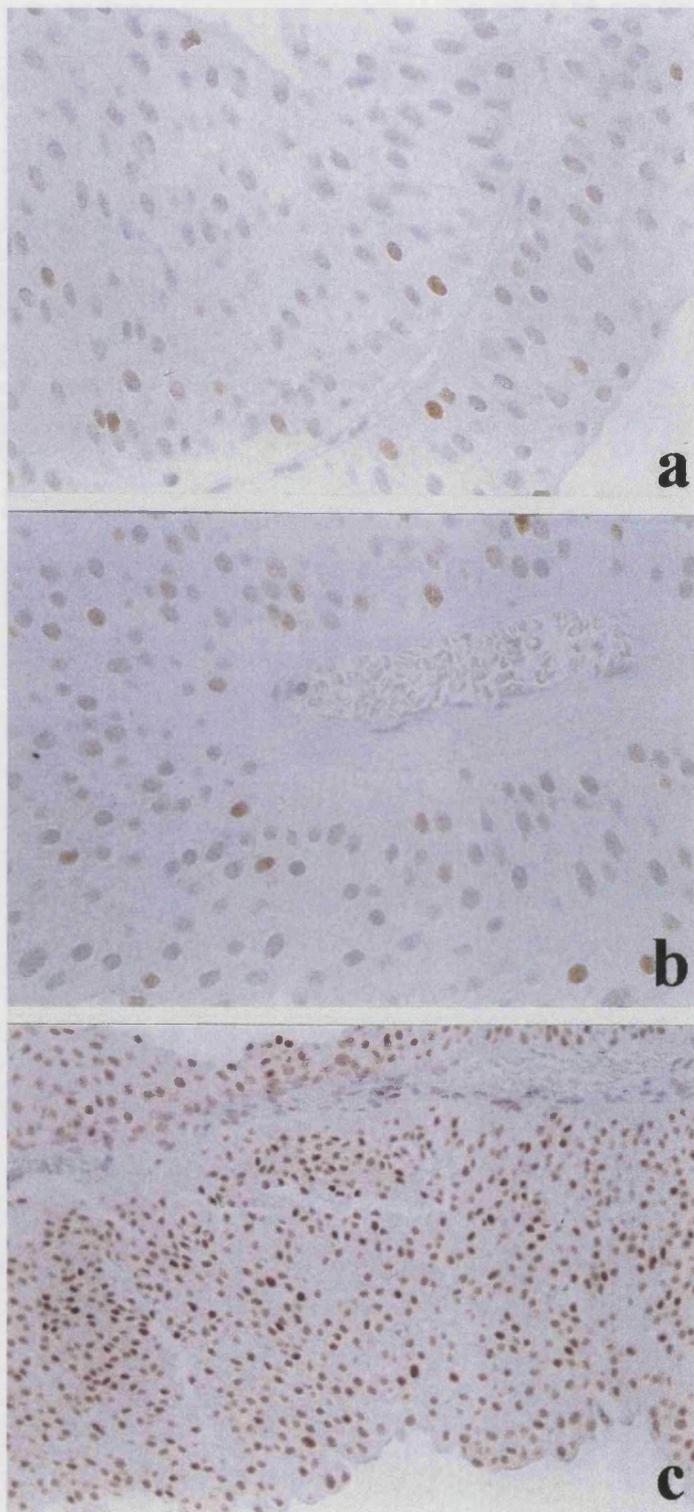


FIGURA 5.6. Expresión inmunohistoquímica de la proteína p53; a y b- niveles bajos de expresión; c- nivel elevado de expresión de p53 (peroxidasa-antiperoxidasa, 40x y 20x)

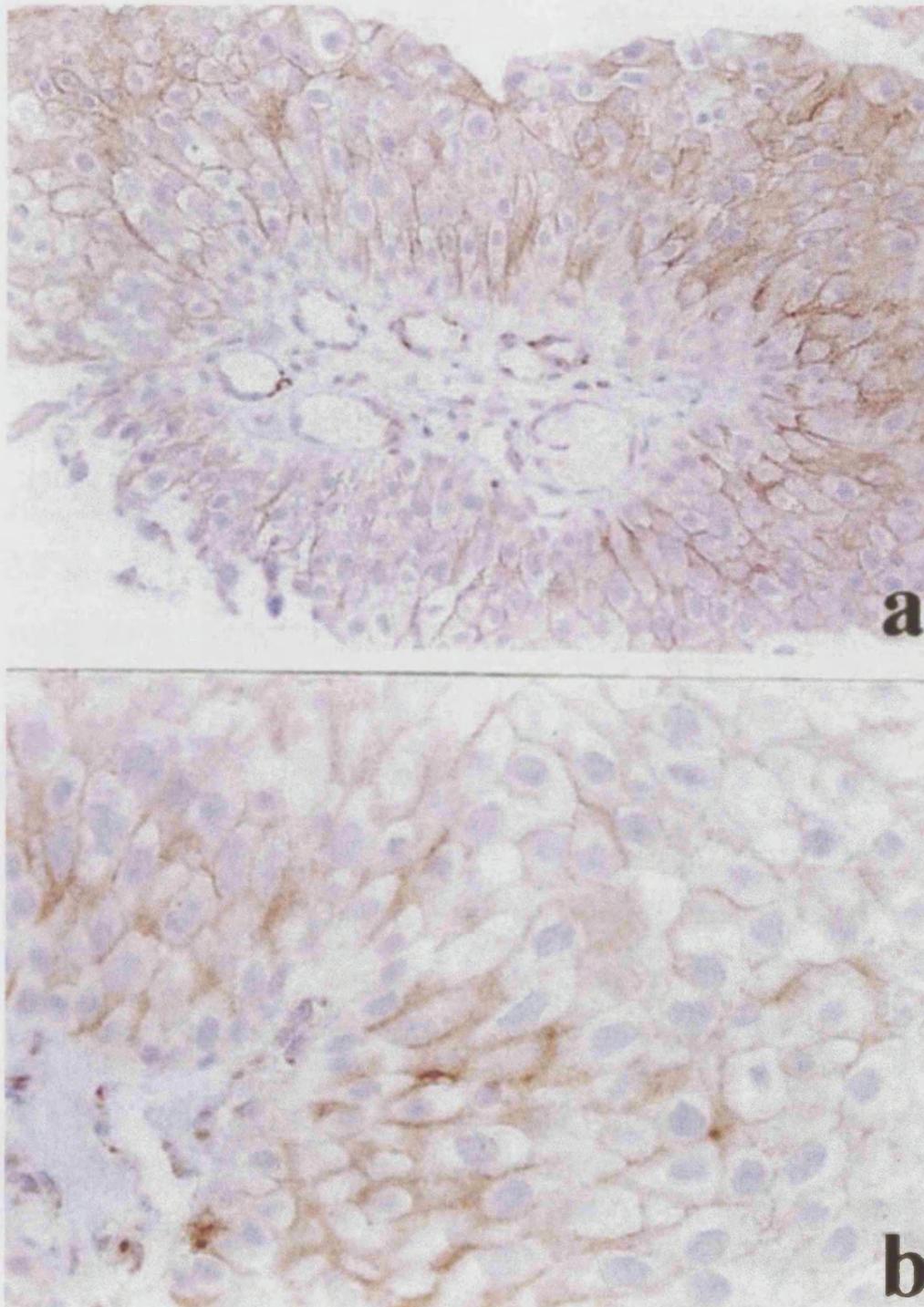


FIGURA 5.7. Expresión inmunohistoquímica de c-erbB-2; a y b- expresión específica de membrana (peroxidasa-antiperoxidasa, 20x y 40x)

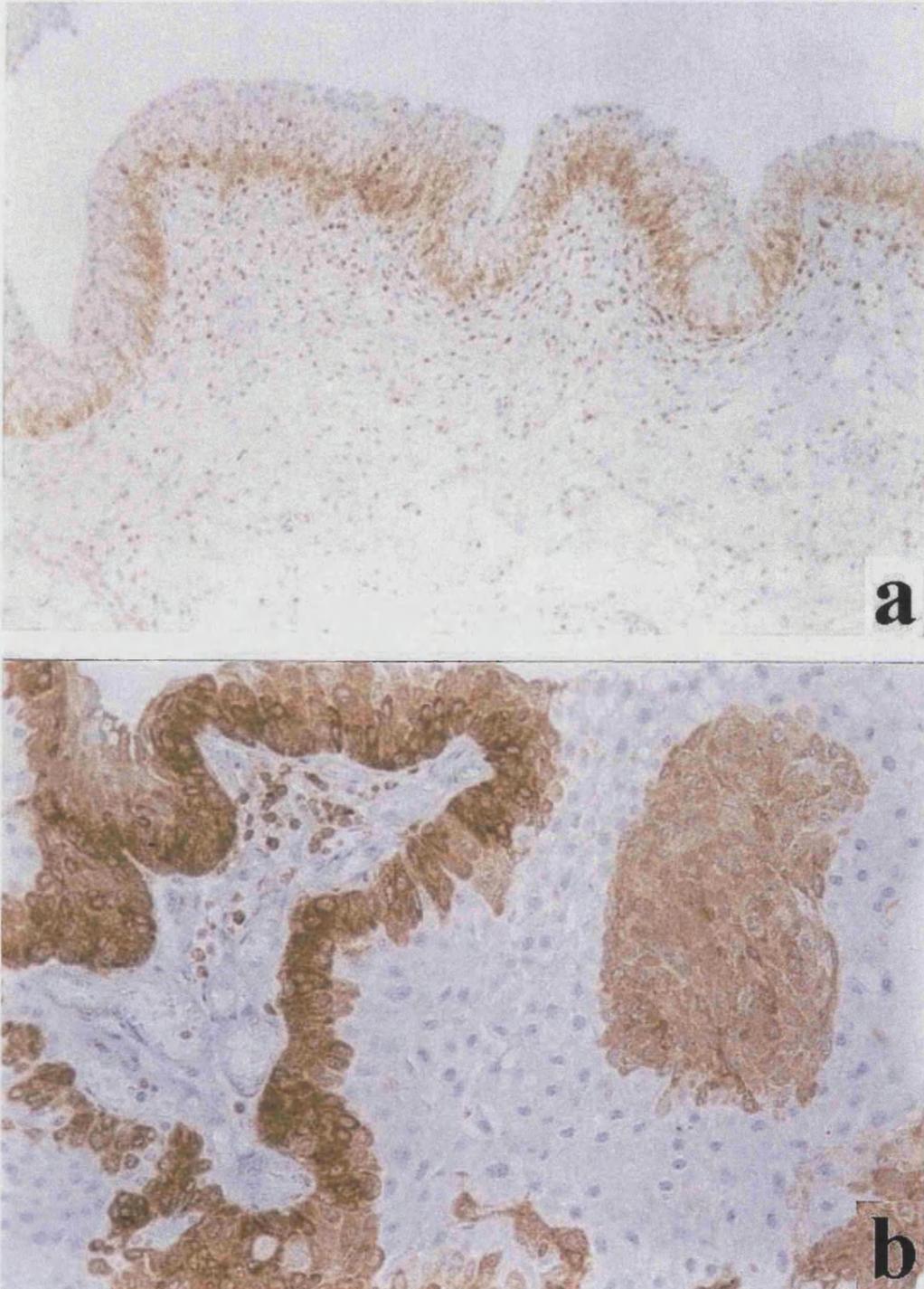


FIGURA 5.8. Expresión inmunohistoquímica de bcl-2; a- positividad en la capa basal del urotelio normal, y b- expresión tumoral en la capa basal y en las capas intermedias (peroxidasa-antiperoxidasa, 10x y 20x)

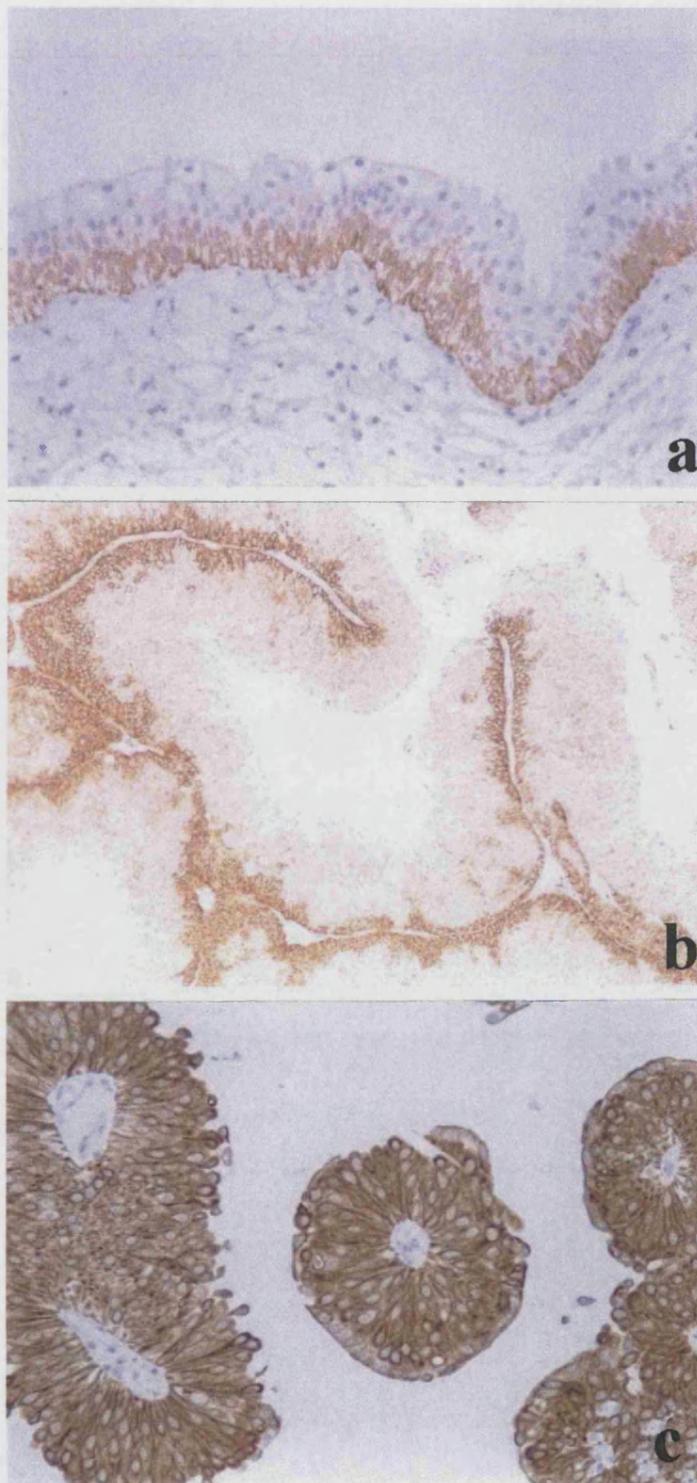
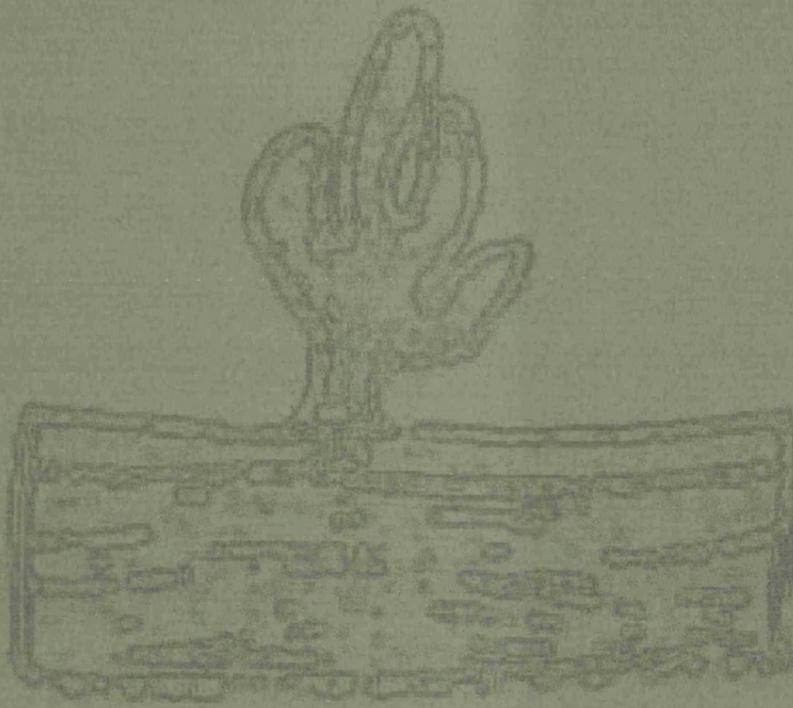


FIGURA 5.9. Expresión inmunohistoquímica de citoqueratina basal; a- positividad en la capa basal del urotelio normal, y b- expresión tumoral de tipo basal, y c- expresión de tipo difuso (peroxidasa-antiperoxidasa, 20x y 10x)



6. DISCUSIÓN

6.1. GENERALIDADES

Las neoplasias vesicales son lesiones de incidencia relativamente alta. Concretamente, en el hombre, son las segundas en frecuencia tras las neoplasias de próstata dentro de los procesos neoplásicos del sistema genitourinario.

Dentro de los tumores de la vejiga urinaria los más frecuentes son las neoplasias uroteliales papilares de bajo grado histológico (NBG), las cuales son en general neoplasias no invasivas o con invasión de la lámina propia, aunque sin alcanzar la capa muscular. Nuestro estudio se centra precisamente en este grupo de **neoplasias de bajo grado**, cuyo diagnóstico histopatológico es con frecuencia difícil y presenta una gran variabilidad intra- e interobservador.

Los tumores vesicales afectan con más frecuencia al varón, con una relación que oscila según los diferentes estudios entre 2:1 y 10:1. De los 120 casos de nuestro estudio 101 (84.2%) son varones y 19 (15.8%) mujeres (**relación 5:1**).

La edad de presentación más frecuente se sitúa según los diferentes estudios entre los 60 y los 70 años de media. En el nuestro, la edad media de presentación es de 63.6 ± 11.7 años, sin diferencias de edad según el sexo. En definitiva, se trata de un proceso que afecta preferentemente al hombre en la sexta o séptima década de la vida.

La importancia de estas lesiones viene determinada por su alta morbilidad, de hecho se trata de un proceso con una elevado número de recurrencias tumorales y según algunos estudios una nada despreciable tasa de progresión tumoral, sobre todo si el seguimiento clínico es prolongado (Leblanc y cols., 1999; Cheng y cols., 1999b).

No obstante, la historia natural de este grupo de tumores es difícil de determinar ya que son muchos los factores que influyen en mayor o menor medida en la evolución clínico-patológica del proceso. Esta gran variabilidad es reflejo sobre todo de la gran HETEROGENEIDAD TUMORAL propia de estas lesiones de carácter CONTINUO. Esta heterogeneidad se manifiesta asimismo en el ámbito histomorfológico, inmunofenotípico, morfométrico, citométrico, e incluso molecular.

Ya en el siglo XIX, los 2 patólogos más destacados del momento discutían a cerca de la naturaleza benigna o maligna de las neoplasias vesicales de bajo grado.

Así, *Virchow* las consideraba lesiones benignas (papilomas), mientras que *Rokitansky* las clasificó como un proceso maligno (carcinomas). Desde entonces los estudios al respecto han sido muy numerosos y en una revisión extensa de la literatura se describe una probabilidad de recurrencia que varía según las distintas series entre un 0% y un 67% con un seguimiento medio de 5 años (Bostwick, 1992).

En respuesta a esta gran variabilidad histomorfológica se han ido modificando paulatinamente los sistemas de clasificación por grado y por estadio, resultando categorías cada vez más correlacionadas con el pronóstico. Una de las últimas clasificaciones de los tumores vesicales es la **clasificación de consenso OMS/ISUP (1998)**, donde se definen 2 grandes categorías: neoplasias de bajo grado y neoplasias de alto grado histológico. Dentro de las neoplasias de Bajo Grado (NBG) se distinguen a su vez: neoplasias de Bajo Potencial Maligno (BPM) y carcinomas de Bajo Grado (BG), de forma que las primeras apenas recurren y no progresan y las otras presentan una mayor tasa de recurrencia y una posibilidad mínima pero real de progresión tumoral.

