

VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA (ò 人)

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL EFECTO APOPTÓTICO SOBRE CULTIVOS  
CELULARES DE LA ORINA DE PACIENTES CON CISTITIS  
INTERSTICIAL Y SU VALOR COMO BIOMARCADOR DE  
ENFERMEDAD Y SEVERIDAD CLÍNICA.

AUTOR:

Carlos Alberto Di Capua Sacoto

Licenciado en Medicina

DIRECTOR:

Dr. José Luis Ruiz Cerdá



## Hospital Universitario La Fe de Valencia



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

ESTUDIO DEL EFECTO APOPTÓTICO SOBRE CULTIVOS  
CELULARES DE LA ORINA DE PACIENTES CON CISTITIS  
INTERSTICIAL Y SU VALOR COMO BIOMARCADOR DE  
ENFERMEDAD Y SEVERIDAD CLÍNICA.

**Autor:** Carlos Alberto Di Capua Sacoto. Licenciado en Medicina

**Programa:** 040F Cirugía y sus especialidades.

Centro de realización Hospital Universitario La Fe de Valencia

**Director:** Dr. José Luis Ruiz Cerdá



El Dr. Jose Luis Ruiz-Cerdá profesor asociado del departamento de cirugía de la Universidad de Valencia.

Certifica:

Que el licenciado D. Carlos Alberto Di Capua Sacoto ha realizado el trabajo “Estudio del efecto apoptótico sobre cultivos celulares de la orina de pacientes con cistitis intersticial y su valor como biomarcador de enfermedad y severidad clínica” para obtener el título de Doctor en Medicina, bajo mi dirección.

Fdo. Dr. Jose Luis Ruiz Cerdá



## **Agradecimientos.**

Quisiera poder dedicar estas líneas a agradecer a todas las personas que han estado a mi lado y han formado de una u otra manera parte de este proyecto. Gracias a su apoyo desinteresado, este se ha podido finalizar.

Al Dr. José Luis Ruiz, por sus consejos, ánimos y haber depositado en mi la confianza para este proyecto. Por a lo largo de este camino, haberme guiado y dedicado parte de su tiempo personal.

Al Dr. Enrique O'Connor y a Alicia Martínez porque seguro que sin su ayuda, trabajo y paciencia, esto no hubiera sido posible.

Al Dr. Shaban Kilani por haberme apoyado y permitido dedicar tiempo para llevar a acabo este trabajo.

A todos mis compañeros del servicio de urología del Hospital La Plana de Villareal, especialmente a Rafael Villamón y Alfonso Albella por su amistad y por haberme hecho creer en este proyecto.



A mi padre, gracias a él estoy donde  
estoy y soy lo que soy. Espero poder  
ser la mitad de buen ser humano que el fue.

A mi madre, por ser fuente de inspiración  
y por saber que solo “venciéndote te vencerás”

A Natalia, por su generosidad, alegría y por  
darme la oportunidad de vivir la vida que  
quiero junto a ella.



## **Índice general.**

**página**

### **Capítulo I: Síndrome de dolor vesical y cistitis intersticial.**

|  |    |
|--|----|
| 1. Terminología                          | 3  |
| 2. Cistitis Intersticial                 |    |
| 2.1. Conceptos y generalidades           | 4  |
| 2.2. Importancia de la enfermedad        | 6  |
| 3. Etiopatogenia                         | 9  |
| 3.1. Aumento de la permeabilidad vesical | 10 |
| 3.2. Aumento de mastocitos               | 12 |
| 3.3. Inflamación neurogénica             | 13 |
| 3.4. Factores de crecimiento             | 15 |
| 3.5. Proteína p 53                       | 16 |
| 3.6. Apoptosis celular                   | 17 |
| 4. Diagnóstico                           | 20 |

|  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| 4.1. Test de potasio   | 25            |
| 4.2. Cistoscopia   | 26            |
| 4.3 Cuestionarios  | 27            |
| 5. Tratamiento   |               |
| 5.1. Terapias higiénicos-dietéticas y alternativas   | 32            |
| 5.2. Médico oral   | 34            |
| 5.3. Intravesical  | 38            |
| 5.4. Intervencionistas   | 40            |
| <b>Capitulo II: Biomarcadores de cistitis intersticial como<br/>prioridad de investigación.</b>                      |               |
| 1. Tipos de muestras   | 47            |
| 2. Biomarcadores urinarios   | 48            |
| 3. Marcadores diagnósticos   | 49            |
| 4. Marcadores indetificativos de grupos etiológicos  | 52            |
| 6. Marcadores como medida objetiva para evaluar el resultado<br>terapéutico (marcadores de actividad de enfermedad). | 56            |

**Capítulo III: Citometría de flujo como método de estudio de la apoptosis.**

- |   |    |
|---|----|
| 1. Citometría de flujo  | 63 |
| 2. Citometría de flujo como herramienta para medir las fases del ciclo celular y pico sub-G1. | 65 |

**Capitulo IV: Planteamiento del problema, hipótesis de trabajo y objetivos.**

- |  |    |
|--|----|
| 1.. Descripción del problema   | 70 |
| 2. Ausencia parcial de marcadores de enfermedad  | 70 |
| 3. Ausencia de marcadores etiológicos  | 71 |
| 4. Imposibilidad de estudiar marcadores de respuesta al tratamiento, de actividad de enfermedad en modelo humano de investigación. | 71 |
| 5. La apoptosis como herramienta diagnóstica   | 73 |

|   | <b>página</b> |
|---|---------------|
| 6. Hipótesis  | 73            |
| 7. Objetivos  | 76            |
| 8. Contraste de hipótesis   | 77            |
| <b>Capítulo V: Material y método.</b>   |               |
| 1. Muestra  |               |
| 1.1 Selección de la muestra   | 79            |
| 1.2 Comisión de investigación   | 79            |
| 1.3 Consetimiento informado   | 79            |
| 1.4 Criterios de inclusión  | 80            |
| 1.5 Valoración sintomatológica  | 82            |
| 2. Estudio del efecto apóptotico de la orina sobre cultivos celulares                           | 82            |
| 2.1 Líneas celulares, medios de cultivo, productos y equipamiento                               | 82            |
| 2.2. Conservación y cultivo de células  | 83            |
| 2.3. Conservación y procesado de las muestras de orina  | 84            |
| 2.4. Tratamiento con muestras de orina y controles positivos de inhibidores de la proliferación | 84            |

|   | <b>página</b> |
|---|---------------|
| 2.5. Análisis de la proliferación celular por citometría<br>de flujo  | 85            |
| 2.6. Cuantificación del grado de apoptosis por citometría<br>de flujo | 87            |
| 3. Mediciones   | 86            |
| 10. Análisis estadístico  | 88            |
| 4.1. Análisis descriptivo   | 89            |
| 4.2. Análisis comparativo   | 89            |
| 4.3. Transformaciones de variables                                    | 90            |
| 4.4. Análisis de la seguridad diagnóstica                             | 90            |
| 4.5. Análisis de la información diagnóstica<br>independiente          | 92            |
| 4.6. Análisis de la aplicación clínica                                | 93            |
| 4.7 Estrategia del análisis estadístico                               | 93            |
| <br><b>Capítulo: VI: Resultados.</b>                                  |               |
| 1. Descripción de la muestra global y por grupos                      | 96            |

|  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| 2. Evaluación sintomatológica  | 96            |
| 3. Análisis del efecto apoptótico de la orina (prueba de apoptosis) 97   |               |
| 3.1. Distribución de valores de apoptosis entre el grupo control y el de CI  | 101           |
| 3.2. Distribución de valores de apoptosis entre el grupo de CI y el de dolor pélvico   | 102           |
| 4. Análisis de la seguridad diagnóstica de la prueba de apoptosis  |               |
| 4.1. Estudio de la capacidad discriminativa de la prueba de apoptosis para el diagnóstico de CI frente a controles sanos, dolor pélvico crónico de origen no vesical y en conjunto | 104           |
| 4.2. Estudio de la capacidad discriminativa de la prueba de apoptosis estratificada por severidad sintomatológica  | 108           |
| 4.3. Prueba de apoptosis como método diagnóstico de enfermedad frente a controles sanos  | 110           |
| 4.4. Prueba de apoptosis como método diagnóstico de enfermedad frente a pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico   | 116           |

|  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| 4.5. Prueba de apoptosis como método diagnóstico de enfermedad frente al resto de pacientes con o sin dolor pélvico crónico ginecológico                 | 121           |
| 5. Análisis del efecto apoptótico como biomarcador de severidad de enfermedad clínica.   | 125           |
| 5.1. Grado del efecto apoptótico y sintomatológica categorizada por grupos de severidad en pacientes con CI  | 125           |
| 5.2 Grado del efecto apoptótico y sintomatología categorizada por grupos de severidad en pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico                | 127           |
| 5.3 Estudio de asociación del efecto apoptótico y sintomatología clínica entre grupos de pacientes a estudio   | 131           |
| 6. Análisis de la prueba de apoptosis como biomarcador de información diagnóstica independiente de la sintomatología                                     | 133           |
| 7. Aplicación clínica del test de apoptosis ante la presencia de un paciente con dolor pélvico crónico de cualquier origen antes de realizar cistoscopia | 135           |
| <b>Capítulo VII: Discusión</b>   | <b>140</b>    |
| <b>Capítulo VIII: Conclusiones</b>   | <b>161</b>    |
| <b>Bibliografía.</b>   | <b>165</b>    |



## Índices de tablas.

|   | página |
|---|--------|
| <b>Tabla 1:</b> Criterios de inclusión. (NIDDK 1993-1997)   | 21     |
| <b>Tabla 2:</b> Criterios de exclusión de la CI (NIDDK 1993-1997)   | 22     |
| <b>Tabla 3:</b> Exploraciones necesarias para descartar otras patologías  | 24     |
| <b>Tabla 4:</b> Clasificación de la ESSIC de los tipos de síndrome de dolor vesical en función de los resultados de la cistoscopia con hidrodistensión y la biopsia | 27     |
| <b>Tabla 5:</b> Cuestionario de Índice de dolor genitourinario (GUPI)   | 30     |
| <b>Tabla 6:</b> Marcadores urinarios estudiados en la CI, su alteración y el proceso fisiopatológico implicado  | 54     |
| <b>Tabla 7:</b> Grado de severidad sintomatológica por grupos de pacientes  | 97     |
| <b>Tabla 8.</b> Valores de la distribución porcentual de las fases del ciclo celular por grupos de pacientes  | 99     |
| <b>Tabla 9.</b> Comparación de los porcentajes medios de apoptosis por grupos de pacientes  | 101    |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 10.</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 4% y el estándar   | 111 |
| <b>Tabla 11.</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 8% y el estándar   | 112 |
| <b>Tabla 12:</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 10% y el estándar  | 112 |
| <b>Tabla 13:</b> Rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis<br>según puntos de corte para diagnóstico de CI frente a controles<br>sanos        | 113 |
| <b>Tabla 14:</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 4 % y el estándar  | 117 |
| <b>Tabla 15.</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 8% y el estándar   | 118 |
| <b>Tabla 16.</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 10% y el estándar  | 119 |
| <b>Tabla 17:</b> Rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis de<br>acuerdo a diferentes puntos de corte para establecer el<br>diagnóstico de CI | 120 |
| <b>Tabla 18.</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 4% y el estándar. Independiente de sintomatología                        | 122 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 19.</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 8% y el estándar. Independiente de sintomatología   | 122 |
| <b>Tabla 20.</b> Diagnóstico de CI según prueba apoptosis<br>positiva $\geq$ 10% y el estándar. Independiente de sintomatología  | 123 |
| <b>Tabla 21:</b> Rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis de<br>acuerdo a diferentes puntos de corte para establecer el diagnóstico<br>de CI. Independiente de sintomatología | 124 |
| <b>Tabla 22:</b> Grado del efecto apoptótico por severidad<br>sintomatológica (GUPI) en grupo pacientes con CI   | 126 |
| <b>Tabla 23:</b> Análisis de la asociación del grado del efecto<br>apoptótico y la severidad sintomatológica (GUPI) en grupo de<br>pacientes con dolor pélvico de origen ginecológico  | 129 |
| <b>Tabla 24:</b> Resultado de regresión logística introduciendo la<br>prueba de apoptosis como positiva si valor de corte $\geq$ 4%  | 134 |
| <b>Tabla 25:</b> Resultado de regresión logística introduciendo la<br>prueba de apoptosis como positiva si valor de corte $\geq$ 8%  | 134 |
| <b>Tabla 26:</b> Resultado de regresión logística introduciendo la<br>prueba de apoptosis como positiva si valor de corte $\geq$ 10%   | 135 |
| <b>Tabla 27:</b> Información diagnóstica de CI aportada por la prueba<br>de apoptosis según puntos de corte  | 139 |



## Índices de Figuras

|  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| <b>Figura 1:</b> Esquema de los mecanismos que inducen a la apoptosis  | 20            |
| <b>Figura 2:</b> Esquema de la citometría de flujo   | 64            |
| <b>Figura 3:</b> Esquema del análisis de la citometría de flujo y las fases del ciclo celular  | 67            |
| <b>Figura 4:</b> Histograma de una citometría de flujo   | 68            |
| <b>Figura 5:</b> Distribución de los resultados del efecto apoptótico medido como porcentaje medio de apoptosis en los grupos control y de CI  | 102           |
| <b>Figura 6:</b> Distribución de los resultados del efecto apoptótico medido como porcentaje medio de apoptosis en de CI y dolor pélvico ginecológico  | 103           |
| <b>Figura 7:</b> Distribución de los resultados del efecto apoptótico medido como porcentaje medio de apoptosis en los grupos de CI y en las diferentes patologías causantes de dolor pélvico ginecológico | 104           |

**Figura 8:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a controles sanos 105

**Figura 9:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a sujetos con dolor pélvico crónico de ginecológico 106

**Figura 10:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente casos sin CI 107

**Figura 11:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a sujetos con dolor pélvico crónico ajustado por sintomatología moderada (9-15) 109

**Figura 12:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a sujetos con dolor pélvico crónico ajustado por sintomatología severa (> 15) 110

|  |                      |
|--|----------------------|
| <b>Figura 13.-</b> Comparación mediante diagrama de cajas de la distribución del logaritmo del porcentaje medio de apoptosis por grupo de síntomas según el GUPI leve ( $\leq 9$ ) moderada (10-14) y severa ( $\geq 15$ ) en el grupo de pacientes con CI                                   | <b>página</b><br>126 |
| <b>Figura 14:</b> Comparación mediante diagrama de cajas de la distribución del logaritmo del porcentaje medio de apoptosis por grupo de síntomas según el GUPI leve ( $\leq 9$ ) moderada (10-14) y severa ( $\geq 15$ ) para el grupo de pacientes de dolor pélvico de origen ginecológico | 129                  |
| <b>Figura 15:</b> Diagrama de dispersión del porcentaje medio de apoptosis y síntomas con datos continuos para los tres grupos de pacientes.   | 132                  |
| <b>Figura 16:</b> Diagrama de flujo para el diagnóstico de la CI, incorporando la prueba de apoptosis.   | 149                  |



## **Índices de Abreviaturas**

**SDPC:** síndrome de dolor pélvico crónico

**SVD:** Síndrome de vejiga dolorosa

**SDV:** Síndrome de dolor vesical

**CI:** cistitis intersticial

**NIDDK:** National Institute of Diabetes and Digestive And Kidney Diseases

**Hb-EGF:** Heparin-binding-epidermal-growth-factor like growth factor

**APF:** Factor antiproliferativo

**EGF:** Factor de crecimiento epitelial

**MDM2:** Mouse Double Minute 2

**IL:** inteleuquinas

**NIH:** National Institutes of Health

**ICDB:** Interstitial Cystitis Data Base

**GAG:** grupo de cialoglicoproteínas

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**BCG:** bacilo de Calmette-Guérin

**RTU:** resección transuretral

**TXB-A:** toxina botulínica A

**ON:** Óxido nítrico

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ESSIC:** European Society for the study of interstitial cystitis

**ACACI:** Asociación Catalana de Afectadas por Cistitis Intersticial

**GUPI:** cuestionario de dolor genitourinario

**EVA:** Escala visual analógica

**ECACC:** European Collection of Cell Cultures

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**μL:** microlitros

**µg:** microgramos

**mL:** mililitros

**ANOVA:** Análisis de varianza

**DE:** Desviación estándar

**IC:** Intervalos confianza

**OR:** odds ratio

**AUC:** área bajo la curva

**VPP:** valor predictivo positivo

**VPN:** valor predictivo negativo



# **Capitulo I: Síndrome de dolor vesical y cistitis intersticial**



## **INTRODUCCIÓN.**

### **1. Terminología.**

Actualmente, con el fin de consensuar la terminología, las Guías Clínicas Europeas adoptaron la propuesta de la International Association for the Study of Pain (IASP) publicada en el 2012, donde definían el dolor pélvico crónico como un dolor persistente que puede ser continuo o recurrente de 6 meses de duración, relacionado con las estructuras de la pelvis tanto del varón como de la mujer (Merskey, 2012).

El síndrome de dolor pélvico crónico (SDPC) se caracteriza por dolor pélvico crónico en ausencia de cualquier patología que justifique dicho dolor (cáncer, infecciones, litiasis, etc...). Generalmente esta asociado a una repercusión en las vida diaria del paciente.

Actualmente para la clasificación del síndrome de dolor pélvico crónico se utiliza si es sistémico u órgano específico. Si es órgano específico se utiliza la palabra del órgano afecto, como por ejemplo síndrome de dolor vesical.

El síndrome de dolor vesical se define en las Guías Clínicas de la

Asociación Europea de Urología como el dolor suprapúbico que esta relacionado con el llenado de la vejiga y va acompañado de otros síntomas como poliaquiria diurna y nocturna en ausencia de una infección urinaria u otra enfermedad evidente conocida (Fall 2010). El síndrome de dolor vesical (SDV) ha reemplazado al de síndrome de vejiga dolorosa (SVD) ( Fall, 2010, van de Merwe et. al. 2008). La cistitis intersticial (CI) se engloba actualmente dentro de el síndrome de dolor vesical, aunque algunos pacientes que han sido catalogados de CI no cumplen los criterios del National Institute of Diabetes and Digestive And Kidney Diseases (NIDDK) (Abrams, 2002). En este trabajo utilizaremos a la CI para referirnos a las pacientes con SDV/CI.

## **2. Concepto y generalidades de la CI.**

La CI sigue siendo un gran enigma, cuya comprensión no ha cambiado en 100 años y su definición se ha visto obstaculizada por la falta de criterios específicos de diagnóstico, cambios histopatológicos específicos, la fluctuación de los síntomas y la extrema variabilidad entre los pacientes en términos de síntomas, hallazgos objetivos y la respuesta al tratamiento.

El SDV/CI se considera parte del síndrome de dolor pélvico crónico por guardar similitudes con él. La CI es una enfermedad inflamatoria crónica de la vejiga caracterizada por dolor pélvico y / o perineal, urgencia miccional, frecuencia y nocturia.

Debido a la dificultad para definir la CI se ha empleado una variedad extraordinariamente amplia de criterios diagnósticos. A finales de los años ochenta se establecieron los criterios de consenso del NIDDK con el fin de garantizar que los estudios científicos fueran relativamente comparables (van de Merwe, 2008). Los criterios del NIDDK establecieron un diagnóstico de CI de exclusión. Dolor vesical, tenesmo vesical y el hallazgo de hemorragias submucosas, denominadas glomerulaciones, son los únicos elementos positivos. La identificación de lesiones circunscritas de tipo Hunner es un criterio de inclusión automática. Aunque admitidos de forma general, los criterios del NIDDK tan solo proporcionan un marco mínimo para establecer el diagnóstico y algunos autores consideran que son demasiado restrictivos para su uso clínico. Todavía no existe una definición de consenso para el diagnóstico clínico de la CI

Actualmente las Guías Europeas de Urología dividen a la CI en dos subtipos de acuerdo con los hallazgos de la cistoscopia. En la CI con ulceraciones o cistitis ulcerativa, y en las pacientes sin estos hallazgos como CI no ulcerativa. Esto se debe a que existen algunos datos donde se observan diferentes respuestas a determinados tratamientos y que podría ser diferente su etiopatogenia. (Koziol, 1996; Peeker, 2000; Frijofsson, 1987)

## **2.2. Importancia de la enfermedad**

### **2.2.1 Prevalencia e Incidencia**

La prevalencia exacta no es conocida y puede que varíe según países. Datos procedentes de EEUU estiman entre 700.000 a un millón de afectados. Cifra similar a la de pacientes con enfermedad de Parkinson (Sand, 1997; Kuseck, 2001). Además, se tiene el convencimiento de su infradiagnóstico y de que algunos de los hombres diagnosticados de prostatitis no bacteriana podrían padecerla (Nickel, 2008; Parsons, 2002).

En Europa, Leppilahti y cols. (Leppilahti, 2005) comunicaron tasas en Finlandia de 239/100.000 de CI clínicamente confirmada y 530/100.000 de CI posible/probable.

Estudios recientes generalmente señalan cifras mayores que otras series más antiguas. En un reciente estudio austríaco, se comunicó una prevalencia global de CI de 306/100.000 mujeres, con un valor máximo (464/100.000) en las mujeres de mediana edad (40-59 años) (Temml, 2007). En una revisión, se ha afirmado que podrían estar afectadas el 20 % de las mujeres (Burkman, 2004).

En España no existen datos reales sobre la prevalencia o incidencia de esta enfermedad. Además, se cree que dichos datos son menores a los reales. En parte porque son pacientes complicadas que requieren atención y que por tanto, cambian de especialistas con facilidad. Las pacientes suelen ser controladas y tratadas por urólogos, ginecólogos y clínicas de dolor.

Afecta principalmente a mujeres, siendo la ratio 10/1 con respecto a los hombres. Se puede presentar en cualquier tipo de edad, sexo y raza. Sin embargo, esta enfermedad es mucho mas frecuente en la raza blanca. La edad media de comienzo de los síntomas es 40 años, pero un 25% de los pacientes tienen menos de 25 años (Sant, 1997).

### **2.2.2 Clínica**

Los enfermos apenas logran mantener unos centímetros cúbicos de orina en su vejiga. La orina les provoca molestia, presión y dolor en la vejiga y órganos pélvicos relacionados.

Los pacientes consultan por el dolor característico y por polaquiuria, que a veces es extrema y siempre se acompaña de nicturia. La naturaleza del dolor es el síntoma clave de la enfermedad. El dolor guarda relación con el grado de llenado de la vejiga, de modo que aumenta normalmente al hacerlo el contenido vesical. Se localiza a nivel suprapúbico, a veces con irradiación a ingles, vagina, recto o sacro. El dolor mejora con la evacuación, pero reaparece enseguida con el llenado (Erickson, 1997; Erickson, 2001).

También existen diversos comportamientos de las pacientes afectas de CI, ya que en algunas de ellas los síntomas predominantes pueden ser los de llenado (frecuencia y urgencia), mientras que en otras el síntoma principal será el dolor.

### **2.2.3 Calidad de vida**

La CI tiene un gran impacto sobre la calidad de vida, ya que provoca

cambios de comportamiento social, laboral (50% de incapacidad laboral), ritmo de sueño, etc... En muchas ocasiones conduce a la depresión. De forma comparativa, los pacientes en programa de diálisis tienen mejor calidad de vida que los pacientes con CI (Abrams 2006).

#### **2.2.4 Costes económicos de la enfermedad**

Esta enfermedad tiene importantes costes económicos. Exceptuando los costes indirectos, el coste médico atribuible a este complejo sintomático en Estados Unidos (EEUU) se ha estimado en más de 100 millones de dólares al año (Held, 1990). Además, el coste económico sanitario y en horas perdidas se ha estimado en 1.7 billones de dólares en EEUU (Sand, 2002; Sant, 1997).

### **3. Etiopatogenia**

La etiología de la CI es desconocida. Se han propuesto factores de diversa índole que implican alteraciones estructurales de la mucosa vesical, neurológicos, autoinmunes, linfáticos, infecciosos y psicológicos. Sin embargo, no existen datos suficientes para explicar el papel que juegan cada uno en la etiopatogenia de la CI. No se puede descartar que, en algunos

pacientes, sea posible una combinación de varios factores los que causen la agresión de la mucosa vesical.

Los factores epidemiológicos indican que el sexo, la presencia de infecciones del tracto urinario inferior previas y el antecedente de problemas urinarios desde la infancia, distinguen a los pacientes con CI. El comienzo rápido en la edad media sugiere que es una enfermedad adquirida, en ausencia de una asociación familiar importante. Si bien, se esta comenzando a estudiar la posibilidad de que exista una predisposición genética. Estudios genéticos recientes han revelado una susceptibilidad heredada a padecerla en familiares de primer grado de pacientes con CI a través de múltiples generaciones. Aunque, hasta la fecha no se ha implicado ningún gen específico como causa de la enfermedad (Elgavish, 2009; Gamper, 2009).

También se ha propuesto que sea una enfermedad autoinmune o inmunogénica ya que, tiene una expresión clínica típica de síntomas crónicos con remisiones y exacerbaciones, infiltración de células mononucleares órgano específica, falta de un patógeno claramente definido y respuesta ocasional a esteroides u otros inmunosupresores (Bates, 2000; Eisenberg, 2003)

. La cuestión es cual sería el antígeno permanente o recurrente que provoca la inflamación crónica. Varios aspectos implican a la orina como agente irritativo por sus constituyentes endógenos o exógenos. Puesto que, la micción calma el dolor, la exclusión o derivación urinaria también, aunque la vejiga permanezca en su sitio (Warren, 1994). Por otra parte, aunque la CI presenta una clínica similar a la de cistitis bacteriana no se ha logrado demostrar ningún agente microbiano en muestras urinarias ni biopsias de pared vesical.

Sin embargo, todas las teorías propuestas para explicar su etiopatogenia conducen a un aumento de la permeabilidad vesical, la activación de mastocitos, la inflamación neurogénica y a la activación de varios de factores de crecimiento.

### **3.1 Aumento de la permeabilidad vesical.**

El urotelio tiene como función servir de barrera de protección contra los solutos diluidos en la orina. Dispone de diversos mecanismos de defensa como: una densa capa de glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, sulfato de heparina, dermatan sulfato, condroitin 4-sulfato), una capa de glicoproteínas en la superficie luminal, placas de uroplakin, bomba activa de iones y

estrechas uniones celulares (Chacrabarti, 1980; Thorne, 1984). Todos ellos actúan como una barrera controlando la permeabilidad de las moléculas. Los síntomas en la CI serían consecuencia del efecto irritante que provocan el potasio, la creatinina, la urea o el amonio secundaria a una lesión urotelial y aumento de la permeabilidad (Elbadawi, 1997). Tras la agresión inicial, se desencadenaría una cascada de reacciones inflamatorias (Teichman, 2007). A favor de esta teoría estarían los estudios experimentales donde se ha provocado el aumento de la permeabilidad vesical a la urea y al calcio tras la lesión de la barrera de mucina con sulfato de protamina. Se ha visto mejoría de los síntomas al administrar heparina, para revertir el efecto de la protamina (Parsons, 1990), el aumento en la captación de urea en la vejiga de pacientes con CI (Parsons, 1991) y el test de potasio positivo.

Estudios ultraestructurales más recientes de la pared vesical de pacientes con CI han mostrado cambios morfológicos anormales en células, tejido intersticial, vascularización y nervios intrínsecos a nivel del urotelio, suburotelio y muscularis. Todo ello asociado a edema celular y tejidos extracelulares (Elbadawi, 1997).

También se han encontrado alteraciones en E-cadherina, que tiene un papel crucial en la diferenciación urotelial; en la ZO-1, que es una proteína que forma estrechas uniones celulares y que contribuye a la impermeabilidad del urotelio, en el uroplakin, una proteína con una función hidrofóbica situada a nivel de la superficie de las células en paraguas, y en el condroitin sulfato, elemento esencial en la capa de glicosaminglicanos para mantener la impermeabilidad (Slobodv 2004).

### **3.2 Aumento de mastocitos.**

La CI esta asociada a un aumento del número de mastocitos en la pared vesical (Eldrup, 1983; Feltis, 1987, Sant, 1994). Estas células producen sustancias irritantes como la histamina, factor quimiotáctico de eosinofilos, sustancias implicadas directamente en el desarrollo de inflamación como las citoquinas y en la producción de dolor como los leucotrienos (Aldenborg, 1998; Green, 2004). Sin embargo, si este aumento es una consecuencia o una causa de la enfermedad está todavía por demostrar. La degranulación de mastocitos y la liberación de sustancias pueden, por si mismas, ser responsables de los síntomas de la CI. Sin embargo, dicha degranulación podría ser consecuencia de un factor irritante

previo sobre el urotelio ya alterado. Si esto último fuera cierto, el número de mastocitos sería únicamente el reflejo de la severidad en la alteración urotelial (Moldwin, 2002). Además, el desencadenante del dolor en la CI no es completamente conocido, puesto que no tiene relación directa con los hallazgos patológicos. Se cree que podría existir una participación de las terminaciones nerviosas sensitivas en la patogénesis (inflamación neurogénica).

Otro factor a favor de esta teoría, es la evidencia de aumento de los niveles de histamina en las capas del urotelio (Kastrup, 1983) y en el aumento de la excreción urinaria del ácido 1-4 metilimidazol-acético, un metabolito de la histamina (el-Mansoury, 1994; Pang, 1998). Sin embargo, la validez de esta teoría es cuestionable por la dificultad técnica de cuantificar los mastocitos ya degranulados, en caracterizar y evaluar su contribución a la respuesta inflamatoria y en definir el mecanismo por el cual influyen en dicha reacción (Saban, 2001).

### **3.3 Inflamación neurogénica.**

El dolor es un síntoma común en la CI y a menudo, persiste incluso tras extirpar la vejiga. Este hecho, sugiere que podría existir un componente

central a nivel del sistema nervioso. Sin embargo, las reacciones que se originan a nivel vesical pueden contribuir, por si mismas, al desarrollo y perpetuación del dolor en estos pacientes. La regulación neurológica es probable que juegue un papel relevante en la patogenia de la CI. La inflamación neurogénica es un proceso por el cual las terminaciones nerviosas sensitivas pueden llegar a segregar mediadores inflamatorios que perpetúen la inflamación y produzcan un estado de hiperalgesia. Se produce el fenómeno de neurosensibilización, es decir, se modifican el estado basal del nociceptor alterando su respuesta habitual frente al estímulo. Se modifica la percepción como consecuencia de cambios genotípicos y fenotípicos expresados en todos los niveles de la transmisión nociceptiva, lo que conduce a una alteración en la modulación del dolor a favor de la hiperalgesia (Saban, 2007). La sustancia P jugaría un papel esencial en este proceso. Esta sustancia es un mediador inflamatorio que funciona como un neurotransmisor nociceptivo a nivel de los nervios central y periférico. Su secreción a nivel de las terminaciones nerviosas periféricas, desencadena una cascada inflamatoria que implicaría una degranulación de mastocitos y una estimulación de las terminaciones sensitivas cercanas (Saban, 2002).

Se ha demostrado que el aumento de las terminaciones nerviosas que contienen sustancia P y la eliminación de sustancia P en orina se correlaciona con la severidad de los síntomas en pacientes con CI. Por otra parte, el hecho de que la CI sea más prevalente en mujeres, y que los síntomas se agudicen en el periodo premenstrual, hace sospechar la participación de los estrógenos en la patogenia (Whitmore, 1994; Nazif, 2007). Posiblemente estos actuarán aumentando la expresión de factores de crecimiento nerviosos en la pared vesical y contribuyendo a la inflamación neurológica.

### **3.4 Factores de crecimiento.**

La lesión de la barrera epitelial estaría causada por una inhibición del proceso normal de proliferación de las células epiteliales. Se han identificado dos factores que pueden explicar los cambios que se producen en las vejigas de pacientes con CI. El heparin-binding-epidermal-growth-factor like growth factor (Hb-EGF) jugaría un papel importante en la proliferación celular epitelial y la reparación de lesiones. Se ha demostrado que existe un descenso significativo en los niveles de este factor de crecimiento tanto en muestras urinarias como sanguíneas en pacientes con

CI, en comparación con controles. Estos hallazgos sugieren que la falta de Hb-EGF puede ser el responsable de la incapacidad de la vejiga para reparar el epitelio dañado (Sun, 2007; Wilkinson, 2006).

Key y cols. descubrieron que el factor antiproliferativo (APF) está presente en la orina de personas con CI (Keay, 1996). Esta proteína inhibiría la producción de Hb-EGF y podría impedir el crecimiento del epitelio vesical y su regeneración. Ambos factores han sido confirmados como marcadores de CI en dos estudios recientes. Además, se ha demostrado que el APF afectaría a la distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular. Estas diferentes distribuciones se deberían a apoptosis o a falta de regeneración dentro del ciclo celular (Zhang, 2003; Keay, 2003; Keay, 2004). Por otra parte, el factor de crecimiento epitelial (EGF) también se ha encontrado significativamente disminuido en la orina de los pacientes con CI en comparación con las de pacientes control (Erickson, 2002).

### **3.5 Proteína p53**

Una de las proteínas reguladoras más importantes dentro del ciclo celular es la proteína p53 ya que es un mediador del flujo del ciclo celular, muerte celular por apoptosis y respuestas celulares al estrés (Lane 2005).

Esta proteína se une al ADN del ciclo celular deteniendo el mismo, reparando el ADN, o provocando la apoptosis si el daño celular es irreversible.

La proteína p53 es un factor de transcripción que controla la expresión de numerosos genes en una red que está siendo definida con múltiples enfoques. En respuesta a las condiciones estresantes del medio ambiente, la proteína p53 aumenta dando lugar a la detención del ciclo celular o apoptosis. La pérdida de la función de p53 por mutación es la alteración genética más común y se ha relacionado con algunos tipos de cáncer. La p53 está relacionada como un supresor de la hiperproliferación (Harris, 2005).

### **3.6 Apoptosis celular con relación a la CI**

La muerte celular fisiológica es un proceso natural programado genéticamente, controlado por mecanismos moleculares complejos, cuyo conocimiento es un objetivo primordial de la biología y la medicina contemporáneas. La apoptosis es un programa metabólico que, activado, induce la muerte celular según secuencias estereotipadas, que culminan con la fragmentación de la célula y la digestión de sus fragmentos por fagocitos.

El efecto fisiológico de ese programa es la eliminación de células decadentes, dañadas o superfluas, sin liberar su contenido al entorno (Palomba, 1996)

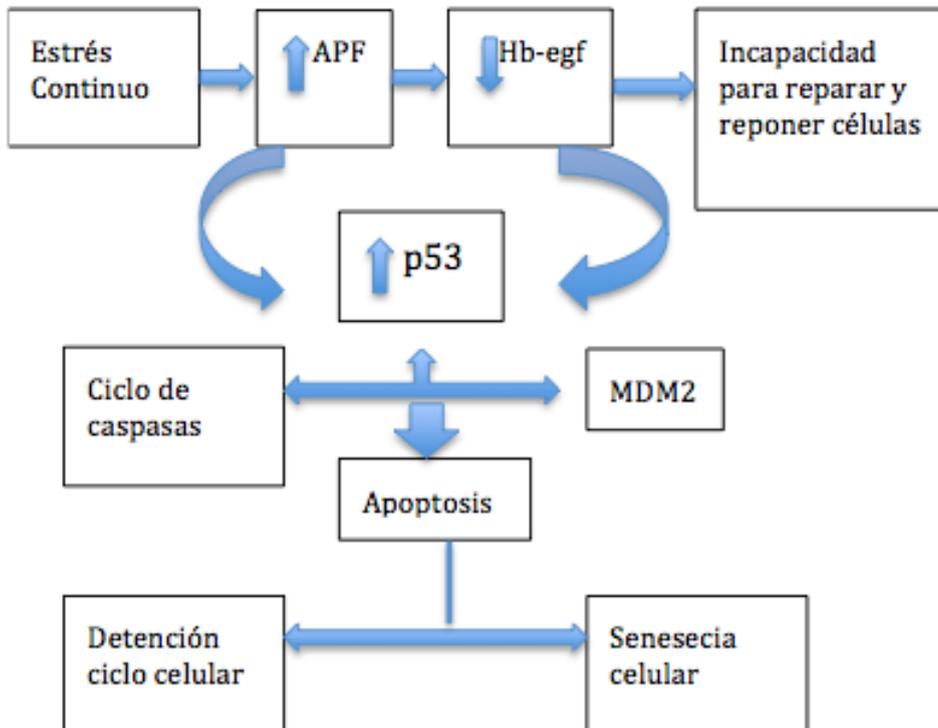
La apoptosis se debe diferenciar de la necrosis, un proceso pasivo en la que la muerte celular se produce por un daño directo, irreversible, de todas las estructuras celulares, como ocurre en la isquemia severa, por acción de temperaturas extremas, por agentes químicos diversos, o por trauma mecánico, entre otros (Lemasters, 1998).

La proteína p53 tiene funciones que implican la ligadura al ADN, como la activación de la transcripción y el control del acceso de la célula al proceso de apoptosis (Sugrue, 1999). La regulación de la reparación del ADN es esencial para el control del crecimiento de los tumores y por lo tanto, para el resultado del tratamiento clínico del cáncer. En este contexto cabe destacar que a) la mutación del gen p53 es frecuente en los tumores humanos y del ratón; (b) p53 controla la respuesta celular al daño al ADN y la mitosis, a través de otro factor regulador p21.

Vicencio et al. publicaron que en condiciones normales la proteína p53 es degradada por el complejo MDM2 (en inglés: Mouse Double Minute 2), pero cuando existe estrés mitogénico o daño del ADN se activa la primera vía de señalización, pues la actividad de MDM2 se suprime,

originando que la proteína p53 active la proteína p21 (también denominada CDK- N1a) que es inhibidora de kinasas dependientes de ciclinas (CDKI), la cual frena el ciclo celular. (Vicencio 2008)

La apoptosis y senescencia celular son excelentes parámetros biológicos que determinan el estado y posible utilización del cultivo, porque revelan condiciones específicas de la célula a nivel fisiológico, morfológico, bioquímico y genético que no pueden ser reconocidas de manera tan completa y clara por otros parámetros celulares, además de estar relacionados con la generación de múltiples fenotipos patológicos que no son convenientes a la hora de implementar mecanismos terapéuticos. Se ha evidenciado que las células en un ambiente in vitro se ven enfrentadas a múltiples agentes perjudiciales extrínsecos e intrínsecos, cuya acumulación resulta en daños a nivel estructural, funcional y fisiológico en los componentes celulares (Vicencio 2008). En respuesta a estos daños, la célula activa una serie de complejas vías bioquímicas y genéticas que resultan en fenotipos particulares asociados a muerte y senescencia celular, lo que eventualmente puede significar un estado de deterioro del cultivo, el cual no tendría aplicabilidad médica pues representaría un riesgo alto. (figura 1).



**Figura 1:** Esquema de los mecanismos que inducen a la apoptosis

#### 4. Diagnóstico

La definición y el diagnóstico de CI han evolucionado durante los últimos años. En 1987, el National Institutes of Health (NIH) llevó a cabo una serie de reuniones de expertos con la intención de desarrollar unos criterios diagnósticos que sirvieran como definición de CI. Posteriormente NIDDKD actualizó los criterios en 1993 y más tarde, en 1997 se fundó un

registro de casos con el desarrollo del proyecto Interstitial Cistitis Data Base. Este registro fue la primera base de datos donde se recogía de forma sistemática, multicéntrica, observacional y longitudinalmente información sobre las características demográficas, hábitos dietéticos, diagnóstico, síntomas y tratamientos empleados, en pacientes con CI. Sin embargo, quedaba claramente expresado que la utilidad de los criterios de inclusión y exclusión era que sirviera para seleccionar pacientes para ensayos clínicos y con fines de investigación (tabla 1 y 2).

**Tabla 1:** Criterios de inclusión. (NIDDK 1993-1997)

---

| Criterios de inclusión  |
|---|
| Cistoscopia: presencia de glomerulaciones y/o presencia de ulcera de Hunner clásica |
| Síntomas: Dolor vesical y/o urgencia miccional                                      |

---

**Tabla 2:** Criterios de exclusión de la CI (NIDDK 1993-1997)

---

| Criterios de exclusión  |
|---|
| Edad inferior a 18 años   |
| Capacidad vesical mayor a 350cc con el paciente consciente  |
| Ausencia de una urgencia intensa de vaciado con la vejiga llena con 100 cc, durante la realización de cistomanometría |
| Demostración de contracciones   |
| Duración de síntomas inferior a 9 meses   |
| Ausencia de nocturia  |
| Mejoría de síntomas con antibióticos  |
| Frecuencia miccional diaria inferior a 8 veces  |
| Diagnostico de cistitis bacteriana o prostatitis (3 meses)  |
| Calculo ureteral o vesical  |
| Herpes genital activo   |
| Cáncer uterino, cervical, vaginal o de uretra   |
| Divertículo uretral   |
| Cistitis química por ciclofosfamida u cualquier otro agente   |
| Cistitis tuberculosa  |
| Cistitis radica   |
| Tumor vesical benigno o maligno   |
| Vaginitis   |

---

Es decir, dicha definición no era necesariamente aplicable para el diagnóstico en la práctica clínica. Se era consciente de que algunos de los pacientes con CI quedarían excluidos (Warren, 2006). Este hecho se ha demostrado en dos estudios recientes donde aproximadamente dos tercios de los pacientes no cumplían la definición de CI cuando se aplicaba de forma estricta los criterios de inclusión (Warren, 2008; Mouracade, 2008). Hanno y cols analizaron (Hanno, 1999) los pacientes incluidos en la base de datos de un estudio multicéntrico sobre CI (Simon, 1997). En este estudio un total de 269 mujeres fueron catalogadas como enfermas de CI definitiva o muy probable por sus urólogos (todos ellos expertos en CI). De ellas, sólo un 32 a 42% cumplían los criterios de la NIDDKD. El resto no hubieran sido tratadas o diagnosticadas como enfermas de CI si sus urólogos hubieran seguido los criterios de la NIDDKD. Por lo tanto, la CI continúa siendo un reto diagnóstico puesto que, sus síntomas se solapan con los síntomas de otras patologías pélvicas. Sigue siendo un diagnóstico de exclusión y se deben llevar a cabo los análisis y las exploraciones complementarias necesarias para descartar el resto de patologías (Tabla 3).

**Tabla 3:** Exploraciones necesarias para descartar otras patologías.

---

Exploraciones complementarias necesarias para el diagnóstico de CI

---

Sedimento urinario

Cultivo de orina

Baciloscopia

Citología

Cistoscopia

Biopsia mucosa vesical

Hidrodistensión bajo anestesia

Urodinámica

Ecografía pelviana

Cultivo de secreción vaginal

Test del potasio

Marcadores urinarios

---

La utilidad de los criterios de la NIDDKD se ha cuestionando. Se necesita un nuevo consenso para definir y diagnosticar en la práctica clínica y para futuras guías de investigación.

#### **4.1 Test del potasio.**

Es opcional y puede servir para confirmar la sospecha de CI. Está diseñado para detectar si existe una lesión en la barrera epitelial vesical. La solución de cloruro potasio se utiliza como irritante para provocar dolor o urgencia. Parsons et. al. (Parson, 2003) realizaron una revisión multicéntrica de los resultados de este test y encontraron que un 78% de los pacientes con la sospecha de CI respondían positivamente. Un test de potasio positivo indica lesión epitelial, lo que puede estar presente en la cistitis radica o en una infecci3n aguda, así como la CI. Sin embargo, los pacientes con infecciones cr3nicas del tracto urinario inferior, obstrucci3n vesical o hiperactividad del detrusor presentan una baja tasa de positividad al test. El test se lleva a cabo mediante la instilaci3n de 40 ml de soluci3n 0.4 mol / litro de cloruro potásico. Si se produce dolor inmediato o urgencia tras la instilaci3n, el test se considera positivo y posteriormente se debe lavar la vejiga con agua bidestilada. Al mismo tiempo, se aprovecha para instilar la terapia intravesical específica, en caso de que se tenga pautada. Si no existen cambios en la sintomatología a los 5 minutos o no hay un cambio superior a dos puntos con respecto a la puntuaci3n basal, se considera negativo.

## **4.2 Cistoscopia.**

En la actualidad para un correcto diagnóstico de las pacientes con CI la AEU recomienda que a todas las pacientes debería realizarse una cistoscopia bajo anestesia con hidrodistensión donde debe comprobar la capacidad máxima además de muestras de biopsia de la pared vesical y recomiendan que se utilice la clasificación del ESSIC (European Society for the Study of IC) para los hallazgos de las cistoscopia (tabla 4).

**Tabla 4:** Clasificación de la ESSIC de los tipos de síndrome de dolor vesical en función de los resultados de la cistoscopia con hidrodistensión y la biopsia

---

|                | Cistoscopia con hidrodistensión |        |                              |                               |
|----------------|---------------------------------|--------|------------------------------|-------------------------------|
|                | No realizada                    | Normal | Glomerulaciones <sup>a</sup> | Lesión de Hunner <sup>b</sup> |
| Biopsia        |                                 |        |                              |                               |
| No realizada   | XX                              | 1X     | 2X                           | 3X                            |
| Normal         | XA                              | 1A     | 2A                           | 3A                            |
| No concluyente | XB                              | 1B     | 2B                           | 3B                            |
| Positiva       | XC                              | 1C     | 2C                           | 3C                            |

---

*a Cistoscopia: glomerulaciones de grado 2-3. b. Con o sin glomerulaciones tejido de granulación o fibrosis intrafascicular.*

### **4.3 Cuestionarios**

El uso de medidas de Calidad de Vida Relacionada con la Salud (CVRS) ha aumentado de forma significativa en importancia de la evaluación de la CVRS, que radica en la necesidad de obtener, mediante otro tipo de resultados que no sean los resultados clínicos tradicionales, el

impacto de la patología en la vida diaria del paciente. La evaluación de la CVRS también es importante para analizar las posibles diferencias entre tratamientos (Sanders, 1998). La perspectiva del paciente como un enfoque válido en la evaluación de los resultados de una determinada intervención, ha impulsado definitivamente que el conocimiento de la CVRS de los pacientes sea cada vez más importante (Badia, 2000). Para medir la CVRS se han desarrollado cuestionarios específicos de las patologías y genéricos relacionadas con la CVRS.

En la actualidad, en la CI también se están utilizando cuestionarios validados tanto para el diagnóstico como para monitorizar la respuesta al tratamiento (Blaivas, 2007). Actualmente, el uso de diversos cuestionarios específicos sobre síntomas miccionales se utilizan con frecuencia clínicamente, tales como cuestionarios de la calidad de vida, de la incontinencia (IQoL), International Prostate Symptom Score (IPSS), y O'Leary Sant (MCO, o ICSI / IPIC).

El cuestionario de O'Leary tuvo como objetivo comparar las características y severidad de los síntomas, la calidad de vida de los pacientes con CI y su respuesta a los tratamientos (O'Leary, 1997).

Recientemente se ha desarrollado el índice de dolor genitourinario (GUPI) que es un instrumento válido, fiable y sensible que se puede utilizar para cuantificar los síntomas en hombres y mujeres con condiciones de dolor urológico. El índice podría ser una herramienta importante para el uso clínico, así como para fines de investigación para evaluar la gravedad inicial de los síntomas y la respuesta al tratamiento (Clemens, 2009). El GUPI (tabla 5) es el cuestionario más completo y más empleado para poder objetivar mediante una escala los síntomas de las pacientes. En él se evalúan el dolor relacionado con la micción y el dolor relacionada con la actividad sexual, además de contener preguntas que permiten conocer la afectación de la calidad de vida de las pacientes.

**Tabla 5:** Cuestionario de Índice de dolor genitourinario(GUPI)

| PUNTOS  | 0     | 1       | 2           | 3       | 4   |
|---|-------|---------|-------------|---------|-----|
| 1) ¿Cuántas veces orina por el día?   | 3-6   | 7-10    | 11-14       | 15-19   | >20 |
| 2a) Cuántas veces orina por la noche  | 0     | 1       | 2           | 3       | > 4 |
| 2b) Le preocupa levantarse por las noches                                       | Nunca | A veces | Normalmente | Siempre |     |
| 3) Sexualmente activo?  | Si/No |         |             |         |     |
| 4a) Si es sexualmente activo, tiene o ha tenido dolor con la actividad sexual   | Nunca | A veces | Normalmente | Siempre |     |
| 4b) Si tiene dolor, le ha hecho evitar el contacto sexual                       | Nunca | A veces | Normalmente | Siempre |     |
| 5) Tiene usted dolor en su vejiga o en la pelvis (vagina, labios, bajo abdomen) | Nunca | A veces | Normalmente | Siempre |     |
| 6a) Cuántas veces orina durante el día  |       | Leve    | Moderado    | Severo  |     |
| 6b) Le preocupa tener dolor   | Nunca | A veces | Normalmente | Siempre |     |
| 7) Después de ir al baño, continúa con urgencia?                                | Nunca | A veces | Normalmente | Siempre |     |
| 8a) Si tiene urgencia, que intensidad tiene                                     |       | Leve    | Moderado    | Severo  |     |
| 8b) Le preocupa tener dolor   | Nunca | A veces | Normalmente | Siempre |     |

Además de estos cuestionarios específicos para dolor pélvico crónico y CI existen cuestionarios genéricos para evaluar la calidad de vida de los pacientes. Los cuestionarios genéricos más utilizados para la medición y percepción del dolor de las pacientes son: el BPI (brief pain inventory), el EQ5D y el PGI.

El BPI es un cuestionario autoadministrado y de fácil comprensión que contiene dos dimensiones: la intensidad del dolor y el impacto del dolor en las actividades de la vida del paciente. En los últimos años ha aumentado el uso del BPI como método de evaluación estandarizada del dolor en pacientes oncológicos, aunque también se ha utilizado en otros procesos que cursan con dolor crónico, existiendo versiones validadas en varios idiomas incluida en español (Badia 2003).

El cuestionario EQ-5D (EuroQol Group, 1990) es otro de los cuestionarios genéricos más utilizados y cuenta de dos apartados: el sistema descriptivo y la Escala Visual Analógica (EVA). El sistema descriptivo contiene 5 preguntas en las que se evalúan 5 dimensiones de la calidad de vida: movilidad, cuidado personal, actividades cotidianas, dolor/malestar y ansiedad/depresión. Cada pregunta tiene 3 opciones de respuesta que van de

1 «no tengo problemas» a 3 «tengo muchos problemas». En la EVA, el paciente debía puntuar su estado de salud en una escala que va de 0 (peor estado de salud imaginable) a 100 (mejor estado de salud imaginable).

## **5. Tratamiento de la CI.**

El tratamiento de la CI sigue siendo un reto para la mayoría de urólogos. Al no tener claro las causas, mecanismos fisiopatológicos y debido a que estas pacientes son tratadas por una multitud de especialistas, hacen que no exista consenso en el tratamiento estándar. Además existe una gran variabilidad en la literatura sobre la eficacia de determinados tratamientos.

El tratamiento de la CI se puede dividir en : cambios en hábitos higiénicos-dietéticos y tratamientos alternativos médicos, tratamientos intravesicales, terapias intervencionista y para los casos más severos tratamientos quirúrgicos.

## **5.1 Terapias higiénicos-dietéticos y alternativas.**

### **5.1.1 Terapias Conductuales.**

Las técnicas conductuales de entrenamiento vesical resultan una alternativa para los pacientes con SVD/CI y síntomas predominantes de polaquiuria/ tenesmo vesical, pero apenas con dolor (Parson, 1991; Chaicen, 1993).

### **5.1.2 Medidas Dietéticas.**

No se dispone de datos científicos que justifiquen este tipo de dietas. Sin embargo, las restricciones alimentarias se encuentran entre las numerosas estrategias de cuidados personales físicos halladas en los pacientes con SVD/CI (Webster, 1994). En un análisis del estudio de cohortes ICDB (*Interstitial Cystitis Data Base*), las dietas especiales figuraron entre los cinco tratamientos más utilizados (Rovner, 2000). Bade y cols. (Bade, 1997) constataron que los pacientes con CI consumían significativamente menos calorías, grasas y café, pero más fibra.

En general, el tratamiento dietético es una estrategia habitual de cuidado personal en el SDV/CI y ofrece una estrategia terapéutica rentable.

En el manual para pacientes con CI se facilitan instrucciones completas sobre el modo de identificar alimentos desencadenantes individuales (Osborne, 1999). Sin embargo, hay pocos datos científicos y las restricciones alimentarias aisladas no producen un alivio completo de los síntomas.

### **5.1.3 Terapias Alternativas.**

Los datos científicos que respaldan estos tratamientos suelen ser escasos, de modo que se han obtenido resultados contradictorios en algunos trabajos con un grado bajo de comprobación científica sobre la acupuntura, con efectos que parecen limitados y pasajeros (Chang, 1998; Chang, 1993; Geirson, 1993).

La hipnosis se utiliza en pacientes urológicos pero no existen datos científicos acerca de su efecto sobre los síntomas de CI (Barber, 1982).

## **5.2 Tratamiento médico (vía oral)**

### **5.2.1 Analgésicos y opiáceos.**

Dado que el dolor suele ser un síntoma predominante, muchos pacientes probarán analgésicos de uso habitual en algún momento de la

enfermedad. Sin embargo, el alivio del dolor es decepcionante porque el dolor visceral que se experimenta en el SDV/CI responde mal a los analgésicos. No se han presentado estudios sistemáticos sobre analgésicos convencionales. El uso breve de opiáceos puede estar indicado en caso de dolor intercurrente o agravado o de exacerbaciones periódicas. Dado que el SDV/CI es una enfermedad crónica, sólo deben utilizarse opiáceos a largo plazo de forma excepcional y bajo estricta vigilancia.

### **5.2.2 Corticoides.**

La terapia con corticoides ha sido tanto prometedor (Pool, 1967) como decepcionante (Soucy, 2005). Los efectos secundarios de los esteroides pueden ser muy graves, por lo que resulta muy difícil justificar su uso.

### **5.2.3 Antialérgicos.**

Una de las posibles causas etiológicas de la enfermedad pueden ser los mastocitos. Entre las sustancias liberadas por los mastocitos figura la histamina. Los antagonistas de los receptores de la histamina se han utilizado para bloquear el subtipo H1 de receptores con resultados variables.

La hidroxizina es un antagonista de los receptores H1 de la histamina que bloquea la activación neuronal de los mastocitos. Con esta se observó escasa mejoría de la sintomatología urinaria sin embargo, lo que resulto más interesante, fue una mejoría de los síntomas asociados, tales como migraña, síndrome del intestino irritable y alergias (Theoharides, 1994). Existe un estudio donde los pacientes no respondieron a hidroxizina siendo, el resultado de mejoría similar al placebo (Sant 2003).

#### **5.2.4 Antidepresivos.**

La amitriptilina ha aliviado los síntomas en el SDV/CI. Probablemente por mecanismos tales como el bloqueo de los receptores de acetilcolina, la inhibición de la recaptación de la serotonina y la noradrenalina liberadas y el bloqueo de los receptores H1 de la histamina.

Varios trabajos han señalado una mejoría después de administrar amitriptilina oral (Hanno, 1989; van Ophoven, 2004). La amitriptilina mejoró significativamente la puntuación media de síntomas, la intensidad del dolor y el tenesmo vesical, mientras que la polaquiuria y la capacidad funcional de la vejiga mejoraron, pero no de un modo estadísticamente significativo (van Ophoven, 2004).

### **5.2.5 Pentosanpolisulfato sódico (Elmiron®).**

El pentosanpolisulfato sódico (PPS, Elmiron®) se ha evaluado en estudios doble ciego y controlados con placebo. Se cree que el PPS sustituye un defecto en la capa de las glucoaminglicanos (GAG). En pacientes que recibieron este medicamento en comparación con placebo se comunicó una mejoría subjetiva del dolor, el tenesmo y la polaquiuria, pero no de la nicturia (Mulholland, 1990; Hwang, 1997). En un estudio multicéntrico abierto, el PPS tuvo un efecto más favorable sobre la CI clásica que sobre la enfermedad no ulcerosa. Además, se ha observado que en las pacientes que recibieron PPS las puntuaciones ICSI medias mejoraron significativamente (Nickel, 2005). La dosis habitual es de 150-200 mg dos veces al día entre las comidas. Sin embargo este medicamento aún no se comercializa en España.

### **5.2.6 Gabapentina.**

La gabapentina es un antiepiléptico que se emplea como tratamiento adyuvante en trastornos dolorosos. En un estudio en pacientes con dolor genitourinario crónico se observó una mejoría con la gabapentina al cabo de 6 meses.

En este estudio participaron ocho pacientes con CI, de los que cinco respondieron a gabapentina (Sasaki, 2001).

### **5.2.7 Inmunomoduladores.**

El tosilato de suplatast (IPD-1151T) es un inmunomodulador oral que suprime los procesos alérgicos mediados por los linfocitos T colaboradores. Catorce mujeres con CI tratadas con tosilato de suplatast notificaron un aumento significativo de la capacidad de la vejiga y una reducción de los síntomas tras un año de tratamiento. No se produjeron efectos secundarios graves y los efectos terapéuticos se correlacionaron con una reducción de la cifra de eosinófilos en sangre, la inmunoglobulina E y los linfocitos T en la orina. No se dispone de datos controlados comparativos (Ueda, 2000).

Los resultados de un pequeño estudio aleatorizado indican que el factor de crecimiento nervioso humano recombinante es seguro y presenta datos preliminares de eficacia en pacientes con SDV/CI, aunque se necesitan más estudios para definir su utilidad (Dimitrakov, 2001).

### **5.3 Tratamiento intravesical**

La aplicación intravesical de medicamentos logra concentraciones elevadas en el lugar objetivo con pocos efectos secundarios sistémicos. Entre sus inconvenientes figuran la necesidad de sondaje intermitente, que puede ser doloroso en los pacientes con CI, el coste y el riesgo de infección. Con la terapia de lidocaína intravesical se han descrito casos esporádicos de tratamiento satisfactorio de la CI (Giannacopoulos, 1992; Henry, 2001).

#### **5.3.1 Pentosanpolisulfato sódico (PPS).**

El pentosanpolisulfato sódico (PPS) es una glicoproteína dirigida a reponer la capa de GAG, que se aplica por vía intravesical debido a su escasa biodisponibilidad tras administración oral. Se han obtenido buenos resultados en cuanto a capacidad vesical y disminución de los síntomas (Bade, 1997).

#### **5.3.2 Heparina intravesical.**

La heparina intravesical, se ha propuesto como sustancia de recubrimiento. En un ensayo abierto, prospectivo y no controlado en más de la mitad de los pacientes estudiados, la heparina intravesical controló los

síntomas, con una mejoría continuada después de un año de tratamiento (Parsons, 1994; Kuo, 2001).

### **5.3.3 Ácido hialurónico.**

El ácido hialurónico (hialuronato) es un proteoglicano natural que está dirigido a reparar defectos en la capa de GAG. Los resultados con ácido hialurónico demuestran una mejoría en los síntomas a partir de la 4ª semana y que se mantienen durante 3 meses produciéndose una disminución tanto en los síntomas de llenado como en el dolor (Kallestrup, 2005; Daha, 2005).

El sulfato de condroitina intravesical presentó efectos beneficiosos en pacientes con una prueba positiva de estimulación con potasio en dos estudios piloto abiertos, no aleatorizados y no controlados (Sorensen, 2003).

### **5.3.4 Dimetilsulfóxido.**

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un disolvente químico y líquido hidrosoluble que penetra en las membranas celulares. También es un receptor del radical OH intracelular que se supone que es un desencadenante importante del proceso inflamatorio. Se ha evaluado empíricamente y se ha comprobado que alivia los síntomas de la CI. Actualmente, el DMSO es un

tratamiento de referencia (Peres-Marrero, 1998; Sant, 1994; Rössberger 2005).

Dado que se ha descrito un caso en el que el tratamiento con DMSO podría haber provocado depósitos pigmentados en el cristalino, ha de plantearse un examen oftalmológico durante el tratamiento (Rowley, 2001).

### **5.3.5 Bacilo de Calmette-Guerin.**

La vacuna contra la tuberculosis, bacilo de Calmette-Guérin (BCG), se utiliza por sus propiedades inmunomoduladoras en el tratamiento intravesical del carcinoma de vejiga superficial. Se han obtenido resultados dispares sobre su eficacias (Peters, 1997; Mayer, 2005). Sin embargo, la tasa de respuesta baja (18 %) con BCG en esta serie es un argumento más en contra de su uso sistemático como tratamiento del SDV/CI (Peters, 1998).