De los 120 casos de nuestro estudio existe un grupo de 48 tumores que evolucionaron bien (apenas recidivan: TR<1, ILE largo: >9 meses y sin progresión) frente a otro grupo de 72 tumores que muestran un peor curso evolutivo (recidivas frecuentes: TR>1, ILE corto: <9 meses y posibilidades reales de progresión). A esos 2 **grupos pronósticos reales** se les denomina en nuestro estudio: **bajo potencial maligno real (BPMr)** y **bajo grado real (BGr)**.

Un problema añadido a la gran variabilidad histomorfológica es la variabilidad intra- e interobservador (Pauwels y cols., 1988), lo cual hace que las lesiones con un carácter continuo pertenecientes a grupos contiguos sean asignadas a categorías distintas según el criterio subjetivo de cada patólogo (sobre todo las NBG, cuyas diferencias histomorfológicas son en ocasiones sutiles). Para disminuir esta variabilidad se han utilizado diferentes técnicas como son: la Morfometría, la Citometría, las técnicas Inmunohistoquímicas y las técnicas de Biología Molecular. Todas estas técnicas utilizan parámetros cada vez más objetivos junto a una progresiva estandarización en los métodos de selección y en la interpretación de los resultados.

En nuestro estudio los grupos pronósticos reales (BPMr, BGr) se comparan con el **grado histológico clásico (G1, G2a)**, con el **grado de la nueva clasificación de**

consenso, 1998 (BPM, BG), y con el sistema de clasificación en 2 grados de Cheng y cols. (2000), en el cual se define un grado secundario del tumor o grado histológico más atípico (**diagnóstico 1**) y un grado primario o predominante (**diagnóstico 2**). Estos grupos reales se comparan, asimismo, con los valores obtenidos a partir de los **estudios cuantitativos e inmunohistoquímicos** y con los **factores clínico-patológicos clásicos** como son el tamaño, la multiplicidad tumoral, los grados clínicos de Parmar, etc.

Los estudios realizados hasta la fecha se han centrado principalmente en el grupo de tumores vesicales superficiales (TVS) (G1-G2-G3/Ta-T1), aunque con una gran variabilidad según los distintos estudios realizados. Esta gran heterogeneidad poblacional se añade a la ya comentada heterogeneidad tumoral.

Sin embargo, son escasos los estudios que, como en el nuestro, se centran únicamente en el grupo de neoplasias de bajo grado histológico (**NBG·G1-G2a**) y estadios tumorales superficiales (**Ta-T1**), sin considerar en el mismo a los tumores vesicales de alto grado (NAG·G2b y G3) y/o estadios profundos con infiltración de la capa muscular.

6.2. DATOS PRONÓSTICOS (FUNCIONES DEL PRONÓSTICO)

Los datos pronósticos de nuestro estudio se obtuvieron a partir de los datos del seguimiento clínico-patológico de los pacientes:

6.2.1. INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD (ILE) O TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

El intervalo libre de enfermedad es en la literatura el ILE para la recidiva o para la progresión tumoral.

Es un hecho demostrado en múltiples estudios que un ILE corto se asocia a un peor curso evolutivo (Parmar y cols., 1989; Reading y cols., 1995; Kurth y cols., 1995); concretamente, en estos estudios se comenta que una primera recidiva a los 3 meses del diagnóstico inicial indica un riesgo elevado de progresión tumoral y una menor supervivencia. Otros autores como Prout y cols. (1992) refieren que una primera recidiva a los 3 meses no es concluyente y sí posee cierto valor a los 6 meses del seguimiento. Para el grupo concreto de NBG Holmäng y cols. (1999) consideran que un ILE de 3-4 meses se encuentra asociado a una mayor TR.

En nuestro estudio se consideró de mal pronóstico un ILE ≤ 9 meses, al resultar este valor el más adecuado para la estratificación de los grupos pronósticos reales.

Por otro lado, Cheng y cols. (1999b) en un estudio con neoplasias vesicales de bajo potencial maligno (BPM) describen un ILE medio hasta la recurrencia (curva de supervivencia) de unos 50 meses (4.1 años). En otro estudio Leblanc B y cols. (1999) obtienen una curva de supervivencia en la que la probabilidad de recurrir se estabiliza a los 48 meses (4 años) del seguimiento.

En nuestro estudio el ILE medio de los 120 casos es de 42 meses (3.5 años), 64.6 meses para los tumores que evolucionan bien (BPMr) y 26.9 meses para los casos que evolucionan mal (BGr). La curva de supervivencia se estabiliza a los 55 meses (4.6 años) del seguimiento, momento en el cual disminuye sensiblemente el riesgo de sufrir una recurrencia y estaría por tanto justificado un seguimiento cistoscópico más espaciado a partir de ese momento.

El ILE para la progresión tumoral es de 45.6 meses para la progresión en grado y 45.7 meses para la progresión en estadio, aunque el número de casos con progresión es muy reducido (9.16% de la casuística).

6.2.2. TIEMPO DE SEGUIMIENTO

Aunque al revisar la literatura se constata una gran variabilidad en el tiempo de seguimiento (2-20 años) la tendencia actual para el grupo de neoplasias de bajo grado (NBG) es hacia un seguimiento prolongado de estos pacientes. En ese sentido, y en contra de la nueva Clasificación de Consenso, Cheng y cols. (1999b) demuestran que en el grupo de neoplasias de bajo potencial maligno (BPM) un seguimiento prolongado de unos 12 años significa un ILE medio para la recurrencia de 4.1 años y de 13.3 años para la progresión tumoral (progresión en estadio). Por tanto, en este estudio un 29% de los pacientes con tumores de BPM tuvieron recurrencia y/o progresión (Ta→T1) y un 4% de éstos evolucionaron con invasión de la capa muscular propia (Ta-T1→T2) . Ese mismo año, Leblanc y cols. (1999) evalúan 152 pacientes con tumores Ta/G1 con un seguimiento medio de 76 meses y constatan que un 55% de éstos recidivan en los primeros 12 meses y un 14% recidivan a partir de los 60 meses de seguimiento.

En nuestro estudio el seguimiento medio es también de 76 meses (6.3 años), aunque en los primeros 12 meses recidivan 20 pacientes (16.6%), mientras que a partir de los 60 meses recidivan tan sólo 7 (5.8%), resultados sensiblemente inferiores a los obtenidos anteriormente por Leblanc y cols.

No obstante, para la obtención de datos fiables en relación con la progresión tumoral tal vez hubiera sido preciso un seguimiento medio en torno a los 10-15 años.

6.2.3. NÚMERO DE RECURRENCIAS / TASA DE RECURRENCIA (TR)

El número de recurrencias del grupo de neoplasias vesicales de bajo grado histológico (NBG) presenta en la literatura grandes diferencias, aunque es en general bastante elevado.

Concretamente, Leblanc y cols. (1999) estudian 152 tumores Ta/G1 y describen que un 55% de los mismos recurren. Por su parte, Cheng y cols. (1999b)

estudian 112 casos de neoplasias de bajo potencial maligno (BPM), de las cuales 30 (26.8%) tuvieron recurrencias. Y, finalmente, Holmång y cols. (1999) describen que un 35% de neoplasias de BPM y un 71% de carcinomas de bajo grado (BG) recurren.

En el presente estudio con tumores Ta-T1/G1-G2a, 77 casos (64.1%) recurren, de los cuales 52 (67.5%) presentan 2 ó más recurrencias y sólo 25 (33.5%) muestran una única recidiva. Ésto se corresponde con el hecho de que sufrir una recidiva tumoral sea un factor de riesgo de padecer una segunda recidiva tumoral (Holmång y cols., 1995; Ojea-Calvo y cols., 1998). En nuestra casuística se considera también el número total de recidivas a lo largo del seguimiento (152 recurrencias totales), con la particularidad de que los 4 primeros años el número de recurrencias es elevado y disminuye a partir del quinto año, con dos picos adicionales en la gráfica en el sexto y décimo año de seguimiento. Este hallazgo coincide con la descripción de recurrencia en fase temprana y nuevos tumores primarios en fase tardía de Hinotsu y cols. (1999).

Numerosos estudios en la literatura utilizan una fórmula que incluye el nº de recurrencias y los meses de seguimiento, multiplicando la cantidad resultante x100 (Pauwels y cols., 1988) ó x12 (Fitzpatrick y cols., 1986a), para así hacer más cómodo el manejo de este índice.

En nuestro estudio se utiliza la primera fórmula con una modificación consistente en que a los casos sin recidiva y un seguimiento <5 años se les asigna un coeficiente "0.5" (18 casos), al no alcanzar los 55-60 meses en que disminuye la probabilidad de recurrencia; mientras que al resto de casos sin recidiva y un seguimiento >5 años (25 casos) se les asignó un coeficiente "0". En total fueron 43 los pacientes que no recidivaron a lo largo del seguimiento (un 35.8% del total).

Posteriormente se comprueba que al introducir los factores de nuestro estudio con valor pronóstico independiente no existen diferencias significativas entre ambos coeficientes 0 y 0.5.

6.2.4. PROGRESIÓN TUMORAL

El concepto exacto de progresión tumoral es muy distinto según los diferentes estudios y las diferentes casuísticas consideradas.

La mayoría de autores considera progresión tumoral a la invasión de la capa muscular. Esto se debe a que la mayoría de estudios se centran en los TVS (Ta-T1/G1-

G2-G3) (Malmström y cols., 1987; Lipponen y cols., 1990a-d; García y cols., 1994; Holmäng y cols., 1999; Cheng y cols., 2000a).

Sin embargo, Cheng y cols. (1999b) consideran progresión tumoral al aumento en estadio de Ta a T1 con invasión de la lámina propia, a pesar de las dificultades diagnósticas que existen en relación con la certeza de invasión focal en el corion. Otros autores como Leblanc y cols. (1999) consideran, además, progresión en el grado histológico.

En nuestro estudio de los 120 casos iniciales 11 casos progresan, de los cuales 4 lo hicieron en estadio hasta tumores con invasión de la capa muscular y 7 progresan en grado. No se consideró progresión al paso desde tumores limitados a la mucosa (Ta) hasta tumores con invasión de la lámina propia (T1), debido a las limitaciones descritas para el diagnóstico. *Este número tan reducido de casos con progresión (9.16% de la casuística) obliga a un estudio meramente descriptivo, ya que para un estudio estadístico completo se hubiera necesitado un mayor número de casos para poder aplicar con confianza las distintas pruebas estadísticas.*

En estudios anteriores Holmäng y cols. (1999) describen que ningún caso de BPM presentó progresión tumoral, mientras que un 2.4% de pacientes con tumores de BG progresaron en estadio. Leblanc y cols. (1999) encuentran en tumores G1/Ta un 37% de casos con progresión en grado o estadio. Finalmente, Cheng y cols. (1999b) describen que un 10.7% de casos de BPM progresaron en grado, un 1.78% progresaron con invasión de la capa muscular (Ta/T1→T2), y otro 1.78% con invasión de la lámina propia (Ta→T1).

En nuestro estudio de los 72 casos que evolucionaron mal (BGr) un 5.55% (4 casos) progresan en estadio y un 9.72% (7 casos) lo hacen en grado. Considerando, sin embargo, los 120 casos totales de neoplasias de bajo grado (NBG) un 3.33% de las mismas progresan en estadio y un 5.83% lo hacen en grado.

Los casos sin progresión presentan, asimismo, un ILE de 44.3 meses y una TR de 1.6%, mientras que los casos con progresión muestran un ILE más corto (18.9 meses) y una mayor TR (3%).

6.2.5. GRUPOS PRONÓSTICOS "REALES"

El valor pronóstico en nuestro estudio viene determinado fundamentalmente por 3 variables o funciones pronósticas íntimamente relacionadas entre sí: el intervalo libre de enfermedad (ILE), la tasa de recurrencia (TR) y la progresión tumoral. De hecho, todos los casos con un ILE<9 meses y/o progresión tumoral presentaron una TR>1.

Así pues, los grupos pronósticos se crearon en función de esas 3 variables y se definieron como tumores de **BPMr** (casos con una evolución clínica indolente) y tumores de **BGr** (casos con mayor número de recurrencias y riesgo de progresión tumoral). En definitiva, resultaron 72 casos de BGr y 48 casos de BPMr.

En la mayor parte de los estudios previos el grupo tumoral de referencia se selecciona mediante el criterio subjetivo del patólogo y a partir de ahí se realizan las comparaciones estadísticas. Esta asignación subjetiva es ciertamente cuestionable, sobre todo si se trata de casos situados entre 2 categorías contiguas.

Ya en la propia **clasificación de consenso de la OMS/ISUP (1998)** (Epstein y cols., 1998-9) se comenta que la distinción entre una neoplasia de BPM y un carcinoma de bajo grado es en ocasiones sutil. Contemporánea a la clasificación de consenso surge una **nueva clasificación en 2 grados** (Cheng y cols., 2000a) en la cual se tiene en cuenta la existencia en el seno del tumor de más de un grado histológico o clones celulares distintos, siempre que este componente secundario suponga más del 5% del tumor. No obstante, este sistema tiene el inconveniente de su complejidad y del excesivo número de grupos.

En nuestro estudio se corrobora este hecho ya que en la asignación subjetiva del grado primario o secundario por parte del patólogo existe concordancia en 91 diagnósticos y discrepancia en los 29 restantes, lo cual supone que en un 24.2% de la casuística existe un clon celular más atípico en el seno de un tumor de bajo potencial maligno que determina el curso evolutivo del proceso, situación confirmada por el hecho de que sólo uno de los diagnósticos (en concreto el diagnóstico 1 o grado secundario o clon celular más atípico) define correctamente los grupos pronósticos reales.

En la actualidad existe una gran controversia en relación con el grupo de neoplasias de BPM, de forma que autores como Cheng y cols. (1999b) y Leblanc B y

cols. (1999) ponen en entredicho la "benignidad" de estos tumores si se realiza un seguimiento prolongado; mientras que otros autores como Holmäng y cols. (1999) defienden esta entidad y señalan que aunque las neoplasias de BPM puedan recurrir e incluso progresar el riesgo se sitúa entre la población normal y el de pacientes con un carcinoma de BG.

La primera conclusión que se extrae a partir de los datos del seguimiento de nuestra casuística es que existe un grupo de tumores que evolucionan bien frente a otro grupo con mayor número de recurrencias y probabilidad de progresión, pese a que los factores que mejor definen estos grupos no tienen relación estrecha, como ya veremos, con el criterio subjetivo del patólogo.

En nuestro estudio son múltiples las variables validas en la definición de los grupos pronósticos reales, y de entre ellas destacan aquellas con asociación más estrecha ($p < 0.001$): área nuclear de los 10 núcleos más atípicos (ANMZ3) y su desviación estándar (DEANMZ3), perímetro nuclear de los 10 núcleos más atípicos (PNMZ3), área nuclear de los 10 núcleos más pequeños (ANMZ4) y su desviación estándar (DEANMZ4), perímetro nuclear de los 10 núcleos más pequeños (PNMZ4), sobreexpresión de p53(15%), índice proliferativo tumoral (índice Ki-67·MIB-1), distribuciones 1 y 2 de Ki-67·MIB-1, grados clínicos "corregidos" de Parmar y ploidía tumoral de los 10 núcleos más atípicos (ploidía Z3).

De todos estos valores **4** se refieren a la zona tumoral más atípica (Z3), aunque sin considerar la proporción tumoral que ésta signifique (mayor o menor del 5% del tumor), y otros **3** valores son relativos a los núcleos de menor tamaño, variable no definida con anterioridad.

El grado aplicado por el criterio subjetivo del patólogo (diagnósticos 1 y 2) y el grado asignado de forma conjunta quedan fuera de los factores que mejor definen los grupos pronósticos reales ($p < 0.001$). De cualquier forma, el diagnóstico 1 (grado secundario más atípico) se asocia a los grupos pronósticos reales con un valor " p " < 0.05 ($0.001 < p < 0.05$) coincidiendo en un 67% de los casos de BPMr y en un 76% de los casos de BGr; mientras que el diagnóstico 2 (grado primario o predominante) acierta sólo un 58% de los casos de BPMr y un 52% de los casos de BGr, resultados que NO mejoran en absoluto con la introducción del grado conjunto (diagnóstico 1+2).

Asimismo, los grupos pronósticos reales presentaron una serie de características específicas, sobre todo en relación con el intervalo libre de enfermedad (ILE), variable menos caracterizadora de los grupos reales; la cual aportará, por tanto, más información adicional. Concretamente, el ILE medio del grupo BPMr es de 64.6 meses por 26.9 meses del BGr, con lo cual un seguimiento **>65 meses** significa una probabilidad de recurrencia realmente baja. Asimismo, considerando el nivel de corte para el ILE en 40 meses, los tumores con un ILE<40 meses presentan una TR=2.8%, por 0.7% de los casos con ILE>40 meses. De todo esto se deduce la estrecha relación existente entre un ILE corto o largo y la TR.

6.3. FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS (ANÁLISIS BIVARIANTE)

6.3.1. EDAD Y SEXO

La edad y el sexo del paciente en el momento del diagnóstico inicial son variables objetivas no sujetas a factores externos de distracción, sin embargo no han demostrado en general un gran valor pronóstico. De cualquier modo, los pacientes jóvenes de entre 30 y 40 años, con independencia del sexo, suelen tener tumores vesicales de bajo grado que evolucionan mejor que los tumores vesicales en pacientes de edad avanzada (Fitzpatrick y Reda, 1986). Páez-Borda y cols. (1997) demuestran que en el grupo de tumores vesicales superficiales (TVS) una edad superior a 65 años se asocia a un comportamiento tumoral más agresivo, lo cual obliga en estos pacientes a un seguimiento más estrecho y un tratamiento más agresivo.

En nuestro estudio la edad y el sexo carecen de valor pronóstico en todas las comparaciones realizadas. En concreto, la edad media de presentación en el grupo de neoplasias vesicales de bajo grado (NBG) fue de **63.6 años** (BPMr: 63.5 y BGr: 63.7).

Sólo 4 casos (3.33%) se corresponden con pacientes menores de 40 años y de éstos 3 casos son BGr y sólo 1 caso presenta buen pronóstico (BPMr).

Ninguno de estos casos progresa, no obstante.

6.3.2. TAMAÑO Y MULTIPLICIDAD TUMORAL

Estas 2 variables han demostrado con relativa frecuencia valor predictivo, sobre todo la multiplicidad tumoral.

Diversos autores destacan el valor pronóstico de la multiplicidad con respecto a un intervalo libre de enfermedad (ILE) más corto (Heney y cols., 1983; Arrizabalaga-Moreno y cols., 1997; Allard y cols., 1998; Páez-Borda y cols., 1999), mayor número de recurrencias (TR) (Prout y cols., 1992; Holmäng y cols., 1999; Millán-Rodríguez y cols., 2000a-b), y progresión tumoral (Fitzpatrick y Reda, 1986; Zieger y cols., 1998; Millán-Rodríguez y cols., 2000b). Además, Holmäng y cols. (1999) añaden que los carcinomas vesicales de bajo grado (BG) son con mayor frecuencia tumores múltiples,

mientras que las neoplasias de bajo potencial maligno (BPM) suelen ser tumores únicos.

En cuanto al valor pronóstico del tamaño tumoral, múltiples trabajos describen que éste se ve superado en poder predictivo por la multiplicidad. Además, respecto al tamaño tumoral se han definido en la literatura diferentes puntos de corte con valor pronóstico: 2 cm (Prout y cols., 1992; Páez-Borda y cols., 1999), en relación con el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la tasa de recurrencia (TR); 3 cm (Kurth y cols., 1995; Allard y cols., 1998; Zieger y cols., 1998; Millán-Rodríguez y cols., 2000a), en relación también con la progresión tumoral; y 5 cm (Heney y cols., 1983), en relación con el ILE y la TR.

En nuestro estudio la variable número de tumores o multiplicidad tumoral tiene un valor predictivo ligeramente superior al tamaño tumoral en la definición de los grupos pronósticos reales, aunque ninguna de las 2 variables alcanza un valor de $p < 0.001$ (en este caso el nivel umbral es de 2cm). Respecto al intervalo libre de enfermedad (ILE) y la tasa de recurrencia (TR) ambas variables presentan un valor de $p \leq 0.001$, con el punto de corte para el tamaño en 3cm.