## **5.4 Tratamientos intervencionistas**

### **5.4.1 Hidrodistensión vesical**

Aunque la hidrodistensión vesical es un tratamiento habitual para el SDV/CI, la justificación científica es escasa. Representa una herramienta

diagnóstica, pero su utilidad terapéutica es limitada. Muchos de los trabajos con hidrodistensión vesical no son concluyentes, pero en la práctica clínica habitual sigue siendo una herramienta muy útil (Bumpus, 1930; Glemain, 2002).

#### **5.4.2 Neuromodulación.**

La neuromodulación o estimulación de raíces sacras actúa creando un campo eléctrico que estimula las raíces aferentes, consiguiendo modificar el comportamiento del detrusor, esfínter uretral externo y músculos del suelo pélvico. Sin embargo, el mecanismo de acción en la CI se desconoce aunque ha demostrado que en estas pacientes disminuye el dolor y la frecuencia. (Weil, 1998). Whitmore y cols. demostraron que la neuromodulación es útil en el tratamiento de pacientes con CI en un ensayo clínico multicéntrico (Whitmore, 2003). Peters y cols. también observaron que la neuromodulación es útil en el tratamiento de pacientes diagnosticadas de CI refractaria a tratamientos convencionales y que además disminuye la utilización de analgesia (Peters, 2003 y Peters, 2004). Actualmente, en las guías europeas de urología junto con la toxina botulínica continua siendo considerada como un método experimental a pesar de la evidencia científica.

En ellas tiene un grado de comprobación científica 3 y un grado de recomendación B.

### **5.4.3 Resección transuretral.**

La resección transuretral (RTU) con coagulación y láser han demostrado que producen un alivio y en algunos casos curación cuando se reseca la úlcera de Hunner, sin embargo las resecciones endourológicas no son aplicables a la CI no ulcerosa. Estas técnicas pueden proporcionar un alivio a largo plazo de los síntomas, pero ninguna cura la enfermedad. Además, que hasta el momento aún no existen estudios controlados (Kerr, 1971; Peecker, 2000).

### **5.4.4 Toxina botulínica.**

La toxina botulínica A (TXB-A) puede tener un efecto antinociceptivo sobre las vías aferentes de la vejiga, con aparición de mejorías sintomáticas y urodinámicas. También se han observado reducciones significativas de la polaquiuria diurna, la nicturia y el dolor, así como un aumento significativo del primer deseo de orinar y la capacidad cistométrica máxima (Kuo, 2005).

Recientemente se han publicado dos trabajos donde la TXB-A ha demostrado ser efectiva tanto en el tratamiento de la CI ulcerativa como en la no ulcerativa (Pinto 2014). Además existen pruebas en laboratorio donde se demostró que la TXB-A podría inducir la desensibilización periférica, reduce la inflamación crónica de la vejiga y disminuye moléculas señal apoptótica en el urotelio (Jhang 2014) . A pesar de estos buenos resultados la TXB-A en las Guías de la Asociación Europea 2014 continua siendo un tratamiento experimental (Fall 2010).

#### **5.4.5 Cistectomía**

Cuando todos los esfuerzos no logran aliviar los síntomas discapacitantes, la extirpación quirúrgica de la vejiga afectada constituye la última opción (van Ophoven, 2002; Oberpenning, 2002; Warwick, 1967). Las tres técnicas principales de resección vesical son: cistectomía supratrigonal (es decir, con conservación del trigono) cistectomía subtrigonal y cistectomía radical con extirpación de la uretra. Todas las técnicas requieren una sustitución del tejido vesical extirpado, realizada en su mayor parte con segmentos intestinales.

La cistectomía supratrigonal con aumento vesical subsiguiente representa la técnica quirúrgica con conservación de la continencia que cuenta con más partidarios. Se han utilizado varios segmentos intestinales para aumentar el trigono, entre ellos íleon, ileociego, colon derecho y sigma. La sustitución con segmentos gástricos parece menos útil porque la producción de ácido gástrico puede mantener la disuria y el dolor persistente.

La eficacia terapéutica de la cistectomía supratrigonal se ha descrito en numerosos estudios (Bruce, 1977; Van Garrets, 1966; Guilleneau, 1993). En general, la cirugía logró una mejoría significativa de la polaquiuria diurna y nocturna, en la capacidad funcional de la vejiga y de las puntuaciones de síntomas, con tan sólo dos fracasos del tratamiento.

En estudios más recientes con un seguimiento más prolongado persiste el debate sobre el resultado de los pacientes con CI tratados con cistectomía y los resultados varían considerablemente entre distintos cirujanos y poblaciones de pacientes (Chakravati, 2004; Blaivas 2005).

Aunque menos popular, también se ha descrito la cistectomía subtrigonal (Linn, 1998). La resección subtrigonal tiene el potencial de

extirpar el triángulo como posible foco de la enfermedad, aunque a costa de requerir un reimplante ureteral con los consiguientes riesgos de fugas, estenosis y reflujo.

La CI es una afección benigna y no acorta la vida, motivo por el que las intervenciones quirúrgicas ocupan el último lugar en el algoritmo terapéutico. Sin embargo, los pacientes muy rebeldes al tratamiento no tendrían que soportar tratamientos conservadores infructuosos durante años cuando hay opciones quirúrgicas disponibles.

Un asesoramiento detallado y el consentimiento informado deben preceder a cualquier tipo irreversible de cirugía mayor, que sólo ha de ser practicada por cirujanos experimentados. La elección de la técnica dependerá de la experiencia del cirujano. El grado adecuado de resección tisular debe basarse en los datos endoscópicos e histopatológicos. Algunos cirujanos recomiendan una cistoscopia y una determinación preoperatoria de la capacidad vesical como parámetro pronóstico del éxito quirúrgico (Awad, 1998).



# **Capitulo II: Biomarcadores de la cistitis intersticial**



La NIDDKD ha diseñado un programa de actuación para el estudio de la CI en diversos campos de investigación básica y clínica. Desde el punto de vista epidemiológico en el año 2001 comenzó el estudio *Epidemiology of Chronic Pelvis Pain of the Bladder and Interstitial Cystitis*. Su objetivo es estimar la verdadera prevalencia de la CI en ambos sexos y su impacto sobre la calidad de vida. Otras áreas de investigación incluyen: el papel del óxido nítrico, estudio de los mecanismos aferentes del dolor vesical, sensibilidad dolorosa y ciclo menstrual, inflamación neurogénica, mediadores inmunes, plasticidad aferencial del dolor uretral y pélvico etc. Además, existen dos áreas especiales: nuevos tratamientos y pruebas diagnósticas y los marcadores biológicos.

Ante la dificultad diagnóstica de la CI, se están realizando esfuerzos para encontrar pruebas diagnósticas de enfermedad menos invasivos y más seguros. La búsqueda de marcadores biológicos es un área de investigación muy atractiva que puede proporcionar claves para el entendimiento de la etiología y el tratamiento de la CI. Si se dispusiese de marcadores concluyentes de diagnóstico se podrían mejorar los estudios epidemiológicos y fisiopatológicos.

## **1. Tipos de muestras**

Los estudios iniciales sobre marcadores biológicos de la CI se realizaron a partir de muestras biopsias de pared vesical. Las biopsias de la pared vesical se dejaron de usar por su baja sensibilidad y especificidad además de ser invasivas. Posteriormente, se han analizado muestras urinarias por su facilidad de manejo y ausencia de invasividad. Las alteraciones encontradas en las biopsias se han logrado reproducir en la orina para los marcadores más representativos. Todo ello, independientemente de si se analiza en orina de 24 horas, tomas alícuotas o corregida por creatinina sanguínea (Birne, 1998; Eriekson, 2002; Keay, 1996).

## **2. Biomarcadores urinarios de la CI**

La concentración de muchos componentes de la orina están aumentados o disminuidos en la CI. Por lo tanto, pueden servir como marcadores objetivos. Su utilidad puede ser diferente: 1) para realizar un diagnóstico de enfermedad definitivo; 2) para identificar grupos de pacientes con diferentes etiologías, con la intención de dirigir investigaciones o tratamientos específicos; 3) para saber que pacientes

responden a un tratamiento específico o proporcionar una medida objetiva del resultado terapéutico.

### **3. Marcadores diagnósticos de CI**

El diagnóstico de la CI recae en la clínica, cistoscopia y exploraciones complementarias necesarias para descartar otras posibles causas de los síntomas. El resultado de estas pruebas se combina con el juicio y experiencia del urólogo y se llega al diagnóstico. Sin embargo, como ya se ha expuesto anteriormente, si se aplican estrictamente los criterios diagnósticos de inclusión propuestos por la NIDDKD, únicamente los reúnen entre un 32-42% de los pacientes. El resto, aún siendo diagnosticados por el urólogo en su práctica clínica habitual quedarían excluidos. Es por esto que, la CI sigue siendo un reto diagnóstico y la necesidad de un marcador de enfermedad que identifique a todos los pacientes sería de gran ayuda en la práctica clínica.

Muchos componentes urinarios se encuentran aumentados o disminuidos en la orina de las pacientes diagnosticadas de CI (tabla 4). Pero la pregunta que se plantea es ¿cual de ellos sería útil como marcador diagnóstico de la CI? Para que sea de utilidad diagnóstica el marcador

biológico debe reunir una serie de cualidades. Los niveles urinarios del marcador deben separar claramente, o con mínimo solapamiento, a los pacientes con CI de los pacientes sanos o de control. El marcador ideal debe ser capaz de identificar la enfermedad y descartarla. O lo que es lo mismo, poseer una elevada sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es la habilidad del marcador para encontrar la enfermedad en los pacientes que realmente la tienen (capacidad de detectar). La especificidad es la capacidad de un marcador para descartar que pacientes no tiene CI (capacidad de descartar). Es decir, la capacidad de acertar que padece una CI, que se está sano o que se padece otra patología diferente. Sin embargo, la mayoría de los marcadores descritos presentan un grado importante de solapamiento entre CI y el grupo control. La especificidad suele ser baja, porque los marcadores no son enfermedad específico de CI y se elevan o disminuyen en otras posibles patologías o son producidos en varios órganos. En este momento, los marcadores urinarios con mayor rendimiento diagnóstico y que mejor separan a los pacientes con CI del grupo control son: la glycoproteína-51 (GP-51), el factor antiproliferativo (AFP), el insulín-like growth factor (IGF) binding protein 3, el epidermal growth factor (EGF), y el heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF).

La GP-51 es una glicoproteína procedente del epitelio transicional que puede ser aislada en orina humana y de otros mamíferos. Byrne y cols (Byrne, 1999) demostraron, mediante biopsias de pared vesical, que los pacientes diagnosticados de CI con los criterios de la NIDDKD tenían un nivel disminuido de GP-51 comparado con grupos de pacientes sanos. Los mismos resultados se produjeron cuando se analizaron y compararon muestras urinarias. Sin embargo, aunque la determinación urinaria de GP-51 podría ser un buen marcador no invasivo para el diagnóstico de CI, lo cierto es que sólo sería útil para el diagnóstico de pacientes que cumplen los criterios de la NIDDKD, pero no para aquellos pacientes que no los cumplen.

El APF fue propuesto por Keay y cols en 1996 (Keay, 1996) como marcador potencial de diagnóstico. La observación inicial era que la orina de pacientes con CI inhibían la proliferación de células epiteliales cultivadas procedentes de mucosa de pared vesical. Para estudiar si la actividad del APF podría ser útil como marcador diagnóstico, determinaron su concentración en orina de 58 pacientes con CI según los criterios de la NIDDKD. Como controles utilizaron 36 mujeres sanas, 58 con cistitis bacteriana y 12 con vulvovaginitis. La determinación se realizó mediante

incorporación de timidina. Se consideró como prueba positiva la inhibición de la incorporación de timidina igual o superior al 25%. La prueba consiguió una sensibilidad y una especificidad para la CI del 91.4 y 90% respectivamente. Estos resultados han sido reproducidos por otros grupos (Erickson, 2000). De todos los marcadores estudiados hasta el momento es el que tiene menor solapamiento entre la CI y el grupo control (Erickson, 2002). Es el mejor candidato a convertirse en marcador que sirva como test diagnóstico, puesto que ha demostrado su reproducibilidad independientemente de la raza, país y hallazgos patológicos (Zhang, 2003; Erickson, 2002; Zhang, 2005).

El IGF binding proteín 3, el EGF y el HB-EGF se encuentran muy alterados la CI. Posiblemente, reflejan una misma vía patogénica. El EGF y el IGF binding protein 3, están significativamente aumentados en orina de pacientes con CI en comparación con los controles normales. Sin embargo, el grado de solapamiento entre los niveles de pacientes con CI y sus controles es superior al del APF. Por su parte, el HB-EGF se encuentra significativamente disminuido en la orina de los pacientes con CI con respecto a los controles. También tiene un mayor grado de solapamiento que el APF. Al igual que el APF, el EGF y el HB-EGF han demostrado su

reproducibilidad independientemente de la raza, país y hallazgos patológicos (Zhang, 2003; Erickson, 2002; Zhang, 2005).

#### **4. Marcadores identificativos de grupos etiológicos de pacientes con CI.-**

Muchos urólogos creen que la CI es un síndrome heterogéneo donde tienen cabida diferentes grupos clínicos de CI de etiologías específicas. Si esto fuera así, explicaría el solapamiento entre pacientes y controles existente en la mayoría de marcadores biológicos analizados. Es decir, si un marcador está alterado en un grupo de pacientes con CI de etiología específica, no lo está en aquellos pacientes con CI de diferente etiología. Por lo que, los pocos marcadores que demostrasen estar alterados en la mayoría de pacientes, reflejarían la vía final del proceso patofisiológico iniciado a través de diferentes etiologías. En la tabla 6, se recogen una lista de marcadores urinarios analizados con sus correspondientes procesos fisiopatológicos implicados. En muchos casos los resultados son contradictorios y no soportan la relación causa – efecto que demuestre su determinada etiología.

**Tabla 6:** Marcadores urinarios estudiados en la CI, su alteración y el proceso fisiopatológico implicado.

| Marcador urinário       | Cambio CI | Fisiopatología        |
|-------------------------|-----------|-----------------------|
| APF                     | Aumentado | Deficiência epitelial |
| HB-EGF                  | Diminuído | Deficiência epitelial |
| EGF                     | Aumentado | Deficiência epitelial |
| IGF-1                   | Aumentado | Deficiência epitelial |
| Glicoproteína-51        | Diminuído | Deficiência epitelial |
| Ácido hialurónico       | Aumentado | Deficiência epitelial |
| Triptofano              | Diminuído | Deficiência epitelial |
| Histamina               | Aumentado | Activación mastócitos |
| Metilhistamina          | Aumentado | Activación mastócitos |
| Tryptasa                | Aumentado | Activación mastócitos |
| IL-6                    | Aumentado | Inflamación           |
| IL-8                    | Aumentado | Inflamación           |
| IL-2                    | Aumentado | Inflamación           |
| Inhibidor de IL-2       | Aumentado | Inflamación           |
| Quemotaxis neutrófila   | Aumentado | Inflamación           |
| Calicreina              | Aumentado | Inflamación           |
| Óxido Nítrico           | Aumentado | Inflamación           |
| GMP cíclico             | Diminuído | R. músculo liso       |
| F.crecimiento nerviosos | Aumentado | Inervación alterada   |
| Norepinefrina           | Aumentado | Inervación alterada   |

EGF= Factor de crecimiento epidérmico, GMP= Guanosin monofosfato, HB-EGF= Factor de crecimiento epidérmico, heparina asociado, factor like, CI= Cistitis interticial, IGF= Factor de crecimiento insulina like, IGFBP= Factor de crecimiento insulina like proteína asociado 1-4 MIAA= 1,4 ácido metilimidazol acético, PGE2= Prostaglandina E2

Aunque existe una falta de consenso con relación a la etiología de la CI, una de las teorías más aceptadas es la alteración de la permeabilidad del urotelio. Recientemente, se ha realizado un estudio de la expresión de marcadores moleculares implicados en la impermeabilidad del urotelio. En el análisis inmunohistoquímico se realizó a partir de biopsias de pared vesical de pacientes con CI y controles. Se demostraron anomalías en E-cadherina, proteína ZO-1, uroplakin y condroitin sulfato (Slobodv, 2004).

Otra de las teorías etiopatogénicas de la CI es la liberación de histamina y otros mediadores a través de la activación y degranulación de mastocitos. Hasta el momento, únicamente se ha logrado demostrar un aumento de 1-4 ácido metilimidazol acético y de la proteína catiónica eosinofílica en orina de pacientes con aumento de la densidad de mastocitos en el detrusor.

También existen niveles elevados de interleukina 6 (IL-6) en orina de pacientes con CI e inflamación severa demostrada en biopsias (Erickson, 1997). Sin embargo, el proceso inflamatorio es una respuesta inespecífica y puede ser consecuencia de una infección microbiana, una reacción alérgica o autoinmune, una inflamación neurogénica o un filtrado de la orina a través

de la pared vesical.

Otra forma de demostrar que un marcador urinario refleja un determinado mecanismo fisiopatológico que explique la CI es medir su nivel antes y después de un tratamiento, ya que se conoce su mecanismo de acción específico sobre el proceso fisiopatológico propuesto. Sin embargo, la mayor parte de marcadores determinados lo han sido tras la aplicación de tratamientos inespecíficos, ya que los tratamientos pueden tener diversos mecanismos de aliviar los síntomas. Hasta el momento, el único tratamiento específico empleado para estudiar un marcador urinario ha sido la L-arginina oral para aumentar los niveles de óxido nítrico (ON) (Smith, 1996). Los resultados no han sido concluyentes, puesto que no se ha conseguido aumentar el nivel de ON en la vejiga con la administración de L-arginina. Tampoco clínicamente se demostró una mejoría significativa de los pacientes tratados con relación a los controles.

## **5. Marcadores como medida objetiva para evaluar el resultado terapéutico (marcadores de actividad de enfermedad).**

La mayoría de tratamientos para la CI son empíricos. Su eficacia terapéutica se mide únicamente mediante la evaluación de la mejoría

sintomatológica. Sin embargo, existen una serie de preguntas en cuanto al efecto terapéutico todavía sin contestar como: ¿consigue el tratamiento el efecto fisiológico para el cual fue desarrollado? ¿Tiene el paciente una enfermedad no relacionada con el tratamiento que se le está administrando? ¿Tiene la vejiga cambios anatómicos residuales, como la fibrosis, que limitan su capacidad, incluso si el proceso activo de la CI ha desaparecido? ¿Tiene el paciente cambios en su sistema nervioso central que le provocan dolor incluso después de que el insulto ha desaparecido? Los marcadores de actividad de enfermedad de la CI podrían ayudar a resolver estas cuestiones.

Se han realizado diferentes intentos mediante la determinación de marcadores antes y después del tratamiento. Lose y cols (Lose, 1983) describieron dos casos con una gran densidad de mastocitos y de proteína catiónica eosinofílica en los que, tras la administración de heparina subcutánea, hubo una mejoría clínica y disminución del marcador al orinar, sin embargo, no se han publicado series más amplias. Posiblemente porque la heparina causa osteoporosis cuando se administra crónicamente.

Por otra parte, Lynes y cols (Lynes, 1987) determinaron los niveles de PGE2 en 6 pacientes con CI tras la distensión vesical e instilaciones de oxychloroseno. En tres pacientes, los síntomas mejoraron tras el tratamiento

y se normalizaron los niveles de PGE2. En los tres restantes no hubo respuesta. No ha habido estudios posteriores, por lo que, el valor de la PGE2 como marcador sigue por determinar.

Por su parte, Zuraw y cols (Zuraw, 1994) estudiaron la modificación de los niveles de calicreina antes y después de un mes de hidrodistensión vesical en 10 pacientes. La calicreina es una enzima que transforma el quiminógeno en bradicinina y que, estos mismos autores, la observaron elevada en pacientes con relación a pacientes control sanos (Zuraw, 1994). Únicamente en 5 pacientes se produjo una mejoría de síntomas y se normalizaron los niveles. En el resto, los niveles de calicreina estaban normales antes y después del tratamiento. En consecuencia se consideró que la calicreina era un factor predictivo de mejoría de síntomas tras la distensión vesical. Sin embargo, no se han realizado estudios posteriores de seguimiento. Por lo tanto, sigue sin determinarse el verdadero papel de la calicreina como marcador.

Elgebaly y cols, publicaron (Elgebaly, 1992) que la orina de pacientes con CI tenía capacidad quimiotáctica para neutrófilos. Esta característica no se presentaba en controles normales, en otras patologías vesicales ni tras el tratamiento con DMSO.

Sin embargo, no hay estudios de seguimiento publicados posteriormente.

Shingleton y Fleishmann (Shingleton, 1991) encontraron un inhibidor de la interleuquina 2 en la orina de pacientes con CI. Sin embargo, también aparecía en pacientes con cistitis bacteriana y con tumores vesicales. Tampoco existen estudios de seguimiento.

Peters y cols (Peters, 1999) determinaron los niveles de diferentes citoquinas en tres grupos de pacientes: 11 controles normales, 15 pacientes con CI activa y 9 pacientes en remisión tras la administración de vacuna con bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Los pacientes en remisión y los controles demostraron niveles urinarios de interleuquina 6, 8 y 2 similares. Por el contrario, los pacientes con CI activa presentaban niveles elevados de todas las interleuquinas. Este estudio no es propiamente de seguimiento tras tratamiento, ya que no se determinaron estos marcadores previamente a la administración de BCG. Por lo tanto, no se pueden extraer conclusiones. Sin embargo, las citoquinas podrían tener un papel en el futuro como marcadores activos de enfermedad.

Por último, el APF y el HB-EGF, ya comentados previamente, han

sido estudiados como marcadores de actividad de enfermedad, además de diagnóstico. El APF inhibe la proliferación de células epiteliales de vejiga humana y ha sido aislado tanto en orina como en biopsias de pared vesical de pacientes con CI (Keay, 2000). El HB-EGF es un factor de crecimiento de la orina normal que se encuentra significativamente disminuido en pacientes con CI (Keay, 1997). Se ha logrado demostrar que el APF purificado inhibe específicamente la producción de HB-EGF en cultivos de células epiteliales vesicales y que, dicho efecto antiproliferativo del APF, puede ser revertido añadiendo HB-EGF al cultivo (Keay, 2000). Para ello, se ha teorizado sobre la posibilidad de que las células epiteliales de pacientes con CI producen APF. Ambos marcadores han sido determinados antes y después de 2 a 4 horas y 2 semanas de la realización de distensión vesical en pacientes con CI (Chai, 2000). Antes de la distensión, los niveles de APF estaban aumentados y los de HB-EGF disminuidos en relación a los controles. Tras la distensión, los niveles del HB-EGF aumentaron hasta cifras en rango de los controles. Por su parte, el APF disminuyó considerablemente, aunque no lo bastante para alcanzar las cifras de los controles normales. Por lo tanto, los niveles de ambos marcadores se modifican hacia la normalidad tras la distensión vesical.

Por su parte, Chai y cols (Chai, 2004) compararon ambos marcadores antes y 5 días después de la realización de estimulación sacra percutánea con electrodo temporal en S3. Tras la estimulación, ambos marcadores alterados previamente, se normalizaron. Además, en este estudio se realizó una valoración sintomática con un cuestionario para el dolor y un diario miccional. Se pudo demostrar que la normalización de los marcadores se asociaba a una mejoría sintomatológica. Por lo tanto, estos son los únicos marcadores en los que se ha logrado demostrar una normalización tras la administración de dos tipos de tratamiento completamente diferentes. La pregunta en el futuro es si también cambiarían con otro tipo de tratamiento y si los marcadores se normalizaran en aquellos pacientes en los que no responden al tratamiento. Por lo tanto, los marcadores más estudiados han sido el APF, el HB-EGF y el EGF. La evidencia existente sobre estos marcadores sugiere que podrían ser útiles para distinguir pacientes con CI que reúnen los criterios de la NIDDKD. Sin embargo, queda por determinar si serían de utilidad en la práctica clínica para diagnosticar pacientes que no reúnen dichos criterios.

Estos marcadores deben ser estudiados con mayor profundidad, y uno o mas de ellos deben ser incluidos en estudios clínicos y epidemiológicos futuros para confirmar su capacidad diagnóstica y determinar su utilidad para predecir el pronóstico o para monitorizar la historia natural o respuesta terapéutica.

# **Capitulo III: Citometría de flujo como método de estudio de la apoptosis celular**



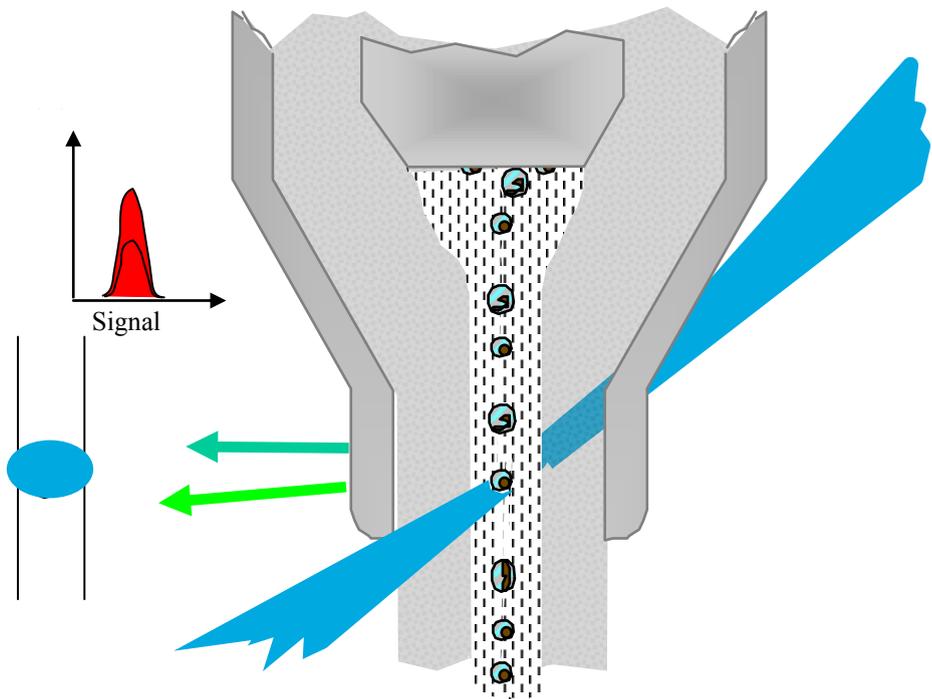
## **1. Citometría de flujo.**

La citometría de flujo es un método de estudio citológico que permite la cuantificación exacta de distintos parámetros celulares tales como el contenido de ADN, contenido de ARN o la actividad enzimática celular. Es un método objetivo, multiparamétrico, automatizado y con alta reproducibilidad que permite el despistaje de extensas muestras celulares con mayor rentabilidad que los tradicionales métodos citopatológicos.

Básicamente, la citometría de flujo consiste en introducir una suspensión celular dentro de una cámara de flujo, mediante una ligera presión, con un orificio en el extremo inferior. En la cámara, las células entran en un rápido movimiento, que junto con la forma geométrica de la cámara así como la propia vaina de fluido de salida permiten formar un flujo de alta velocidad (5000 células/segundo) con una sola línea celular (célula a célula) pasando inmediatamente a través de un haz de láser o cualquier otra forma de fuente de luz de alta intensidad focalizado sobre el flujo celular.

La interacción de la luz con el flujo celular puede dispersar el haz con o sin excitación de moléculas fluorescentes presentes en la superficie celular. Una serie de lentes ópticas presentes en la zona de detección

permiten convertir dichas señales en impulsos eléctricos, enviados a una computadora para su almacenaje y análisis (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema de la citometría de flujo

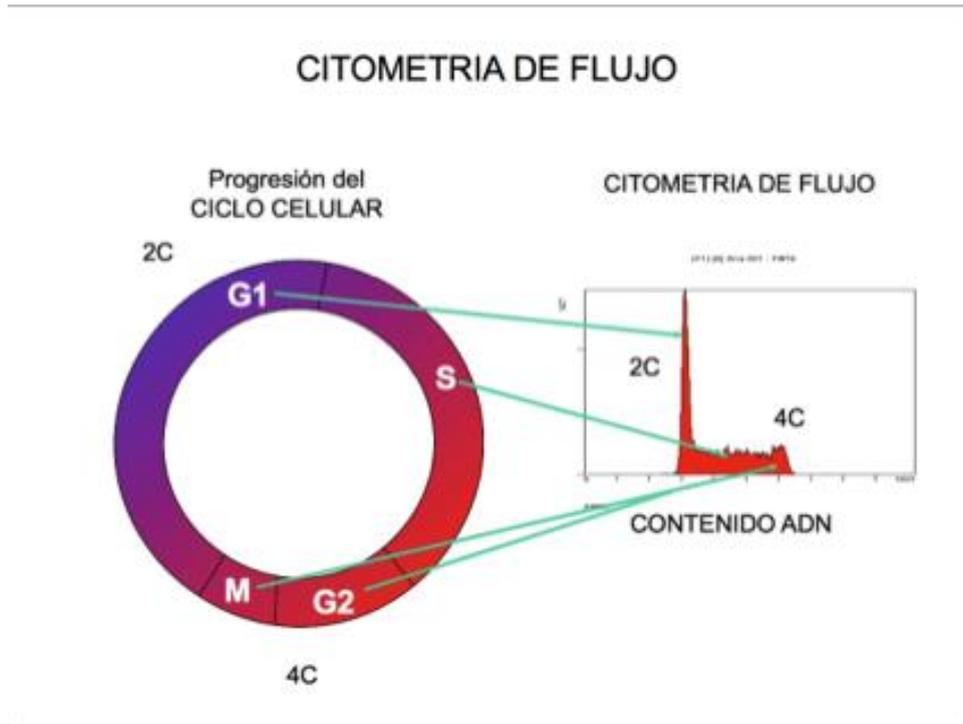
Para el análisis de dichas señales se utilizan filtros ópticos que permiten seleccionar previamente aquellas señales con una longitud de onda deseada. Algunas de sus aplicaciones clínicas específicas son análisis de ADN/ARN, detección de células neoplásicas y alteraciones en la distribución porcentual de las células dentro de las fases del ciclo celular (actividad proliferativa/apoptosis), análisis de subpoblaciones y diagnóstico de linfomas, entre otras.

Las ventajas de la citometría de flujo es que permite analizar las células y su ciclo celular tanto en muestras de tejidos como en líquidos orgánicos (orina). Ruiz et. al. demostraron que mediante los parámetros resultantes de la citometría de flujo proporcionaban información directamente relacionada con el comportamiento biológico del tumor, considerándose factores pronósticos del riesgo de progresión y de mortalidad (Ruiz Cerda, 1997). Más adelante y del mismo grupo Di Capua y cols. (Di Capua, 2011) mediante citometría de flujo determinaron que las células aneuploides en el tumor renal presentaban un peor pronóstico.