El estudio descriptivo en relación con la progresión tumoral indica una clara tendencia a la no-asociación de ninguna de las 2 variables.

6.3.3. GRADOS CLÍNICOS "CORREGIDOS" DE PARMAR

Parmar y cols. (1989), y Reading y Parmar (1995) definen un grado clínico en función de 2 factores: ILE y número de tumores, quedando así definidas 3 categorías o grupos de bajo, moderado y alto riesgo en relación con la TR. Su casuística incluía tumores de cualquier grado y estadio (Gx/Tx).

En el presente estudio los grados clínicos de Parmar definen correctamente los grupos pronósticos reales ($p < 0.001$), y en estudios comparativos individuales se comprueba, además, una estrecha asociación entre los grados clínicos de Parmar y la tasa de recurrencia ($p < 0.001$). Hemos de tener presente, no obstante, que este parámetro incluye en su definición el intervalo libre de enfermedad (ILE), un dato de indudable valor pronóstico "per se".

El ILE no se considera en estas comparaciones ya que es una función incluida en la propia definición de los grados clínicos de Parmar.

Respecto a la progresión tumoral se observa una tendencia a la falta de asociación estadística, ya que de los 11 casos que progresaron sólo 1 caso (9.09%) era G3 de Parmar, y el resto eran 3 casos G2 y 7 casos G1 de Parmar.

En definitiva, en nuestro estudio se comprueba un indudable valor pronóstico de los grados de Parmar, en contraposición con Arrizabalaga-Moreno y cols. (1997).

6.3.4. GRADO HISTOLÓGICO

Son numerosos los estudios comparativos uni- o bivariantes que demuestran el valor pronóstico de los sistemas clásicos de gradación (Malmström y cols., 1987; Angulo y cols., 1993; Choi y cols., 1994; Jarkrans y cols., 1995; Krüger y Müller, 1995; Nakopoulou y cols., 1998; Liukkonen y cols., 1999, etc.). Sin embargo, son escasos los trabajos en los que se concluye ausencia de valor pronóstico (Lipponen y cols., 1991a). El valor predictivo del grado se comprueba también en las NBG (BPM / BG) (Holmäng y cols., 1999; Cheng y cols., 1999b; Leblanc y cols., 1999), aunque este valor es relativo si el seguimiento clínico es prolongado, ya que entonces se comprueba un riesgo relativamente alto para la recurrencia y escaso pero real para la progresión tumoral en el grupo de neoplasias de BPM.

En el presente estudio se observa una falta de concordancia entre ambos diagnósticos (1 y 2) según el grado de la Clasificación de Consenso OMS/ISUP (1998) y sólo uno de ellos, en concreto el grado secundario o clon celular más atípico (diagnóstico 1) muestra correlación con la definición de los grupos pronósticos reales y el intervalo libre de enfermedad (ILE); aunque ambos grados (diagnóstico 1 y 2) definen correctamente la tasa de recurrencia (TR).

Por lo que se refiere al grado clásico de la OMS (1973) / modificación escandinava (1987); en nuestra casuística el grado así definido no se corresponde con los grupos reales, aunque sí que muestra asociación con ILE y TR.

6.3.5. ESTADÍO TUMORAL

Son también numerosos los estudios a cerca del valor pronóstico del estadio tumoral en análisis estadísticos uni- o bivariantes (Collan, 1979; Lipponen y cols., 1990b-c; Angulo y cols., 1993; van Velthoven y cols., 1996; Herr, 1999; Cheng y cols., 1999a; etc.), siendo escasos los estudios que demuestran ausencia de valor

pronóstico (Krüger y Müller, 1995; Liukkonen y cols., 1999; Millán-Rodríguez y cols., 2000a).

La gran variabilidad en cuanto al diferente curso evolutivo de casos con el mismo estadio se confirma en el estudio de Millán-Rodríguez y cols. (2000b), donde según el grado histológico y el número de tumores un mismo estadio pertenece a diferentes grupos pronósticos de riesgo.

En nuestra casuística distinguimos entre tumores no invasivos limitados a la mucosa (Ta), y tumores con invasión focal (T1f) o difusa (T1d) de la lámina propia.

Los estadios tumorales así definidos se asocian significativamente con los grupos pronósticos reales, de forma que la mitad de tumores limitados a la mucosa (Ta) evolucionan bien (BPMr), mientras que la mayoría de casos con invasión focal o difusa (T1f ó T1d) evolucionan mal (BGr). Es un hecho significativo que un caso con infiltración difusa de la lámina propia y seguimiento prolongado (>7 años) evolucionó bien. En relación con el intervalo libre de enfermedad y la tasa de recurrencia se observan diferencias significativas entre los estadios Ta y T1(f+d), pero no entre T1f y T1d.

De los 11 casos que progresan 6 casos eran inicialmente tumores limitados a la mucosa (Ta), 5 casos infiltraban focalmente la lámina propia (T1f) y ninguno lo hizo de forma difusa (T1d), lo cual es también muy significativo.

6.3.6. TRATAMIENTO ADYUVANTE INTRAVESICAL (TAI)

La mayoría de estudios en relación con la administración del TAI describen una disminución en el número de recurrencias aunque sin influencia sobre la progresión tumoral (Krege y cols., 1996; Pawinski y cols., 1996; Malmström y cols., 1999). Asimismo, en estudios comparativos existe una línea de defensores del tratamiento con BCG (Okamura y cols., 1996; Jiménez-Cruz y cols., 1997; Moyano-Calvo y cols., 1999) y otro grupo que defienden el tratamiento con MM-C (Schwaibold y cols., 1997; Solsona y cols., 1999; Kondas y cols., 1999), usando para cada uno de los grupos un régimen terapéutico distinto.

Por lo que respecta al grupo de tumores Ta/G1-2(a) algunos autores afirman que NO es necesario un tratamiento adyuvante (Kurth y cols., 1996; Krege y cols., 1996; Otto y cols., 1999), grupo en el cual quedarían encuadrados muchos de los casos

de nuestro estudio. Sólo se administraría este tratamiento en caso de recidivas múltiples o de progresión con invasión de la lámina propia (T1). Dentro de este grupo tumoral (G1-G2/Ta-T1) Witjes y cols. (1997) y Hurle y cols. (1999) describen un grupo de bajo riesgo con tumores únicos en el que se efectuaría sólo una resección transuretral (RTU), mientras que el TAI (MM-C) se administraría añadido a la RTU sólo si se trata de una recurrencia tumoral o es inicialmente un tumor múltiple.

Lundholm y cols. (1996) refieren una menor tasa de recurrencia (TR) con el uso de BCG en los tumores de bajo grado, aunque el mayor nº de efectos indeseables ha extendido la administración de la MM-C; no obstante, estos efectos secundarios pueden ser parcialmente atenuados disminuyendo la dosis o el nº de instilaciones de BCG (Pagano y cols., 1995; Solsona y cols., 1999).

En el Servicio de Urología del HCUV los tumores G1/Ta se tratan en general con resección transuretral (RTU), con o sin MM-C según las características concretas de cada caso. En los casos G1-G2/T1 o G2/Ta se lleva a cabo RTU+MM-C, dejando la administración de BCG para casos seleccionados dentro de los tumores G2(a)/T1 y todos los tumores G3.

En el diseño de nuestro estudio no se distingue entre la administración del TAI en el momento inicial del diagnóstico y a lo largo del seguimiento en las recidivas, considerando siempre el primer agente terapéutico administrado.

Si se consideran sólo los casos con recidiva, la tasa de recurrencia media de los casos en que se administró MM-C es del 2.8% por un 1.7% de los casos tratados con BCG; de este hecho parece deducirse que la administración de BCG significa en este grupo de neoplasias de bajo grado (NBG) una disminución en el número de recurrencias respecto a la terapia con MM-C.

Además, con respecto a los 11 casos con progresión tumoral en ninguno de ellos se había administrado BCG (7 casos tratados con MM-C y el resto sin tratamiento), lo cual podría indicar un efecto protector de BCG frente a la progresión tumoral, al igual que en Okamura y cols. (1996), Lundholm y cols. (1996), Hurle y cols. (1998), y Malmström y cols. (1999).

No obstante, el diseño de nuestro estudio y el número de casos no son probablemente los más adecuados para la valoración correcta de la influencia del TAI en el curso evolutivo del proceso.

6.4. FACTORES EN PATOLOGÍA CUANTITATIVA POR ANÁLISIS DE IMAGEN (ANÁLISIS BIVARIANTE)

6.4.1. FACTORES MORFOMÉTRICOS

- **Generalidades**

Dentro de las múltiples lesiones continuas que se estudian en anatomía patológica (Mariuzzi y Montironi, 1986), las neoplasias vesicales son quizás las que muestran una relación más estrecha entre los cambios morfológicos nucleares (individuales y contextuales) y la evolución clínica del proceso; de forma que cuanto más alejados estén los núcleos de la normalidad (más hipercrómicos, de mayor tamaño, más irregulares y con una mayor cantidad de DNA) peor será el curso evolutivo. Además, de entre todas las técnicas cuantitativas utilizadas es el análisis de imagen la que permite un mayor número de estudios y comparaciones simultáneas sobre una misma población celular, que puede, además, ser controlada directamente por el patólogo.

En patología cuantitativa los resultados obtenidos a partir de estudios estadísticos o de grupo han sido en general mucho más significativos que los obtenidos en estudios individuales o de diagnóstico, y, además, en estos últimos es necesario medir un mayor número de núcleos (163 objetos) que en los primeros (93 objetos) (Collan, 1985). Esto se debe a que en los estudios de grupo el gran número de casos estudiados permite la medición de un menor número de objetos por caso (Collan y cols., 1984-6).

Por lo que se refiere a la selección de los objetos de interés, ésta puede ser de 2 tipos: Selección randomizada o aleatoria y Selección específica o selectiva. La selección aleatoria es en realidad más objetiva y prácticamente sin fuentes de error (Collan, 1989); sin embargo, si la selección es de tipo específico o dirigida la consistencia de los resultados y la reproducibilidad del método son mayores, disminuyendo asimismo la variabilidad inter- e intraobservador (Baak, 1987).

Todo ésto ha permitido la estandarización de la técnica (Böcking y cols., 1995; "Consenso en técnicas cuantitativas") y el control de las distintas fuentes de error (Collan, 1986; Baak, 1987; Ooms y cols., 1983; Fleege, 1991).

Dentro de las múltiples posibilidades de la morfometría en nuestro estudio nos centramos en la morfometría individual (**área, perímetro y factor de forma**) y no en la morfometría contextual (medidas de relación entre objetos vecinos), pese a la importancia que ha demostrado ésta última en la clasificación por grados de las neoplasias vesicales (Choi y cols., 1994; Jarkrans y cols., 1995).

Otro aspecto a tener en cuenta en Patología cuantitativa es la **gran heterogeneidad Tumoral** y la **selección de las Áreas Tumorales**.

Las neoplasias en general y los tumores vesicales en particular son lesiones caracterizadas por una gran heterogeneidad tanto intra- como intertumoral (Cheng y cols., 2000a). La heterogeneidad intratumoral viene definida asimismo por la existencia de uno o varios clones celulares más atípicos con un tamaño nuclear y una hipercromasia mayor que la del resto de núcleos.

En los distintos estudios realizados hasta la fecha los valores morfométricos son también distintos según se consideren las capa de células basales (**Z2**) o el resto de capas más superficiales (**Z1**) (Ooms y cols., 1983a-b; Montironi y cols., 1986a-b; Portillo y cols., 1992), aunque en otros estudios se consideran todas las capas conjuntamente (Lipponen y cols., 1989; García y cols., 1994; Krüger y Müller, 1995). De cualquier forma, todos coinciden en rechazar las papilas cortadas oblicuamente y seleccionar subjetivamente sólo las más atípicas de entre las papilas cortadas transversalmente.

Otros autores consideran tan sólo una pequeña población de células más atípicas independientemente de cómo esté cortada la papila. Así, los hay que consideran los **5-10 núcleos más grandes (Z3)** (Ooms y cols., 1981-3; Montironi y cols., 1986; Blomjous y cols., 1988-89-90; Lipponen y cols., 1990b-91a), o bien **50 núcleos** (Lipponen y cols., 1990d; Ooms y cols., 1985), e incluso **75 núcleos** (García y cols., 1994).

Siguiendo esta metodología en nuestro estudio se decide medir unos **100-150 núcleos** en las zonas Z1 (zona papilar externa) y Z2 (zona papilar interna o basal) sólo en las papilas cortadas transversalmente, y los **10 núcleos más grandes (Z3)** y más

pequeños (Z4) independientemente de la orientación del corte de la papila. Todas estas selecciones se realizan sobre la base del criterio subjetivo inicial del patólogo.

- **Área nuclear (ANM±DE)**

Múltiples estudios han demostrado el valor pronóstico del área nuclear media (ANM) y su desviación estándar (DEANM) en distintas zonas tumorales (en general las más atípicas) de las neoplasias vesicales, aunque los niveles de corte y los grupos de estudio han sido ciertamente heterogéneos.

Ooms y cols. (1983) establecen el nivel de corte para los tumores G1 en: $41\mu\text{m}^2$ (Z1), $47\mu\text{m}^2$ (Z2) y $61\mu\text{m}^2$ (Z3); valores que fueron significativamente mayores para los tumores G2. Portillo y cols. (1992) determinan un nivel de corte muy inferior sólo en Z2 para tumores G1 ($28\mu\text{m}^2$) lo cual demostró valor pronóstico en relación con la tasa de supervivencia.

Blomjous y cols. (1990) establecen el corte en $95\mu\text{m}^2$ con valor predictivo superior al de los parámetros clásicos pero sólo en el grupo de tumores G2.

Con anterioridad, Montironi y cols. (1986a-b) describen el ANM del urotelio normal (Z1: $32.8\mu\text{m}^2$ / Z2: $32.6\mu\text{m}^2$), y los tumores G1 (Z1: $41.5\mu\text{m}^2$ / Z2: $42.2\mu\text{m}^2$ / Z3: $52.3\mu\text{m}^2$), aunque concluyen que el valor pronóstico de la DEANM es superior al ANM en cualquiera de las zonas tumorales consideradas.

García y cols. (1994) no definen áreas tumorales concretas y concluyen un valor de corte para tumores G1 en $50\mu\text{m}^2$, el cual se correlaciona estrechamente con el grado y con el pronóstico. Para Krüger y Müller (1995) el punto de corte se sitúa en $38.4 \pm 9.6\mu\text{m}^2$ para los tumores G1 en ambas zonas (Z1 y Z2), parámetro que se correlaciona con el grado pero no con el estadio.

Finalmente, Dalla-Palma y cols. (1996) no encuentran diferencias significativas entre los grados contiguos (G1-2a y G2b-3), aunque sí que se observan diferencias entre los tumores de alto y bajo grado (Sánchez, 1986).

Lipponen y cols. (1990c-d y 1991a) realizan un estudio comparativo sobre tumores de cualquier grado y estadio en el cual concluyen que el ANM y DEANM en Z1-Z2 tienen relación con el ILE y la progresión tumoral, mientras que el ANM en Z3 tiene relación también con la supervivencia y la TR. En este estudio el ANM en Z3 demostró ser el único parámetro asociado significativamente con el pronóstico. Sin

embargo, su poder predictivo demostró ser menor que el de los parámetros clásicos (grado, estadio y "status papilar") y que el índice proliferativo tumoral.

En nuestro estudio los valores del área nuclear media (ANM) para las diferentes zonas tumorales estudiadas (zonas 1-4) se sitúan entre los valores obtenidos para el urotelio normal y los papilomas por un lado, y los valores de un grupo control de carcinomas de alto grado (WHO G2) por otro.

En el grupo concreto de neoplasias de bajo grado (WHO G1) los valores son próximos en nuestro estudio a algunos de los resultados revisados en la bibliografía según las distintas zonas tumorales consideradas, asimismo, el área nuclear media (ANM) fue superior en poder predictivo a la media de la desviación estándar (DEANM) en todas las comparaciones estadísticas realizadas.

En concreto, en nuestra casuística el área nuclear media (ANM) de las zonas papilar externa e interna (Z1 y Z2) resulta útil en la definición de los grupos pronósticos, al igual que la desviación estándar del área (DEANM). Sin embargo, los valores del ANM y DEANM en la zona tumoral más atípica o clon celular más atípico (Z3) muestran en general un mayor poder estadístico con una $p < 0.001$. Respecto al tiempo de supervivencia o intervalo libre de enfermedad (ILE) sólo el ANM y DEANM de Z3 muestran valor pronóstico significativo, y en relación con la tasa de recurrencia (TR) se repiten esos 2 factores además del ANM de la zona papilar interna (ANM Z2).

Los valores morfométricos de las zonas 1 y 2 son superados en nuestro estudio por diversos parámetros clínico-patológicos clásicos, pero no los valores referentes a la zona 3; y en todos los casos los valores "p" relativos al área nuclear (ANM) son superiores a los valores de la media de desviaciones estándar del área (DEANM). Finalmente, los valores de la zona 4 (Z4) son originales en nuestra investigación al no existir referencias bibliográficas anteriores, resultando que el ANM Z4 y la DEANM Z4 son útiles en la definición de los grupos pronósticos reales, aunque sólo el ANM Z4 se asocia también con la tasa de recurrencia (TR).

Por lo que respecta a la progresión tumoral se observa una tendencia a valores mayores del ANM y la DEANM de todas las zonas, aunque esta tendencia es más acusada para los valores de Z3.

- **Perímetro nuclear (PNM±DE)**

En los distintos estudios revisados este valor ha demostrado su estrecha relación con el área nuclear, aunque con un valor predictivo en general inferior (Montironi y cols., 1986a-b; Dalla-Palma y cols., 1996).

En nuestro estudio ocurre algo parecido, y así el perímetro nuclear (PNM) y la media de sus desviaciones estándar (DEPNM) de todas las zonas del tumor pero en especial de la zona tumoral más atípica (PNM Z3) son válidos en la definición de los grupos pronósticos, el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la tasa de recurrencia (TR); aunque siempre menores que los resultados obtenidos para el área nuclear y su desviación estándar (ANM·DE).

En cuanto a los casos que progresan, éstos muestran valores de PNM y DEPNM sensiblemente mayores para todas las zonas, aunque inferiores a los valores del ANM.

- **Factor de Forma (FF±DE)**

Un reducido número de estudios concluye algún valor en relación con la forma o tendencia a la esfericidad de los núcleos de las células tumorales. Además, los pocos estudios al respecto muestran resultados controvertidos y así, mientras autores como Sánchez (1986) describen una menor esfericidad de los núcleos en los tumores vesicales de bajo grado, otros como Montironi y cols. (1986a-b), y Fukuzawa y cols. (1995) demuestran que la pérdida de esfericidad nuclear posee mayor poder predictivo que el ANM en relación con la predicción de progresión tumoral y supervivencia.

Nuestros resultados indican que el FF nuclear no posee valor pronóstico y sólo se observan diferencias mínimas, aunque sin alcanzar el nivel de significatividad, en relación con los valores de la Z4 (10 núcleos más pequeños), no existiendo asociación estadística con el resto de las funciones del pronóstico.

6.4.2. FACTORES CITOMÉTRICOS

Existen 2 métodos básicos para la cuantificación del DNA nuclear: la Citometría de Flujo (CMF) y la Citometría Estática o de Imagen (CME / CMI). Diferentes estudios han demostrado en las neoplasias vesicales y otros tipos tumorales que los resultados son prácticamente superponibles con ambas técnicas, con un nivel de concordancia entre un 77 y un 100%, siempre para material incluido en parafina (Cohen, 1996; e Hierro I y cols., 1996).

Las discrepancias se deben fundamentalmente a la gran heterogeneidad tumoral y al hecho de que con técnicas de CMF no se discriminan correctamente pequeñas poblaciones celulares que contienen una cantidad de DNA distinta de la población celular predominante (Goulandris y cols., 1996). En ese estudio, de los 81 casos diploides en 10 existía un pico hiperdiploide o peridiploide con valor predictivo y sólo detectable con CMI.

Por su parte, Schapers y cols. (1993) encuentran mejor correlación pronóstica con la proporción de células hiperdiploides que con el pico de células con un contenido de DNA >5c.

Nenning y cols. (1997) describen que los tumores vesicales de bajo grado (NBG/G1) tienen una proporción de células con un contenido nuclear >5c muy pequeña en relación con los G2 y G3. En nuestra casuística es importante mencionar que apenas existían casos con un contenido de DNA >5c en Z3.

Como norma general la mayoría de los estudios concluyen que los tumores vesicales G1 y la mitad de los G2 son diploides, lo cual no significa que todas las células de los tumores diploides hayan de tener necesariamente la misma cantidad de DNA como ya hemos visto, y ese pico hiperdiploide, por ejemplo, representa generalmente una población celular con una mayor actividad proliferativa (Nenning y cols., 1997). En nuestro estudio la mayor parte de los casos son diploides en Z1 y Z2, aunque una pequeña proporción de éstos (aproximadamente un 10% de casos para cada zona) muestra un contenido no diploide de DNA (**hiperdiploide o tetraploide**) con valor pronóstico.

Van Velthoven y cols. (1995-6) afirman que los factores morfométricos texturales (textura cromatínica) aportan más información pronóstica que la ploidía tumoral, añadiendo que esta última es expresión de la edad del tumor más que de su

agresividad biológica; no obstante, el hecho que un tumor esté presente durante más tiempo significa también que ha tenido la posibilidad de expresar toda su malignidad biológica.

En tumores vesicales superficiales (TVS) de cualquier grado y estadio la ploidía tumoral ha demostrado con frecuencia valor pronóstico, incluso mayor los parámetros clásicos y los parámetros morfométricos como el ANM (Blomjous y cols., 1989a). En nuestro estudio la **ploidía tumoral en Z3** es en general superior en poder predictivo a los parámetros pronósticos clásicos aunque inferior al valor pronóstico del ANM(DE) en Z3 y diversos factores inmunohistoquímicos, lo cual podría apoyar la hipótesis de van Velthoven a cerca de la edad tumoral como efecto inmediato de la aneuploidía tumoral y su valor pronóstico como consecuencia indirecta.

Es interesante destacar que, metodológicamente, existe una relación obvia entre el ANM, el índice proliferativo tumoral y la ploidía tumoral, ya que los núcleos de mayor tamaño suelen ser los núcleos en división y contienen una mayor cantidad de DNA. Además, la ploidía del tumor es una medida obtenida a partir del índice IOD (densidad óptica integrada), variable relacionada directamente con el tamaño nuclear y con la hiperchromasia.

Sin embargo, muy pocos estudios valoran conjuntamente el ANM y la ploidía en las neoplasias de bajo grado (NBG).

Pantazopoulos y cols. (1997) demuestran asociación estadística entre la ploidía tumoral y la TR, y también con el índice proliferativo tumoral.

En nuestro estudio la ploidía tumoral se relaciona estadísticamente con el área nuclear media (ANM) y con el índice proliferativo tumoral (índice Ki-67-MIB-1), como se comentará posteriormente. Al margen de esta consideración la ploidía tumoral es válida en la definición de los grupos pronósticos en la zona papilar interna (Z2) y en la zona de los 10 núcleos más grandes (Z3), sobre todo en ésta última. En concreto, la ploidía en Z3 se traduce en que un 86% de los casos diploides o hiperdiploides son tumores que evolucionan bien (BPMr), mientras que la mayor parte de casos triploides y todos los casos con un contenido de DNA tetraploide o superior son casos que evolucionaron mal (BGr). Respecto al intervalo libre de enfermedad (ILE) y a la tasa de recurrencia (TR), un contenido hiperdiploide en Z2 y

un contenido triploide o superior en Z3 se asocia con un ILE más corto y a una mayor TR.

Un hecho destacado referente a la progresión tumoral en nuestra casuística es que todos los casos que progresan muestran un contenido de DNA triploide o superior en la zona tumoral más atípica (Z3).

6.5. FACTORES INMUNOHISTOQUÍMICOS (ANÁLISIS BIVARIANTE)

6.5.1. Ki-67 (MIB-1)

Son numerosas las técnicas que se utilizan en Patología para el estudio del índice proliferativo tumoral, y numerosos los estudios en que se demuestra su valor pronóstico. Dentro de las técnicas IHQ que se utilizan tenemos fundamentalmente dos: el índice PCNA y el índice Ki-67, aunque en la actualidad está más extendido el uso del Ag Ki-67, sobre todo tras la introducción de un nuevo Ac para su aplicación en cortes de parafina: Ki-67 (MIB-1).

Aunque es obvia la relación existente entre ambas pruebas algunos autores han demostrado falta de asociación entre Ki-67 y PCNA (Koyuncuoglu y cols., 1998).

En la mayoría de estudios se demuestra que el índice de Ki-67 se asocia estadísticamente con el grado, el estadio y con las distintas funciones del pronóstico (Liukkonen y cols., 1997-99; Vollmer y cols., 1998; Nakopoulou y cols., 1998; Wu y cols., 2000). En estos estudios se contabilizan unos 1000 núcleos por cada caso con niveles de positividad que oscilan entre el 6% y el 15%. Por el contrario, hay estudios que concluyen que el Ag Ki-67 no tiene valor pronóstico o no está asociado con grados y estadios elevados, en este sentido diversos autores señalan ausencia de relación entre el índice proliferativo y el estadio tumoral (Okamura y cols., 1990; Fontana y cols., 1992; Krüger y Müller, 1995).

Pfister y cols. (1999a-b) describen que MIB-1 es un factor predictivo del nº de recurrencias y del ILE en neoplasias vesicales de bajo grado (NBG). En este grupo tumoral (NBG), Mulder y cols. (1992), Pfister y cols. (1999) sitúan el nivel umbral con valor pronóstico en torno al 10% (100%) de núcleos positivos.

Okamura y cols. (1990) estratifican el índice de Ki-67 *en grupos*, de forma que un índice <5% comporta un curso evolutivo indolente, 5-15% un curso intermedio, y >15% comporta un curso evolutivo agresivo.

Se considera, asimismo, la *distribución intratumoral* de las áreas proliferativas en relación con las distintas capas celulares dentro las papilas o de todo el tumor en su conjunto. En este sentido, Fontana y cols. (1992) describen que una distribución apical

o vegetante determina una buena evolución clínica del tumor, mientras que una distribución en la base del tumor comporta un mal pronóstico. Por su parte, Helpap y cols. (1999) describen que una distribución papilar difusa (en todas las capas del urotelio) comporta un peor pronóstico que una distribución basal (en la capa de células basales).

En nuestro estudio se valora simultáneamente la positividad de las áreas tumorales que subjetivamente muestran un mayor índice proliferativo y también de las distintas distribuciones intratumorales, contabilizando un total de 1000 núcleos por cada caso. De este modo se considera el **índice proliferativo global**, se estratifican los grupos en **4 categorías**, y se valoran también las distribuciones según las distintas zonas del tumor (**distribución 1**) y según las distintas capas dentro de la papila (**distribución 2**), situación que no ha sido estudiada de forma conjunta hasta la fecha.

De acuerdo con los resultados obtenidos cualquier parámetro en relación con el índice proliferativo (tasa global de proliferación o distribuciones específicas de Ki-67·MIB-1) es válido en la definición de los grupos pronósticos reales, el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la tasa de recurrencia (TR) con $p < 0.001$.

En cuanto al índice proliferativo global el nivel de corte con mejor correlación pronóstica se determina en un **79‰** de células en ciclo. Para determinar el índice con valor pronóstico independiente es necesario un estudio estadístico multivariable que se comentará con posterioridad. Por lo que hace referencia a las distribuciones de Ki-67(MIB-1) una distribución 1 de tipo apical y una distribución 2 de tipo basal (capa de células basales) se asocia con un buen pronóstico.

Finalmente, en cuanto a la progresión tumoral la tendencia de los casos que progresan es a tener un índice de Ki-67 sensiblemente más elevado que los casos que no lo hacen (160‰ por 102.3‰)

6.5.2. P53 (DO-7)

La sobreexpresión de esta oncoproteína está implicada en el desarrollo de numerosos procesos neoplásicos y en concreto en el caso de los tumores vesicales se relaciona con la progresión tumoral en relación con la invasión de la pared vesical.

No obstante, existe una gran controversia en relación con los resultados obtenidos, lo cual se debe en parte a la gran diversidad de clones utilizados, los

distintos niveles de positividad, los grupos de estudio, etc. En este sentido, Gardiner y cols. (1994) y Casetta y cols. (1997) consideran la positividad a partir de un 0-5%, aunque sólo el valor 0% predice correctamente la progresión tumoral y el nº de recurrencias.

Soini y cols. (1993) establecen este nivel de corte en el 1%. Thomas y cols. (1993), Nakopoulou y cols. (1998), y Li y cols. (1998) en el 10%. Y, finalmente, otros autores como Liukkonen y cols. (1997), y Wu y cols. (2000) establecen el nivel de corte en el 20%.

En la mayoría de estudios se comprueba asociación entre el nivel de expresión de p53 y grados y estadíos altos, y en un número algo más reducido se comprueba una verdadera asociación con el pronóstico, pasándolos a detallar a continuación:

Soini y cols. (1993), Esrig y cols. (1993), Sarkis y cols., (1993), Lipponen y cols. (1993a-b), Casetta y cols. (1997), Liukkonen y cols. (1999), etc.; demuestran asociación entre la expresión tumoral de p53 y la predicción de recurrencias o de progresión tumoral, aunque en general son superados en poder predictivo por los factores clínico-patológicos clásicos (grado, estadío y "status papilar"). En otros estudios se descarta dicha asociación con el grado y el estadío (Wu y cols., 2000), e incluso son numerosos los estudios donde se describe una ausencia total de valor pronóstico de la p53 (Burkhard y cols., 1997; Gardiner y cols., 1994; Pfister y cols., 1999a).

Para el grupo de neoplasias de bajo grado (NBG) se han descrito niveles medios de expresión de p53 que oscilan entre el 3-9% según los diferentes estudios. En este grupo de tumores Casetta y cols. (1997) asocian la expresión de p53 con el ILE y la TR; y Vollmer y cols. (1998) correlacionan la negatividad de p53 con un buen pronóstico en todos los grados histológicos incluidas las neoplasias grado 1.

En nuestro estudio la tasa global de positividad es de **6.78%**, proporción muy parecida a la de los estudios realizados hasta la fecha. En relación con la definición de los grupos pronósticos reales los 2 niveles de positividad considerados en un primer momento (10% y 20%) resultan útiles para la asignación de los casos a los grupos, sin embargo en nivel de corte ideal resulta ser del 15%. En cuanto al intervalo libre (ILE) y a la tasa de recurrencia (TR) la asociación es también muy fuerte para cualquier nivel de corte ($p < 0.001$).

Finalmente, de los 11 casos que progresan la expresión media de p53 fue del 13.9% frente al 6.1% de los casos que no lo hacen.

A partir de nuestros resultados se puede afirmar que la expresión de p53 superó en valor predictivo a muchos parámetros predictivos clásicos (entre ellos al grado y al estadio), al contrario que en muchos de los estudios realizados hasta la fecha. Este hecho podría deberse entre otras cosas a la definición a posteriori (y no a priori) del nivel umbral de positividad.

Pfister y cols. (1998) afirman que la ploidía tumoral es superior en poder predictivo a la expresión conjunta de Ki-67 y p53, sin embargo en nuestro estudio ocurre al contrario, ya que la expresión conjunta de estos 2 factores inmunohistoquímicos (índice Ki-67·MIB-1 y p53) supera en valor predictivo al valor de la ploidía tumoral en cualquiera de las zonas tumorales consideradas.

6.5.3. Bcl-2 (MARCADOR DE APOPTOSIS)

El estudio inmunohistoquímico (IHQ) de la apoptosis en las neoplasias vesicales no ha sido tan estudiado como en las neoplasias de mama, tiroides y distintos procesos linfoproliferativos. Además, los resultados obtenidos en estos estudios han sido en ocasiones contradictorios.

En el urotelio normal y en las neoplasias de bajo grado (NBG) se ha comprobado una expresión de bcl-2 en la capa de células basales en proliferación, observándose como a mayor grado y estadio se incrementa la expresión de bcl-2 en capas intermedias y superficiales (Nakopoulou y cols., 1998; Li y cols., 1998; Wu y cols., 2000). En estos estudios no se demostró, sin embargo, ningún valor pronóstico en relación con esa distribución de la positividad. Liukkonen y cols. (1997) consideraron de forma conjunta la expresión basal y difusa de bcl-2 y describen que la positividad se concentra en carcinomas de alto grado (NAG), aunque tampoco concluyen ningún valor pronóstico.

En los estudios mencionados previamente se considera que la positividad aislada de bcl-2 carece de valor pronóstico pero en combinación con la expresión de p53 existe un **efecto dual**, de forma que la expresión de bcl-2 con p53 negativo comporta buen pronóstico (evento precoz en el proceso carcinogenético); sin embargo, la expresión conjunta de bcl-2 y p53 (evento tardío) significa un curso evolutivo

ominoso, es decir, que el efecto protector inicial de bcl-2 desaparece al confirmarse la sobreexpresión de p53 (Vollmer y cols., 1998). Otros autores como Tzai y cols. (1998) describen que en NBG la expresión conjunta de p53 y bcl-2 carece de valor pronóstico.

En nuestra investigación, la expresión aislada de bcl-2 no muestra valor predictivo en la definición de los grupos pronósticos ni en relación con el intervalo libre de enfermedad (ILE); sin embargo, sí se evidencia asociación estadística entre la expresión difusa de bcl-2 y una tasa de recurrencia (TR) más alta.

Con respecto a la expresión conjunta de bcl-2 y p53 se obtienen resultados interesantes. Así, respecto a la expresión basal de bcl-2, la expresión aislada de bcl-2 con negatividad para p53 se traduce en un buen curso evolutivo libre de recurrencias, mientras que la positividad de p53 significa un peor curso evolutivo con una TR alta y un ILE corto. Sin embargo, la expresión difusa de bcl-2 no se vio influenciada por la expresión anómala de p53 y se asocia siempre a un mal pronóstico.

No obstante, estos resultados han de ser contrastados en estudios posteriores con un mayor número de casos y un seguimiento clínico prolongado, válidos también para el estudio adicional de la progresión tumoral.

6.5.4. C-erbB-2

La expresión de esta oncoproteína ha demostrado valor pronóstico en el carcinoma de mama pero no en las neoplasias vesicales. Dentro de la familia de los receptores de los factores de crecimiento, el EGFR ha mostrado en algunos estudios valor pronóstico en relación también con el grado (Liukkonen y cols., 1997-9). Sin embargo, en algunos estudios se describe ausencia de relación entre la expresión EGFR y la expresión de c-erbB-2 (Moriyama y cols., 1991).

El valor pronóstico de la oncoproteína c-erbB-2 ha sido descrito en diversos estudios en tumores de alto grado y en relación con un **curso evolutivo indolente** (Moriyama y cols., 1991; Vollmer y cols., 1998). Por su parte, Sato y cols. (1992) demuestran valor pronóstico de esta misma oncoproteína aunque en relación con un **curso evolutivo ominoso**.

En nuestra casuística la expresión de c-erbB-2 no confirma valor pronóstico para ninguno de los parámetros evolutivos considerados, hecho que podría estar en

relación con el grupo de poblacional estudiado (neoplasias de bajo grado-NBG), ya que con anterioridad se ha descrito valor pronóstico en relación siempre con grados histológicos y estadios tumorales avanzados.

6.5.5. CITOQUERATINA BASAL (CLON 34βE12)

La expresión de esta citoqueratina, constituida por las citoqueratinas **CK1-5-10-14**, es específica de las células basales del urotelio normal (Helpap y Köllermann, 1999).

Su valor pronóstico ha sido ampliamente estudiado en el **carcinoma de próstata** (Wojno y Epstein, 1995), aunque son muy escasos los estudios realizados en las neoplasias vesicales.

Sánchez (1992) estudia la expresión de **CK-1 (LP 34)** en tumores vesicales papilares, observando que en los tumores de bajo grado (BG) existe una expresión predominante en la capa basal, mientras que en tumores de alto grado (AG) la expresión es en el todas las capas de forma difusa. Este hecho se podría explicar por la pérdida o desnaturalización de los filamentos intermedios del citoesqueleto.

En 1999, Helpap y Köllermann estudian la expresión de CK-basal (**Ag 34βE1,2**) en neoplasias papilares vesicales uroteliales, concluyendo resultados muy similares, es decir, expresión difusa de esta citoqueratina en los tumores de alto grado histológico con elevada tasa de recurrencia (TR). Del mismo modo, en el 2000 estos mismos autores describen que en neoplasias de bajo potencial maligno (BPM) predomina una expresión basal similar a la del urotelio normal, mientras que en el grupo de carcinomas de bajo grado la expresión ocurre con mayor frecuencia en todas las capas de forma difusa o en las capas superficiales, lo cual se relaciona a su vez con una mayor tasa de recidiva tumoral (Helpap y Köllermann, 2000).

En nuestro estudio este patrón específico de positividad frente a las citoqueratinas (basal o difuso) es válido en la definición de los grupos pronósticos, el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la tasa de recurrencia (TR); aunque se ve superado en poder predictivo por otros marcadores IHO y por alguno de los parámetros clásicos clínico-patológicos. De entre todos, la expresión más fuerte se produce en relación con la TR (p=0.001).

En cuanto a la progresión tumoral 9 (81.8%) de los 11 casos que progresan muestran un patrón difuso de expresión, y sólo 2 casos presentan un patrón basal.

Helpap y Köllermann (2000) también estudian en NBG el valor pronóstico de la expresión conjunta de CK basal y Ki-67 distribución 2, resultando diferencias significativas de los grupos en relación con la TR, sobre todo entre el grupo de expresión difusa de ambos Ac y el resto de combinaciones posibles.

En nuestra experiencia y en relación con la TR y el ILE, la expresión basal de ambos Ac se asocia a buen pronóstico, la expresión difusa en cambio se relaciona con una elevada TR y un ILE corto, mientras que la expresión mixta (basal de uno y difusa del otro Ac) demuestra que la expresión difusa de Ki-67 tiene un valor pronóstico superior al de la expresión difusa de CK-basal. En cualquier caso el poder predictivo de la CK-basal de forma aislada es menor que considerada juntamente con la distribución 2 de Ki-67·MIB-1.

6.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS ADICIONALES

6.6.1. DE LOS DISTINTOS FACTORES INMUNOHISTOQUÍMICOS (IHQ) ENTRE SÍ

Diferentes estudios en neoplasias vesicales han demostrado la asociación existente entre la expresión de p53 y el índice proliferativo Ki-67·MIB-1 (Liukkonen y cols., 1997; Vollmer y cols., 1998; Nakopoulou y cols., 1998); y también con el índice de PCNA (Shiina y cols., 1996). Sin embargo, en otros estudios se afirma que Ki-67 y p53 son 2 parámetros con valor pronóstico independiente (Pfister y cols., 1998).

En estudios de carcinogénesis y de biología molecular se ha comprobado que el **gen TP53** interviene en la regulación de genes implicados en la apoptosis y en la diferenciación y crecimiento celular (Cordón-Cardo y cols., 1997b-98; Prives y Hall, 1999), condicionando de este modo un aumento de la masa tumoral.

En nuestro estudio sobre la posible asociación entre los diferentes factores IHQ destaca la estrecha relación existente entre la expresión de p53(15%) y de Ki-67·MIB-1 (79%), y también con la distribución 2 de Ki-67·MIB-1. Concretamente, un nivel de positividad frente a p53>15% se asocia a un elevado índice proliferativo tumoral y a una distribución 2 de Ki-67 de tipo difuso.