## **2. Citometría de flujo como herramienta para medir las fases del ciclo celular y pico sub-G1 como reflejo de la apoptosis.**

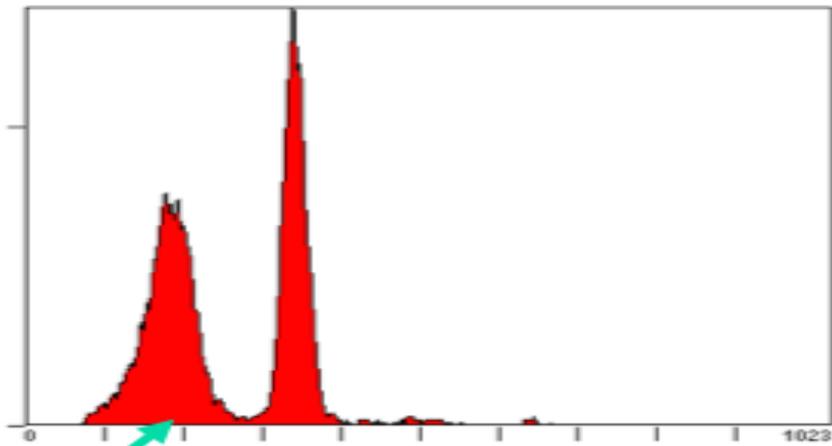
Los principios básicos de la citometría de flujo son sencillos. Es esencial disponer de una suspensión celular de modo que la dificultad para obtenerla es un factor limitante para el empleo de la técnica. La posibilidad de conseguir una suspensión celular individualizada varía con el tejido: la sangre, la médula ósea, cultivos celulares y orina.

La suspensión celular convenientemente procesada y teñida se inyecta en la cámara de flujo del citómetro de flujo que está hidrodinámicamente enfocada para que las células pasen individualmente una detrás de la otra en «fila india» a través de un punto en que estas interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática dispersando la luz en todas las direcciones. El ordenador capta la cantidad de luz basado en la cuantificación del contenido de DNA nuclear en núcleos individuales y la misma es proporcional a la cantidad de DNA que contiene. Esto posteriormente es procesado por un ordenador obteniendo histogramas donde se pueden visualizar las fases del ciclo celular: G1, fase S, G2M. En la figura 3 vemos un esquema del análisis que realiza el ordenador y es visto como un histograma.



**Figura 3:** Esquema del análisis de la citometría de flujo y las fases del ciclo celular.

En el histograma si existe un pico en la fase sub-G1 serán las células que se encuentran en apoptosis, el tamaño de este pico es proporcional al porcentaje de células apoptóticas. Es por ello que la citometría de flujo es una herramienta que permite identificar de manera relativamente sencilla el porcentaje medio de apoptosis con contenido DNA en fase sub G0G1 (M1) (figura 4).



**Pico sub-G1**

**Figura 4:** Citometría de flujo donde la flecha indica el pico sub G0/1, que corresponde al porcentaje de apoptosis.

**Capitulo IV: Planteamiento del problema, hipótesis de trabajo y objetivos.**



## **1. Descripción del problema**

En la actualidad, no se dispone de un marcador diagnóstico ni etiológico de enfermedad. Tampoco existen marcadores que reflejan la actividad de la enfermedad ni la respuesta al tratamiento. Por otra parte existe una ausencia de un modelo humano de investigación para el estudio de la CI.

## **2 Ausencia parcial de marcadores de enfermedad.**

De acuerdo a la evidencia actual, la determinación de APF, el HB-EGF y el EGF en orina tienen capacidad diagnóstica únicamente para separar pacientes que cumplen los criterios de la NIDDKD. Sin embargo, no son de utilidad en la práctica clínica para diagnosticar el resto de pacientes, que son la mayoría.

Los dos marcadores mas estudiados son el APF y el HB-EGF, sin embargo el análisis de los mismos en las práctica clínica habitual, es casi inviable por varias razones: el coste de dichas pruebas es muy elevado, las tinciones celulares como su análisis es muy complejo y al alcance de muy pocos centros. Además su sensibilidad y especificidad aun sigue siendo cuestionada.

### **3. Ausencia de marcadores etiológicos.**

No se dispone de marcadores etiológicos ya que faltan estudios de relación causa efecto. Muchos de los marcadores estudiados hasta ahora se desconoce si son causa o efecto. La única manera de demostrar que participan en el proceso fisiopatológico de la enfermedad sería evidenciar una correlación del nivel del marcador con los hallazgos relevantes en la biopsia, o que se modificase su nivel respondiendo a un determinado tratamiento dirigido hacia la etiología propuesta. Sin embargo, al no conocer bien la etiopatogenia tampoco es posible aplicar un tratamiento específico. Por ahora, no disponemos de modelos para poder investigar y demostrar hipótesis de relación causa efecto a través de mecanismos precisos.

### **4. Imposibilidad de estudiar marcadores de respuesta al tratamiento, de actividad de enfermedad en modelo humano de investigación.**

En la actualidad, el manejo de la CI se rige exclusivamente por los aspectos clínicos. Parecería que este campo es ideal para llevar a cabo investigación translacional. Sin embargo, existe una falta de conocimiento sobre su etiología y su historia natural que hace inviable este abordaje. La única posibilidad que tenemos a nuestro alcance es estudiar la evolución de

pacientes con CI para tratar de identificar a los respondedores al tratamiento, los no respondedores y aquellos con remisiones espontáneas.

Ante la ausencia de modelo humano, el progreso en la investigación de la patogenia de las enfermedades, y en concreto de la CI, está supeditado a la creación y desarrollo de modelos fiables de experimentación. Los modelos *in vitro* mimetizan las interacciones intercelulares que se producen en la pared vesical y son fácilmente manipulables.

Para entender la etiopatogenia de la CI los modelos animales *in vivo* son preferibles. Estos modelos animales permiten realizar dos tipos de experimentación. Por una parte, utilizando agentes irritantes que puede reproducir los síntomas de urgencia, frecuencia y dolor. Por otra, sirven para estudiar el mecanismo de acción de dicho efecto, identificar marcadores y moléculas asociadas y correlacionarlas con los síntomas e investigar las posibles intervenciones terapéuticas. A pesar de ello, en la actualidad existen pocos modelos animales que se asemejen al modelo humano para el estudio de la CI. El gato podría ser un buen modelo por sus similitudes con el género humano, pero la prevalencia de CI en el gato no es elevada. Además, este modelo no es fácilmente manejable para la manipulación o el análisis genético.

Otro modelo con el que se ha experimentado es el ratón, mediante la creación de una cistitis neurogénica a través de una infección aguda con un virus pseudorábico. Este modelo es fácilmente manejable y reproducible, sin embargo, los efectos sistémicos de este virus limitan su uso para la caracterización de los aspectos crónicos de la CI. Por lo tanto, existe la necesidad de un modelo humano de investigación.

### **5. La apoptosis como herramienta diagnóstica.**

Actualmente existen múltiples teorías que están involucradas en la etiopatogenia de la CI una de ellas es la alteración en el ciclo celular normal, bien sea de las células debido a las proteínas involucradas en la apoptosis y falta de regeneración celular (proteína 53, APF, HB-EGF) y otra es debido a un fallo en las estructuras de la membrana (teoría de la permeabilidad vesical).

### **6. Hipótesis**

La hipótesis que subyace en esta tesis es que la capacidad regenerativa del epitelio vesical está deteriorada como consecuencia de la presencia de un factor antiproliferativo en la orina de pacientes con CI, que impediría la adecuada regeneración del epitelio vesical tras una agresión.

El APF ejercería su efecto inhibiendo la producción de dos factores esenciales para el crecimiento celular y la regeneración epitelial: Hb-EGF y el EGF. La inhibición se llevaría a cabo a través de la vía de la proteína p53 facilitadora de la apoptosis celular. De tal forma que, se produciría una paralización del ciclo celular a nivel de la fase G<sub>0</sub>, impidiendo que las células epiteliales entren en fase G<sub>1</sub> para su división. Por lo tanto, la afectación de la regeneración del epitelio, impediría la normal re-epitelización de las lesiones de la mucosa vesical, siendo éstas las responsables de los síntomas de dolor al llenado y de las imágenes cistoscópicas objetivadas con la distensión vesical. Nuestro estudio se basa en que, la paralización del ciclo celular debe producir una alteración de la distribución porcentual de células en cada una de sus fases del ciclo celular. Concretamente, se expresaría como un aumento (acúmulo) de células a nivel de la fase sub-G<sub>1</sub>, fácilmente medible mediante citometría de flujo.

El factor antiproliferativo, ha sido determinado y utilizado como biomarcador de enfermedad. Sin embargo, su análisis es complejo, poco reproducible (mediante la incorporación de timidina al ARN) y muy caro. Por lo que, su aplicación en la práctica clínica no se ha extendido.

Una forma indirecta de demostrar la presencia de éste factor antiproliferativo en orina de pacientes con CI sería tratar de objetivar su

efecto. De tal forma que se evidenciara que la orina de pacientes con CI es capaz de inducir un aumento de la apoptosis *in vitro* en cultivos celulares respecto a la orina de pacientes normales. Si esta hipótesis se confirmara, sería interesante valorar cuantitativamente dicha capacidad apoptótica y estudiar su valor como biomarcador de diagnóstico y de severidad de enfermedad.

## **7. Objetivos.**

- 1) Estudiar si la orina de pacientes con CI ejerce un efecto apoptótico sobre cultivos celulares y si dicho efecto difiere del que ejerce la orina de pacientes normales.
- 2) Si el primer objetivo se confirma, estudiar si los pacientes que presentan un determinado nivel de efecto apoptótico presentan una probabilidad mayor de presentar CI que pacientes con dolor pélvico crónico similares.
- 3) Si la magnitud del efecto apoptótico se correlaciona positivamente con la severidad de enfermedad clínica.

## **8. Contraste de hipótesis.**

### **Hipótesis nula:**

La orina de pacientes con CI no ejerce un efecto inhibitorio del crecimiento celular en cultivos celulares tumorales cuantificado mediante el porcentaje de células en fase G0 (grado de apoptosis) respecto a la orina de pacientes sanos.

### **Hipótesis alternativa:**

La orina de pacientes con CI si ejerce un efecto inhibitorio del crecimiento celular en cultivos celulares tumorales cuantificado mediante el porcentaje de células en fase G0 (grado de apoptosis) respecto a la orina de pacientes sanos.

## **Capitulo V: Material y método**



---

## **1. Muestra**

### **1.1 Selección de la muestra**

Entre enero del 2007 y enero del 2011, se recogieron 57 pacientes diagnosticadas de CI, 50 pacientes sanas y 49 pacientes diagnosticadas de dolor pélvico crónico de origen ginecológico. Las pacientes del dolor pélvico crónico de origen ginecológico fueron: 10 pacientes diagnosticadas de vulvodinia, 12 de dolor neuropático y 27 pacientes diagnosticadas de endometriosis.

Las pacientes pertenecían al Hospital Clinic de Barcelona y al Hospital Universitario la Fe de Valencia.

### **1.2 Comisión de investigación.**

El proyecto se presentó al comité de ensayos clínicos Hospital Universitario La Fe de Valencia y recibió la aprobación para su desarrollo del comité ético de investigación médica. Se pidió la colaboración de la Asociación Catalana de Afectadas por Cistitis Intersticial (ACACI) para el reclutamiento del mayor número de pacientes posible.

---

### **1.3 Consentimiento informado**

A todos los pacientes se les solicitó su consentimiento informado. En él, se informaba de los objetivos del estudio, de cómo se iba a llevar a cabo, del número de visitas y de las exploraciones complementarias que se iban a llevar a cabo.

### **1.4. Criterios de inclusión.**

Todas las pacientes con CI eran mujeres, mayores de 18 años y diagnosticados de CI según los criterios de la NIDDKD. Es decir, clínica de dolor vesical y/o urgencia miccional y demostración cistoscópica de glomerulaciones y/o presencia de úlcera de Hunner clásica. Todas estas pacientes de CI fueron diagnosticadas *de novo* y sin haber recibido tratamiento alguno. A todas las pacientes se les realizó como procedimiento estándar durante su estudio una cistoscopia bajo anestesia con hidrodilatación donde se comprobó la capacidad máxima. Todas las pacientes debían tener al menos 6 meses de seguimiento desde el diagnóstico de CI.

---

Los criterios de inclusión para el grupo control fueron; mujeres mayores de 18 años asintomática y sin sintomatología miccional, con cultivos de orina negativos.

El diagnóstico de las pacientes de dolor pélvico crónico de origen ginecológico fue realizado por el ginecólogo específico de la consulta de dolor pélvico crónico. Las pacientes se diagnosticaron de vulvodinia cuando presentaban dolor vulvar persistente o episódico recurrente relacionados con el ciclo miccional o acompañado de síntomas indicativos de disfunción de las vías urinarias o sexual y ausencia de infección u otra enfermedad evidente conocida (Abrahms, 2003).

La pacientes diagnosticadas de dolor neuropático del pudendo presentaban un dolor de tipo neuropático que surge en la distribución del nervio pudendo con síntomas y signos de disfunción rectal, de las vías urinarias o sexual. Ausencia de una enfermedad evidente conocida. Además como prueba diagnóstica a estas pacientes se les realizo un bloqueo del nervio pudendo y todas ellas mejoraron de su sintomatología (Fall, 2003).

A todas las pacientes para el diagnóstico de endometriosis se les realizó una laparoscopia diagnóstica.

---

El síndrome de dolor asociado a la endometriosis es el dolor pélvico crónico o recurrente en pacientes con endometriosis confirmada por laparoscopia y se utiliza cuando los síntomas persisten a pesar del tratamiento de la endometriosis adecuada. Muchas pacientes tienen dolor por encima y más allá de las lesiones de endometriosis. Los síntomas principales de este grupo de pacientes eran la dispareunia, dismenorrea, y en algunas la hipermenorrea.

### **1.5 Valoración sintomatológica.**

Para la cuantificación objetiva de los signos y síntomas se utilizó el cuestionario de índice de dolor genitourinario (GUPI) que las pacientes rellenaron por sí solas antes de la recogida de muestras de orina.

## **2. Estudio del efecto apoptótico de la orina sobre cultivos celulares**

Este estudio se llevó a cabo en el Instituto de Investigación Príncipe Felipe de Valencia. Para ello se expuso la orina de las pacientes con CI y del grupo control a cultivos de células neoplásicas y se analizó su capacidad para inducir apoptosis. El grado de apoptosis se midió cuantificando el porcentaje de células del ciclo celular en fase subG0 del ciclo celular

---

determinado mediante citometría de flujo. Siguiendo la metodología expuesta en los siguientes apartados.

## **2.1 Líneas celulares, medios de cultivo, productos y equipamiento**

Se utilizaron las líneas celulares HT1197 y EJ138 (línea T24), correspondientes ambas a carcinoma vesical humano (Keay, 2004). La línea HT1197 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y la línea EJ138 de la European Collection of Cell Cultures (ECACC).

Los medios y productos de cultivo utilizados fueron: Medio Esencial Mínimo (MEM), solución de glutamina, solución de antibióticos y suero bovino fetal. Todos los productos se obtuvieron de InVitrogen.

Los reactivos que se utilizaron para el análisis del ciclo celular fueron: yoduro de propidio (Sigma), RNAasa A (Sigma), MTT (Sigma), PBS e Isotón.

El equipamiento disponible para la unidad de cultivos celulares fueron: un sistema de criopreservación en nitrógeno líquido, una cabina de flujo laminar e incubador de CO<sub>2</sub> y un microscopio óptico invertido.

---

## **2.2. Conservación y cultivo de células**

Los viales de células congeladas de las líneas HT1197 y EJ138, procedentes del proveedor, fueron mantenidas desde su recepción hasta el inicio de la fase experimental criopreservados en tanque de nitrógeno líquido. Para el inicio de los cultivos celulares, fueron descongelados y crecidos sucesivamente en frascos Falcon T-25 y Falcon-T-75 (Iwaki), hasta generar un stock suficiente de células. Una parte del stock fue alicuotada en crioviales estériles y se mantuvo en criopreservación hasta su uso. Previamente a los estudios de inhibición de la proliferación, se descongelaron los viales necesarios y crecieron durante una semana en los frascos Falcon T-25, siguiendo los procedimientos habituales de cultivo antes de ser sembrados en placas de cultivo de 96 pocillos (Iwaki).

## **2.3. Conservación y procesamiento de las muestras de orina**

Las muestras de orina de todas las pacientes del estudio fueron mantenidas a 4°C desde su obtención hasta la llegada al laboratorio. Se centrifugaron a baja velocidad para eliminar material sedimentable y, a continuación, fueron filtradas a través de filtros Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro y congeladas a -80°C en alícuotas distribuidas en crioviales

---

estériles hasta su utilización en los estudios de inhibición de la proliferación celular. Inmediatamente antes de su uso, las muestras fueron descongeladas, neutralizadas a pH 7.2 y corregidas en osmolaridad hasta 300 mOsm. Antes de ser adicionadas a los pocillos de las placas de cultivo, las muestras de orinas fueron diluídas 1:2 (v/v) con medio de cultivo completo (Keay 1998).

#### **2.4. Tratamiento con muestras de orina y controles positivos de inhibidores de la proliferación.**

Las líneas celulares HT1197 y EJ138, fueron sembradas con pipeta multicanal en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo (200  $\mu$ L de suspensión celular por pocillo). Tras 24 horas de cultivo en incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo de las placas se eliminó y reemplazó con 180-200  $\mu$ L medio de cultivo fresco. Los pocillos se trataron con 0-20 nL de muestra de orina neutralizada procedente de los sujetos de control o de los pacientes con CI. En cada placa de cultivo se utilizó algunos pocillos como controles positivos de inhibición de la proliferación celular. En dichos pocillos, las células fueron tratadas con 10-20  $\mu$ L de soluciones de agentes antiproliferativos (Sigma) en medio de cultivo Aphidicolina 1 mM (agente bloqueante de la progresión a través de la fase de síntesis del ciclo celular), Nocodazol 1 mM (agente inhibidor de la

---

polimerización de microtúbulos y bloqueante de la progresión de la fase de Mitosis del ciclo celular). Los cultivos celulares así tratados fueron incubados durante 24 horas en incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, hasta su uso para análisis del ciclo celular. Todas las etapas de la preparación se monitorizaron mediante la observación de los cultivos con un microscopio óptico invertido.

### **2.5. Análisis de las fases del ciclo celular por citometría de flujo.**

Un estudio exhaustivo del efecto del tratamiento sobre la proliferación celular se realizó mediante el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Basado en la cuantificación del contenido de DNA nuclear en núcleos individuales en suspensión procedentes de los diferentes pocillos de las placas de cultivo. El contenido en DNA nuclear se estimó por la intensidad de la emisión de fluorescencia naranja del fluorocromo yoduro de propidio, que se intercala de forma estequiométrica en el DNA nuclear. La suspensión nuclear se obtuvo por la lisis hipotónica controlada de la monocapa celular del cultivo. La unión inespecífica del yoduro de propidio al RNA de doble cadena se eliminó mediante tratamiento con RNAasa (Krishan 1975; Báguena-Cervellera 1987, Ruiz-Cerdá, 1996)

---

Tras 24 horas de incubación en presencia de las muestras de orina o los agentes de control positivo, el sobrenadante de los pocillos de las placas de cultivo se reemplazó por una solución hipotónica de yoduro de propidio (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en citrato trisódico (5% p/v) con 0.1% (p/v) de Triton X-100, adicionada de RNAasa (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las placas así tratadas fueron incubadas a 4  $^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad durante la noche. Al día siguiente, se procedió a resuspender los núcleos de cada pocillo mediante pipeteo suave y cuidadoso con pipeta multicanal con volumen desplazado de 100  $\mu\text{L}$ .

Se utilizó el citómetro de flujo Cytomics FC500 MPL, diseñado para aspirar directamente desde pocillos de placa de cultivo. Las células teñidas con yoduro de propidio se excitaron a 488 nm con el láser de argón de 15 mW. La emisión de fluorescencia naranja se recogió a través de un conjunto de filtros de 575 BP + 610 LP y se amplificó en modo lineal, calculando para cada núcleo individual la integral y el pico de la señal de fluorescencia. La eliminación del ruido de fondo y desechos celulares se estableció mediante el análisis de la morfología de cada partícula (señales de dispersión frontal y lateral de luz láser) y la presencia de DNA en la partícula (fluorescencia de propidio). Los agregados de dos o más núcleos fueron excluidos mediante el análisis del cociente entre la señal integral y de

---

pico para cada partícula. Para cada pocillo se analizarán 10.000 núcleos individuales. La distribución del ciclo celular en cada suspensión de núcleos analizada se estableció a partir del histograma de frecuencias de la intensidad de fluorescencia individual en los núcleos individuales analizados en cada pocillo. Para el ajuste de las fases del ciclo celular (G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>+M) se utilizará el programa matemático MultiCycle A V (Phoenix Flow Systems), que aplica un algoritmo para la desconvolución de la distribución de fluorescencia en las curvas gaussianas particulares de cada fase.

## **2.6. Cuantificación del grado de apoptosis por citometría de flujo.**

Al analizar el histograma resultante de las fases del ciclo celular que son representadas (G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>+M) cuando se observaba en el histograma un pico en la fase sub-G<sub>1</sub> este pico en el mismo corresponden a las células apoptóticas, el tamaño de este pico es proporcional al porcentaje de células apoptóticas. Es por ello que la citometría de flujo es una herramienta que permite identificar de manera relativamente sencilla el porcentaje medio de apoptosis con contenido DNA en fase sub G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> (M1)

---

### **3. Mediciones**

Se analizaron las siguientes variables:

VARIABLES CLÍNICAS: sexo, edad y severidad clínica. La severidad clínica se categorizó en leve, moderada y grave en función de la puntuación de los cuestionarios. Leve puntuación menor de 10, moderado entre 10 y 14 y severo mayor de 15.

VARIABLES DEL ESTUDIO CON CITOMETRÍA DE FLUJO DE ADN: número total de células analizadas (eventos), número de células en G1 y G2 y porcentaje de apoptosis.

### **4. Análisis Estadístico.**

Para facilitar el correcto análisis de los datos, la información recogida de cada caso se introdujo en un ordenador personal tipo PC, quedando estructurada en la forma de una base de datos con el programa Gestor de Base de Datos Access 97 (Microsoft). Se utilizó el programa estadístico R (Team 2010) y sus aplicaciones Rcmdr y RcmdrPlugin.EZR. Además, se utilizó el Programa SPSS para Windows versión 20.0 de SPSS Inc.

---

A continuación, se detallan los tipos de análisis estadísticos que se han utilizado con el fin de alcanzar los objetivos propuestos por el estudio.

#### **4.1 Análisis descriptivo.**

Incluyó el cálculo de distintos estadísticos de distribución para las variables cuantitativas (media, mediana, intervalo, desviación típica, valor máximo, valor mínimo) y de frecuencia de sucesos en distintas clases para las variables cualitativas. El cálculo se llevó a cabo mediante las fórmulas habituales. Además, se llevó a cabo una labor de detección de posibles errores, datos faltantes y outliers.

#### **4.2 Análisis comparativo**

Para estudiar la asociación entre variables cualitativas, se realizó la prueba de Chi-Cuadrado mediante la creación de tablas de contingencia y se comparó las proporciones de las características consideradas. En aquellos casos en que uno de la frecuencia observada en alguna de las casillas de la tabla de contingencia fuera inferior a 5 se utilizó la prueba exacta de Fisher.

---

Para la comparación de medias muestrales entre variables continuas cuantitativas se han utilizado la prueba de la t de Student para grupos independientes

. Cuando la variable de referencia tenía más de dos categorías se utilizó un análisis de la varianza de una vía (test de ANOVA). Previamente a la comparación de medias, se llevó a cabo un test Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad y un test de F de Snedecor para comprobar la homogeneidad de las varianzas. En caso de incumplimiento de condiciones de aplicabilidad, se utilizaron los test no paramétricos de Mann-Whitney y test de Kruskal-Wallis. Igualmente, en caso de que las variables cuantitativas incumplieran la normalidad, se llevó a cabo una transformación logarítmica en base 10.

### **4.3 Transformaciones de variables.**

Dado que la variable porcentaje de células en fase G0 no presentaba una distribución normal, se llevó a cabo una transformación logarítmica transformando su escala de medición y logrando una distribución normal.

---

Por otra parte, la variable sintomatológica se categorizó en tres niveles con sus correspondientes códigos. Leve (<9), moderado (10-15) y severo (>15)

#### **4.4 Análisis de la seguridad diagnóstica.**

Para evaluar la capacidad del porcentaje de apoptosis como prueba diagnóstica (prueba de apoptosis) se utilizó la construcción de curvas ROC y tablas de 2 x 2 comparando el diagnóstico realizado por la prueba de apoptosis y el realizado por la prueba de referencia.

*a) Construcción de curvas ROC.-* Se construyeron curvas ROC y se estimó el área por debajo de la misma (AUC) para cuantificar la capacidad discriminativa de la prueba como resumen de seguridad diagnóstica global. Además, se identificaron los puntos de máxima especificidad y sensibilidad según el criterio de proximidad al ángulo superior izquierdo. La selección de puntos de corte definitiva se realizó priorizando la especificidad sobre la sensibilidad para permitir identificar el mayor porcentaje de personas sin CI. De tal forma, se revisaron todos los pares de valores de sensibilidad y especificidad proporcionados por la curva ROC y se eligieron tres para considerar a la prueba de apoptosis como positiva para el diagnóstico de CI:  $\geq 4\%$ ,  $\geq 8\%$  y  $\geq 10\%$ .

---

*b) Construcción de tabla de clasificación de 2 x 2.-* Una vez elegidos los puntos de cortes, se llevó a cabo la categorización de pacientes como enfermos (CI) y no enfermos. Se construyeron tablas de contingencia de doble entrada 2x2 clasificando a todos los individuos de acuerdo al diagnóstico por la prueba de apoptosis frente al diagnóstico estándar. Se evaluó la concordancia de clasificaciones correctas entre pruebas diagnósticas. A partir de estos datos, se realizaron las siguientes estimaciones junto a sus intervalos de confianza: prevalencia, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, seguridad diagnóstica y la razón de probabilidades para test positivo y negativo.

#### **4.5 Análisis de información diagnóstica independiente.**

Para conocer si la prueba de apoptosis aportaba información diagnóstica independiente de la sintomatología en el diagnóstico de CI, se llevaron a cabo tres análisis de regresión logística. De tal forma que, se introdujeron como variable respuesta (diagnóstica) la presencia o no de CI y, como variables explicativas, la severidad sintomatológica junto y la prueba de apoptosis de acuerdo a los tres puntos de corte establecidos. Se estimaron las odds ratio diagnósticas para la prueba de apoptosis positiva

---

para los tres puntos de corte. La variable respuesta se codificó como 1 si la paciente presentaba CI y como 0 si no lo presentaba. Esta codificación responde a que nosotros estamos interesados en conocer la probabilidad de diagnóstico de CI. Para la variable explicativa de los síntomas con tres categorías (leve, moderada y severa), se crearon  $n-1$  variables dummy tomando el primer valor como categoría de referencia. De esta forma se pudo estimar el diferente efecto de pasar de una categoría a otra sobre la variable respuesta. Para la estimación de los coeficientes se utilizó el método de máxima verosimilitud. Para testar la hipótesis de que los coeficientes obtenidos eran diferentes a 0, se utilizó el estadístico de Wald. La interpretación de los coeficientes en la regresión logística fue directa y expresan la unidad de cambio en la variable respuesta por cada unidad de cambio en la variable explicativa. Las odds ratios se calcularon mediante el exponencial del coeficiente con sus correspondientes intervalos de confianza al 95%.

#### **4.6 Análisis de la aplicación clínica.**

Para medir hasta qué punto la probabilidad de presentar CI cambia por el resultado de la prueba de apoptosis, se utilizó el teorema de Bayes.

---

De tal forma que, se calculó la probabilidad de un evento en base a: probabilidad pre-prueba y la información añadida por la prueba. Mediante la razón de probabilidades para test positivo y negativo, se realizó un refinamiento de la capacidad diagnóstica del porcentaje de apoptosis según los puntos de corte para los que se considera la prueba de apoptosis como positiva. La probabilidad pre-prueba se obtuvo de datos previos de la literatura científica. Las probabilidades se convirtieron en odds y la razón de probabilidad positiva se obtuvo de las tablas de 2 x 2.

#### **4.7 Estrategia del análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevo a cabo de forma secuencial por pasos para contestar a las preguntas del estudio: 1º) se realizó una descripción de las variables cuantitativas y cualitativas de la muestra global y por grupos; 2º) para estudiar si la orina de pacientes con CI ejercía un efecto apoptótico sobre cultivos celulares diferente del que ejerce la orina de pacientes normales y la orina de pacientes con otras causas de dolor pélvico crónico de origen no vesical, se realizó un análisis comparativo de medias entre los grupos control, CI y de dolor pélvico y un análisis de la distribución de los valores del porcentaje de apoptosis para cada grupo; 3º) se analizó la

---

seguridad diagnóstica de la prueba de apoptosis mediante el estudio de su capacidad para discriminar entre enfermos y controles sanos, controles con dolor pélvico crónico de origen no vesical y global mediante la construcción de curvas ROC y se determinaron diferentes puntos de cortes para maximizar la especificidad; 4º) se evaluó el rendimiento global de la prueba mediante la construcción de tablas de 2 x 2 estimando los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para cada uno de los puntos de corte previamente establecidos. En este paso, se realizó un refinamiento diagnóstico de la prueba mediante el cálculo de la razón de probabilidad positiva y negativa; 6º), se realizó un modelo de regresión logística para el estudio de la capacidad diagnóstica independiente de la prueba de apoptosis y 7º) la estimación de la verdadera utilidad práctica de la prueba de apoptosis se realizó siguiendo las bases del teorema de Bayes.

## **Capitulo VI: Resultados**



---

## **RESULTADOS**

### **1. Descripción de la muestra global y por grupos.**

La muestra global consta de 156 pacientes distribuidos de la siguiente forma: 57 pacientes con CI (36,5%), 50 (32,1%) controles normales y 49 pacientes (31,4%) con síndrome de dolor pélvico de origen ginecológico (10 vulvodinias, 12 dolores neuropáticos, 27 endometriosis).

De las 57 pacientes, 6 (10,5% ) presentaron una úlcera de Hunner en la cistoscopia.

La edad media de las pacientes fue de 43,85 años  $\pm$  12,2 DE (rango 18 a 69).

### **2. Evaluación sintomatológica**

En la tabla 7 se exponen el grado de severidad de síntomas categorizado de acuerdo al índice GUPI por grupos de pacientes del estudio.

**Tabla 7:** Grado de severidad sintomatológica por grupos de pacientes.

| Síntomas             | Normal<br>n (%) | CI<br>n (%) | D. Pélvico<br>n (%) | <b>Total</b><br>n (%) |
|----------------------|-----------------|-------------|---------------------|-----------------------|
| Leve ( $\leq 9$ )    | 50 (32,1)       | 12 (7,7)    | 0(0)                | 62 (39,7)             |
| Moderada(10-14)      | 0 (0)           | 23 (14,7)   | 12 (7,7)            | 35 (22,4)             |
| Severa ( $\geq 15$ ) | (0)             | 22 (14,1)   | 37 (23,7)           | 59 (37,8)             |
| <b>Total</b>         | 50 (32,1)       | 57 (36,5)   | 49 (31,4)           | 156 (100%)            |

\* Los porcentajes son los globales.

### **3. Análisis del efecto apoptótico de la orina (prueba de apoptosis).**

Para cada uno de los 156 pacientes del estudio se analizó dos veces el efecto de su orina sobre el ciclo celular de las poblaciones de los cultivos celulares tumorales. Por lo que en total, se analizaron 312 ciclos celulares.

En la tabla 8, se exponen los resultados del análisis del ciclo celular de las poblaciones de los cultivos celulares tumorales tras la exposición a la orina de los pacientes de los diferentes grupos. Se comparó la media del número total de células en orina (eventos) y fase G1 donde se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes con CI con el grupo control y grupo de dolor pélvico crónico ginecológico ( $p > 0,05$ ).

---

La media de células en fase G2 de las pacientes del grupo con CI fue significativamente mayor que la de las pacientes del grupo control (35,31±17,4 DE vs 22,00±12,0 DE, p=0,02) y que las del dolor pélvico crónico ginecológico (35,31±17,4 DE vs 27,55±14,8 DE, p=0,02). La media de células en fase S de las pacientes del grupo con CI fue significativamente menor que la de las pacientes del grupo control (19,9±12,06 DE vs 26,02±13,08 DE, p=0,01) y que las del dolor pélvico crónico ginecológico (19,9±12,06 DE vs 25,4±9,22 DE, p=0,01).

La media de la células en el pico sub-G1 de las pacientes del grupo CI fue significativamente mayor que las de las pacientes del grupo control (278,8±287,14 DE vs 147±109 DE, p=0,02) y que las pacientes del grupo de dolor pélvico crónico ginecológico (278,78±287,14 DE vs 168±103 DE p=0,02).

**Tabla 8.** Valores de la distribución porcentual de células en las diferentes fases del ciclo celular por grupos de pacientes.

| Fases Ciclo Celular | Normal<br>(n=50) | CI<br>(n=57) | Dolor<br>Pélvico<br>(n=49) | Valor<br>de p           |
|---------------------|------------------|--------------|----------------------------|-------------------------|
| <b>Nº eventos,</b>  |                  |              |                            |                         |
| - Media             | 4601             | 4715,1       | 4235                       | 0,80                    |
| - DE                | 2168,31          | 2455,85      | 1943,86                    |                         |
| <b>Pico subG1,</b>  |                  |              |                            |                         |
| - Media             | 147              | 278,80       | 168,0                      | <b>0,02</b>             |
| - DE                | 109,0            | 287,14       | 103,0                      |                         |
| <b>% fase G1</b>    |                  |              |                            |                         |
| - Media             | 46,30            | 44,70        | 45,30                      | 0,87                    |
| - DE                | 11,29            | 15,10        | 9,6                        |                         |
| <b>% faseG2</b>     |                  |              |                            |                         |
| - Media             | 22               | 35,31        | 27,55                      | <b>0,02<sup>1</sup></b> |
| - DE                | 12,03            | 17,47        | 14,8                       |                         |
| <b>% fase S</b>     |                  |              |                            |                         |
| - Media             | 26,2             | 19,9         | 25,41                      | <b>0,01<sup>2</sup></b> |
| - DE                | 13,08            | 12,06        | 9,22                       |                         |

<sup>1</sup> Control *versus* Cistitis Intersticial; valor de p= 0,02; CI 95% diferencia= 8,0 – 9,0

Cistitis Intersticial *versus* Dolor Pélvico; valor de p= 0,02; CI 95% diferencia= 3,2 – 8,1

<sup>2</sup> Grupo Control *versus* Cistitis Intersticial valor de p= 0,01; CI 95% diferencia= 6,0 – 12,1

Cistitis Intersticial *versus* Dolor Pélvico; valor de p= 0,02; CI 95% diferencia = 6,4 - 13,7

---

En la tabla 9 se expone el valor medio del porcentaje de apoptosis y el valor de su transformación logarítmica para cada uno de los grupos a estudio. Los valores medios de apoptosis de los pacientes con CI fueron significativamente muy superiores a los de los pacientes controles sanos ( $p=0,001$ ). La diferencia estimada al 95% de IC a favor de los pacientes de CI fue entre un 3,7% y 9,0%. Con respecto a los pacientes con dolor pélvico ginecológico, los porcentajes medios de apoptosis fueron también significativamente superiores en los pacientes con CI ( $p=0,001$ ). Si bien, las diferencias en el porcentaje medio estimadas al 95% fueron ligeramente inferiores entre un 2,9% y un 8,1.

**Tabla 9.** Comparación de los porcentajes medios de apoptosis por grupos de pacientes.

| Efecto               | Control          | Cistitis               | Dolor             | Valor de p                  |
|----------------------|------------------|------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Apoptótico           | Normal<br>(n=50) | Intersticial<br>(n=57) | Pélvico<br>(n=49) |                             |
| n° subG1             |                  |                        |                   |                             |
| Media±DE             | 147 ± 109        | 278 ± 287,8            | 168 ± 103         | <b>0,02</b>                 |
| %Apoptosis           |                  |                        |                   |                             |
| Media±DE             | 3,60 ± 2,8       | 9,97 ± 9,5             | 4,46 ± 4,2        | <b>&lt;0,01<sup>1</sup></b> |
| Log10 %<br>Apoptosis |                  |                        |                   |                             |
| -Media±DE            | 0,41 ± 0,3       | 0,74 ± 0,5             | 0,58 ± 0,25       | <b>&lt;0,01<sup>2</sup></b> |

<sup>1</sup> Control *versus* Cistitis Intersticial; valor de p= 0,0014; CI 95% diferencia= 3,7 – 9,0

Cistitis Intersticial *versus* Dolor Pélvico; valor de p= 0,00979. CI 95% diferencia= 2,9 – 8,1

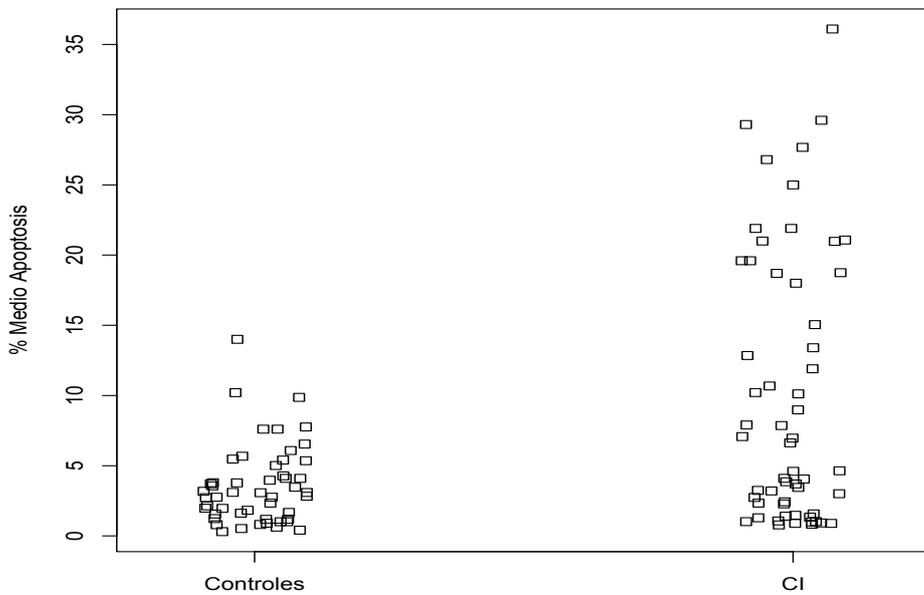
<sup>2</sup> Grupo Control *versus* Cistitis Intersticial valor de p= 0,03; CI 95% diferencia= 0,49 – 0,15  
Grupo Cistitis Intersticial *versus* Grupo Dolor Pélvico; valor de p= 0,04. CI 95% diferencia= 0,001 – 0,3.

### 3.1 Distribución de valores de apoptosis entre el grupo control y el de CI.

En la figura 5, se exponen la distribución de los valores del porcentaje medio de apoptosis de los grupos control y CI.

---

Se aprecia cómo únicamente tres pacientes del grupo control (3/50, 6%) superan el 10% de apoptosis. Por el contrario, en los pacientes con CI, el valor del porcentaje de apoptosis se distribuye ampliamente alcanzado en uno de los casos el 35%.

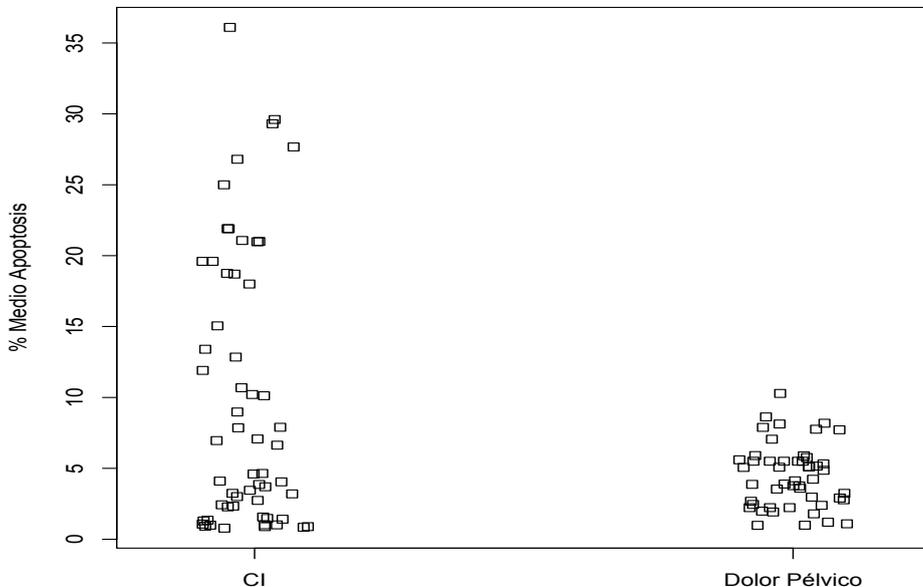


**Figura 5:** Distribución de los resultados del efecto apoptótico medido como porcentaje medio de apoptosis en los grupos control y de CI.

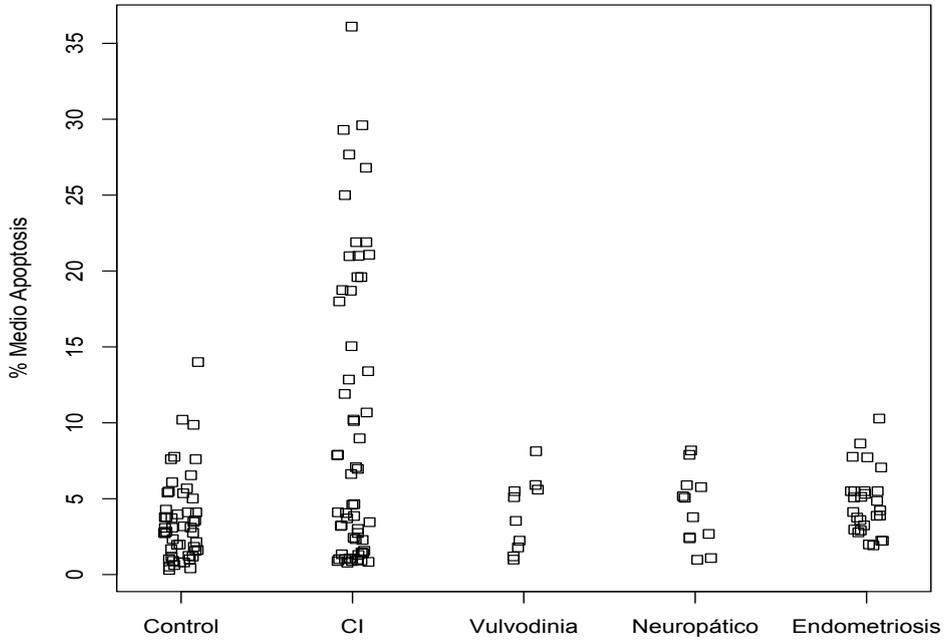
---

### 3.2 Distribución de valores de apoptosis entre el grupo de CI y el de dolor pélvico.

En la figura 6 se exponen la distribución de los valores del porcentaje medio de apoptosis de los grupos CI y de dolor pélvico crónico ginecológico. Se aprecia claramente que, mientras que la distribución del porcentaje de apoptosis para las pacientes de CI es amplia y, algunas de ellas, alcanza hasta un 35% de apoptosis, ningún paciente con dolor pélvico supera el 10% de apoptosis. En la figura 7 se exponen la misma distribución de valores del porcentaje medio de apoptosis por patologías.



**Figura 6:** Distribución de los resultados del efecto apoptótico medido como porcentaje medio de apoptosis en de CI y dolor pélvico ginecológico.



**Figura 7:** Distribución de los resultados del efecto apoptótico medido como porcentaje medio de apoptosis en los grupos control, CI y en las diferentes patologías causantes de dolor pélvico ginecológico.

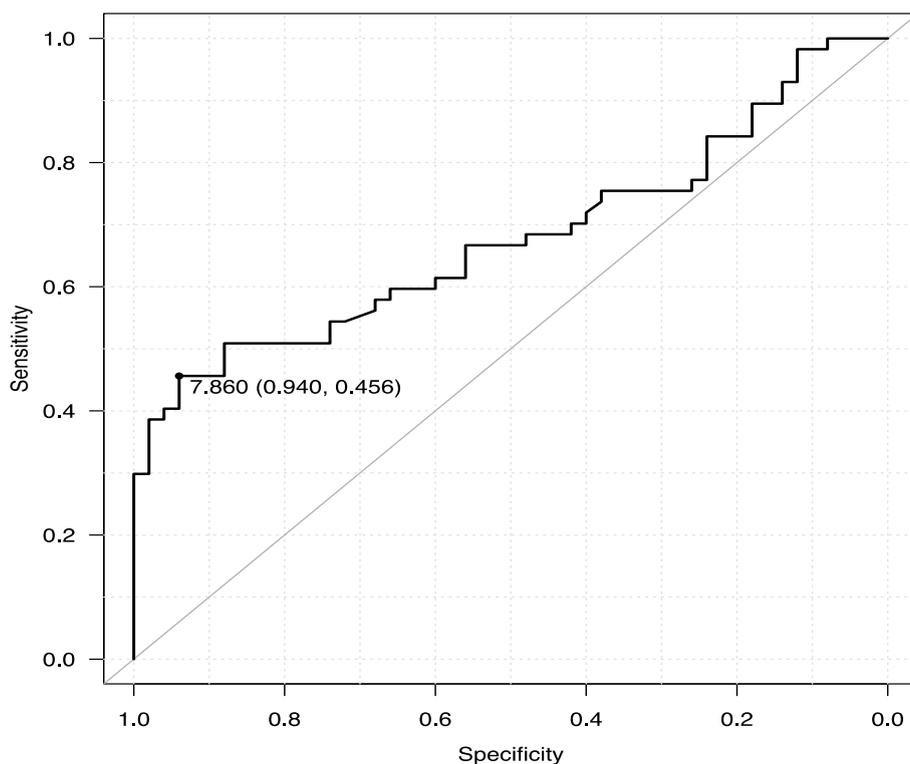
---

#### **4. Análisis de la seguridad diagnóstica de la prueba de apoptosis.**

##### **4.1 Estudio de la capacidad discriminativa de la prueba de apoptosis para el diagnóstico de CI frente a controles sanos, dolor pélvico crónico de origen no vesical y en conjunto.**

En la figura 8 se muestra la curva ROC que analiza la capacidad discriminativa del porcentaje de apoptosis entre los grupos de pacientes de CI (57 casos) y controles sanos (50 casos).

El valor de la AUC como índice resumen del funcionamiento de la prueba de apoptosis para el diagnóstico de CI fue de 68% (95% IC: 57%-78%). Lo cual se interpreta como buena. Considerando a la prueba de apoptosis como positiva para un valor de corte un porcentaje de apoptosis  $\geq 7.9$ , se obtiene una especificidad del 94% y una sensibilidad del 46% para el diagnóstico de CI frente a los controles sanos.

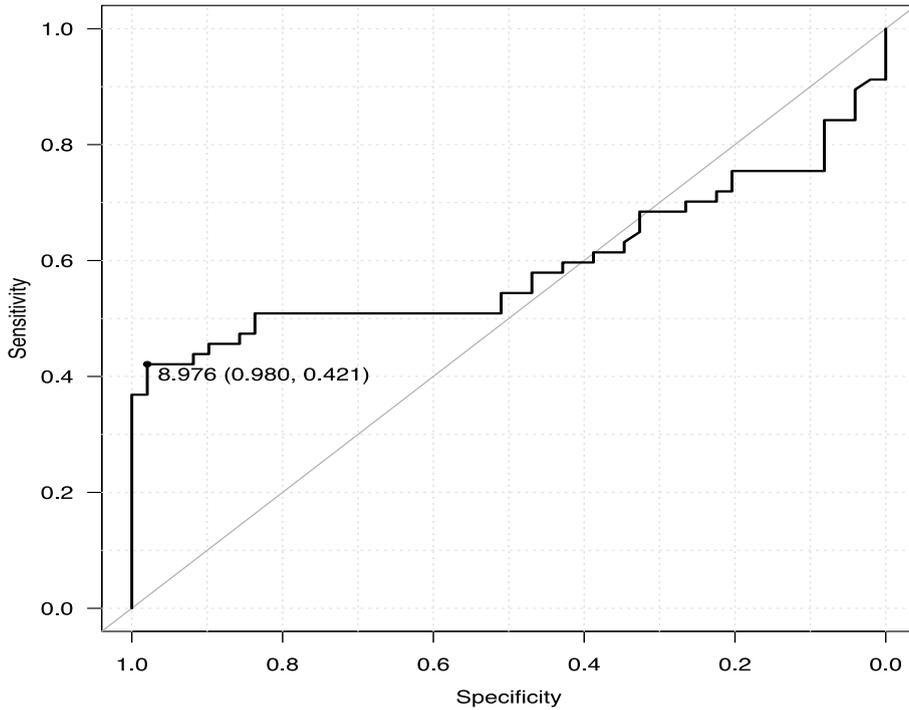


**Figura 8:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a controles sanos (AUC= 68%, 95% IC 57-78%).

En la figura 9 se muestra la curva ROC que analiza la capacidad discriminativa del porcentaje de apoptosis entre los grupos de pacientes de CI (57 casos) y pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico (49 casos). El valor de la AUC es de 59%, (95% IC 48-70%), lo cual puede interpretarse como suficiente. Considerando a la prueba de apoptosis como

---

positiva para un valor de corte de porcentaje de apoptosis  $\geq 9$ , se obtiene una especificidad de 98% y una sensibilidad del 42%.

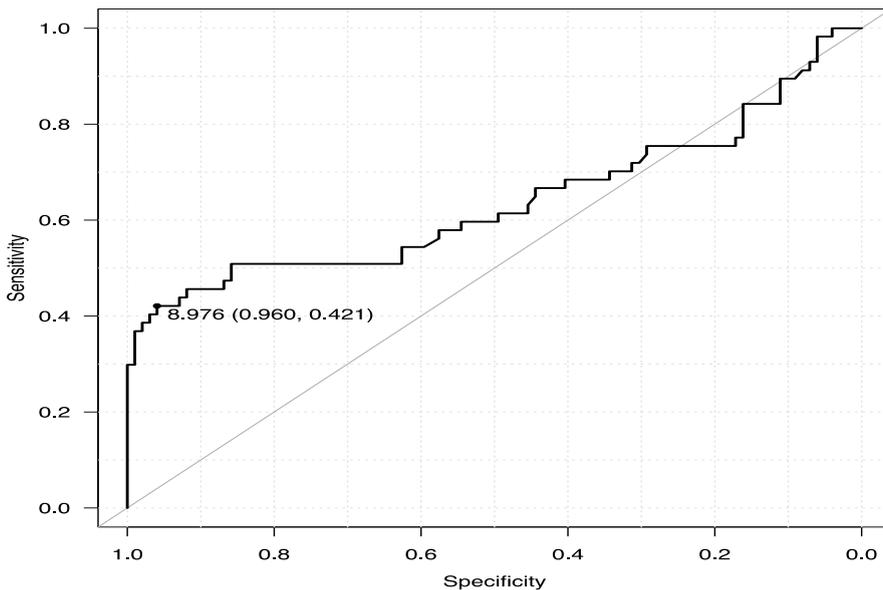


**Figura 9:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a sujetos con dolor pélvico crónico ginecológico (AUC= 59%, 95% IC 48-70%).

En la figura 10 se muestran la curva ROC que analiza la capacidad discriminativa del porcentaje de apoptosis entre los grupos de pacientes de CI (57 casos) y el resto de pacientes, sin tener en cuenta la sintomatología.

---

Es decir, considerándoles como pacientes sin CI, independientemente de si presentan dolor o no (99 casos, 49 casos con dolor pélvico crónico ginecológico y 50 controles sanos). El valor de la AUC es de 64% (95% CI: 53%-74%), lo cual puede interpretarse como suficiente. Considerando a la prueba de apoptosis como positiva para un valor de corte  $\geq 9$ , se obtiene una especificidad de 96% y una sensibilidad del 42%.



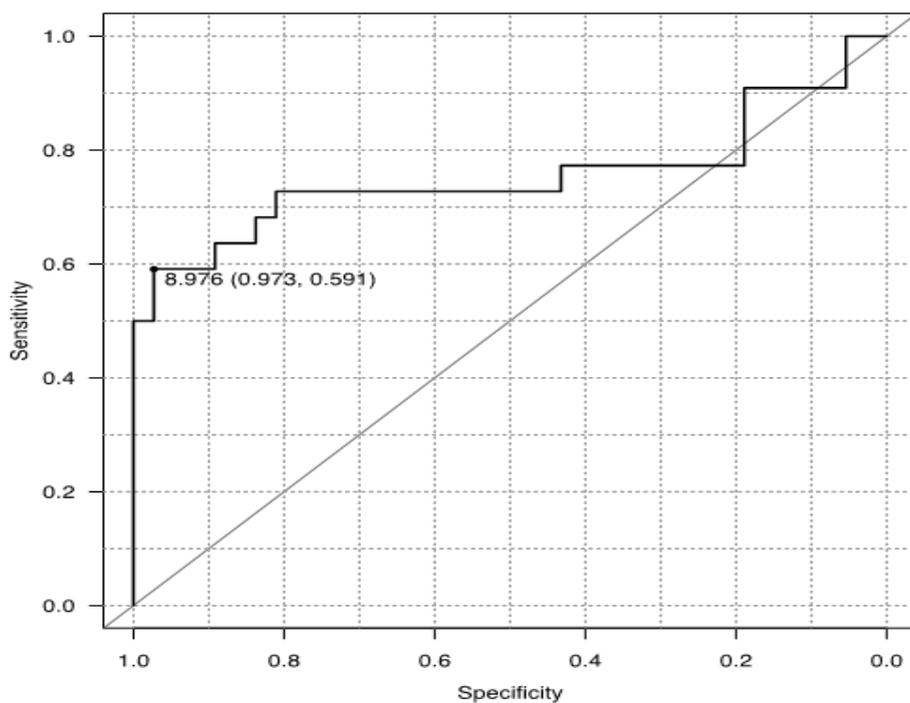
**Figura 10:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente casos sin CI (AUC= 64 %, 95% IC 53-74%).

---

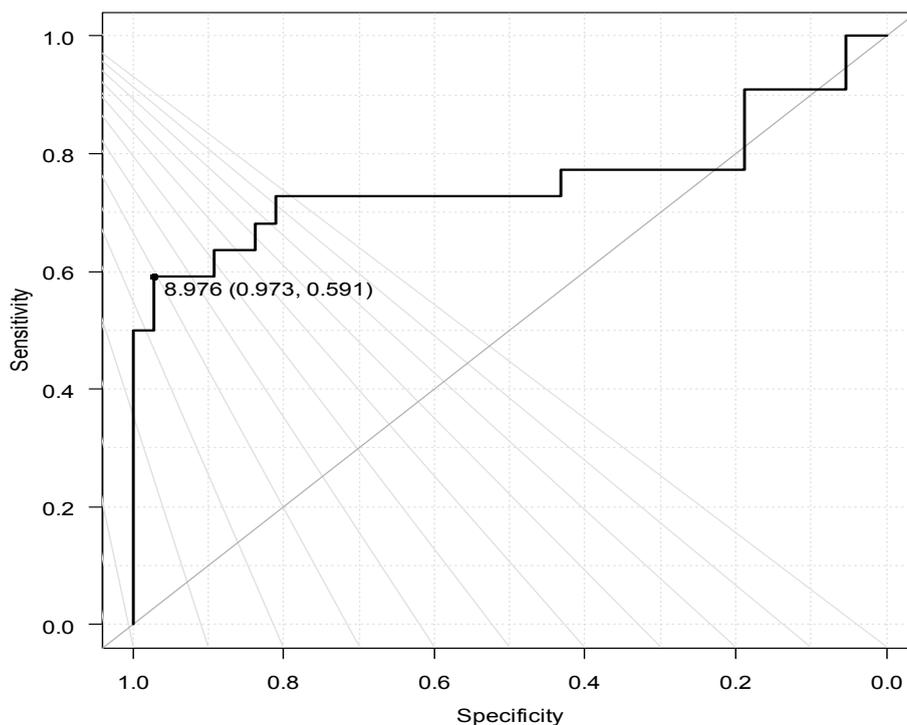
## **4.2 Estudio de la capacidad discriminativa de la prueba de apoptosis estratificada por severidad sintomatológica.**

Dado que los pacientes sanos y un grupo de pacientes con CI presentan valores de porcentaje de apoptosis bajos, se llevó a cabo un análisis estratificado por grupos de severidad sintomatológica para conocer la capacidad discriminativa de la prueba en donde más se necesita, es decir, cuando la sintomatología es moderada o severa entre grupos de pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico.

El AUC de la curva de ROC de la prueba de apoptosis para discriminar entre pacientes con el diagnóstico de CI (n=23) frente a sujetos con dolor pélvico crónico no visceral (n= 12) con sintomatología moderada (9-15) fue suficiente con un valor de 68% (95% IC 50-86%) (figura 11). La AUC aumentó en la discriminación entre pacientes con sintomatología severa (> 15) alcanzando un valor del 75% (95% IC 60-91%), lo que se considera una buena capacidad discriminativa (Figura 12).



**Figura 11:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a sujetos con dolor pélvico crónico ajustado por sintomatología moderada (9-15).



**Figura 12:** Curva ROC del % medio de apoptosis indicando el punto de corte que maximiza la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de CI frente a sujetos con dolor pélvico crónico ginecológico ajustado por sintomatología severa ( $> 15$ ).

### **4.3 Prueba de apoptosis como método diagnóstico de enfermedad frente a controles sanos.**

Teniendo en cuenta los valores de máxima discriminación diagnóstica donde la sensibilidad y especificidad alcanzan su valor máximo, y dado que en un porcentaje de pacientes con CI presentaban valores de la prueba de apoptosis similares a pacientes control normales, se decidieron

tres puntos de corte para considerar la prueba de apoptosis como positiva para enfermedad de CI:  $\geq 4\%$ ,  $\geq 8\%$  y  $\geq 10\%$ .

En la tabla 10, 11 y 12 se exponen los resultados de la comparación entre el diagnóstico de CI realizado según prueba de apoptosis positiva de acuerdo a los puntos de corte considerados y el diagnóstico estándar (57 pacientes con CI frente a 50 controles sanos). En la tabla 13 se exponen los resultados del rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis con el análisis de validez (sensibilidad y especificidad) y seguridad (valor predictivo positivo y negativo), seguridad diagnóstica global y razones de probabilidad positiva y negativa calculados a partir de las tablas anteriores.