Es importante señalar la **ausencia** de relación estadística entre la distribución 2 de Ki-67·MIB-1 y la expresión tumoral de CK-basal ($p=0.551$), entre Ki-67·MIB-1 distribución 1 y p53 ($p=0.059$), y entre p53 y bcl-2 ($p=0.628$). Sin embargo, respecto a la distribución 1 de Ki-67, la asociación con p53 estuvo muy cerca de ser significativa ($p=0.059$).

6.6.2. DE LOS FACTORES INMUNOHISTOQUÍMICOS (IHQ) CON LA PLOIDÍA TUMORAL Y LA MORFOMETRÍA

Algunos estudios en la literatura muestran asociación entre la expresión de p53 y un mayor contenido de DNA (Mellon y cols., 1994; Pfister y cols., 1998; Shiina y cols., 1996), lo cual se traduce asimismo en que estos núcleos con expresión anómala de la proteína tienen un área nuclear más grande (Krüger y Müller, 1995), un mayor

número de alteraciones cromosómicas y una mayor tasa proliferativa (Mellon y cols., 1994).

En otras publicaciones se confirma correlación estadística entre el índice Ki-67:MIB-1 y la ploidía tumoral (Pfister y cols., 1998).

En casi todos los estudios revisados la ploidía tumoral superaba en valor predictivo al resto de factores IHQ.

En nuestra casuística tanto la expresión de p53(15%) como las distintas distribuciones de Ki-67, incluido el índice proliferativo (79%) se asocian a un mayor grado de ploidía tumoral en la zona tumoral más atípica (Z3).

De igual forma ocurre entre el área nuclear de los 10 núcleos más grandes (ANM Z3), y los valores del índice y las distribuciones 1 y 2 de Ki-67·MIB-1 (79%): las cuales a mayor tasa de proliferación determinan un mayor n° de alteraciones cromosómicas y un mayor tamaño de los núcleos. El ANMZ3 se asocia también con la expresión basal o difusa de citoqueratina basal.

Comparativamente la ploidía tumoral en Z3 tiene según los estudios estadísticos bivalente un valor predictivo similar al índice proliferativo tumoral, a las distribuciones de Ki-67·MIB-1 y a la expresión de p53, con un valor $p < 0.001$, no obstante la referencia exacta de su verdadero poder predictivo necesita del estudio multivariable.

6.6.3. DE LOS DISTINTOS FACTORES CON LA MULTIPLICIDAD Y EL TAMAÑO TUMORAL

Por lo que se refiere a la multiplicidad tumoral diferentes estudios de carcinogénesis describen un origen monoclonal o "siembra tumoral" (Fadl-Elmula y cols., 2000); oligoclonal (Hartmann cols., 2000); o multiclonal o "lesión de campo" (Richie y cols., 1989; Wolf y cols., 1982) para las neoplasias vesicales uroteliales.

En cuanto al gen TP53, existe controversia a cerca de su implicación en el proceso carcinogénico, y así hay autores que correlacionan la expresión de p53 con la multifocalidad tumoral (Habuchi y cols., 1993; Xu y cols., 1996), mientras que el resto lo asocia tan sólo con los procesos de invasión y de progresión tumoral y refiere que la extensión intracanalicular a distancia se asociaría más con las alteraciones en el

cromosoma 9, implicado más en el proceso carcinogénico inicial (Gibas y cols., 1997; Hartmann y cols., 2000).

Por otro lado, Okamura y cols. (1990), y Pfister y cols. (1999) concluyen que la multiplicidad tumoral es un proceso absolutamente independiente del índice proliferativo de Ki-67·MIB-1.

En nuestro estudio existen 3 factores ligados estrechamente a la multiplicidad tumoral: Ki-67·MIB-1 (79%), Z3ANM, y sobre todo la expresión de p53(15%), este último con $p<0.001$. Este hecho significa que tumores primitivos con un elevado índice proliferativo, sobreexpresión de p53, o con un clon celular con elevada ploidía se presentaron con más frecuencia como tumores múltiples independientemente del mecanismo carcinogénico.

Respecto al tamaño tumoral son numerosos los estudios que demuestran asociación directa o indirecta de diferentes factores con el tamaño del tumor. De hecho, en estudios de carcinogénesis se describe la influencia de la expresión de p53 sobre distintos genes implicados en la apoptosis (bcl-2) y en el crecimiento celular (Ki-67·MIB-1) (Cordón-Cardo y cols., 1998-9; Prives y cols., 1999). En otros estudios se demuestra, sin embargo, que la expresión de p53 es independiente de Ki-67 y no se relaciona por tanto con el crecimiento del tumor (Wu y cols., 1996).

En nuestra casuística se comprueba asociación estadística entre el tamaño tumoral, y los valores del área nuclear media y la ploidía en el área tumoral más atípica (ANM Z3 y ploidía Z3) (valores "p" de 0.002 y 0.008 respectivamente). Además, se evidencia correlación entre el tamaño tumoral y el índice proliferativo Ki-67·MIB-1 ($p=0.006$).

Destaca el hecho de que el tamaño tumoral no mostró en nuestra casuística relación estadística con la expresión anómala de p53 ($p=0.293$).

6.7. VALOR PRONÓSTICO DE LOS FACTORES SEGÚN EL TIPO DE ESTUDIO ESTADÍSTICO (INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS MULTIVARIANTE)

Todos los factores pronósticos que demuestran en los distintos estudios estadísticos bivariantes un valor $p < 0.001$ se pueden agrupar en 4 grupos principales:

- **Parámetros clínico-patológicos clásicos**

Dentro de este grupo sólo los **grados clínicos "corregidos" de Parmar** han demostrado para todas las variables pronósticas un valor $p < 0.001$ (en la definición de los grupos reales, el intervalo libre de enfermedad·ILE y la tasa de recurrencia·TR), aunque hemos de tener presente que en su definición entra un parámetro pronóstico (ILE corto o largo). Asimismo, la **multiplicidad** y el **tamaño tumoral** aparecen estrechamente relacionados con el ILE; y el **grado definido con el diagnóstico 1** con la TR.

- **Parámetros morfométricos**

El área nuclear media de las áreas extremas del tumor (**ANM Z3 y Z4**), correspondientes a los 10 núcleos más grandes y los 10 más pequeños del tumor; y el perímetro nuclear del área tumoral más atípica (**PNM Z3**) han demostrado un valor "p" < 0.001 en relación con todas las funciones del pronóstico. A éstos se añaden además: la desviación estándar del área en esas mismas zonas tumorales (**DEANM Z3 y Z4**) y el **PNM Z4** en la definición de los grupos pronósticos reales, el **ANM Z4** en relación con el ILE y la **DEPNM Z3** en relación con la TR.

- **Factores citométricos**

Tan sólo la **ploidía en Z3** ha demostrado un valor $p < 0.001$ con respecto a la TR y también en la definición de los grupos pronósticos reales.

- **Factores inmunohistoquímicos**

Dentro de los factores inmunohistoquímicos (IHQ) la expresión de **p53(15%)**, el **índice proliferativo (Ki-67·MIB-1)** y la **distribución 1 de Ki-67·MIB-1** presentan una $p < 0.001$ para todas las variables del pronóstico, a los que se añade asimismo la **distribución 2 de Ki-67** en relación con la definición de los grupos pronósticos reales y el ILE.

Según estos estudios bivariantes sería imposible determinar qué factores tienen un valor pronóstico independiente del resto.

6.8. ESTUDIO ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE (VALOR PRONÓSTICO INDEPENDIENTE)

Esta prueba estadística ha significado ciertamente un avance extraordinario en el estudio de la influencia de los diferentes factores pronósticos en el diagnóstico y en la predicción evolutiva de los pacientes.

Las múltiples técnicas utilizadas en Anatomía Patológica generan una gran cantidad de datos numéricos con diferente valor pronóstico, datos que han de ser comparados entre sí y con los datos del seguimiento. Sin embargo, de todos estos valores sólo un número muy reducido de ellos aportará información esencial en relación al diagnóstico y al pronóstico (Mariuzzi y cols., 1995; Cohen, 1996). Esta selección de variables con **valor pronóstico independiente** se consigue mediante la aplicación del **estudio multivariable o multivariante (EMV)** (Tosi y Cottier, 1989).

Con este estudio lo que se consigue es evitar la coincidencia o superposición de las variables dentro de los distintos grupos (Baak y cols., 1985), lo cual puede conducir a conclusiones erróneas a cerca del valor pronóstico de los distintos factores.

Para el caso concreto de las neoplasias vesicales, numerosos factores en la literatura han demostrado tener valor pronóstico independiente; aunque, eso sí, en muestras poblacionales muy heterogéneas en cuanto al grado, el estadio, los tipos morfológicos tumorales, el tiempo de seguimiento, la valoración de la positividad de las pruebas IHQ, los niveles de corte para dicha positividad, el número de objetos contabilizados, etc. Además, este valor pronóstico se determina en función de las diferentes funciones del pronóstico como son la progresión tumoral, el intervalo libre de enfermedad (ILE) para la progresión o para la recurrencia, la tasa de recurrencia (TR), el número total de recurrencias, la tasa de supervivencia, etc.

En la literatura los factores que han presentado con mayor frecuencia valor pronóstico independiente han sido el grado histológico, el estadio tumoral y el "status" papilar del tumor (Lipponen y cols., 1990c,d-1991-3; Schapers y cols., 1993; Serth y cols., 1995; Nakopoulou y cols., 1998; etc).

Sin embargo, en otros estudios el estadio (Liukkonen y cols., 1999; Millán-Rodríguez y cols., 2000a) y en ocasiones también el grado (Blomjous y cols., 1988;

Zlotta y cols., 1999) son eliminados como factores con valor pronóstico independiente en estos estudio multivariable (EMV).

Por lo que hace referencia al resto de factores clínico-patológicos clásicos muchos de ellos han sido seleccionados en alguno de los estudios como factores de valor predictivo independiente: la edad (Schapers y cols., 1993; Serth y cols., 1995), el sexo (Sarkis y cols., 1993), la multiplicidad (Millán-Rodríguez y cols., 2000a), y el tamaño tumoral (Allard y cols., 1998; Zieger y cols., 1998). En concreto Millán-Rodríguez y cols. (2000b) definen grupos pronósticos de riesgo en función del grado, el estadio y el número de tumores.

En cuanto a los factores morfométricos y citométricos ocurre algo parecido. Así, muchos de ellos han sido seleccionados en las distintas series como factores con valor pronóstico independiente: el área nuclear media y la desviación estándar de los 10 núcleos más atípicos (ANM Z3 y DEANM Z3) (Lipponen y cols., 1990c-d; Montironi y cols., 1986b), los factores de forma nuclear (Montironi y cols., 1986a-b), el perímetro nuclear medio (PNM) (Montironi y cols., 1986b), la ploidía tumoral (Blomjous y cols., 1988; López-Beltrán y cols., 1994; Koyuncuoglu y cols., 1998), el porcentaje de células con índice de DNA >5c (Hemstreet y cols., 1991; Schapers y cols., 1993), y el porcentaje de células con contenido hiperdiploide de DNA (Shiina y cols., 1996).

Dentro de los parámetros inmunohistoquímicos el factor incluido con más frecuencia como factor con valor pronóstico independiente ha sido la expresión tumoral de la proteína p53, tanto de forma individual (Casetta y cols., 1997; Lacombe y cols., 1996; Sarkis y cols., 1993; Serth y cols., 1995) como en combinación con bcl-2 o con el índice Ki-67·MIB-1 (Vollmer y cols., 1998). Con menor frecuencia se han seleccionado también el índice proliferativo Ki-67 (Liukkonen y cols., 1999; Wu y cols., 2000), y la expresión de c-erbB-2 (Sato y cols., 1992). Sin embargo, ningún estudio ha demostrado hasta la fecha valor pronóstico en la expresión de bcl-2 independiente de p53.

Todos estos factores con valor pronóstico independiente han sido excluidos en otros estudios en los que tan sólo presentaron valor pronóstico en los estudios estadísticos uni- o bivariantes.

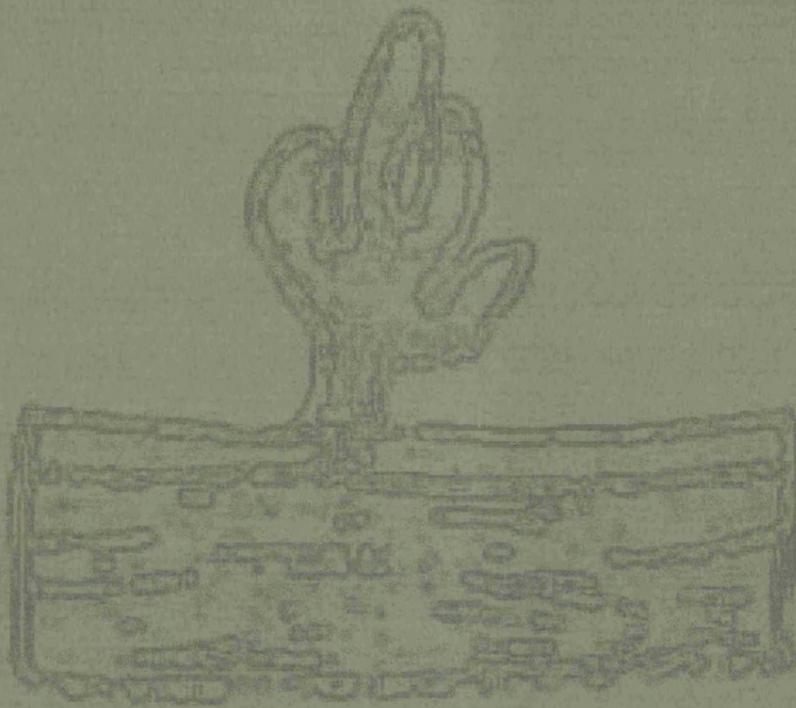
Por lo que respecta al grupo de neoplasias de bajo grado histológico (NBG) muy pocos estudios demuestran valor predictivo independiente para alguno de los factores antes considerados: proporción de células >5c (Hemstreet y cols., 1991), y p53(0%) en tumores vesicales grado 1 limitados a la mucosa (Ta/G1) (Casetta y cols., 1997). Esto se debe probablemente a que la mayoría de estudios hasta la fecha se han centrado en el grupo de tumores vesicales superficiales (TVS), categoría enormemente heterogénea que incluye cualquier grado (G1-G2-G3) y 2 estadios (Ta-T1).

Por lo que se refiere a nuestra casuística constituida por neoplasias de bajo grado (NBG), que incluye neoplasias de bajo potencial maligno (BPM) y carcinomas de bajo grado (BG) se aplican diferentes **estudios estadísticos multivariable** para las 3 funciones pronósticas (*definición de los grupos pronósticos reales, intervalo libre de enfermedad-ILE y tasa de recurrencia-TR*). Según los resultados obtenidos se puede afirmar que los 2 factores con mayor valor pronóstico para las 3 funciones del pronóstico son el área nuclear media de los 10 núcleos más atípicos (ANMZ3) y el índice proliferativo del tumor (índice Ki-67-MIB-1). A estos factores se añade la distribución 1 de Ki-67-MIB-1 en relación con el ILE y la TR; y la ploidía tumoral del área tumoral más atípica (ploidía Z3), la expresión de citoqueratina basal (CK-basal), la distribución 2 de Ki-67-MIB-1 y la expresión difusa de bcl-2 en relación sólo con la TR.

Es de destacar también la ausencia en estas pruebas de estudio multivariante de todos los parámetros clínico-patológicos clásicos, la expresión de p53 (para cualquier nivel de corte de la positividad) y de todos los parámetros morfométricos, excepto los referentes a la zona 3 o población celular más atípica. La ausencia de valor pronóstico independiente del grado y el estadio podría deberse a la no inclusión en el presente estudio de neoplasias de alto grado (G2b y G3), al contrario que Millán-Rodríguez y cols.

Es interesante destacar, asimismo, la ausencia del índice Ki-67 (79%) en la predicción independiente de la TR, y la presencia no antes descrita de bcl-2 y CK-basal como factores de valor pronóstico independiente en relación con esta misma función pronóstica.

Por último señalar que la mejor combinación posible de factores en la definición de los grupos pronósticos reales (curso evolutivo del tumor) incluye un parámetro correspondiente al área tumoral más atípica y otro referente al índice proliferativo tumoral, lo cual refuerza sin duda el diagnóstico de estos tumores en función grado histológico más indiferenciado (diagnóstico histológico en función del grado secundario) y del número de células en ciclo (índice proliferativo tumoral).



7. CONCLUSIONES

En nuestro estudio sobre factores pronósticos en 120 casos de neoplasias vesicales de bajo grado histológico (neoplasias de bajo potencial maligno y carcinomas de bajo grado) se puede concluir lo siguiente:

- 1. Un gran número de parámetros clínico-patológicos clásicos, morfométricos, citométricos e inmunohistoquímicos han demostrado valor pronóstico en relación con la definición de los grupos pronósticos reales (curso evolutivo), con el intervalo libre de enfermedad y con la tasa de recurrencia de estos tumores. Para seleccionar aquellos factores con valor pronóstico independiente es absolutamente imprescindible la aplicación de estudios estadísticos multivariable.**
- 2. La definición de los grupos pronósticos reales a partir de los datos del seguimiento ha demostrado su eficacia en la determinación exacta del factor o combinación de factores que mejor definen las neoplasias vesicales papilares uroteliales de bajo grado (neoplasias de bajo potencial maligno y carcinomas bajo grado). Este estudio incluye tan sólo 2 factores: el área nuclear media de los 10 núcleos más atípicos y el índice proliferativo tumoral (índice Ki-67·MIB-1), quedando excluidos los sistemas subjetivos de clasificación por grados.**
- 3. El diagnóstico subjetivo por grados (neoplasias de bajo potencial maligno o carcinomas de bajo grado) mostró una gran variabilidad intraobservador e intratumoral, según se considere el grado primario predominante o el grado secundario más atípico, dicha discrepancia no mejora con la introducción de un grado conjunto ni con los sistemas clásicos de clasificación.**
- 4. La correcta definición de las neoplasias vesicales de bajo grado (neoplasias de bajo potencial maligno y carcinomas de bajo grado) se basa como aspectos fundamentales en el clon o clones celulares más**

atípicos y en el índice proliferativo tumoral más elevado, hecho que se halla relacionado con el mayor valor predictivo del grado secundario frente al primario.

5. En relación con el intervalo libre de enfermedad el estudio multivariante seleccionó 3 factores con valor pronóstico independiente y en el siguiente orden de inclusión: área nuclear media de los 10 núcleos más atípicos (ANMZ3), índice proliferativo de Ki-67·MIB-1 y distribución 1 de Ki-67·MIB-1 (área vegetante o base del tumor).
6. En relación con la tasa de recurrencia el estudio multivariante seleccionó un gran número de variables con valor pronóstico independiente y en el siguiente orden de inclusión: área nuclear media de los 10 núcleos más atípicos (ANMZ3), distribución 1 Ki-67·MIB-1 (área vegetante o base del tumor), índice de DNA de los 10 núcleos más atípicos (ploidía Z3), expresión tumoral de citoqueratina basal (clon 34βE1,2), distribución 2 de Ki-67·MIB-1 (células basales o todas las capas de forma difusa) y reactividad difusa para bcl-2.
7. Los factores clínico-patológicos clásicos y la expresión de p53 no fueron seleccionados como variables de valor pronóstico independiente en ninguna de las funciones pronósticas consideradas.
8. Según el estudio de supervivencia global para los 120 casos de neoplasias de bajo grado (neoplasias de bajo potencial maligno y carcinomas de bajo grado) la probabilidad de recurrencia disminuye a partir de los 55 meses de seguimiento, lo cual justificaría un seguimiento cistoscópico más espaciado a partir de ese momento.
9. Independientemente del tratamiento adyuvante intravesical administrado las neoplasias vesicales con índice Ki-67·MIB-1 elevado (>79%) y p53 positivo (>15%) evolucionarán peor que los casos con

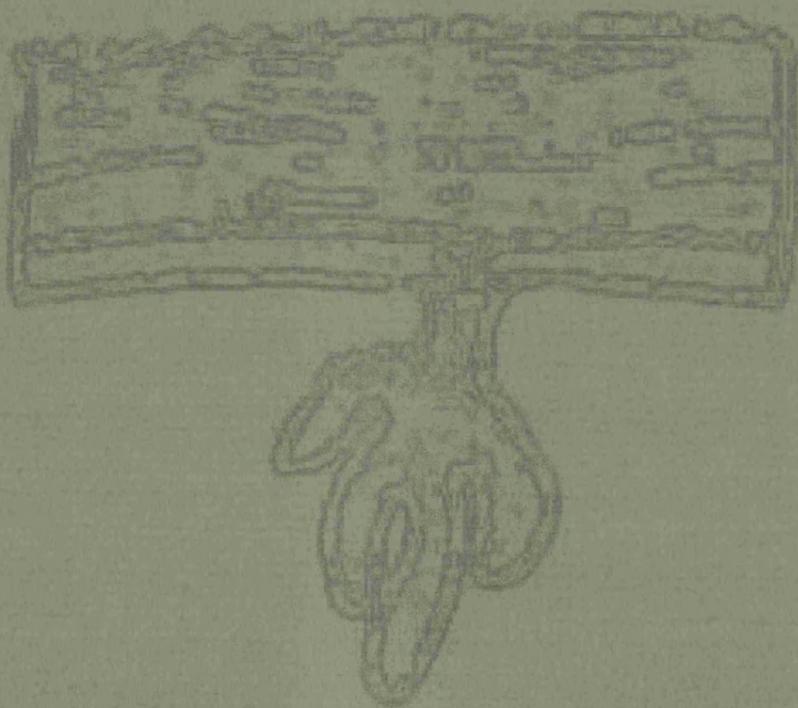
índice proliferativo bajo (<79%) y p53<15%; considerando, asimismo, la estrecha relación existente entre el índice Ki-67·MIB-1 y la expresión de p53 con independencia del valor pronóstico de ambas pruebas.