**Tabla 10.** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 4\%$  y el estándar.

| Prueba Apoptosis<br>$\geq 4\%$ | Cistitis Intersticial |    | Total |
|--------------------------------|-----------------------|----|-------|
|                                | Si                    | No |       |
| Si                             | 33                    | 16 | 49    |
| No                             | 24                    | 34 | 58    |
| Total                          | 57                    | 50 | 107   |

**Tabla 11.** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 8\%$  y el estándar.

| Prueba Apoptosis<br>$\geq 8\%$ | Cistitis Intersticial |    | Total |
|--------------------------------|-----------------------|----|-------|
|                                | Si                    | No |       |
| Si                             | 24                    | 3  | 27    |
| No                             | 33                    | 47 | 80    |
| Total                          | 57                    | 50 | 107   |

**Tabla 12:** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 10\%$  y el estándar.

| Prueba Apoptosis<br>$\geq 10\%$ | Cistitis Intersticial |    | Total |
|---------------------------------|-----------------------|----|-------|
|                                 | Si                    | No |       |
| Si                              | 23                    | 2  | 25    |
| No                              | 34                    | 48 | 82    |
| Total                           | 57                    | 50 | 107   |

**Tabla 13:** Rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis según puntos de corte para diagnóstico de CI frente a controles sanos.

|                           | Apoptosis $\geq 4\%$<br>Estimación (IC 95%) | Apoptosis $\geq 8\%$<br>Estimación (IC 95%) | Apoptosis $\geq 10\%$<br>Estimación (IC 95%) |
|---------------------------|---|---|--|
| Prevalencia               | 0.53 (0.43-0.63)                            | 0.53 (0.43-0.63)                            | 0.53 (0.43-0.63)                             |
| Sensibilidad              | 0.58 (0.44-0.71)                            | 0.42 (0.29-0.56)                            | 0.40 (0.27-0.54)                             |
| Especificidad             | 0.68 (0.53-0.80)                            | 0.94 (0.83-0.99)                            | 0.96 (0.86-0.99)                             |
| Valor Predictivo positivo | 0.67 (0.52-0.80)                            | 0.89 (0.70-0.98)                            | 0.92 (0.74-0.99)                             |
| Valor Predictivo negativo | 0.58 (0.44-0.71)                            | 0.66 (0.56-0.75)                            | 0.66 (0.57-0.75)                             |
| Seguridad diagnóstica     | 0.62 (0.52-0.71)                            | 0.65 (0.55-0.74)                            | 0.67 (0.57-0.76)                             |
| Razón probabilidad test + | 1.80 (1.14-2.87)                            | 7.02 (2.25-21.91)                           | 10.1 (2.50-40.67)                            |
| Razón probabilidad test - | 0.62 (0.43-0.897)                           | 0.62 (0.49-.77)                             | 0.62 (0.50-0.77)                             |

---

De acuerdo a estos resultados, si consideramos como resultado positivo valores  $\geq 4\%$  de la prueba de apoptosis, el test presenta una sensibilidad de 58% (95% IC= 44% - 71%) y una especificidad de 68% (95% IC= 53% - 80%). Lo que significa que de 100 pacientes con CI, el test únicamente diagnostica correctamente 58 casos (58% de verdaderos positivos, 33 de 58). Por otro lado, de 100 pacientes sanos sin CI, el test diagnostica 68 correctamente (tasa de verdaderos negativos del 68%, 34 de 50). El porcentaje global de diagnósticos correctos que proporciona la prueba con este punto de corte es 62%, lo que expresa una seguridad diagnóstica baja. La baja sensibilidad es consecuencia de que las pacientes con baja sintomatología, presentan valores de prueba de apoptosis semejantes a los controles sanos.

En la muestra a estudio, la prevalencia de pacientes con CI es del 53%, por lo que el valor predictivo positivo y negativo para el punto de corte  $\geq 4\%$  fue del 67% y 58% respectivamente. Lo que significa que, de 100 pacientes, 67 en los que la prueba da positiva para CI tienen realmente CI. Por otra parte, de 100 pacientes, 58 en los que la prueba da como negativa para CI, realmente no presentan CI.

Para el mismo punto de corte, la razón de probabilidad positiva es de 1.80 (prácticamente 1) lo que indica que la prueba no posee ningún valor

---

para distinguir entre pacientes con y sin CI. Ya que, la probabilidad de un resultado positivo de la prueba es igual para pacientes con CI que sin CI (controles sanos).

Para un valor  $\geq 8\%$  de la prueba de apoptosis como resultado positivo, se observa un aumento sustancial de la especificidad (94%), valor predictivo positivo (89%) y negativo (66%) y la razón de probabilidad positiva (7.02). Por otra parte, disminuye la sensibilidad y la razón de probabilidad negativa se mantiene. En general, la seguridad diagnóstica del test alcanza el 65%. Sin embargo, el último criterio para la utilización de un test diagnóstico es si añade información por encima de la que ya disponemos, y si dicha información nos permite llevar cambios en el manejo del paciente que, en última instancia, le rendirá un beneficio. Mientras que un valor de 7 de razón de probabilidad positivo aumenta la probabilidad de CI en un 30% ayuda moderadamente al diagnóstico de CI, el valor de 0,62 de la razón de probabilidad negativo no permite descartar su presencia cuanto el valor es negativo, ya que aumenta la probabilidad de ausencia de enfermedad en menos del 15%.

Finalmente, con valor  $\geq 10\%$  de la prueba de apoptosis como resultado positivo, se observan pequeños aumentos de la especificidad (96%), el valor predictivo positivo (92%) y la razón de probabilidad positiva

---

(10.1). Lo que significa que, la probabilidad de que un paciente presente una CI si el valor de la prueba de apoptosis es  $\geq 10\%$ , aumenta en un 45%. Este aumento ayuda en gran medida al diagnóstico de CI. Por otro lado, con este punto de corte la razón de probabilidad negativa sigue siendo de 0.62. Por lo que, lógicamente, no permite descartar la presencia CI cuanto el valor de la prueba de apoptosis es negativa ( $< 10\%$ ).

#### **4.4 Prueba de apoptosis como método diagnóstico de enfermedad frente a pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico.**

En la tabla 14, 15 y 16 se exponen los resultados de la comparación entre el diagnóstico de CI realizado según prueba de apoptosis positiva de acuerdo a los puntos de corte considerados y el diagnóstico estándar entre grupos de pacientes con CI y con dolor pélvico crónico ginecológico (57 pacientes con CI frente a 49 con síndrome de dolor pélvico crónico ginecológico). En la tabla 17, se exponen los resultados del rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis.

Con valor  $\geq 4\%$  de la prueba de apoptosis como resultado positivo, la sensibilidad se mantiene (57%, 95% IC= 0.44-0.70) pero la especificidad baja considerablemente al 0.46 (95%, IC= 0.32-0.61). Lo que significa, que frente a pacientes con dolor pélvico crónico de origen ginecológico este punto de corte no permite un diagnóstico diferencial. El porcentaje global de

diagnósticos correctos del 52% expresa una seguridad diagnóstica muy baja. Igualmente, los valores predictivo positivo y negativo son bajos (55% y 48% respectivamente) y el valor bajo de la razón de probabilidad positiva (prácticamente 1) indican que la prueba positiva no posee ningún valor para distinguir entre pacientes con y sin CI.

**Tabla 14:** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 4\%$  y el estándar.

| Prueba Apoptosis | Cistitis Intersticial |    | Total |
|------------------|-----------------------|----|-------|
|                  | $\geq 4\%$            |    |       |
| Si               | 33                    | 26 | 59    |
| No               | 24                    | 23 | 47    |
| Total            | 57                    | 49 | 106   |

Con valor  $\geq 8\%$  de la prueba de apoptosis como resultado positivo, se observa un aumento sustancial en la especificidad (91%), valor predictivo positivo (85%) y la razón de probabilidad positiva (5.16). Por otra parte, disminuyen la sensibilidad, valor predictivo negativo y la razón de probabilidad negativa, aunque, en menor medida. En general, la seguridad

diagnóstica del test alcanza el 65%. El valor de 5 de razón de probabilidad positivo aumenta la probabilidad de CI en un 30%, lo cual ayuda moderadamente al diagnóstico de CI. Sin embargo, el valor de la razón de probabilidad negativo de 0,89 no permite descartar en absoluto su presencia cuanto la prueba es negativa ( $< 8\%$ ).

**Tabla 15:** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 8\%$  y el estándar.

| Prueba Apoptosis | Cistitis Intersticial |    | Total |
|------------------|-----------------------|----|-------|
|                  | Si                    | No |       |
| $\geq 8\%$       |                       |    |       |
| Si               | 24                    | 4  | 28    |
| No               | 33                    | 45 | 78    |
| Total            | 57                    | 49 | 106   |

Con valor  $\geq 10\%$  de prueba de apoptosis como resultado positivo, se observa un aumento de la especificidad (98%), valor predictivo positivo (95%) y, de manera muy pronunciada la razón de probabilidad positiva (19.7). Lo que significa que cuando estamos ante un paciente con clínica de dolor pélvico crónico de origen o no vesical, la probabilidad de que tenga una CI cuando la prueba de apoptosis es positiva para un valor  $\geq 10\%$ ,

aumenta en un 45%. Este aumento ayuda en gran medida al diagnóstico diferencial. Por otro lado, con este punto de corte la razón de probabilidad negativa baja al 0.61, lo que significa que si el valor del % de apoptosis medio es inferior a 10% se reduce la probabilidad de presentar una CI en aproximadamente en un 15%.

**Tabla 16:** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 10\%$  y el estándar.

| Prueba Apoptosis | Cistitis Intersticial |    | Total |
|------------------|-----------------------|----|-------|
|                  | Si                    | No |       |
| $\geq 10\%$      |                       |    |       |
| Si               | 23                    | 1  | 24    |
| No               | 34                    | 48 | 82    |
| Total            | 57                    | 49 | 106   |

**Tabla 17:** Rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis de acuerdo a diferentes puntos de corte para establecer el diagnóstico de CI.

|                           | Apoptosis $\geq 4\%$ | Apoptosis $\geq 8\%$ | Apoptosis $\geq 10\%$ |
|---------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|                           | Estimación (IC 95%)  | Estimación (IC 95%)  | Estimación (IC 95%)   |
| Prevalencia               | 0.53 (0.43-0.63)     | 0.53 (0.43-0.63)     | 0.53 (0.43-0.63)      |
| Sensibilidad              | 0.57 (0.44-0.70)     | 0.42 (0.29-0.55)     | 0.40 (0.27-0.55)      |
| Especificidad             | 0.47 (0.32-0.61)     | 0.91 (0.80-0.97)     | 0.98 (0.89-0.99)      |
| Valor Predictivo positivo | 0.55 (0.42-0.68)     | 0.85 (0.67-0.96)     | 0.95 (0.78-0.99)      |
| Valor Predictivo negativo | 0.48 (0.34-0.63)     | 0.57 (0.34-0.69)     | 0.58 (0.47-0.69)      |
| Seguridad diagnóstica     | 0.52 (0.42-0.62)     | 0.65 (0.55-0.74)     | 0.67 (0.57-0.76)      |
| Razón probabilidad test + | 1.09 (0.77-1.56)     | 5.16 (1.92-13.84)    | 19.7 (2.77-140.12)    |
| Razón probabilidad test - | 0.89 (0.58-1.37)     | 0.89 (0.58-1.37)     | 0.61 (0.49-0.75)      |

---

#### **4.5 Prueba de apoptosis como método diagnóstico de enfermedad frente al resto de pacientes con o sin dolor pélvico crónico ginecológico.**

Para poder evaluar la prueba de la apoptosis de forma global sin tener en cuenta la sintomatología, se llevó a cabo el mismo análisis de seguridad diagnóstica comparando el diagnóstico de CI según prueba de apoptosis positiva de acuerdo a los puntos de corte considerados y el diagnóstico estándar entre grupos de pacientes con CI frente al resto de pacientes incluidos como un solo grupo (57 pacientes con CI frente a 99 pacientes correspondientes a 50 controles sanos + 49 con dolor pélvico crónico no vesical). En la tabla 18, 19 y 20 se exponen los resultados de la comparación y en la tabla 21 se exponen los resultados del rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis.

Se observa que el mejor rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis se consigue con el valor de corte igual o superior al 10%. Si bien la sensibilidad es muy baja, (40%, 95% IC= 0.27-0.55), la especificidad y el valor predictivo positivo son muy elevados con un 98% (95% IC= 89-99%) y 95% (95% IC= 78-99) respectivamente. Lo que significa que ante 100 pacientes en los que no conociéramos su sintomatología, la prueba de apoptosis solo detectaría 40 con CI. Sin embargo, podría descartarse casi por completo su presencia ante una prueba de apoptosis inferior al 10%

El porcentaje global de diagnósticos correctos con este corte es del 76%, lo que expresa buena seguridad diagnóstica. Por último, la razón de probabilidad positiva sigue siendo elevada por encima de 10 (13.3, 95% IC=4.18-42.40) y la negativa se mantiene en el 0.61 (95% IC = 0.49-0.75).

**Tabla 18.** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 4\%$  y el estándar, independiente de la sintomatología.

| Prueba Apoptosis | Cistitis Intersticial |    | Total |
|------------------|-----------------------|----|-------|
|                  | Si                    | No |       |
| $\geq 4\%$       |                       |    |       |
| Si               | 33                    | 42 | 75    |
| No               | 24                    | 57 | 81    |
| Total            | 57                    | 99 | 156   |

**Tabla 19.** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis (positiva  $\geq 8\%$ ) y el estándar, independiente de la sintomatología.

| Prueba Apoptosis | Cistitis Intersticial |    | Total |
|------------------|-----------------------|----|-------|
|                  | Si                    | No |       |
| $\geq 8\%$       |                       |    |       |
| Si               | 24                    | 7  | 31    |
| No               | 33                    | 92 | 125   |
| Total            | 57                    | 99 | 156   |

---

**Tabla 20.** Diagnóstico de CI según prueba apoptosis positiva  $\geq 10\%$  y el estándar, independiente de la sintomatología.

---

| Prueba Apoptosis<br>$\geq 8\%$ | Cistitis Intersticial |    | Total |
|--------------------------------|-----------------------|----|-------|
|                                | Si                    | No |       |
| Si                             | 23                    | 3  | 26    |
| No                             | 34                    | 96 | 130   |
| Total                          | 57                    | 99 | 156   |

---

**Tabla 21:** Rendimiento diagnóstico de la prueba de apoptosis de acuerdo a diferentes puntos de corte para establecer el diagnóstico de CI (Independiente de sintomatología).

|                           | Apoptosis $\geq 4\%$<br>Estimación (IC 95%) | Apoptosis $\geq 8\%$<br>Estimación (IC 95%) | Apoptosis $\geq 10\%$<br>Estimación (IC 95%) |
|---------------------------|---|---|--|
| Prevalencia               | 0.36 (0.29-0.45)                            | 0.36 (0.29-0.45)                            | 0.36 (0.29-0.45)                             |
| Sensibilidad              | 0.57 (0.44-0.71)                            | 0.42 (0.29-0.56)                            | 0.40 (0.28-0.54)                             |
| Especificidad             | 0.57 (0.47-0.68)                            | 0.93 (0.86-0.97)                            | 0.97 (0.91-0.99)                             |
| Valor Predictivo positivo | 0.44 (0.32-0.56)                            | 0.77 (0.58-0.90)                            | 0.88 (0.69-0.97)                             |
| Valor Predictivo negativo | 0.70 (0.59-0.80)                            | 0.73 (0.65-0.81)                            | 0.74 (0.65-0.81)                             |
| Seguridad diagnóstica     | 0.58 (0.49-0.65)                            | 0.74 (0.67-0.81)                            | 0.76 (0.68-0.82)                             |
| Razón probabilidad test + | 1.36 (0.99-1.88)                            | 6.00 (2.74-13.0)                            | 13.3 (4.18-42.40)                            |
| Razón probabilidad test - | 0.73 (0.52-1.04)                            | 0.62 (0.50-0.78)                            | 0.61 (0.49-0.76)                             |

---

## **5. Análisis del efecto apoptótico como biomarcador de severidad de enfermedad clínica.**

Se llevó a cabo un análisis de la asociación entre el grado del efecto apoptótico y la sintomatológica categorizada por grupos de severidad y sin categorizar para cada grupo de pacientes.

### **5.1 Grado del efecto apoptótico y sintomatológica categorizada por grupos de severidad en pacientes con CI.**

En la tabla 22 se exponen los porcentajes medios de apoptosis, expresados con valores crudos y mediante transformación logarítmica, por grados de severidad sintomatológica en el grupo de pacientes con CI. Se aprecia un aumento significativo de los porcentajes medios de apoptosis conforme aumenta el grado de severidad sintomatológica. De tal forma que, en la comparación múltiple entre los grupos, se encontraron diferencias significativas entre grupos de leve *versus* moderada ( $p= 0,0014$ ; diferencia= 7.02, IC 95%= 1,8 – 14,0), severa *versus* leve ( $p= 0,001$ ; CI 95% diferencia= 6,2 – 11,1) y moderada *versus* severa ( $p= 0,53$ . CI 95% diferencia = 3,7 -7,1). Estas diferencias fueron más acusadas en la variable con transformación logarítmica. En la figura 13, se muestran estas diferencias gráficamente.

**Tabla 22:** Grado del efecto apoptótico por severidad sintomatológica (GUPI) en grupo pacientes con CI.

| Efecto Apoptótico | Síntomas (GUPI) |                |               | Valor p            |
|-------------------|-----------------|----------------|---------------|--------------------|
|                   | Leve(n=12)      | Moderada(n=23) | Severa (n=22) |                    |
| %Apoptosis        |                 |                |               |                    |
| -Media±DE         | 3,3±2,7         | 10,3±10,3      | 12,0 ± 8,4    | <0,01 <sup>1</sup> |
| Log10 %           |                 |                |               |                    |
| Apoptosis         | 0,33±0,3        | 0,69 ± 0,3     | 0,95 ± 0,3    | <0,01 <sup>2</sup> |
| -Media±DE         |                 |                |               |                    |

<sup>1</sup>Leve *versus* Moderada; valor de p= 0,0014.Diferencia= 7.02 (IC 95% = 1,8 – 14,0).

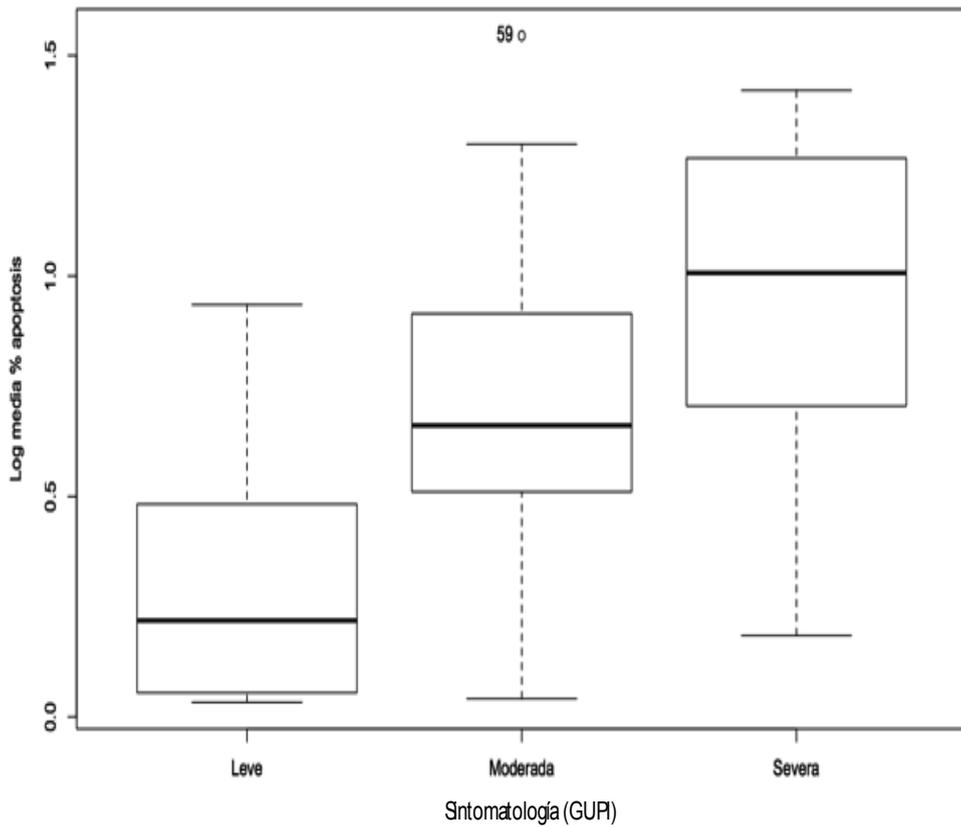
Leve *versus* Severa; valor de p= 0,001.Diferencia=8,66, (IC 95%= 6,2 – 11,1).

Moderada *versus* Severa; valor de p= 0,53.Diferencia= 1,68 (IC 95% = 3,7 -7,1).

<sup>2</sup>Leve *versus* Moderada; valor de p= 0,0014. Diferencia= 0,66,(IC 95%= 0,06 – 0,65).

Leve *versus* Severa; valor de p= 0,001.Diferencia = 0,62 (IC95% = 0,31 – 0,91)

Moderada *versus* Severa; valor de p= 0,04.Diferencia= 0,26 (IC 95% = 0,01-0.5)



**Figura 13:** Comparación mediante diagrama de cajas de la distribución del logaritmo del porcentaje medio de apoptosis por grupo de síntomas según el GUPI leve ( $\leq 9$ ) moderada (10-14) y severa ( $\geq 15$ ) en el grupo de pacientes con CI.

---

## **5.2 Grado del efecto apoptótico y sintomatología categorizada por grupos de severidad en pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico.**

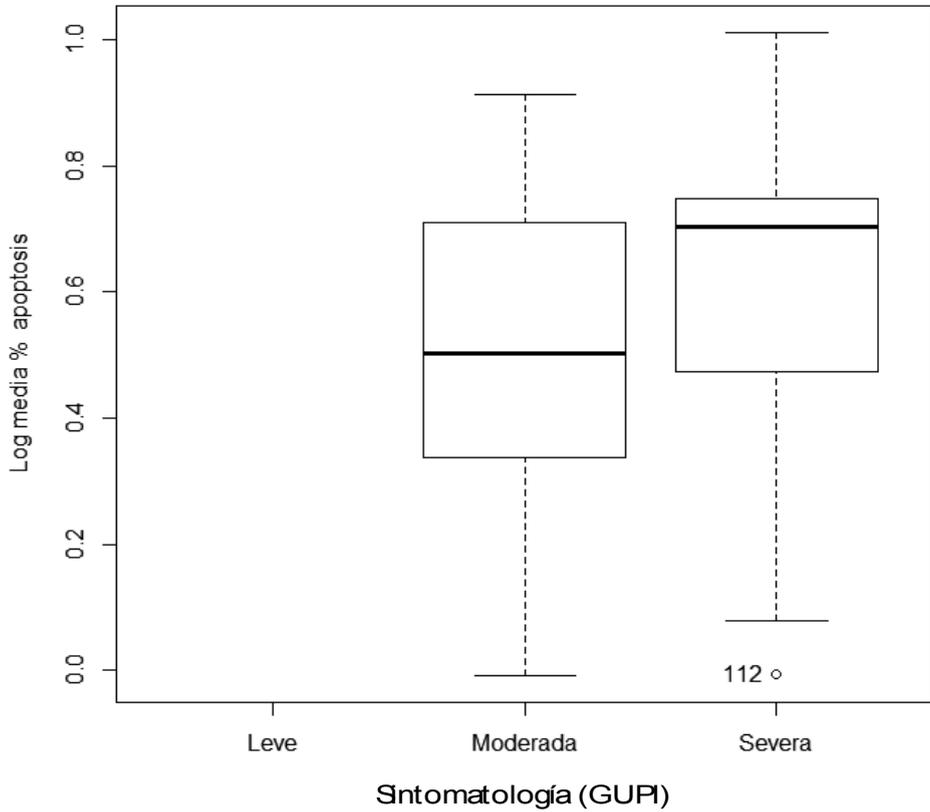
En este grupo de pacientes, a diferencia con el grupo de pacientes con CI, no se observó diferencias significativas entre los porcentajes medios de apoptosis entre los que presentaban sintomatología moderada y severa ( $p= 0,154$ ; CI 95% diferencia =  $-2,57 - 0,43$ ) . Es decir, el porcentaje medio de apoptosis no aumentó con el grado de severidad de los síntomas. Por lo que, para este grupo de pacientes, la apoptosis media se mantuvo constante y no asociada al aumento del grado de severidad sintomatológica (tabla 23). No fue posible detectar diferencias con el grupo de síntomas leves porque ningún paciente se encontraba en esta categoría. Esta ausencia de diferencias tampoco se observaron con la transformación logarítmica de la variable. En la figura 14, se muestra gráficamente la ausencia de diferencias.

**Tabla 23:** Análisis de la asociación del grado del efecto apoptótico y la severidad sintomatológica (GUPI) en grupo de pacientes con dolor pélvico de origen ginecológico.

| Efecto Apoptótico | Síntomas (GUPI) |                |               | Valor p            |
|-------------------|-----------------|----------------|---------------|--------------------|
|                   | Leve(n=0)       | Moderada(n=12) | Severa (n=37) |                    |
| <hr/>             |                 |                |               |                    |
| %Apoptosis        |                 |                |               |                    |
| -Media±DS         |                 | 4,76± 2,1      | 3,66 ± 2,1    | 0,154 <sup>1</sup> |
| <hr/>             |                 |                |               |                    |
| Log10 % Apoptosis |                 |                |               |                    |
| -Media±DS         |                 | 0,61 ±0,28     | 0,48 ± 0,23   | 0,169 <sup>2</sup> |

<sup>1</sup>Moderada *versus* Severa; T-Test, Diferencia entre medias= 1,06, CI 95% diferencia= -2,57 – 0,43.

<sup>2</sup>Moderada *versus* Severa; T-Test, Diferencia entre medias =0,13, CI 95% diferencia= 0,3 – 0,05.

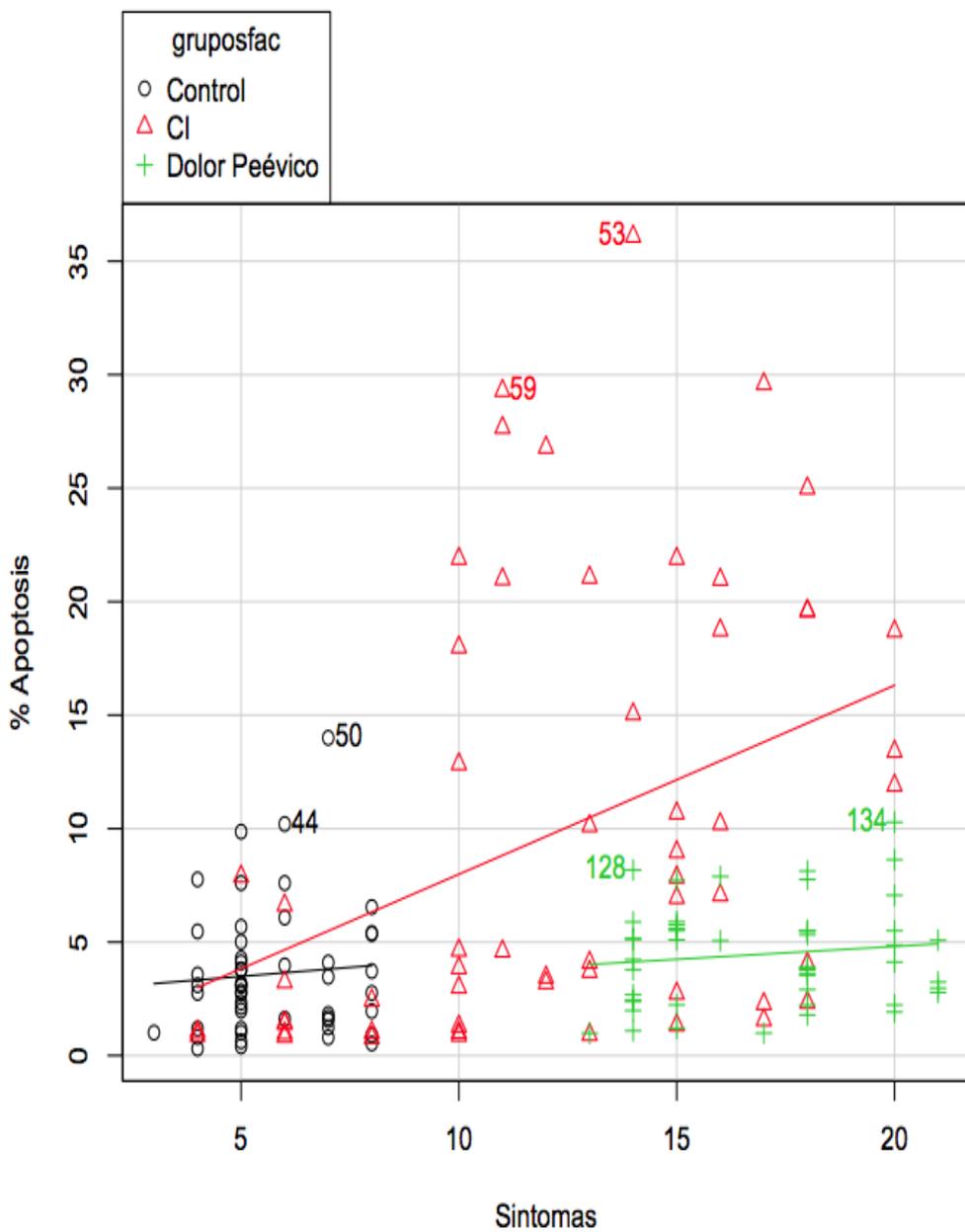


**Figura 14:** Comparación mediante diagrama de cajas de la distribución del logaritmo del porcentaje medio de apoptosis por grupo de síntomas según el GUPI leve ( $\leq 9$ ) moderada (10-14) y severa ( $\geq 15$ ) para el grupo de pacientes de dolor pélvico de origen ginecológico.

---

### **5.3 Estudio de asociación del efecto apoptótico y sintomatología clínica entre grupos de pacientes a estudio.**

Cuando se llevó a cabo un diagrama de dispersión entre el porcentaje de apoptosis y el grado de severidad sintomatológica pero utilizando los datos sin categorizar, la correlación positiva se manifiesta de forma más evidente en los pacientes con CI y está ausente en el grupo de pacientes con dolor pélvico de origen no vesical y controles sanos (figura 15). Los porcentajes de apoptosis de las pacientes con CI presentan un aumento progresivo conforme aumenta la sintomatología. En los grupos control y de dolor pélvico de origen no vesical se mantiene estable o ligeramente aumentado.



**Figura 15:** Diagrama de dispersión del porcentaje medio de apoptosis y síntomas con datos continuos para los tres grupos de pacientes.

---

## **6. Análisis de la prueba de apoptosis como biomarcador de información diagnóstica independiente de la sintomatología.**

Se realizó un análisis de regresión logística para determinar si la prueba de apoptosis aportaba información diagnóstica de CI independiente de la sintomatología (tabla 24). En el análisis se introdujeron los 156 pacientes del estudio. Se consideró como variable respuesta el diagnóstico o no de CI (57 pacientes con CI + 99 pacientes sin CI, 50 controles y 49 con dolor pélvico crónico ginecológico). Como variables independientes se incluyeron la severidad sintomatológica categorizada y el resultado de la prueba de apoptosis. Se llevaron a cabo tres análisis diferentes, uno para cada valor del punto de corte de apoptosis establecido previamente. La severidad de síntomas leve y el resultado negativo de la prueba de apoptosis se consideraron como categoría de referencia.

La prueba de apoptosis positiva para un punto de corte  $\geq$  al 4% no aportó información diagnóstica de CI independiente de la sintomatología ( $p= 0.284$ ). Por el contrario, la presencia de sintomatología moderada sí que multiplicó la probabilidad por 7.33 de presentar CI con respecto a los pacientes con sintomatología leve y ajustada por el resultado de la prueba de apoptosis.

La prueba de apoptosis positiva para puntos de corte  $\geq 8\%$  y  $10\%$ , aportó información diagnóstica independiente de la sintomatología de forma muy significativa. De tal forma que, la probabilidad de diagnóstico de CI se multiplicó por 7,6 y 17,28 veces respectivamente con prueba de apoptosis positiva respecto a los presentaban resultados negativos y ajustados por severidad sintomatológica.

**Tabla 24:** Resultado de regresión logística introduciendo la prueba de apoptosis como positiva si valor de corte  $\geq 4\%$

| Variable            | B    | ES   | Wald | Valor p | Odds Ratio | IC 95% |      |
|---------------------|------|------|------|---------|------------|--------|------|
|                     |      |      |      |         |            | Inf    | Sup  |
| Constante           | -1.5 | 0.34 | -4.4 | <0.001  |            |        |      |
| %Apoptosis $\geq 4$ | 0.40 | 0.37 | 1.07 | 0.284   | 1.49       | 0.71   | 3.12 |
| Síntomas 9-15       | 1.99 | 0.48 | 4.10 | <0.001  | 7.33       | 2.90   | 19.7 |
| Síntomas >15        | 0.77 | 0.43 | 1.76 | 0.07    | 2.16       | 0.92   | 5.21 |

B= Coeficiente B , ES= Error estándar.

**Tabla 25:** Resultado de regresión logística introduciendo la prueba de apoptosis como positiva si valor de corte  $\geq 8\%$

| Variable            | B    | ES   | Wald  | Valor p | Odds Ratio | IC 95% |       |
|---------------------|------|------|-------|---------|------------|--------|-------|
|                     |      |      |       |         |            | Inf    | Sup   |
| Constante           | -1.5 | 0.33 | -4.47 | <0.01   |            |        |       |
| %Apoptosis $\geq 8$ | 2.02 | 0.50 | 3.35  | <0.01   | 7.60       | 2.94   | 21.8  |
| Síntomas 9-15       | 1.69 | 0.51 | 3.34  | <0.01   | 5.40       | 2.05   | 15.24 |
| Síntomas >15        | 0.45 | 0.46 | 0.98  | 0.32    | 1.60       | 0.63   | 3.90  |

B= Coeficiente B, ES= Error estándar.

**Tabla 26:** Resultado de regresión logística introduciendo la prueba de apoptosis como positiva si valor de corte  $\geq 10\%$

| Variable             | B    | ES   | Wald  | Valor p | Odds Ratio | IC 95% |       |
|----------------------|------|------|-------|---------|------------|--------|-------|
|                      |      |      |       |         |            | Inf    | Sup   |
| Constante            | -1.5 | 0.34 | -4.65 | <0.01   |            |        |       |
| %Apoptosis $\geq 10$ | 0.40 | 0.37 | 1.07  | <0.01   | 17.28      | 5.27   | 79.16 |
| Síntomas 9-15        | 1.65 | 0.51 | 3.20  | 0.02    | 5.20       | 1.90   | 14.7  |
| Síntomas >15         | 0.40 | 0.46 | 0.86  | 0.38    | 1.49       | 0.60   | 3.77  |

B= Coeficiente B, ES= Error estándar.

---

## **7. Aplicación clínica del test de apoptosis ante la presencia de un paciente con dolor pélvico crónico de cualquier origen antes de realizar cistoscopia.**

El último criterio para la utilidad de una prueba diagnóstica depende de si añade información por encima de la que ya disponemos, y si dicha información nos cambia el manejo o el tratamiento del paciente que, en última instancia, le rendirá un beneficio. En nuestro caso, antes de tratar a una paciente con CI debemos estar seguros de que nos encontramos realmente frente a una verdadera CI. Sin embargo, no siempre podemos estar seguros de ello. Puesto que, sus síntomas se solapan con los síntomas de otras patologías que causan dolor pélvico de origen no vesical, el examen físico no es claramente demostrativo y la cistoscopia no siempre es informativa. Diversos estudios han puesto de manifiesto que sólo un tercio de las pacientes con sintomatología de dolor pélvico crónico son realmente CI, por lo que podemos considerar que una paciente con dolor pélvico crónico presenta una probabilidad pre-prueba de un 33% de ser diagnosticada de CI (Abrams, 2003).

En última instancia, el objetivo de una prueba diagnóstica es determinar la probabilidad de que un paciente presente la enfermedad a estudio (CI). La prueba de apoptosis será útil si la información que aporta

---

modifica substancialmente la probabilidad pre-prueba de presentar CI. Para medir hasta que punto la probabilidad de la presencia de una enfermedad (CI) cambia por el resultado de una prueba diagnóstica, se utiliza el teorema de Bayes, de tal forma que se calcula la probabilidad de un evento en base a: probabilidad pre-prueba de un evento y la información añadida por la prueba. Mediante la razón de probabilidades para test positivo y negativo, se realizó un refinamiento de la capacidad diagnóstica del porcentaje de apoptosis según los puntos de corte para los que se considera la prueba de apoptosis como positiva. Los resultados se exponen en la tabla 27.

Teniendo en cuenta una probabilidad pre-prueba de 0,33 y las razones de probabilidad positivas obtenidas de acuerdo a los puntos de corte considerados se observa que, con un punto de corte de  $\geq 4$ , la magnitud del cambio de probabilidad es escasamente de un 2% (de 33% a 35%), con un punto de corte de  $\geq 8\%$ , la magnitud del cambio de probabilidad es de un 38% (de 33% a 71%) y, finalmente, con un punto de corte mayor o igual a la magnitud de cambio es considerable alcanzando un 57% (de 33% a 90%).

**Tabla 27:** Información diagnóstica de CI aportada por la prueba de apoptosis según puntos de corte.

| Variable              | Probabilidad pre-prueba <sup>1</sup> | Odds pre- prueba <sup>2</sup> | Razón proba positiva <sup>3</sup> | Odds post-prueba <sup>4</sup> | Probabilidad post-prueba <sup>5</sup> |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| % apoptosis $\geq 4$  | 0,33                                 | 0,49                          | 1,09                              | 0,53                          | 35%                                   |
| % apoptosis $\geq 8$  | 0,33                                 | 0,49                          | 5,16                              | 2,53                          | 71%                                   |
| % apoptosis $\geq 10$ | 0,33                                 | 0,49                          | 19,7                              | 9,65                          | 90%                                   |

<sup>1</sup>Basada en literatura científica de estudios previos.

<sup>2</sup>Odds pre prueba= probabilidad pre-prueba / (1- probabilidad pre-prueba)

<sup>3</sup>Razón de probabilidad = sensibilidad / (1- especificidad)

<sup>4</sup>Odds post- prueba = Odds pre- prueba x Razón de probabilidad positiva

<sup>5</sup>Probabilidad Post-Prueba = Odds post- prueba / (1 + Odds post- prueba)

## **Capitulo VII: Discusión**



---

En nuestro trabajo hemos observado que la orina de pacientes con CI ejerce un efecto apoptótico sobre cultivos celulares expresado por un aumento del porcentaje de células en la fase sub-G1 frente a orina de pacientes control. Además, hemos podido demostrar que para la prueba de apoptosis tomando como nivel un punto de corte de 10%, presenta una elevada especificidad y una aceptable sensibilidad, que lo harán útil como biomarcador de enfermedad. Su valor se correlaciona positivamente con el grado de severidad sintomatológica, por lo que lo hace útil también como biomarcador de severidad de enfermedad.

La distribución porcentual celular en cada una de las fases en los diferentes grupos indican que existe un efecto apoptótico por acúmulo significativo de células en la fase G2 sin pasar a fase S. Una de nuestras hipótesis era que el efecto del APF sobre el ciclo celular se traduciría en un aumento del porcentaje de las células en apoptosis (fase sub-G1) y que una forma de medirlo indirectamente sería utilizando la citometría de flujo. Estos datos apoyan esta hipótesis.

Estos resultados han mostrado ser consistentes y reproducibles en dos mediciones independientes. Cada muestra de orina ha sido procesada en dos ocasiones, por lo que consideramos que la prueba es fiable aunque los

---

resultados obtenidos deben de ser validados con una muestra externa.

La teoría de los factores de crecimiento se basa en los múltiples trabajos que existen publicados relacionados con su presencia en mujeres con CI. Entre los citados factores descritos los de mayor importancia son los citados a continuación.

El heparin-binding-epidermal-growth-factor like growth factor (HB-EGF) que jugaría un papel importante en la proliferación celular epitelial y en la reparación de las lesiones. En las pacientes con CI en comparación con controles, se demostró que este factor se encontraba aumentado significativamente tanto en muestras urinarias como sanguíneas (Sun, 2007; Wilkinson, 2006).

El marcador más estudiado y analizado ha sido el APF. Este marcador fue propuesto por Keay y cols en 1996 (Keay, 1996) como marcador potencial de diagnóstico. La observación inicial era que la orina de pacientes con CI inhibía la proliferación de células epiteliales cultivadas procedentes de mucosa de pared vesical. La determinación se realizó mediante incorporación de timidina. Se consideró como prueba positiva la inhibición de la incorporación de timidina igual o superior al 25%. La

---

prueba consiguió una sensibilidad y una especificidad para la CI del 91.4 y 90% respectivamente. Estos resultados han sido reproducidos por otros grupos (Erickson, 2000). De todos los marcadores estudiados hasta el momento, es el que tiene menor solapamiento entre la CI y el grupo control (Erickson, 2002).

El APF esta presente en la orina de personas con CI (Keay, 1996.) Esta proteína inhibe la producción de HB-EGF y podría impedir el crecimiento de epitelio vesical de regeneración. Ambos factores han sido confirmados como marcadores de CI en dos estudios ciegos (Keay, 2003; Keay, 2004)

Se ha visto que el APF esta muy relacionado con la proteína p53, y que ésta induce la señalización del APF e induce su actividad antiproliferativa de manera considerable. Además, se ha demostrado que el tratamiento con proteína p53 de las células humanas normales uroteliales y líneas de células humanas del carcinoma de vejiga, aumenta el APF y que los cambios inducidos experimentalmente en los niveles de p53 altera el efecto de la APF sobre el crecimiento celular. Lo que indica que la p53 está involucrada en el mecanismo de APF-supresión (apoptosis) en el contexto de la CI (Kim, 2007).

---

El IGF binding proteín 3, el EGF y el HB-EGF se encuentran muy alterados en la CI. Posiblemente, reflejan una misma vía patogénica. El EGF y el IGF binding protein 3 están significativamente aumentados en orina de pacientes con CI en comparación con los controles normales. Sin embargo, el grado de solapamiento entre los niveles de pacientes con CI y sus controles es superior al del APF. Por su parte, el HB-EGF se encuentra significativamente disminuido en la orina de los pacientes con CI con respecto a los controles. También tiene un mayor grado de solapamiento que el APF. Al igual que el APF, el EGF y el HB-EGF han demostrado su reproducibilidad independientemente de la raza, país y hallazgos patológicos (Zhang, 2003; Erickson, 2002; Zhang, 2005).

Existen dos vías que pueden inducir la muerte celular por apoptosis: la vía intrínseca (o mitocondrial), que es inducida por el estrés celular y mediada por la Bcl- 2 (proteína antiapoptótica), debido a un aumento de la permeabilidad de la membrana externa mediada por la caspasa- 9, y la vía extrínseca (vía de apoptosis), que es inducida por ligandos específicos que se acoplan a los receptores de muerte como por ejemplo la inducida por el APF o la proteína p53

---

De todos estos marcadores propuestos, el más estudiado es el APF, sin embargo, este presenta dificultades tanto de técnica como de análisis que dificultan su uso clínico, ya que requiere de la fijación con timidina. Este proceso, además de ser extremadamente costoso, tiene una dificultad técnica casi imposible de reproducir en los laboratorios o de la práctica clínica habitual.

En nuestro estudio hemos intentado medir de manera indirecta el efecto apoptótico de la orina de pacientes con CI como un indicador de la presencia del APF. Puesto que el APF induce a la p53 y se produce una paralización del ciclo celular y en última instancia apoptosis celular.

La citometría de flujo es una técnica de laboratorio que permite cuantificar de forma objetiva las diferentes fases del ciclo celular y con ella medir el porcentaje células en apoptosis. Actualmente se encuentra disponible en algunos laboratorios de los centros hospitalarios. Por lo tanto, el análisis del porcentaje de apoptosis puede ser un marcador útil en la práctica clínica habitual y su uso no presenta los inconvenientes de marcadores como el APF que son complejos, caros y poco reproducibles.

---

No existen trabajos previos para poder comparar nuestros resultados, pero si se tiene en cuenta, como ya se ha explicado anteriormente, que el APF y HB-EGF inhiben el crecimiento celular y actúan sobre la proteína p53, cabe esperar que exista mayor apoptosis en las pacientes con CI.

Los hallazgos de un aumento de APF y su relación con la p53 y su inhibición del ciclo celular fueron descritos por Keay y cols. (Keay, 2003; Keay, 2004), al igual que los observados por Kim y cols. (Kim, 2007). Sin embargo, en ninguno de los estudios anteriormente señalados se exploraron dichos marcadores como pruebas diagnósticas, simplemente se limitaron a observar como existían diferencias entre pacientes con CI y controles. No se establecieron puntos de corte ni tampoco se analizaron la sensibilidad y especificidad de las pruebas.

Recientemente Lee y cols investigaron la ruta apoptótica en biopsias de vejiga de pacientes con CI. No encontraron diferencias significativas en los niveles de proteínas apoptóticas de la vía intrínseca (vía de las caspasas) entre los grupos. Por el contrario, los niveles de proteínas apoptóticas de la vía extrínseca (p53) de las pacientes con CI fueron significativamente mayores que las del grupo control. Estos hallazgos sugieren que existe un nivel elevado de apoptosis celular en las biopsia de vejiga en las pacientes

---

con CI a través de la activación de la vía apoptótica extrínseca (Lee, 2013; Fulda, 2006).

Los hallazgos de Lee y cols (Lee, 2013) y Fulda y cols (Fulda, 2006) apoyan nuestra hipótesis de que las pacientes con CI tienen un mayor grado de apoptosis y que dicha apoptosis se produce a través de la mediación de la APF y la proteína p53.

La CI es una enfermedad de etiología desconocida. Se han descrito múltiples teorías sobre su fisiopatología sin llegar a conocer exactamente ni la causa ni sus desencadenantes. Al desconocer su etiología se desconocen marcadores que permitan el diagnóstico y seguimiento de estas pacientes.

Disponer de un biomarcador en la CI podría ser de gran utilidad por varias razones: ayudaría a realizar un diagnóstico de enfermedad definitivo, identificaría enfermos con diferentes etiologías, saber que pacientes están respondiendo a un tratamiento específico y tener una manera objetiva de cuantificarlo.

Existen diferentes tipos de biomarcadores que se utilizan en la práctica clínica diaria como por ejemplo: biomarcadores de cribado, de diagnóstico, de extensión y de monitorización.

---

En la actualidad en la CI no se han encontrado ni desarrollado ningún tipo de biomarcador.

Los biomarcadores de cribado deberían idealmente ser útiles para la detección precoz de una enfermedad, presentar una elevada sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y ser órgano-específicos. Generalmente este tipo de biomarcadores son útiles en el diagnóstico precoz del cáncer donde se debe distinguir al enfermo de la población sana y con pocos falsos positivos (Cortés 1999). En la CI el biomarcador de cribado no sería de utilidad, ya que, lo importante es distinguir las pacientes con CI de pacientes con enfermedades similares pero con diferentes tratamientos.

Los biomarcadores de diagnóstico deberían tener una elevada especificidad para clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano la prueba logre un resultado negativo. La especificidad es, por lo tanto, muy importante para el diagnóstico de la CI ya que de ella depende la capacidad de la prueba para no equivocarse al detectar una enfermedad.

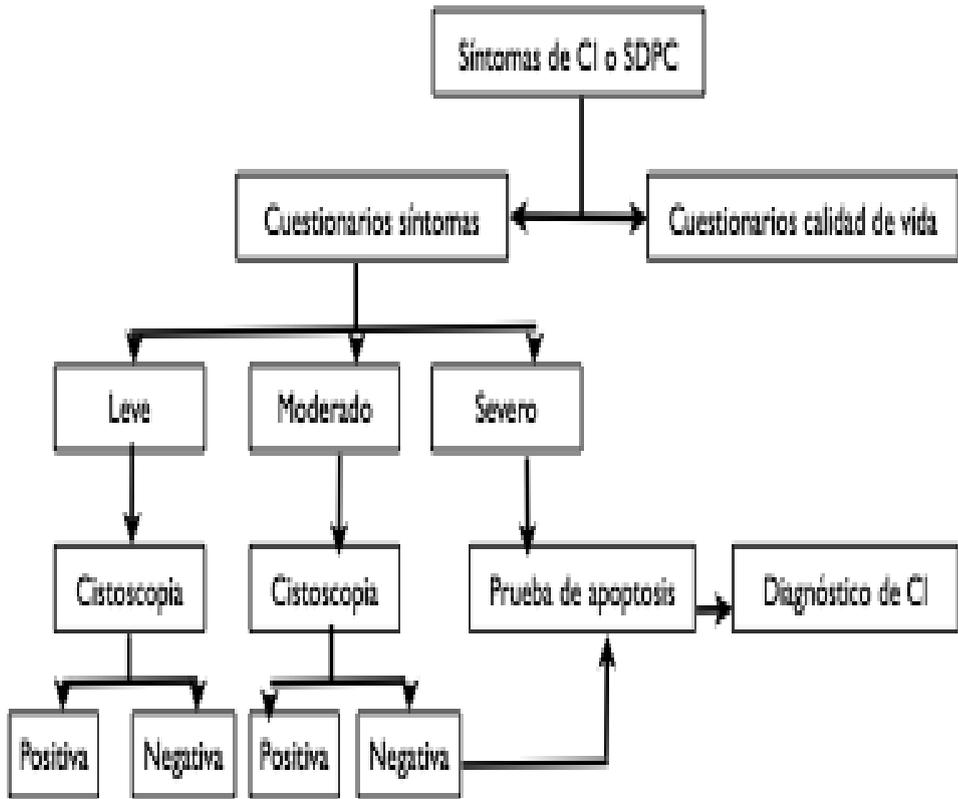
En la actualidad, en la literatura médica no hemos encontrado ningún biomarcador diagnóstico de la CI. Esto hace que para pacientes con CI que

---

presenten leve o escasos síntomas, la medición del efecto apoptótico de su orina no sirva para el diagnóstico de las mismas ya que un valor bajo de apoptosis no permite ni confirmar ni descartar. Sin embargo, para la prueba de apoptosis con un valor de corte del 10% y con síntomas moderados o severos la prueba tiene una especificidad del 98%, lo que permite descartar con seguridad a las pacientes que no presentan CI. Por tanto, ante una paciente con clínica importante de dolor pélvico crónico ya sea por CI como de origen ginecológico, si en la prueba tiene un porcentaje de apoptosis menor del 10% permitiría, en algunos casos, obviar la cistoscopia como prueba diagnóstica y con ello evitar al paciente pruebas invasivas no concluyentes.

Por lo tanto, con el desarrollo de la prueba de apoptosis nos podríamos plantear un esquema alternativo para el diagnóstico y así poder ahorrar en algunos casos cistoscopias innecesarias (figura 16).

**Figura 16:** Diagrama de flujo para el diagnóstico de la CI, incorporando la prueba de apoptosis.



Los biomarcadores de extensión dan información sobre la enfermedad y por lo tanto de su agresividad. Por lo general, los biomarcadores de extensión se deben medir en el momento en que se establece el diagnóstico y debería ser capaces de identificar el grado de

---

extensión de la enfermedad, además de que deberán ser útiles para predecir el curso futuro de la enfermedad individualmente (Schrohl 2003).

En nuestro trabajo observamos que existieron diferencias significativas grupos de severidad sintomatológica (leve, moderado y grave). Lo que significa, que a mayor gravedad o severidad de la sintomatología de las pacientes con CI, mayor es el porcentaje de apoptosis. Por el contrario, las pacientes con dolor pélvico crónico de origen ginecológico a pesar de la severidad de su sintomatología el porcentaje de apoptosis no se ve alterado. Este resultado nos hace pensar que el efecto apoptótico de la orina de pacientes con CI es un excelente biomarcador de extensión, permitiendo diferenciar las pacientes afectas de CI de pacientes sanas y además su grado se asocia a la severidad de los síntomas. Así pues, en pacientes leves el porcentaje de apoptosis será bajo y pacientes con síntomas severos es alto. En la actualidad, no existen estudios de biomarcadores de extensión en la CI con los que este trabajo se pueda comparar, ya que la mayoría de marcadores solo han permitido diferenciar a las pacientes afectas de CI de las pacientes sanas.

No se han realizado estudios con los diferentes marcadores (APF, HB-EFG entre otros) donde hayan evaluado como biomarcadores de

---

extensión. Por primera vez hemos observado un marcador que también se ve modificado con la sintomatología.

Los biomarcadores de monitorización son sustancias que se pudieran medir y que permitirían a los pacientes seguir durante su evolución. Un biomarcador de evolución también deberían responder positivamente a los tratamientos empleados y debería ser capaz de predecir recurrencias o empeoramiento de la enfermedad. Nosotros hemos demostrado que la prueba de apoptosis varía con lo síntomas, a mayor sintomatología mayor grado de síntomas por tanto creemos que en el futuro también podría emplearse como una prueba de monitorización, donde la prueba nos permita prevenir o tratar recurrencias, sin embargo en nuestro estudio al ser un estudio transversal no lo hemos realizado.

Sin embargo, en estudios recientes se ha observado que el efecto apoptótico podría tener utilidad en la práctica clínica para monitorizar un tratamiento y la respuesta a él. De hecho, Jhang y cols, demostraron que en pacientes que habían recibido varias inyecciones de TXB-A como tratamiento para la CI disminuía la apoptosis en estas pacientes y mejoraban su sintomatología.

---

Por ende, estos autores concluyen que la TXB-A tipo A disminuye las señales de inflamación y la apoptosis siendo por esto que evidenciaron una mejoría de la sintomatología (Jhang, 2014).

No existen estudios previos en la literatura donde la prueba de apoptosis obtenida mediante la citometría de flujo se utilice en el diagnóstico o en el pronóstico de la CI, por tanto se pueden hacer analogías con enfermedades que afecten al mismo órgano.

La citometría de flujo permite cuantificar el contenido de ADN y analizar las diferentes fases del ciclo celular. En investigación urológica se ha utilizado sobretodo en oncología, tanto para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de tumores uroteliales como de tumores renales. Así por ejemplo, la ploidía de ADN se ha relacionado con el pronóstico del cáncer renal, donde se observa que los tumores aneuploides presentan un peor pronóstico que los diploides ( Di Silverio, 1992; Ruiz- Cerda, 1996; Di Capua, 2011). También hay que destacar un estudio realizado por Buschman y colaboradores en 1994, que realizaron citometría de flujo en pacientes con CI y encontraron un aumento de células aneuploides en la orina de pacientes con CI comparada con los controles sanos (Bushman, 1994).

---

Actualmente, la citometría de flujo es una técnica de laboratorio presente en hospitales terciarios. Por tanto, el disponer de dicho aparato permitiría en el futuro que éste se pueda usar como herramienta diagnóstica para su utilización en la prueba de apoptosis para el diagnóstico de la CI.

La citometría de flujo es una herramienta que permite identificar todas las fases del ciclo celular mediante la elaboración de un histograma (G1, S, G2M). Dentro del histograma se puede observar el pico sub-G1, este pico correspondería a las células que se encuentran en apoptosis.

En la búsqueda de biomarcadores para la CI se han utilizado dos tipos de muestras biológicas: la biopsia de pared vesical y la orina. La biopsia de pared vesical fueron las primeras en utilizarse. Sin embargo se dejaron de utilizar por su variabilidad interobservador, baja sensibilidad y especificidad. Pero sobre todo, por ser una técnica invasiva y porque la orina puede expresar en su contenido los hallazgos de la biopsia.

La orina es la muestra idónea para el estudio de marcadores de enfermedad en la CI. Es una prueba no invasiva, con pocas variaciones, fácil de recoger y procesar. Los hallazgos encontrados en las biopsias se han logrado reproducir en la orina. Además, el análisis de esta orina se puede

---

realizar, tanto en orina de 24 horas como en pequeñas cantidades sin mayores variaciones.

Otra de las cualidades de la orina es que la CI es una enfermedad que afecta exclusivamente a la vejiga. Además, en la orina se excretan sustancias que pueden ser medidas y cuantificadas objetivamente. Los marcadores en la orina se han utilizado principalmente para el seguimiento y diagnóstico de los tumores vesicales. Si esto ha servido para el diagnóstico de tumores vesicales, cuando afecta casi exclusivamente a la pared de la vejiga, su analogía con la CI es obvia. Durante los últimos años se han investigado múltiples marcadores de enfermedad de la CI en orina.

La evaluación de las pacientes con CI se realiza de manera subjetiva en la práctica clínica habitual. Es por eso que, a finales de los años ochenta, se establecieron los criterios de consenso del NIDDK con el fin de garantizar que los estudios científicos fueran relativamente comparables (van de Merwe, 2008).

Se han desarrollado diferentes cuestionarios de severidad sintomatológica que representa una manera objetiva de cuantificar los síntomas y pueden ser utilizados como herramienta diagnóstica.

---

El cuestionario de O'Leary tiene como objetivo comparar las características y severidad de los síntomas la calidad de vida de los pacientes con CI y su respuesta a los tratamientos (O'Leary, 1997). Recientemente, se ha desarrollado el índice de dolor genitourinario (GUPI), que es un instrumento válido, fiable y sensible que se puede utilizar para cuantificar los síntomas en hombres y mujeres con condiciones de dolor de la esfera urológica y genital.

Todas las pacientes diagnosticadas de CI y de dolor pélvico crónico ginecológico obtuvieron en el cuestionario puntuaciones por encima de 5, mientras que todas las pacientes del grupo control presentaban puntuaciones por debajo de 5. Si bien, otros autores no han utilizado estos cuestionarios para el diagnóstico, en nuestro estudio un valor en los cuestionarios por encima de 5 estaba relacionado con CI. También se observó que la gran mayoría de pacientes presentaban una puntuación entre 5 y 15, siendo pocas pacientes las que presentaban puntuaciones superiores a 15. Esto significa que la mayoría de las pacientes presentan síntomas entre leves y moderados y pocas pacientes síntomas graves.

---

Esta puede ser una de las razones de que estas pacientes son erróneamente diagnosticadas de infecciones urinarias de repetición o vejiga hiperactiva, con las que la CI guardan estrecha relación de síntomas.

Si bien el cuestionario GUPI y el cuestionario de O'Leary-Sant pueden distinguir la CI de otras patologías del tracto urinario, ningún cuestionario ha demostrado la especificidad suficiente para servir como el único indicador de diagnóstico. Estos cuestionarios no son adecuados para el diagnóstico de la CI, pero si permite cuantificar la severidad sintomatológica. En un estudio Kushner y cols. (Kushner, 2006) observaron que el GUPI es más objetivo que el cuestionario de O'Leary y una puntuación de 13 tiene una buena sensibilidad pero una baja especificidad. En nuestro estudio, el punto de corte que se estableció en 10 puntos y este punto de corte para nuestros pacientes demostró tener una buena sensibilidad pero baja especificidad similar al estudio de Kushner y cols. (Kushner, 2006).

En este trabajo queríamos demostrar que la prueba de apoptosis permitía diferenciar a las pacientes con CI de controles sanos. Encontramos que la distribución de los valores del porcentaje medio de apoptosis del grupo control de pacientes sanos comparado con el de las pacientes con CI

---

fue menor. Cuando analizamos la distribución de la media se aprecia cómo únicamente tres pacientes del grupo control (6%) superan el 10% de apoptosis. Por el contrario, en las pacientes con CI, el valor del porcentaje de apoptosis se distribuye ampliamente, y en muchas de las pacientes con escasos síntomas presentan un porcentaje medio inferior al 10%.

A nuestro entender, este estudio es pionero por ser la primera vez que se encuentra una prueba que permita el diagnóstico diferencial de la CI con pacientes sanas y pacientes con dolor pélvico crónico de origen ginecológico. La única prueba diagnóstica en la actualidad es el test de potasio, donde Parsons y cols. (Parson, 2003), realizaron una revisión multicéntrica de los resultados de esta prueba y encontraron que un 78% de los pacientes con la sospecha de CI respondían positivamente. Sin embargo, también respondían positivamente todas las pacientes que presentaban cambios en el epitelio vesical como en los casos de cistitis radica o infecciones. Otros inconvenientes del test de potasio es su invasividad y el dolor que produce a las pacientes. Por otra parte un resultado negativo del mismo no permite descartar la CI. Actualmente las Guías Clínicas de la Asociación Europea de Urología no recomiendan la utilización de la prueba de potasio debido a que no demostró ser útil en el diagnóstico de la CI y recomiendan que el diagnóstico se haga descartando otras patologías ya que

---

no existen pruebas de diagnóstico (Fall, 2010).

Al desconocer la etiología de la CI, el diagnóstico actualmente se basa en la clínica y en el cumplimiento de ciertos criterios definidos por el NIDDK. Si bien, muchos autores están de acuerdo que dichos criterios dejarían de diagnosticar hasta un 30% de pacientes con diagnóstico clínico de CI (Hanno, 1999; Simon, 1997). Por tanto, dichos criterios podrían establecer diagnósticos erróneos y solo se deberían usar para ensayos clínicos o estudios clínicos (Fall, 2010).

Por lo tanto surgirían varias preguntas ¿qué utilidad clínica tendría el medir el efecto apoptótico de la orina de pacientes con CI? ¿qué podría aportar este nuevo marcador y de que serviría en la práctica clínica diaria?. Hemos demostrado que la información diagnóstica aportada por la prueba de apoptosis es independiente de la aportada por la sintomatología, eso significaría, que se pueden utilizar de forma secuencial (por pasos) en el algoritmo diagnóstico.

Además en la práctica clínica cuando observamos que una prueba de apoptosis con un punto de corte  $\geq 10\%$ , modifica sustancialmente la probabilidad pre-prueba de presentar CI, lo que permite llevar a cabo un refinamiento diagnóstico de CI aumentando la probabilidad un 57%.

---

Eso podría ayudar al clínico primero a poder realizar un diagnóstico de certeza y además la posibilidad de ahorrar a las pacientes pruebas más invasivas como la cistoscopia. Para ello podríamos utilizar el algoritmo diagnóstico de la figura 16.