- 10. La expresión conjunta de citoqueratina basal y distribución 2 de Ki-67·MIB-1, así como la co-expresión de bcl-2 y de p53 mejora el valor pronóstico de cualquiera de las variables consideradas por separado. En concreto, se observa que la expresión basal de bcl-2 es dependiente del nivel de expresión de p53, mientras que la expresión difusa de bcl-2 comporta mal pronóstico independientemente de p53.**

CONCLUSIÓN FINAL

Nuestro estudio puso de manifiesto la gran heterogeneidad intra- e intertumoral de las neoplasias vesicales papilares uroteliales de bajo grado histológico, fundamentada sobre todo en la presencia de un clon celular más atípico y un área concreta del tumor con una elevada actividad proliferativa; ambas variables determinantes en el curso evolutivo de los pacientes y con valor pronóstico independiente en términos de intervalo libre de enfermedad y número de recurrencias.

8. BIBLIOGRAFIA



- **Al-Abadi H, Nagel R, Neuhaus P.** Immunohistochemical detection of p53 protein in transitional cell carcinoma of the bladder in correlation to DNA ploidy and histopathological stage and grade. *Cancer Detect Prev* 22:43-50, 1998.
- **Algaba F.** Atlas de patología de los tumores urogenitales. Pulso Ediciones, Barcelona, pp. 85-185, 1991.
- **Allard P, Fradet Y, Têtu B, Bernard P.** Tumor-associated antigens as prognostic factors for recurrence in 382 patients with primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 1:1195-1202, 1995.
- **Allard P, Bernard P, Fradet Y, Têtu B.** The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol* 81:692-698, 1998.
- **Angulo JC, López IL, Flores N, Toledo JD.** The value of tumour spread, grading and growth pattern as morphological predictive parameters in bladder carcinoma. A critical revision of the 1987 TNM classification. *J Cancer Res Clin Oncol* 119:578-593, 1993.
- **Angulo JC, López JI, Grignon DJ, Sánchez-Chapado M.** Muscularis mucosae differentiates two populations with different prognosis in stage T1 bladder cancer. *Urology* 45:47-53, 1995.
- **Anwar K, Naiki H, Nakakuki K y cols.** High frequency of human papillomavirus infection in carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 70:1967-1973, 1992.
- **Arrizabalaga-Moreno M, Castro-Pita M, Díez-Rodríguez JM y cols.** Evolución clínica de los carcinomas transicionales superficiales de vejiga sin factores pronóstico desfavorables. *Actas Urol Esp* 21:187-194, 1997.
- **Auerbach O, Garfinkel L.** Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer* 64:983-987, 1989.
- **Baak JPA.** Basic points in and practical aspects of the application of diagnostic morphometry. *Path Res Pract* 179:193-199, 1984.
- **Baak JPA.** The principles and advances of quantitative pathology. *Analyt Quant Cytol Histol* 9:89-95, 1987.
- **Badalament RA, Schervish EW.** Bladder cancer, current diagnostic methods and treatment options. *Postgrad Med* 100:217-230, 1996.
- **Balazs M, et al.** Frequent homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (MTS-1, p16) in superficial bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 19:84-, 1997.
- **Bancroft J, Cook H.** Protein (amino acids) and nucleic acids. In: Manual of

- histological techniques and their diagnostic application. Turner D (ed.) vol. 5 pp. 89-105. Churchill Livingstone. London, 1994.
- **Bane LB, Rao JY, Hemstreet GP.** Pathology and staging of bladder cancer. *Semin Oncol* 23(5):546-570, 1996.
 - **Banfalvi A, Navabi H, Bier B, Bocker W, Jasani B, Schmid KW.** Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J Pathol* 174:223-228, 1994.
 - **Berkvist A, Ljungqvist A, Moberger G.** Classification of bladder tumors based on the cellular pattern. *Acta Chir Scand* 130:371-378, 1965.
 - **Belldegrún AS, Franklin JR, O'Donnell MA y cols.** Superficial bladder cancer: the role of interferon-alpha. *J Urol* 159:1793-1801, 1998.
 - **Bernardini S, Adessi GL, Billerey C, Chey E, Carbillet JP, Bittard H.** Immunohistochemical detection of p53 protein overexpression versus gene sequencing in urinary bladder carcinomas. *J Urol* 162:1496-1501, 1999.
 - **Blasco JE.** Determinación inmunohistoquímica de oncoproteínas en el carcinoma vesical de células transicionales: su significado anatomoclínico. Tesis doctoral. Universitat de València. València, 1996.
 - **Blomjous ECM, Schipper NW, Baak JPA, Vos W, De Voogt HJ, Meijer CJLM.** The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol* 91:243-248, 1989a.
 - **Blomjous ECM, Smeulders AWM, Baak JPA y cols.** A comparative study in morphometric grading of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Analyt Quant Cytol Histol* 11:426-432, 1989b.
 - **Blomjous ECM, Vos W, Schipper NW y cols.** The prognostic significance of selective nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. *Hum Pathol* 21:409-413, 1990.
 - **Boccafoschi C, Robutti F, Montefiore F, Betta PG.** A model to assess the risk of recurrences of superficial bladder carcinoma. *Pathologica* 84:269-273, 1992.
 - **Bocking A, Giroud F, Reith A.** Consensus Report of the European Society for Analytical Cellular Pathology Task Force on standardization of diagnostic DNA Image Cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol* 17:1-7, 1995.
 - **Bohle A, Durek C.** Recent perspectives in topical therapy in

- superficial bladder cancer. *Curr Opin Urol* 9:407-411, 1999.
- **Boring CC, Squires TP, Tong T y cols.** Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 44:7-26, 1994.
 - **Bostwick DG.** Natural history of early bladder cancer. *J Cell Biochem, Suppl* 161:31-38, 1992.
 - **Bouffieux C, Kurth KH, Bono A y cols.** Intravesical adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: results of two European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Trials with mitomycin c and doxorubicin comparing early versus delayed instillations and short-term versus long-term treatment. *J Urol* 153:934-941, 1995.
 - **Boyd PJ, Burnand KG.** Site of bladder-tumour recurrence. *Lancet* 2:1290-1292, 1974.
 - **Broders AC.** Epithelium of the genitourinary organs. *Ann Surg* 75:574-604, 1922.
 - **Broders AC.** The grading of carcinoma. *JAMA* 726-30, 1925.
 - **Burkhard FC, Markwalder R, Thalmann GN, Studer UE.** Immunohistochemical determination of p53 overexpression. An easy and readily available method to identify progression in superficial bladder cancer?. *Urol Res* 25:S31-35, 1997.
 - **Busch C, Price P, Norton J, Parkins CS, Bailey MJ, Boyd J, Jones CR, Hern RP, Horwich A.** Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: Its potential clinical importance. *Br J Cancer* 64:357-360, 1991.
 - **Busch C.** Subjective and objective contexture based malignancy grading of bladder cancer. 13th Congress of Academic and Environmental Pathology. Nice, France. October, 1998.
 - **Carbadillo J, Álvarez-Mon M.** Neoplasias uroteliales y moduladores biológicos de la respuesta inmune. *Actas Urol Esp LIV Congreso Nacional de Urología.* Toledo. Mayo, 1989.
 - **Carbin BE, Ekman P, Gustafson H, Christensen NJ, Sandstedt B, Silfverswärd C.** Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency. I. Histological description. *J Urol* 145:968-971, 1991a.
 - **Carbin BE, Ekman P, Gustafson H, Christensen NJ, Silfverswärd C, Sandstedt B.** Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency. II. Histological description. *J Urol* 145:972-976, 1991b.
 - **Caron de Fromentel C, May-Levin F, Mouriesse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P.** Presence

- of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with b-cell lymphoma. *Int J Cancer* 39:185-189, 1987.
- **Casetta G, Gontero P, Russo R, Pachioni D, Tizzani A.** P53 expression compared with other prognostic factors in OMS grade-I stage-Ta transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 32:229-236, 1997.
 - **Caspersson T.** Über den chemischen aufbau der strukturen des zellkerns. *Scand Arch Physiol* 73:1-, 1936.
 - **Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J.** Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen MIB-1 and MIB-3 detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-363, 1992.
 - **Chang F, Lipponen P, Tervahauta A y cols.** Transitional cell carcinoma of the bladder: failure to demonstrate human papillomavirus DNA by in situ hybridization and polimerase chain reaction. *J Urol* 152:1429-1433, 1994.
 - **Cheng L, Weaver AL, Neumann RM, Scherer BG, Bostwick DG.** Substaging of T1 bladder carcinoma based on the depth of invasion as measured by micrometer. *Cancer* 86:1035-1043, 1999a.
 - **Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG.** Papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. *Cancer* 86:2102-2108, 1999b.
 - **Cheng L, Darson M, Cheville JC, Neumann RM, Zincke H, Nehra A, Bostwick DG.** Urothelial papilloma of the bladder. *Cancer* 86:2098-2101, 1999c.
 - **Cheng L, Neumann RM, Weaver AL y cols.** Grading and staging of bladder carcinoma in transurethral resection specimens. Correlation with 105 matched cystectomy specimens. *Am J Clin Pathol* 113:275-9, 2000a.
 - **Cheng L, Neumann RM, Nehra A, Weaver AL, Bostwick DG.** Cancer heterogeneity and its biologic implications in the grading of urothelial carcinoma. *Cancer* 88:1663-1670, 2000b.
 - **Choi HK, Vaskó J, Bengtsson E, Jarkrans T, Malmström PU, Wester K, Busch C.** Grading of transitional cell bladder carcinoma by texture analysis of histological sections. *Anal Cell Pathol* 6:327-343, 1994.
 - **Choi HK, Jarkrans T, Bengtsson E, Vaskó J, Wester K, Malmström PU, Busch C.** Image analysis based grading of bladder carcinoma. comparison of object, texture and graph based methods and their reproducibility. *Anal Cell Pathol* 15:1-18, 1997.
 - **Chow NH, Liu HS, Yang HB, Chan SH, Su IJ.** Expression patterns of erbB receptor family in normal urothelium

- and transitional cell carcinoma. *Virchows Arch* 430:461-466, 1997.
- **Claude J, Kunze E, Frentzel-Beyme R, Paczkowski K, Schneider J, Schubert H.** Life-style and occupational risk factors in cancer of the lower urinary tract. *Am J Epidemiol* 124:577-589, 1983.
 - **Clemo FA, Cabtree WN, Walker E, De Nicola DB.** Comparison of image analysis and flow cytometric measurements of DNA content of canine transitional cell carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 15:418-, 1993.
 - **Cohen C.** Image cytometric analysis in pathology. *Hum Pathol* 27:482-93, 1996.
 - **Collan Y.** Histological grading of transitional cell tumours of the bladder. value of histological grading (WHO) in prognosis. *Eur Urol* 5:311-318, 1979.
 - **Collan Y.** Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pathol Res Pract* 179:189-192, 1984.
 - **Collan Y.** Application of morphometry in tumor pathology. *Analyt Quant Cytol Histol* 9:79-88, 1985.
 - **Collan Y, Montironi R, Mariuzzi GM y cols.** Observer variation in interactive computerized morphometry. *Appl Pathol* 4:9-14, 1986.
 - **Collan Y.** General principles of grading lesions in diagnostic histopathology. *Path Res Pract* 185:539-43, 1989.
 - **Colombel MC, Pous MF, Abbou CC y cols.** Computer assisted image analysis of bladder tumour nuclei for morphonuclear and ploidy assessment. *Anal Cell Pathol* 6:137-147, 1994.
 - **Colombel MC, de Launoit Y, Bellot J, Kiss R, Abbou C, Chopin D.** Prognostic evaluation of morphonuclear parameters in superficial and invasive bladder cancer. *Br J Urol* 75:364-369, 1995.
 - **Colpaert C, Goovaerts G, Buysens N.** Factors influencing the subjective grading of bladder cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 411:479-484, 1987.
 - **Corbett TP, Henry JA, Angus B y cols.** NCL-CB11: A new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin embedded tissue. *J Pathol* 161:15-25, 1990.
 - **Cordón-Cardo C, Dalbagni D, Sáez GT y cols.** TP53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 56:347-353, 1994.
 - **Cordón-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G y cols.** Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res* 57:1217-1221, 1997a.
 - **Cordón-Cardo C, Reuter VE.** Alterations of tumor suppressor genes

- in bladder cancer. *Semin Diag Pathol* 14:123-132, 1997b.
- **Cordón-Cardo C.** "Molecular alterations in bladder cancer". Precancer: biology, importance and possible prevention (*Cancer Surveys*) vol. 32. Ponten J (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 115-131, 1998.
 - **Cordón-Cardo C.** Predicting clinical outcomes in bladder cancer. A molecular approach. 22nd Annual Course of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Session II: Genitourinary tract pp. 75-84. Granada (Spain). May, 1999.
 - **Corral D, Slaton JW, Perrotte P y cols.** Examination under anesthesia (EUA) in the staging and management of bladder cancer in the contemporary Era. *J Urol* 159:A 819-, 1998.
 - **Cotran RS, Kumar V, Collins T.** Robbins: Patología Estructural y Funcional (6th edition). Saunders, Philadelphia, 1999.
 - **Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD.** Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 30:403-408, 1982.
 - **Dalbalgni G, Sáez GT, Oliva MR, Pellicer A, Reuter VE, Fair WR, Cordón-Cardo C.** p53 mutations in bladder cancer: correlation between immunohistochemistry, single strands conformation polymorphism and sequencing. Congress of the AAU, *J Urol* 98:238a, 1992.
 - **Dalla-Palma P, Mauri MF, Forti S y cols.** Grading in superficial papillary bladder carcinoma, with an emphasis on nuclear orientation. *Analyt Quant Cytol Histol* 18:305-308, 1996.
 - **Decaestecker C, van Velthoven R, Petein M y cols.** The use of the decision tree technique and image cytometry to characterize aggressiveness in WHO grade II superficial transitional cell carcinomas of the bladder. *J Pathol* 178:274-283, 1996.
 - **Desoize B.** Anticancer drug resistance and inhibition of apoptosis. *Anticancer Res* 14:2291-, 1994.
 - **Duncan RE, Bennett DW, Evans AT y cols.** Radiation induced bladder tumors. *J Urol* 118:43-45, 1977.
 - **Eble JN, Young RH.** Carcinoma of the urinary bladder: a review of its diverse morphology. *Semin Diagn Pathol*, 14:98-108, 1997.
 - **Eissa S, Seada LS.** Quantitation of bcl-2 protein in bladder cancer tissue by enzyme immunoassay: comparison with western blot and immunohistochemistry. *Clin Chem* 44:1423-1429, 1998.
 - **England HR, Paris AMI, Blandy JP.** The correlation of T1 bladder tumors history with prognosis and follow-up

- requirements. *Br J Urol* 53:593-597, 1981.
- **Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK, and the Bladder Consensus Conference Committee.** The World Health Organization / International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Bladder. *Am J Surg Pathol* 22:1435-1448, 1998.
 - **Esposti PL, Zajicek J.** Grading of transitional cell neoplasms of the urinary bladder from smears of bladder washings. *Acta Cytologica* 16:529-537, 1972.
 - **Esrig D, Spruck CS, Nicols PW y cols.** P53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 113:1389-1397, 1993.
 - **Esrig D, Elmajian D, Groshen S y cols.** Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 331:1259-1264, 1994.
 - **Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S.** Cytogenetic monoclonality in multifocal uroepithelial carcinomas: evidence of intraluminal tumour seeding. *Br J Cancer* 81:6-12, 1999.
 - **Farrow GM, Utz DC, Rife CC.** Morphological and clinical observations of patients with early bladder cancer treated with total cystectomy. *Cancer Res* 36:2495-2501, 1976.
 - **Ferrari P, Trentini GP, de Gaetani C, Caragnani L, Righi E, Ferrari G.** Molecular biology in bladder carcinoma: contributions of immunohistochemistry. *Arch Ital Urol Androl* 69:271-277, 1997.
 - **Fitzpatrick JM, West AB, Butler MR, Lane V, O'Flynn JD.** Superficial bladder tumours (stage pTa, grade 1 and 2): The importance of recurrence pattern following initial resection. *J Urol* 135:920-922, 1986a.
 - **Fitzpatrick JM, Reda M.** Bladder carcinoma in patients 40 years or less. *J Urol* 135:53-, 1986b.
 - **Fleege JC.** Reliability of quantitative assessments data management in pathology. Doctoral Thesis. *Institute of Pathology*. Amsterdam, 1991.
 - **Fontana D, Bellina M, Gubetta L, Fasolis G, Rolle L, Scoffone C, Porpiglia F, Colombo M, Tarabuzzi R, Leonardo E.** Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol* 148:1149-1151, 1992.
 - **Fontana D, Bellina M, Galietti F, Scoffone C, Cagnazzi E, Guercio S, Cappia S, Pozzi E.** Intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG) as inducer of tumor-suppressing p53 and

- p21 (waf1-cip1) during treatment of superficial bladder cancer. *J Urol* 162:225-230, 1999.
- **Franksson C.** Tumours of the urinary bladder. *Acta Chir Scand* 151(Suppl):6-16, 1950.
 - **Fukuzawa S, Hashimura T, Sasaki M y cols.** Nuclear morphometry for improved prediction of the prognosis of human bladder carcinoma. *Cancer* 76:1790-1796, 1995.
 - **Gao JP, Uchida T, Wang C, Jiang SX, Matsumoto K, Satoh T, Minei S, Soh S, Kameya T, Baba S.** Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Oncol* 16:469-475, 2000.
 - **García I, Álvarez M, Hierro I, Vicioso L, Hidalgo R, Matilla A.** Utilidad de la morfometría nuclear como factor predictivo de progresión tumoral en los carcinomas papilares de vejiga. *Actas Urol Esp* 18:937-941, 1994.
 - **Garden RJ, Liu BC, Redwood SM.** Bacillus Calmette-Guerin (BCG) abrogates in vitro invasion and motility of human bladder tumor cell via fibronectin interactions. *J Urol* 148:900-950, 1992.
 - **Gardiner RA, Walsh MD, Allen V y cols.** Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. *Br J Urol* 73:526-32, 1994.
 - **Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20, 1983.
 - **Glasham HY, Robinson MRE, Richards B, Fryszman A, Daponte D, Cooper E.** Changes in the urine protein following intravesical doxorubicin. *J Urol* 128:272-275, 1982.
 - **Gao JP, Uchida T, Wang C y cols.** Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Oncol* 16:469-475, 2000.
 - **Gardiner RA, Walsh V, Allen S y cols.** Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. *Br J Urol* 73:526-532, 1994.
 - **Gibas Z y Gibas L.** Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 95:108-115, 1997.
 - **Goulandris N, Karakitsos P, Georgoulakis J, Bellos Ch, Deliveliotis Ch, Legaki S.** Deoxyribonucleic acid measurements in transitional cell carcinomas: comparison of flow and image

- cytometry techniques. *J Urol* 156:958-960, 1996.
- **Gown AM y Vogel AM.** Monoclonal antibodies to intermediate filament proteins of human cells: unique and cross-reacting antibodies. *J Cell Biol* 95:414-, 1982.
 - **Greven KM, Solin LJ, Hanks GE.** Prognostic factors in patients with bladder carcinoma treated with definitive irradiation. *Cancer* 65:908-912, 1990.
 - **Grignon DJ, Shum DT, Bruckschwaiger O.** Transitional cell carcinoma in the Muir-Torre Syndrome. *J Urol* 138:406-8, 1987.
 - **Grignon DJ.** Neoplasms of the Urinary Bladder. In: Urologic Surgical Pathology. Bostwick DG, Eble JN (ed.) pp. 215-306. Mosby (Missouri), 1997.
 - **Haapasalo H, Collan Y, Pesonen E.** Volume corrected mitotic index (M/V-index) the standard of mitotic activity in neoplasms. *Pathol Res Pract* 185:551-554, 1989.
 - **Habuchi T, Takahashi R, Yamada H, et al.** Metachronous multifocal development of urothelial cancers by intraluminal seeding. *Lancet* 342:1087-1088, 1993.
 - **Hamilton PW, Allen DC.** Morphometry in histopathology. *J Pathol* 175:369-379, 1995.
 - **Harnden P, Mahmood N, Southgate J.** Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. *Lancet* 353:974-977, 1999.
 - **Harris AL, Neal DE.** Bladder cancer, field versus clonal origin. *N Engl J Med* 326:759-761, 1992.
 - **Hartmann A, Rosner U, Schlake G y cols.** Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest* 80:709-718, 2000.
 - **Hasui Y, Osada Y, Kitada S, Nishi S.** Significance of invasion to the muscularis mucosae on the progression of superficial bladder cancer. *Urology* 43:782-786, 1994.
 - **Hatch TR, Barry JM.** The value of excretory radiography in staging bladder cancer. *J Urol* 135:49-, 1986.
 - **Helander KG.** Karyometric investigations on urinary bladder carcinoma including histotechnological studies with special reference to nuclear morphology. *Doctoral Thesis*. Umeå, 1986.
 - **Helpap B, Köllermann J.** Proliferative pattern of exophytic and superficially invasive and noninvasive low-grade urothelial carcinomas. *Hum Pathol* 30:145-150, 1999.
 - **Helpap B, Köllermann J.** Assessment of basal cell status and proliferative patterns in flat and papillary urothelial lesions: A contribution to the new WHO classification of urothelial

- tumors of the urinary bladder. *Hum Pathol* 31:745-750, 2000.
- **Hemstreet GP, Rollins S, Jones P, Rao JY, Hurst RE, Bonner RB, Hewett T, Smith BG.** Identification of a high risk subgroup of grade 1 transitional cell carcinoma using image analysis based DNA ploidy analysis of tumor tissue. *J Urol* 146:1525-1529, 1991.
 - **Hendry WF, Rawson NSB, Turley L, Dunlop A, Whitfield HN.** Computerization of urothelial carcinoma records: 16 years' experience with the TNM System. *Br J Urol* 65:583-588, 1990.
 - **Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ y cols.** Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 130:1083-1086, 1983.
 - **Hermann GG, Horn T, Steven K.** The Influence of the level of lamina propria invasion and the prevalence of p53 nuclear accumulation on survival in stage T1 bladder cancer. *J Urol* 159:91-94, 1998.
 - **Herr HW.** The value of a second TUR in evaluating patients with bladder tumors. *J Urol* 162:74-76, 1999.
 - **Hierro-Martín I, Álvarez M, Blanes AB, Vicioso L, García I, Matilla A.** Contribución a la categorización de los carcinomas de células transicionales de vejiga, sistematización de la gradación y utilidad de la ploidía de ADN. *Actas Urol Esp* 23(6):489-96, 1999.
 - **Hierro I, Álvarez M, Blanes A, Vicioso L, García I, Matilla A.** Cuantificación de ADN en carcinomas de células transicionales de vejiga mediante citometría de imagen en cortes tisulares. *Patología* 29:37-43, 1996.
 - **Hinotsu S, Akaza H, Ohashi Y, Kotake T.** Intravesical chemotherapy for maximum prophylaxis of new early phase superficial bladder carcinoma treated by transurethral resection. *Cancer* 86:1818-1826, 1999.
 - **Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Johansson SL.** The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol* 153:1823-1827, 1995.
 - **Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Holmberg E, Busch C, Johansson SL.** Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol* 162:702-707, 1999.
 - **Hsu SM, Raine L, Fanger H.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580, 1981.

- **Hurle R, Losa A, Manzetti A, Lembo A.** upper urinary tract tumors developing after treatment of superficial bladder cancer: 7-year follow-up of 591 consecutive patients. *Urology* 53:1144-1148, 1999.
- **Hurlimann J, Larrinaga B, Vala DL.** Bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 426:163-168, 1995.
- **Inagaki T, Ebisuno S, Uekado Y y cols.** PCNA and p53 in urinary bladder cancer: correlation with histological findings and prognosis. *Int J Urol* 4:172-177, 1997.
- **Ioakim-Liossi A, Pantazopoulos D, Karakitsos y cols.** DNA ploidy and p53 protein expression in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Cytopathology* 11:96-103, 2000.
- **Isaacs H, Lindeman J.** Virus interference: The Interferon. *Proc R Soc Oncol Biol* 147:257-262, 1951.
- **Jarkrans T, Vaskó J, Bengtsson E, Choi HK, Malmström PU, Wester K, Busch C.** Grading of transitional cell bladder carcinoma image analysis of histological sections. *Anal Cell Pathol* 8:135-158, 1995.
- **Jewett HJ, Strong GH.** Infiltrating carcinoma of the bladder: relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of local extension and metastases. *J Urol* 55:366-, 1946.
- **Jiménez RE, Keane TE, Hardy HT, Amin MB.** PT1 Urothelial carcinoma of the bladder: criteria for diagnosis, pitfalls, and clinical implications. *Advances in Anatomic Pathology* 7:13-25, 2000.
- **Jiménez-Cruz JF, Vera-Donoso CD, Leiva O, y cols.** Intravesical immunoprophylaxis in recurrent superficial bladder cancer (stage T1): multicenter trial comparing bacille Calmette-Guerin and interferon-alpha. *Urology* 50:529-535, 1997.
- **Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S.** Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 145:1191-, 1994.
- **Johansson SL.** Staging of Bladder Cancer. 13th International Congress of the International Academy of Pathology. Nice. October, 1998.
- **Jordan AM, Weingarten J, Murphy WM.** Transitional cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading? *Cancer* 60:2766-2774, 1987.
- **Kakizoe T, Fujita J, Murase T, Matsumotoko K, Kishi K.** Transitional cell carcinoma of the bladder in patients with renal pelvis and ureteral cancer. *J Urol* 124:17-19, 1980.
- **Keegan PE, Lunec J, Neal DE.** P53 and P53-regulated genes in bladder cancer. *Br J Urol* 82:710-720, 1998.

- **Kenworthy P, Tanguay S, Dinney CP.** The risk of upper tract recurrence following cystectomy in patients with transitional cell carcinoma involving the distal ureter. *J Urol* 155:501-504, 1996.
- **Kern WH.** The cytology of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Acta Cytol* 19:420-428, 1975.
- **Kern WH.** The grade and pathologic stage of bladder cancer. *Cancer* 53:1185-1189, 1984.
- **Kiemeny LA, Witjes JA, Heijbroek RO, Koper NP, Verbeek AL, Debruyne FM.** Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol* 150:60-64, 1993.
- **Kirsh EJ, Baunoch DA, Stadler WM.** Expression of bcl-2 and bcl-x in bladder cancer. *J Urol* 159:1348-, 1998.
- **Koyuncuoglu M, Kargi A, Cingöz S, Kirkali Z.** Investigation of p53, c-erbB-2, PCNA immunoreactivity, DNA content, AgNOR, and apoptosis in bladder carcinoma as prognostic parameters. *Cancer Letters* 126:143-148, 1998.
- **Kondas J, Kiss L, Hatar A, Kiss A, Lukacs T.** The effect of intravesical mitomycin C on the recurrence of superficial (Ta-T1) bladder cancer. A Hungarian Multicenter Study. *Int Urol Nephrol* 31:451-456, 1999.
- **Koss LG.** Diagnostic cytology and its histopathologic bases. Vol. 2 (4th ed.) Lippincott, Philadelphia pp. 46-, 1992.
- **Krege S, Giani G, Meyer R y cols.** A Randomized multicenter trial of adjuvant therapy in superficial bladder cancer: TUR, versus TUR plus mitomycin C, versus TUR plus bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 156:962-966, 1996.
- **Krüger S, Müller H.** Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol* 75:480-484, 1995.
- **Kurth KH, Denis L, Bouffieux C y cols.** Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours. *Eur J Cancer* 31a:1840-, 1995.
- **Kurth KH.** Intravesical chemotherapy for superficial bladder tumors category Ta, T1: Who should be treated and how?. *Semin Urol Oncol Suppl* 14:30-35, 1996.
- **Kurth KH, Tunn U, Schroder FH y cols.** Adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: long-term results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer. *J Urol* 158:378-384, 1997.

- **Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF y cols.** Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after BCG therapy: correlation to clinical outcome. *J Clin Oncol* 14:2646-2652, 1996.
- **Lamm DL.** "Carcinoma in situ". *Urol Clin North Am* 19:442-, 1992.
- **Landis SH et al.** Cancer statistics, 1998. *Cancer J Clin* 48:6, 1998.
- **Leblanc B, Duclos AJ, Bènard F y cols.** Long-term follow-up of initial Ta grade 1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 162:1946-1950, 1999.
- **Lebret T, Becette V, Barbagelatta M y cols.** Correlation between p53 overexpression and response to bacillus Calmette-Guerin therapy in a high risk select population of patients with T1G3 Bladder Cancer. *J Urol* 159:788-791, 1998.
- **Lee CCR, Ichihara T y cols.** Reduced expression of the CDK inhibitor p27(KIP1) in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1) and p53. *Carcinogenesis* 20:1697-1708, 1999.
- **Levi PE, Cooper EH, Anderson CK, Williams RE.** Analyses of DNA content, nuclear size and cell proliferation of transitional cell carcinoma in man. *Cancer* 23:1074-1085, 1969.
- **Li B, Kanamaru H, Noriki S y cols.** Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res* 26:235-241, 1998.
- **Lipponen PK, Simpanen H, Pesonen E, Eskelinen M, Sotarauta M, Collan Y.** Potential of morphometry in grading transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Pathol Res Pract* 185:617-620, 1989.
- **Lipponen PK, Collan Y, Eskelinen MJ y cols.** Morphometry in human transitional cell bladder cancer. *Eur Urol* 17:155-160, 1990a.
- **Lipponen PK, Eskelinen M.** Nuclear morphometry in grading transitional cell bladder cancer compared with subjective histological grading. *Anticancer Res* 10:1725-1730, 1990b.
- **Lipponen PK, Collan Y, Eskelinen MJ y cols.** Volume corrected mitotic index (M/V Index) in human bladder cancer: relation to histological grade (WHO), clinical stage (UICC) and prognosis. *Scand J Urol Nephrol* 24:39-45, 1990c.
- **Lipponen PK, Kosma VM, Collan Y y cols.** Potential of nuclear morphometry and Volume-Corrected Mitotic Index in grading transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 17:333-337, 1990d.

- **Lipponen PK, Eskelinen MJ, Kiviranta J, Pesonen E.** Prognosis of transitional cell bladder cancer: a multivariate prognostic score for improved prediction. *J Urol* 146:1535-1540, 1991a.
- **Lipponen PK, Eskelinen MJ.** How to count mitoses in bladder cancer grading? *Anticancer Res* 11:825-830, 1991b.
- **Lipponen PK.** Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 53:365-370, 1993a.
- **Lipponen PK.** Interrelationship between expressions of p53, PCNA, and c-erbB-2 in bladder cancer. *Pathobiology* 61:178-182, 1993b.
- **Lipponen PK, Aaltomaa S, Eskelinen M.** Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumours. *Histopathology* 28:135-140, 1996.
- **Liukkonen TJO, Lipponen PK, Helle M, Jauhianen KE, and the Finnbladder III Group.** Immunoreactivity of bcl-2, p53, and EGFr is associated with tumor stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. *Urol Res* 25:1-8, 1997.
- **Liukkonen TJO, Rajala P, Raitanen M, Rintala E, Kaasinen E, Lipponen PK, for Finnbladder Group.** Prognostic value of MIB-1 score, p53, EGFr, mitotic index and papillary status in primary superficial (stage pTa/T1) bladder cancer: a prospective comparative study. *Eur Urol* 36:393-400, 1999.
- **Lonn U, Lonn S, Friberg S y cols.** Prognostic value of amplification of c-erbB-2 in bladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 1:1189-1194, 1995.
- **López-Beltrán A, Croghan GA, Croghan I, Mantilla A, Gaeta JF.** Prognostic factors in bladder cancer. A pathologic immunohistochemical, and DNA flow-cytometry study. *Anat Pathol* 102:109-114, 1994.
- **Lu QI, Laniado M, Abel PD.** Expression of bcl-2 in bladder neoplasms is a cell lineage associated and p53-independent event. *Mod Pathol* 50:28-33, 1997.
- **Lundholm C, Norlen BJ, Ekman P, y cols.** A randomized prospective study comparing long-term intravesical instillations of MM-C and BCG in patients with superficial bladder carcinoma. *J Urol* 156:372-376, 1996.
- **Malmström PU, Busch C, Norlén BJ.** Recurrence, progression and survival in bladder cancer: a retrospective analysis of 232 patients with 5-year follow-up. *J Urol Nephrol* 21:185-195, 1987.
- **Malmström PU, Norlén BJ, Andersson B, Busch C.** Combination of blood group ABH antigen status and DNA-ploidy as an independent

- prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Urol* 64:49-55, 1989.
- **Malmström PU.** Improved patient outcomes with BCG immunotherapy versus chemotherapy, Swedish and Worldwide Experience. *Eur Urol* 37(suppl):16-20, 1999.
 - **Marchal-Escalona C, Diéguez-Lucena JL, García-Villanova J y cols.** Gen de la proteína p53. revisión de la literatura y valoración de las implicaciones pronósticas de sus mutaciones en el tumor vesical. *Actas Urol Esp* 20:93-102, 1996.
 - **Mariuzzi GM, Montironi R.** Quantitative microscopy and index formulation in continuous pathologic lesions. *Appl Pathol* 4:43-47, 1986.
 - **Mariuzzi GM, Collan YUI.** Some reflections on the history, and presence of Quantitative Pathology. *Pathologica* 87:215-220, 1995.
 - **McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Desmond NC.** C-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 65:88-92, 1990.
 - **McFarlane JP, Ellis BW, Harland SJ.** The management of superficial bladder cancer: an interactive seminar. *Br J Urol* 78:372-378, 1996.
 - **Mellon K, Wilkinson S, Vickers J, Robinson MC, Shenton BK, Neal DE.** Abnormalities in p53 and DNA-content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 73:522-525, 1994.
 - **Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J y cols.** Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 163:73-78, 2000a.
 - **Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodríguez J.** Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol* 164:680-684, 2000b.
 - **Miyamoto H, Kubota Y, Noguchi S y cols.** C-erbB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology* 55:679-683, 2000b.
 - **Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R.** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24, 1982.
 - **Montironi R, Scarpelli M, Pisani E, Ansuini G, Marinelli F, Mariuzzi G.** Noninvasive papillary transitional cell tumors. Karyometric and DNA-content analysis. *Analyt Quant Cytol* 7:337-342, 1985.
 - **Montironi R, Scarpelli M, Ansuini G y cols.** Quantitative evaluation of the progressive nuclear abnormalities in urothelial papillary lesions. *Appl Pathol* 4:65-73, 1986a.

- **Montironi R, Scarpelli M, Pisani E y cols.** Multivariate classifications of transitional cell tumors of the bladder: nuclear abnormality index and pattern recognition analysis. *Appl Pathol* 4:48-54, 1986b.
- **Morales-López A, León-Dueñas E, Maestro-Durán JL, del Pobil-Moreno JL.** Echography and cytology versus cystoscopy in the follow-up of patients with superficial tumors of the bladder. *Actas Urol Esp* 13:436-438, 1989.
- **Moreno-Sierra J, López-García-Asenjo JA, Redondo-González E y cols.** Usefulness of p53 oncoprotein immunohistochemistry in the follow-up of bladder carcinoma: a 5-year study. *Arch Esp Urol* 52:840-848, 1999.
- **Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T y cols.** Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol* 145:423-427, 1991.
- **Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H.** Histological typing of urinary bladder tumours. International Classification of Tumours 19. World Health Organization; Geneva, 1973.
- **Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA.** Histological typing of urinary bladder tumors. WHO International Histological Classification of Tumors. 2nd ed. Springer-Verlag; Berlin, 1999.
- **Moyano-Calvo JL, Romero-Díaz A, Ortiz-Gámiz A, y cols.** The prognostic factors in T1 superficial bladder carcinoma. Our experience. *Arch Esp Urol* 52:465-470, 1999.
- **Mulder AH, van Hootegem JC, Sylvester R, ten Kate FJ, Kurth KH, Ooms ECM, van der Kwast TH.** Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen Ki-67. *J Pathol* 166:37-43, 1992.
- **Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM.** Tumors of the Kidney, Bladder, and Related Urinary Structures. Atlas of Tumor Pathology, Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), fasc 11 pp. 193-288, New York, 1993.
- **Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A y cols.** The prevalence of Bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 29:146-154, 1998.
- **Navarro S, Noguera R, Zaragoza J, Calderón I y Llombart-Bosch A.** Prognostic factors in superficial bladder carcinoma. A study of 50 cases. *Lab Invest* 76:84a, 1997.
- **Nenning H, Rassler J, Minh DH, Stolzenburg JU.** The value of DNA cytometry in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Gen Diagn Pathol* 143:231-236, 1996.
- **Nielsen K.** Nuclear volume in transitional cell tumors. *Doctoral Thesis*. Copenhagen, 1991.

- **Nossal GJ.** The basic components of the immune system. *N Engl J Med* 316:1320-1325, 1987.
- **Ogura K, Fukuzawa S, Habuchi T y cols.** Correlation of nuclear morphometry and immunostaining for p53 and proliferating cell nuclear antigen in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol* 4:561-566, 1997.
- **Ojea-Calvo A, Pérez-García D, Rodríguez-Alonso A y cols.** Cáncer superficial de vejiga: ¿qué controles han de seguir y durante cuánto tiempo, los pacientes libres de tumor?. *Actas Urol Esp* 22:210-214, 1998.
- **Okamura K, Miyake K, Koshikawa T, Asai J.** Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol* 144:875-878, 1990.
- **Okamura T, Tozawa K, Yamada Y, y cols.** Clinicopathological evaluation of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation for preventing recurrence of initially resistant superficial bladder cancer. *J Urol* 156:967-971, 1996.
- **Ooms ECM, Essed E, Veldhuizen RW y cols.** The prognostic significance of morphometry in T1 bladder tumours. *Histopathology* 5:311-318, 1981.
- **Ooms ECM, Anderson W, Alons CL, Boon M, Veldhuizen R.** Analysis of the performance of pathologists in grading of bladder tumors. *Hum Pathol* 14:140-143, 1983a.
- **Ooms ECM, Kurver PHJ, Veldhuizen RW, Alons CL, Boon ME.** Morphometric grading of bladder tumors in comparison with histologic grading by pathologists. *Hum Pathol* 14:144-150, 1983b.
- **Ooms ECM, Blok APR, Veldhuizen RW.** The reproducibility of a quantitative grading system of bladder tumors. *Histopathology* 9:501-509, 1985.
- **Ordoñez NG, Rosai J.** Urinary tract. In: Ackerman's Surgical Pathology vol.1 (7th Edition) Rosai J (ed.) pp. 1059-1120. Mosby (Missouri), 1996.
- **Orlando C, Sestini R, Vona G, Pinzani P, Bianchi S, Giacca M, Pazzagli M, Selli C.** Detection of c-erbB-2 amplification in transitional cell bladder carcinoma using competitive PCR technique. *J Urol* 156:2089-2093, 1996.
- **Orlow I, Lacombe L, Hanon GJ y cols.** Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 87:1524-, 1995.
- **Orlow I, Lacombe L, Pellicer I y cols.** Genotype and phenotype characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer* 75:819-824, 1998.
- **Otero G, Fernández A, Gil J.** Epidemiología descriptiva y analítica

- en oncología urológica. Tema monográfico del LXIII Congreso de la Asociación Española de Urología. ENE (ed) Madrid, 1998.
- **Otto T, Krege S, Noll F, Rübber H.** Therapy of superficial bladder carcinomas. *Urol Int* 63:32-39, 1999.
 - **Ozen H.** Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 11:207-212, 1999.
 - **Páez-Borda A, Luján-Galán M, Martín-Oses E, Berenguer-Sánchez A.** Alternatives to the cystoscopic control of bladder neoplasms. *Arch Esp Urol* 50:1079-1083, 1997.
 - **Páez-Borda A, Luján-Galán M, Llanes-González L y cols.** Resultados a medio plazo de un programa de vigilancia en los tumores vesicales superficiales. *Arch Esp Urol* 52:229-235, 1999.
 - **Pagano F, Gablegio A, Milani C y cols.** Prognosis of bladder cancer I. Risk factors in superficial transitional cell carcinoma. *Eur Urol* 13:145-149, 1987.
 - **Pagano F, Bassi P, Piazza N y cols.** Improving the efficacy of BCG immunotherapy by dose reduction. *Eur Urol* 27(suppl.1):19-22, 1995.
 - **Page BH, Levison VB, Curwen MP.** The site of recurrence of non-infiltrating bladder tumours. *Br J Urol* 50:237-242, 1978.
 - **Pantazopoulos D, Ioakim-Liossi, Karakitsos P y cols.** DNA content and proliferation activity in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* 17:781-786, 1997.
 - **Pardo-Mindán FJ, Guiu M, de Álava E, Ramón y Cajal S.** Métodos en Patología. En: Anatomía Patológica. Pardo-Mindán (ed.) pp. 333-406. Mosby (Missouri), 1997.
 - **Parmar MKB, Freedman LS, Hargreave TB, Tolley DA.** Prognostic factors for recurrence and follow-up policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council Subgroup on superficial bladder cancer. *J Urol* 142:284-288, 1989.
 - **Pauwels RPE, Schapers RFM, Smeets WGB, Debruyne FMJ, Geraedts JPM.** Grading in superficial bladder cancer. (1) Morphological criteria. *Br J Urol* 61:129-134, 1988.
 - **Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, y cols.** A Combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council Randomized Clinical Trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer... *J Urol* 156:1934-1940, 1996.
 - **Pedersen-Bjergaard J, Ersboll J, Hansen VL y cols.** Carcinoma of the urinary bladder after treatment with ciclophosphamide for non-Hodgkin's

- lymphoma. *N Engl J Med* 318:1028-1032, 1988.
- **Petrovich Z, Baert L, Stuart D, y cols.** Management of carcinoma of the bladder. *Am J Clin Oncol* 21:217-222, 1998.
 - **Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Pulford KAF, Gatter KC, Mason DY.** Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal traslocation. *Am J Pathol* 137:225-232, 1990.
 - **Pfister C, Buzelin F, Casse C, Bochereau G, Buzelin G, Bouchot O.** Comparative analysis of MIB1 and p53 expression in human bladder tumors and their correlation with cancer progression. *Eur Urol* 33:278-284, 1998.
 - **Pfister C, Moore L, Allard P, Larue H, Lacombe L, Meyer F, Fradet Y.** Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin Cancer Res* 5:4079-4084, 1999a.
 - **Pfister C, Lacombe L, Vezina MC, Moore L, Larue H, Tétu B, Meyer F, Fradet Y.** Prognostic value of the proliferative index determined by Ki-67 immunostaining in superficial bladder tumors. *Hum Pathol* 30:1350-1355, 1999b.
 - **Platz CE, Cohen MB, Jones MP y cols.** Is microstaging of early invasive cancer of the urinary bladder possible or useful?. *Mod Pathol* 11:1035-1039, 1996.
 - **Portillo JA, Val-Bernal F, Garijo-Ayenza F y cols.** Estudio morfométrico del carcinoma transicional de vejiga (I): análisis de 148 tumores superficiales. *Arch Esp Urol* 44:243-249, 1991.
 - **Portillo JA, Val-Bernal F, Garijo-Ayenza F y cols.** The value of nuclear area as a prognostic factor in T1 papillary transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 70:622-627, 1992a.
 - **Portillo JA, Val-Bernal F, Garijo-Ayenza F y cols.** Prognostic correlation of morphometric values with survival in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 70:628-633, 1992b.
 - **de Prez C, de Launoit Y, Kiss R y cols.** Computerized morphonuclear cell image analyses of malignant disease in bladder tissues. *J Urol* 143:694-699, 1990.
 - **Probert JL, Persad RA, Greenwood RP, Gillatt DA, Smith PJB.** Epidemiology of transitional cell carcinoma of the bladder: profile of an urban population in the South-West of England. *Br J Urol* 82:660-666, 1998.
 - **Prout GR, Barton BA, Griffin PP, Friedell GH.** Treated history of non-invasive grade 1 transitional cell carcinoma. *J Urol* 148:1413-9, 1992.

- **Pugh RGB.** The pathology of cancer of the bladder. *Cancer*, 32:1267-1274, 1973.
- **Pyrah LN, Raper FP, Thomas GM.** Report of a follow-up of papillary tumors of the bladder. *Br J Urol* 36:14-25, 1964.
- **Raab SS.** Citopatología Urinaria. En: Atlas de Dificultades Diagnósticas en Citopatología. Atkinson BF y Silverman JF (ed.) pp. 231-256 Saunders (Harcourt). Madrid, 2000.
- **Ramaekers F, Huysman A, Muesker O, Schaart G, Herman CH, Vooijs P.** Cytokeratin expression during neoplastic progression of human transitional cell carcinomas as detected by a monoclonal and a polyclonal antibody. *Lab Invest* 52:31-38, 1985.
- **Ramani P, Birch BRP, Harland y cols.** Evaluation of endothelial markers in detecting blood and lymphatic channel invasion in pT1 transitional carcinoma of the bladder. *Histopathology* 19:551-554, 1991.
- **Reading J, Hall RR, Parmar MKB.** The application of a prognostic factor analysis for Ta, T1 bladder cancer in routine urological practice. *Br J Urol* 75:604-607, 1995.
- **Reynolds GM, Young FI, Young JA, Williams A, Rowlands DC.** Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens. *Cytopathology* 5:345-358, 1994.
- **Reuter VE.** Superficial bladder cancer: a study in morphological and clinical diversity. 22nd Annual Course of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Session II: Genitourinary Tract pp. 57-74. Granada (Spain). May, 1999a.
- **Reuter VE.** Bladder. Risk and prognostic factors: A pathologist's perspective. *Urol Clin North Am* 26(3):481-92, 1999b.
- **Richie JP, Shipley WU, Yagoda A.** Cancer of the Bladder. In: Cancer Principles and Practice of Oncology. De Vita VT, Helman S and Rosenberg SA (ed.) pp. 1008-1022. Lippincott: Philadelphia, 1989.
- **Sánchez de la Muela P, Aguera-Fernández L, Castro-Barbosa F y cols.** Tumores vesicales superficiales: valor pronóstico del período libre de enfermedad. *Actas Urol Esp* 14:8-13, 1989.
- **Sánchez-Fernández de Sevilla MC.** Estudio comparativo como base pronóstica de los carcinomas superficiales e infiltrantes de vejiga mediante técnicas morfométricas e inmunohistoquímicas. *Tesis Doctoral*. Universitat de València, 1986.
- **Sánchez-Fernández de Sevilla MC, Morell-Quadreny L, Gil-Salom M, Pérez-Bacete M, Fenollosa-Entrena**

- B, Llombart-Bosch A.** Behavior of epithelial differentiation antigens (CEA, EMA, Keratin and Cytokeratin) in transitional cell carcinomas of the bladder. *Urol Int* 48:14-19, 1992.
- **Sarkis AS, Dalbagni G, Cerdón-Cardo C y cols.** Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 85:53-59, 1993.
 - **Sarma KP.** The role of lymphoid reaction in bladder cancer. *J Urol* 104:843-839, 1970.
 - **Sasaki K, Hamano K, Kinjo M, Hara S.** Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of bladder carcinomas. *Oncology* 49:219-222, 1992.
 - **Sato K, Moriyama M, Mori S y cols.** An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* 70:2493-2498, 1992.
 - **Sauter G, Moch H, Wagner U y cols.** Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Gen Citogen* 163-9, 1995.
 - **Schapers RFM, Ploem-Zaaijer JJ, Pauwels RPE y cols.** Image cytometric DNA analysis in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 72:182-189, 1993.
 - **Schnitz-Dräger BJ, Jankevicius F, Ackermann R.** Molecular biology of dissemination in bladder cancer laboratory findings and clinical significance. *World J Urol* 14:190-196, 1996.
 - **Schnitz-Dräger BJ, Müller M.** Intravesical treatment of bladder cancer: current problems and needs. *Urol Int* 61(4):199-205, 1998.
 - **Schulte PA, Ringen K, Hemstreet GP, et al.** Risk factors for bladder cancer in a cohort exposed to aromatic amines. *Cancer* 58:2156-2162, 1986.
 - **Schwaibold H, Pichlmeier U, Klingenberger HJ, Huland H.** Long-term follow-up of cystostatic intravesical instillation in patients with superficial bladder carcinoma. Is short-term, intensive instillation better than maintenance therapy? *Eur Urol* 31:153-159, 1997.
 - **See WA, Miller JS, Williams RD.** Patophysiology of transitional tumor cell adherence to sites of urothelial injury in rats: mechanisms mediating intravesical recurrence due to implantation. *Cancer Res* 49:5414-5418, 1989.
 - **Sella A, Dexeus FH, Chong C y cols.** Radiation therapy-associated invasive bladder tumors. *Urology* 33:185-188, 1989.
 - **Serth J, Kuczyk MA, Bokemeyer C y cols.** P53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma

- of the bladder. *Br J Cancer* 71:201-205, 1995.
- **Shiina H, Igawa M, Nagami H, Urakami S, Yoneda T, Shirakawa H, Ishibe T, Kawanishi M.** Immunohistochemical analysis of PCNA, p53 protein and nm23 protein, and nuclear DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 78:1762-1774, 1996a.
 - **Shiina H, Igawa M, Urakami S, Honda S, Shirakawa H, Ishibe T.** Immunohistochemical analysis of bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 49:395-399, 1996b.
 - **Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, Tateishi J.** Hydrated autoclave pretreatment enhances Tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's Disease brain tissues. *Lab Invest* 64:693-702, 1991.
 - **Shinka T, Sawada Y, Morimoto S, Fujinaga T.** Clinical study on urothelial tumors of dye workers in Wakayama City. *J Urol* 146:1504-1507, 1991.
 - **Sidransky D, Frost P, Von-Eschenbach A, Oyasu R, Vogelstein B.** Clonal origin of bladder cancer. *N Eng J Med* 326:737-740, 1992.
 - **Silvestrini R, Veroni S, Daidone MG y cols.** The bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 86:499-504, 1994.
 - **Simon NL, Gore H, Shingleton HM y cols.** Study of superficially invasive carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 68:19-24, 1986.
 - **Smith JA Jr, Labasky RF, Cockett At y cols.** Bladder cancer clinical guidelines panel summary report on the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1 and TIS). *J Urol* 162:1697-1701, 1999.
 - **Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W.** "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6:963-968, 1953.
 - **Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Kamel D y cols.** P53 Immunohistochemistry in transitional cell carcinoma and dysplasia of the urinary bladder correlates with disease progression. *Br J Cancer* 68:1029-1035, 1993.
 - **Solsona E, Iborra I, Ricos JV y cols.** Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term follow-up. *J Urol* 161:1120-1123, 1999.
 - **Stephenson WT, Holmes FF, Noble MJ, Gerald KB.** Analysis of bladder carcinoma by subsite. Cystoscopic location may have prognostic value. *Cancer* 66:1630-1635, 1990.

- **Stenkvist B, Strande G.** Entropy as an algorithm for the statistical description of DNA cytometric data obtained by image analysis microscopy. *Anal Cell Pathol* 2:159-165, 1990.
- **Stöckle M, Tanke HJ, Mesker WE, Ploem JS, Jonas U, Hohenfellner R.** Automated DNA-image cytometry: a prognostic tool in infiltrating bladder carcinoma? *World J Urol* 51:127-132, 1987.
- **Summerhayes IC, Chen LB.** Localization of an M 52000 keratin in basal epithelial cells of the mouse bladder and expression throughout neoplastic progression. *Cancer Res* 42:4098-, 1982.
- **Tétu B, Fradet Y, Allard P y cols.** Prevalence and clinical significance of HER/2neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol* 155:1784-1788, 1996.
- **Thomas DJ, Robinson MC, Charlton R, Wilkinson S, Shenton BK, Neal DE.** P53 Expression, ploidy and progression in pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 73:533-537, 1993.
- **Thompson MI, Peek M, Rodríguez FR.** The impact of cigarette smoking on stage, grade and number of recurrences of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 137:401-403, 1987.
- **Toktas G, Turkeri LN, Unluer LN y cols.** Prognostic significance of p53 protein accumulation in stage pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol* 31:437-441, 1999.
- **Toma V, Hauri D, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Gasser T, Sauter G, Roth J.** Focal loss of CD44 variant protein expression is related to recurrence in superficial bladder carcinoma. *Am J Pathol* 155:1427-1432, 1999.
- **Tosi P, Cottier H.** What's new in quantitative pathology? Past developments and outlook. *Path Res Pract* 184:652-5, 1989.
- **Tosoni I, Wagner U, Sauter G y cols.** Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder Cancer. *BJU Int* 85:48-53, 2000.
- **True LD.** Morphometry applications in Anatomic Pathology. *Hum Pathol* 27:450-467, 1996.
- **Tzai TS, Chow NH, Lin JS, Yang WH, Tong YC.** The expression of p53 and bcl-2 in superficial bladder transitional cell carcinoma and its role in the outcome of postoperative intravesical chemotherapy. *Anticancer Res* 18:4717-4721, 1998.
- **Ukai R, Kawashita E, Ikeda H.** A New technique for transurethral

- resection of superficial bladder tumor in 1 piece. *J Urol* 163:878-879, 2000.
- **Van der Meijden, Oosterlinck W, Brausi y cols.** Significance of bladder biopsies in Ta, T1 bladder tumors: a report from the EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group. *Eur Urol* 35:267-271, 1999.
 - **Van der Poel HG, Witjes JA, Schalken JA, Debruyne FMJ.** Automated image analysis for bladder cancer. *Urol Res* 26:1-5, 1998.
 - **Van der Poel HG.** Markers for recurrence of superficial bladder cancer: what is valid?. *Curr Opin Urol* 9:401-406, 1999.
 - **Van Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer B, van de Velde CJH, Cornelisse CJ.** Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 138:1165-1172, 1991.
 - **Van Velthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ y cols.** Image cytometry determination of ploidy level, proliferative activity, and nuclear size in a series of 314 transitional bladder cell carcinomas. *Hum Pathol* 26:3-11, 1995a.
 - **Van Velthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ y cols.** The use of digital image analysis of chromatin texture in Feulgen-stained nuclei to predict recurrence of low grade superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 75:560-568, 1995b.
 - **Van Velthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ y cols.** The additional predictive value contributed by quantitative chromatin pattern description as compared to DNA ploidy level measurement in 257 superficial bladder transitional cell carcinomas. *Eur Urol* 29:245-251, 1996.
 - **Vaskó J.** Prognosis in bladder cancer. A study of cytometric, morphometric and immunohistochemical techniques. Doctoral Thesis. Uppsala, Sweden. *Scand J Urol Nephrol* 160:74-, 1994.
 - **Vera-Donoso CD, Jiménez-Cruz JF.** Cáncer vesical: aspectos generales y epidemiológicos, diagnóstico histopatológico, clasificación clínico-patológica, diagnóstico de extensión y grupos de riesgo. *Archiv Esp Urol* 52:553-563, 1999.
 - **Vet JAM, Bringuier PP, Schaafsma HE, Witjes JA, Debruyne MJ, Schalken JA.** Comparison of p53 protein overexpression with p53 mutation in bladder cancer. *Lab Invest* 73:837-843, 1995.
 - **Viale G, Roncalli M, Grimelius L, Graziani D, Wilander E, Johansson H, Bergholm U, Coggi G.** Prognostic value of bcl-2 immunoreactivity in medullary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 26:945-, 1995.

- **Vissher DW, Sarkar F, Tabaczka P, Crissman J.** Clinicopathologic analysis of Bcl-2 immunostaining in breast carcinoma. *Mod Pathol* 9:642-646, 1996.
- **Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP.** An immunohistochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 151:237-244, 1992.
- **Vollmer RT, Humphrey PA, Swanson PE, Wick MR, Hudson MLA.** Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma. *Cancer* 82:715-723, 1998.
- **Weldom TE, Soloway MS.** Susceptibility of urothelium to neoplastic cellular implantation. *Urology* 5:824-827, 1992.
- **Wells WA, Rainer RO, Memoli VA.** Basic principles of image processing. *Am J Clin Pathol* 98:493-501, 1992.
- **Wheless LL, Badalament RA, de Vere White RW y cols.** Consensus review of the clinical utility of DNA Cytometry in bladder cancer. *Cytometry* 14:478-481, 1993.
- **Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ y cols.** Harrison. Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill Interamericana de España. 12th ed. vol. II. Madrid, 1993.
- **Witjes JA.** Current recommendations for the management of bladder cancer. *Drug Therapy. Drugs* 53:404-414, 1997.
- **Wojno KJ, Epstein JI.** The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34 β E12) in the diagnosis of prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 19:251-260, 1995.
- **Wolf H, Hojgaard K.** Urothelial dysplasia concomitant with bladder tumors as a determinant factor for future new occurrences. *Lancet* 2:134-140, 1982.
- **Wolf H, Melsen F, Pedersen SE, Nielsen KT.** Natural history of carcinoma in situ of the urinary bladder. *Scand J Urol Nephrol* 157(Suppl):147-151, 1994.
- **Worth PHL.** Cyclophosphamide in the bladder. *Br Med J* 3:182-, 1971.
- **Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Wilson Horne HW.** Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: Correlation with Ki-67 index. *Br J Urol* 75:173-179, 1995.
- **Wu TT, Chen JH, Lee YH, Huang JH.** The role of bcl-2, p53, and Ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J Urol* 163:758-760, 2000.
- **Xu X, Stower MJ, Reid NI, Garner RC.** Molecular screening of multifocal

transitional cell carcinomas of the bladder using TP53 mutations as biomarkers. *Clin Cancer Res* 2:1795-1800, 1996.

- **Yao A, Rubin HA.** Critical test of the role of population density in producing transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7712-7716, 1994.
- **Younes M, Sussman J, True LD.** The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 66:543-548, 1990.
- **Zaragozá J.** Comportamiento biológico y proliferativo de los tumores vesicales superficiales. Valor pronóstico de la determinación inmunohistoquímica del PCNA y del receptor de interferón y del contenido de DNA. Tesis Doctoral, Universitat de València. València, 1995.
- **Zieger K, Wolf H, Olsen PR, Hojgaard K.** Long-term survival of patients with bladder tumours: the significance of risk factors. *Br J Urol* 82:667-672, 1998.
- **Zlotta AR, Noel JC, Fayt I y cols.** Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with Bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol* 161:792-798, 1999.