La utilidad de una prueba en su habilidad para distinguir entre enfermedades similares o posibles confundentes que tendrán un tratamiento y un pronóstico diferente. Por eso, era precisamente importante encontrar una prueba útil en la CI, ya que esta puede y suele confundirse o pasar inadvertida muchas veces. Creemos que con la prueba de la apoptosis hemos conseguido una prueba que puede confirmar el diagnóstico y descarta enfermedades similares.

A pesar de que en este trabajo hemos comprobado el valor del efecto apoptótico como marcador de enfermedad de CI, queda por saber como se comporta dicho marcador en otras enfermedades que tienen como mecanismo fisiopatológico una alteración del ciclo celular como puede ser el carcinoma *in situ* vesical, cistitis radica, etc.

Tampoco esta claro el papel que juegan el APF, HB-EGF y la p53 en otras enfermedades que cursa con inflamaci3n. El efecto de los mismos en enfermedades como la cistitis infecciosa es actualmente desconocido.

---

También en futuros trabajos se podría evaluar el efecto apoptótico y su relación con estas patologías de origen inflamatorio.

Este estudio tiene algunas limitaciones; la reproductibilidad, la utilización de cuestionarios traducidos al español no validados, la variabilidad y la falta de validación externa. La reproductibilidad del efecto apoptótico como marcador diagnóstico y de enfermedad para su utilización en la práctica clínica diaria es complicada, debido a todo el proceso que deben tener las muestras. Para ello, se requieren de cultivos celulares y un citómetro de flujo. Los cultivos celulares son complejos y su uso está muy limitado debido a su difícil procesamiento. Por tanto, creemos que estos dos aspectos pueden tener una limitación para poder utilizar este test como diagnóstico en la población general.

Una segunda limitación, es que hemos utilizado en nuestro estudio un cuestionario que ha sido validado en inglés, el índice de dolor genitourinario (GUPI). Sin embargo, dicho cuestionario no ha sido validado al español. A pesar de ello creemos que al ser un cuestionario de autocumplimentación y debido al poco conocimiento de inglés por parte de las pacientes hacía inviable que los pudieran rellenar. Así pues, se llevó a cabo una traducción textual del mismo.

---

Comprendemos que la validación de dicho cuestionario sería por si solo un tema complejo y que solo se tomó en cuenta para poder saber los síntomas de las pacientes en el momento de la recogida.

La variabilidad del efecto apoptótico de la orina de pacientes con CI sobre cultivos celulares puede ser una limitación, ya que las mediciones de la seguridad de un test pueden variar entre diferentes estudios. Uno de los principales problemas que se presentan en el campo de la investigación básica tiene que ver con la dificultad de conseguir que las distintas medidas se realicen exactamente en las mismas condiciones. Las condiciones de los sujetos, como de la muestras, etc., pueden variar de una medición a otra, por lo que resulta imprescindible establecer un procedimiento estandarizado de medición que permita reducir al mínimo las variables extrañas que puedan influir en los resultados finales. Por lo tanto, la fiabilidad hace referencia a la estabilidad y consistencia de las mediciones en aquellos casos en los que no existen razones teóricas o empíricas que nos hagan suponer que la variable que se mide se haya visto modificada de forma significativa por el estudio, por lo que se asume su estabilidad (Muñiz 2011). Esta variabilidad puede reflejar: diferentes grupos de pacientes, diferentes logísticas o aparatos de medición o condiciones de trabajo, diferentes

---

definiciones de la enfermedad a estudio y diferencias en los criterios para catalogar a test como positivo o los protocolos de un test.

Por último, al ser el primer estudio experimental, hasta no disponer de una validación externa de nuestros datos no sabremos si son extrapolables para el diagnóstico y seguimiento de las pacientes con CI. Sin embargo, durante el estudio se procesaron las muestras de forma independiente en dos ocasiones. El resultado de procesar las muestras en dos ocasiones diferentes y tener resultados similares hacen que creamos que nuestros resultados tienen la consistencia necesaria para permitir a otros grupos de trabajo encontrar los mismos resultados.



## **Capitulo VIII: Conclusiones**



---

## Conclusiones

1) La orina de pacientes con CI ejerce un efecto apoptótico sobre cultivos celulares tumorales significativamente superior al que ejercen orinas de pacientes controles sanos y pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico.

2) La distribución de valores del efecto apoptótico según los diferentes grupos a estudio demostró que, sólo tres de 99 pacientes controles sanos y de dolor crónico ginecológico presentó un efecto apoptótico medio superior al 10%. Por el contrario, 23 de 57 pacientes con CI presentaron valores superiores a 10%.

3) La capacidad discriminativa de la prueba de apoptosis para el diagnóstico de CI frente a controles sanos, dolor pélvico crónico ginecológico y en conjunto, sin tener en cuenta la severidad sintomatológica fue suficiente y aumentó a buena cuando se estratifica por severidad sintomatológica. Por lo que, puede ser útil como biomarcador de enfermedad de CI.

4) La prueba de apoptosis que consigue mayor rendimiento diagnóstico como biomarcador de enfermedad es aquella en la que se considera positiva cuando es igual o superior al 10%. Ya que, aunque la sensibilidad diagnóstica de CI es muy baja (40%) su capacidad para confirmar la presencia de CI cuando el resultado es positivo es muy elevada (>90%). De

---

tal forma que, una prueba de apoptosis  $\geq 10\%$  prácticamente confirma la enfermedad frente a controles y frente a pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico

5) La magnitud del efecto apoptótico está asociada al grado de severidad sintomatológica, ya que, en el grupo de pacientes con CI, el porcentaje medio de apoptosis aumenta significativamente con la sintomatología. Lo que no se produce ni en el grupo control de pacientes sanos ni en el de pacientes con dolor pélvico crónico ginecológico. Por lo que, podría ser de utilidad como biomarcador de severidad de enfermedad.

6) La información diagnóstica de CI aportada por la prueba de apoptosis es independiente de la aportada por la sintomatología. Por lo que, se pueden utilizar de forma secuencial (por pasos) en el algoritmo diagnóstico.

7) La prueba de apoptosis considerada como positiva  $\geq 10\%$  modifica sustancialmente la probabilidad pre-prueba de presentar CI, lo que permite llevar a cabo un refinamiento diagnóstico de CI aumentando la probabilidad un 57%.

# **Bibliografía**



---

## **Bibliografia**

Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A; Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. The standarization of terminology of lower urinary tract function: report from the standarization subcommittee of the international continence society. *Neurourol Urodyn.* 2002;21:167-78.

Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Subcommittee of the International Continence Society. *Urology* 2003;61(1):37- 49.

Abrams PA, Baranowski AP, Berger RE, et al. A new classification is needed for pelvic pain syndromes--are existing terminologies of spurious diagnostic authority bad for patients? *J Urol* 2006;175(6):1989-90

Aldenberg F, Peeker R, Fall M, Olofsson A, Enerbäck L. Metaplastic transformation of urinary bladder epithelium: effect on mast cell recruitment, distribution, and phenotype expression. *Am J Pathol.* 1998;153:149-57.

---

Awad SA, Al-Zahrani HM, Gajewski JB, Bourque-Kehoe AA. Long-term results and complications of augmentation ileocystoplasty for idiopathic urge incontinence in women. *Br J Urol* 1998;81: 569-73.

Bade JJ, Laseur M, Nieuwenburg A, van der Weele LT, Mensink HJ. A placebo-controlled study of intravesical pentosanpolysulphate for the treatment of interstitial cystitis. *Br J Urol* 1997;79: 168-71.

Bade JJ, Peeters JM, Mensink HJ. Is the diet of patients with interstitial cystitis related to their disease? *Eur Urol* 1997;32:179-83.

Badia X, Muriel C, Gracia A, Núñez-Olarte JM, Perulero N, Gálvez R, Carulla J, Cleeland CS; Grupo Vesbpi. Validation of the Spanish version of the Brief Pain Inventory in patients with oncological pain. *Med Clin (Barc)*. 2003;25;120:52-9

Badia X, Garcia A. La medición de la calidad de vida relacionada con la salud y la preferencias en estudios de Investigación de Resultados en salud. En: Badia X. *La investigación de resultados en salud*. Barcelona: Edimac; 2000.

---

Báguena-Cervellera, R., Renau-Piqueras, J., O'Connor, J.E., Grisolia, S. Effects of prolonged exposure to ammonia on fluid phase, receptor-mediated and absorptive (non-specific) endocytosis in cultured neuroblastoma cells". *Histochemistry* 1987;87: 445-455.

Barber J. Incorporating hypnosis in the management of chronic pain. In: Barber J, Adrian C, eds. *Psychological Approaches in the Management of Pain*. New York: Brunner/Mazel, 1982; pp. 60-83.

Bates S, Short course oral prednisolone therapy in chronic abacterial prostatitis and prostatodynia: case reports of three responders and one non-responder. *Talbot M .Sex Transm Infect.* 2000;76:398-9.

Blaivas JG, Panagopoulos G, Weiss JP, Somaroo C, Chaikin DC. The urgency perception score: validation and test- retest. *J Urol* 2007;177:199–202

Bruce PT, Buckham GJ, Carden AB, Salvaris M. The surgical treatment of chronic interstitial cystitis. *Med J Aust* 1977;1: 581-2.

Bumpus HCJ. Interstitial cystitis: its treatment by overdistension of the bladder. *Med Clin North Am* 1930;13:1495-8.

---

Burkman RT. Chronic pelvic pain of bladder origin: epidemiology, pathogenesis and quality of life. *J Reprod Med* 2004;49(3 Suppl): 225-9.

Bushman W1, Goolsby C, Grayhack JT, Schaeffer AJ. Abnormal flow cytometry profiles in patients with interstitial cystitis. *J Urol.* 1994; 152:2262-6.

Byrne DS, Das A, Sedor J, Huang B, Rivas DA, Flood HJ, DeGroat W, Jordan ML, Chancellor MB, McCue P. Effect of intravesical capsaicin and vehicle on bladder integrity control and spinal cord injured rats. *J Urol.* 1998;159:1074-8.

Byrne DS, Sedor JF, Estojak J y cols. The urinary glycoprotein GP-51 as a clinical marker for interstitial cystitis. *J Urol.* 1999;161:1786-90.

Chai TC, Zhang CO, Shoenfelt JL et al. Bladder stretch alters urinary heparin-binding epidermal growth factor and antiproliferative factor in patients with interstitial cystitis. *J Urol,* 2000;163:1440-44.

Chaiken DC, Blaivas JG, Blaivas ST. Behavioral therapy for the treatment of refractory interstitial cystitis. *J Urol* 1993;149:1445-8.

---

Chakravarti A, Ganta S, Somani B, Jones MA. Caecocystoplasty for intractable interstitial cystitis: long-term results. *Eur Urol* 2004;46:114-7.

Chang PL, Wu CJ, Huang MH. Long-term outcome of acupuncture in women with frequency, urgency and dysuria. *Am J Chin Med* 1993;21:231-6.

Chang PL. Urodynamic studies in acupuncture for women with frequency, urgency and dysuria. *J Urol* 1988;140:563-6.

Clemens JQ, Calhoun EA, Litwin MS, McNaughton-Collins M, Kusek JW, Crowley EM, Landis JR. Validation of a modified National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index to assess genitourinary pain in both men and women; Urologic Pelvic Pain Collaborative Research Network. *Urology*. 2009;74:983-7.

Cortés H, Díaz Rubio E, García Conde J, Germá Lluch JR, Guillén Porta V, López López J. *Oncología Médica*. Madrid: Aula Médica SA, 1999.

Daha LK, Riedl CR, Lazar D, Hohlbrugger G, Pflüger H. Do cystometric findings predict the results of intravesical hyaluronic acid in women with interstitial cystitis? *Eur Urol* 2005;47:393-7.

---

Di Capua Sacoto C., Budia Alba A., Alapont Alacre JM., Ruiz Cerda JL., Jiménez-Cruz JF. In vivo aneuploidization during the expansion of renal adenocarcinoma. *Urol. Int*; 2012;86: 466-9

Dimitrakov J, Tchitalov J, Zlatanov T, Dikov D, Rawadi G. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of interstitial cystitis: preliminary results. *Urology* 2001;57:118-9.

Eisenberg ER, Moldwin RM. Etiology: where does prostatitis stop and interstitial cystitis begin? *World J Urol.* 2003;21:64-9.

el-Mansoury M, Boucher W, Sant GR, Theoharides TC. Increased urine histamine and methylhistamine in interstitial cystitis. *J Urol.* 1994;152:350-3.

Eldrup J, Thorup J, Nielsen SL, Hald T, Hainau B. Permeability and ultrastructure of human bladder epithelium. *Br J Urol.* 1983;55:488-92.

Elgavish A. Epigenetic reprogramming: a possible etiological factor in bladder pain syndrome/interstitial cystitis? *J Urol.* 2009;181:980-4

Elgebaly SA, Allam ME, Walzak MP Jr et al. Urinary neutrophil chemotactic factors in interstitial cystitis patients and a rabbit model of

---

bladder inflammation. *J Urol* 1992, 147:1382-1387.

Erickson DR, Belchis DA, Dabas DJ. Inflammatory cell types and clinical features of interstitial cystitis. *J Urol* 1997;158:790-93.

Erickson DR, Ordille SD, Zhang CO et al: Antiproliferative factor (APF), heparin binding epidermal growth factor-factor-like growth factor (HB-EGF) and epidermal growth factor (EGF) alterations in interstitial cystitis (IC) confirmed. *J Urol* 2000;163:62.

Erickson DR, Xie SX, Bhavanandan VP, Wheeler MA, Hurst RE, Demers LM, Kushner L, Keay SK. A comparison of multiple urine markers for interstitial cystitis. *J Urol*. 2002;167:2461-9.

EuroQol Group. EuroQol a new facility for the measurement of health-related quality of life. *Health Policy*. 1990; 16: 199-208.

Fall M, Baranowski AP, Fowler CJ, Lepinard V, Malone- Lee JG, Messelink EJ, Oberpenning F, Osborne JL, Schumacher S. EAU Guidelines on Chronic Pelvic Pain. In: EAU Guidelines, edition published at the 18th Annual EAU Congress, Madrid, 2003. ISBN 90- 70244- 06- 3.

---

Fall M,, Baranowski Ap,, Elneil S., Engeler D., Hughes J., Messelink EJ., F. Oberpenning F., Williams AC; members of the European Association of Urology (EAU) Guidelines Office. Guidelines on Chronic Pelvic Pain. In: EAU Guidelines, edition presented at the 25th EAU Annual Congress, Barcelona 2010. ISBN 978-90-79754-70-0

Feltis JT, Perez-Marrero R, Emerson LE. Increased mast cells of the bladder in suspected cases of interstitial cystitis: a possible disease marker. J Urol. 1987;138:42-3.

Fritjofsson A, Fall M, Juhlin R, Persson BE, Ruutu M. Treatment of ulcer and nonulcer interstitial cystitis with sodium pentosanpolysulfate:a multicenter trial. J Urol 1987;138: 508-12.

Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene. 2006;25:4798-4811.

Gamper M, Viereck V, Geissbühler V, Eberhard J, Binder J, Moll C, Rehrauer H, Moser R. Gene expression profile of bladder tissue of patients with ulcerative interstitial cystitis. BMC Genomics. 2009;10:199-202.

---

Geirsson G, Wang YH, Lindström S, Fall M. Traditional acupuncture and electrical stimulation of the posterior tibial nerve. A trial in chronic interstitial cystitis. *Scand J Urol Nephrol* 1993;27:67-70.

Giannakopoulos X, Champilomatos P. Chronic interstitial cystitis. Successful treatment with intravesical lidocaine. *Arch Ital Urol Nefrol Androl* 1992;64:337-9.

Glemain P, Rivière C, Lenormand L, Karam G, Bouchot O, Buzelin JM. Prolonged hydrodistention of the bladder for symptomatic treatment of interstitial cystitis: efficacy at 6 months and 1 year. *Eur Urol* 2002;41:79-84.

Green M, Filippou A, Sant G, Theoharides TC. Expression of intercellular adhesion molecules in the bladder of patients with interstitial cystitis. *Urology*. 2004;63:688-93.

Guillonnet B, Toussaint B, Bouchot O, Buzelin JM. Treatment of interstitial cystitis with sub-trigonal cystectomy and enterocystoplasty. *Prog Urol* 1993;3:27-3.

Hanno PM, Buehler J, Wein AJ. Use of amitriptyline in the treatment of interstitial cystitis. *J Urol* 1989;141:846-8.

---

Hanno PM, Landis JR, Matthews-Cook Y, Kusek J, Nyberg L Jr The diagnosis of interstitial cystitis revisited: lessons learned from the National Institutes of Health Interstitial Cystitis Database study. *J Urol.* 1999;161:553-7.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* 2005;24:2899-908.

Held PJ, Hanno PM, Wein AJ. In: Hanno PM, Staskin DR, Krane RJ, Weins Aj, eds. *Interstitial Cystitis. Epidemiology of interstitial cystitis.* London: Springer Verlag, 1990, 29-48.

Henry R, Patterson L, Avery N, Tanzola R, Tod D, Hunter D, Nickel JC, Morales A. Absorption of alkalized intravesical lidocaine in normal and inflamed bladders: a simple method for improving bladder anaesthesia. *J Urol* 2001;165:1900-3.

Hwang P, Auclair B, Beechinor D, Diment M, Einarson TR. Efficacy of pentosan polysulfate in the treatment of interstitial cystitis: a meta-analysis. *Urology* 1997;50:39-43.

---

Jhang JF, Jiang YH, Kuo HC. Potential therapeutic effect of intravesical botulinum toxin type A on bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Int J Urol*. 2014;21:49-55.

Kallestrup EB, Jørgensen S, Nordling J, Hald T. Treatment of interstitial cystitis with Cystistat: a hyaluronic acid product. *Scand J Urol Nephrol* 2005;39:143-7.

Kastrup J, Hald T, Larsen S, Nielsen VG. Histamine content and mast cell count of detrusor muscle in patients with interstitial cystitis and other types of chronic cystitis. *Br J Urol*. 1983;55:495-500.

Key S, Seillier-Moiseiwitsch F, Zhang CO, Chai TC, Zhang J. Changes in human bladder epithelial cell gene expression associated with interstitial cystitis or antiproliferative factor treatment. *Physiol Genomics*. 2003;14:107-15.

Key S, Zhang CO, Trifillis AL, Hise MK, Hebel JR, Jacobs SC, Warren JW. Decreased 3H-thymidine incorporation by human bladder epithelial cells following exposure to urine from interstitial cystitis patients. *J Urol*. 1996;156:2073-8.

---

Keay S, Zhang M, K. Hise, J. R. Hebel, S. C. Jacobs, D. Gordon, K. Whitmore, S. Bodison, N. Gordon, J. W. Warren A diagnostic in vitro urine assay for interstitial cystitis. *Urology*, 1998; 52: 974–978

Keay SK, Szekely Z, Conrads TP, Veenstra TD, Barchi JJ Jr, Zhang CO, Koch KR, Michejda CJ. An antiproliferative factor from interstitial cystitis patients is a frizzled 8 protein-related sialoglycopeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:803-8.

Kerr WS Jr. Interstitial cystitis: treatment by transurethral resection. *J Urol* 1971;105:664-6.

Kim J, Keay SK, Dimitrakov JD, Freeman MR. p53 mediates interstitial cystitis antiproliferative factor (APF)-induced growth inhibition of human urothelial cells. *FEBS Lett*. 2007;581: 3795-9.

Kim SH, Oh SJ. Comparison of voiding questionnaires between female interstitial cystitis and female idiopathic overactive bladder. *Int Neurourol J*. 2010;14:86-92.

---

Koziol JA, Adams HP, Frutos A. Discrimination between the ulcerous and the nonulcerous forms of interstitial cystitis by noninvasive findings. *J Urol* 1996;155:87-90.

Krishan A Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol*, 1975; 66:188-193.

Kuo HC. Preliminary results of suburothelial injection of botulinum a toxin in the treatment of chronic interstitial cystitis. *Urol Int* 2005;75:170-4.

Kuo HC. Urodynamic results of intravesical heparin therapy for women with frequency urgency syndrome and interstitial cystitis. *J Formos Med Assoc* 2001;100:309-14

Kusek JW, Nyberg LM. The epidemiology of interstitial cystitis: is it time to expand our definition? *Urology*. 2001;57(6 Suppl):95-9.

Kushner L1, Moldwin RM. Efficiency of questionnaires used to screen for interstitial cystitis. *J Urol*. 2006;176:587-92.

Lane DP. Exploiting the p53 pathway for the diagnosis and therapy of human cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:489-97.

---

Lee JD, Lee MH. Activation of extrinsic apoptotic pathway from bladder biopsy in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome Urology. 2013 Dec;82(6):1451-7

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366: 177-96.

Leppilahti M, Sairanen J, Tammela TL, Aaltomaa S, Lehtoranta K, Auvinen A; Finnish Interstitial Cystitis-Pelvic Pain Syndrome Study Group. Prevalence of clinically confirmed interstitial cystitis in women: a population based study in Finland. *J Urol* 2005;174(2): 581-3.

Linn JF, Hohenfellner M, Roth S, Dahms SE, Stein R, Hertle L, Thüroff JW, Hohenfellner R. Treatment of interstitial cystitis: comparison of subtrigonal and supratrigonal cystectomy combined with orthotopic bladder substitution. *J Urol* 1998 Mar;159 (3)

Lose G, Frandsen B, Hojensgard JC et al. Chronic interstitial cystitis : increased levels of eosinophil cationic protein in serum and urine and an ameliorating effect of subcutaneous heparin. *Scand J Urol Nephrol.* 1983;17:159-6.

---

Lubeck DP, Whitmore K, Sant GR, Alvarez-Horine S, Lai C. Psychometric validation of the O'leary- Sant interstitial cystitis symptom index in a clinical trial of pentosan polysulfate sodium. *Urology* 2001;57:62-6.

Lynes WL, Flynn SD, Shortliffe LD et al. Mast cell involvement in interstitial cystitis. *J Urol* 1987;138:746-52

Mayer R, Propert KJ, Peters KM, Payne CK, Zhang Y, Burks D, Culkin DJ, Diokno A, Hanno P, Landis JR, Madigan R, Messing EM, Nickel JC, Sant GR, Warren J, Wein AJ, Kusek JW, Nyberg LM, Foster HE; Interstitial Cystitis Clinical Trials Group. A randomized controlled trial of intravesical bacillus calmette-guerin for treatment refractory interstitial cystitis. *J Urol* 2005;173:1186-91

Merskey H, Bogduk N. *Classification of Chronic Pain*. Seattle, IASP press 2012.

Moldwin RM, Sant GR. Interstitial cystitis: a pathophysiology and treatment update *Clin Obstet Gynecol*. 2002;45:259-72.

---

Mouracade P, Lang H, Jacqmin D, Saussine C. Using the intersitial cystitis new diagnostic criteria in daily practice: about 156 patients. *Prog Urol.* 2008;18:674-7.

Moynault A, Luciani MF, Ghimini G. ABCI, the mammalian homologue of the engulfment gene *ced-7*, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 1998; 26:629-34.

Mulholland SG, Hanno P, Parsons CL, Sant GR, Staskin DR. Pentosan polysulfate sodium for therapy of interstitial cystitis. A double-blind placebo-controlled clinical study. *Urology* 1990;35:552-8.

Muñiz, J. Fiabilidad Teoría clásica de los tests (5ª edición). Madrid: Ed. Pirámide. ISBN 843681262X.

Nazif O, Teichman JM, Gebhart GF. Neural upregulation in interstitial cystitis. *Urology.* 2007;69:24-33.

Nickel JC, Alexander RB, Anderson R, Berger R, Comiter CV, Datta NS, Fowler JE, et. al. Category III chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: insights from the National Institutes of Health Chronic Prostatitis Collaborative Research Network studies. *Curr Urol Rep.* 2008;9(4):320-7.

---

Nickel JC, Barkin J, Forrest J, Mosbaugh PG, Hernandez-Graulau J, Kaufman D, Lloyd K, Evans RJ, Parsons CL, Atkinson LE; Elmiron Study Group. Randomized, double-blind, dose-ranging study of pentosan polysulfate sodium for interstitial cystitis. *Urology* 2005;65:654-8.

O'Leary MP, Sant GR, Fowler FJ Jr, Whitmore KE, Spolarich-Kroll J. The interstitial cystitis symptom index and problem index. *Urology* 1997;49:58-63

Oberpenning F, Van Ophoven A, Hertle L. Interstitial cystitis: an update. *Curr Opin Urol* 2002;12:321-32.

Oh SJ, Choo MS, Kim HS, Kim JC, Lee JG, Yoon JM, et al. Psychometric properties of Korean version of the King's Health Questionnaire in women with stress urinary incontinence. *J Korean Continence Soc* 2005;9:115-23.

Okamura K, Usami T, Nagahama K, Maruyama S, Mizuta E. "Quality of life" assessment of urination in elderly Japanese men and women with some medical problems using International Prostate Symptom Score and King's Health Questionnaire. *Eur Urol* 2002;41:411-9

---

Ormerod MG, Cheetham FPM, Sun X-M: Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. *Cytometry* 21:300–304, 1995

Osborne JH, Manhattan D, Laumn B. IC and Diet. In: Osborne JH , ed. *The Interstitial Cystitis Network Patient Handbook*. Chapter 5. Santa Rosa, CA, USA: The Interstitial Cystitis Network, 1999;43-62.

Palomba L, Sestili P, Cattabeni F, Azzani A, Cantoni O. Prevention of necrosis and activation of apoptosis in oxidatively injured human myeloid leukemia U937 cells. *FEBS Lett* 1996;390: 91-4.

Pang X, Sant G, Theoharides TC. Altered expression of bladder mast cell growth factor receptor (c-kit) in interstitial cystitis. *Urology*. 1998;51:939-44.

Parson CL. Prostatitis, interstitial cystitis, chronic pelvis pain and urethral síndrome share a common pathophysiology: lower urinary dysfunctional epithelium and potassim recycling. *Urology* 2003, 62:976-982

Parsons CL, Boychuk D, Jones S, Hurst R, Callahan H. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *J Urol*. 1990;143:139-42.

---

Parsons CL, Housley T, Schmidt JD, Lebow D. Treatment of interstitial cystitis with intravesical heparin. *Br J Urol* 1994;73:504-7.

Parsons CL, Koprowski PF. Interstitial cystitis: successful management by increasing urinary voiding intervals. *Urology* 1991;37:207-12.

Parsons CL, Lilly JD, Stein P. Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). *J Urol.* 1991;145: 732-5.

Parsons CL. Interstitial cystitis: epidemiology and clinical presentation. *Clin Obstet Gynecol.* 2002;45(1):242-9.

Peeker R, Aldenborg F, Fall M. Complete transurethral resection of ulcers in classic interstitial cystitis. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2000;11:290-5.

Peeker R, Haghsheno MA, Holmang S, Fall M. Intravesical bacillus Calmette-Guerin and dimethyl sulfoxide for treatment of classic and nonulcer interstitial cystitis: a prospective, randomized doubleblind study. *J Urol* 2000;164:1912-15;

Perez-Marrero R, Emerson LE, Feltis JT. A controlled study of dimethyl sulfoxide in interstitial cystitis. *J Urol* 1988;140:36-9.

---

Peters K, Diokno A, Steinert B, Yuhico M, Mitchell B, Krohta S, Gillette B, Gonzalez J. The efficacy Of intra- vesical Tice strain bacillus Calmette-Guerin in the treatment of interstitial cystitis: a double-blind, prospective, placebo controlled trial. *J Urol* 1997;157:2090-4.

Peters KM, Carey JM, Konstandt DB. Sacral neuromodulation for the treatment of refractory interstitial cystitis: outcomes based on technique. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2003;14:223-8.

Peters KM, Diokno AC, Steinert BW, Gonzalez JA. The efficacy of intravesical bacillus Calmette-Guerin in the treatment of interstitial cystitis: long-term followup. *J Urol* 1998;159:1483-6.

Peters KM, Diokno AC, Steinert BW. Preliminary study on urinary cytokine levels in interstitial cystitis: does intravesical bacille Calmette-Guérin treat interstitial cystitis by altering the immune profile in the bladder? *Urology* 1999; 54:450-53.

Peters KM, Konstandt D. Sacral neuromodulation decreases narcotic requirements in refractory interstitial cystitis. *BJU Int.* 2004;93:777-9

---

Pinto R, Lopes T, Costa D, Barros S, Silva J, Silva C, Cruz C, Dinis P, Cruz F. Ulcerative and nonulcerative forms of bladder pain syndrome/interstitial cystitis do not differ in symptom intensity or response to onabotulinum toxin A. *Urology*. 2014;83:1030-4.

Pool TL. Interstitial cystitis: clinical considerations and treatment. *Clin Obstet Gynecol* 1967; 10:185-91

Rössberger J, Fall M, Pecker R. Critical appraisal of dimethyl sulfoxide treatment for interstitial cystitis: discomfort, side-effects and treatment outcome. *Scand J Urol Nephrol* 2005;39:73-7.

Rovner E, Propert KJ, Brensinger C, Wein AJ, Foy M, Kirkemo A, Landis JR, Kusek JW, Nyberg LM. Treatments used in women with interstitial cystitis: the interstitial cystitis data base (ICDB) study experience. The Interstitial Cystitis Data Base Study Group. *Urology* 2000;56:940-5.

Rowley S, Baer R. Lens deposits associated with RIMSO-50 (dimethylsulphoxide). *Eye* 2001;15:332-3.

Ruiz-Cerdá, J.L., Hernández, M., Gomis, F., Vera, C.D., Kimler, B.F., O'Connor, J.E., Jiménez-Cruz, F. Value of DNA ploidy and nuclear

---

morphometry for prediction of disease progression in renal cell carcinoma. *J. Urology* 1996;155: 459-465.

Saban MR, Nguyen NB, Hammond TG, Saban R. Gene expression profiling of mouse bladder inflammatory responses to LPS, substance P, and antigen-stimulation. *Am J Pathol.* 2002;160:2095-110.

Saban R, Saban MR, Nguyen NB, Hammond TG, Wershil BK. Mast cell regulation of inflammation and gene expression during antigen-induced bladder inflammation in mice. *Physiol Genomics.* 2001;7:35-43.

Saban R, Simpson C, Vadigepalli R, Memet S, Dozmorov I, Saban MR. Bladder inflammatory transcriptome in response to tachykinins: neurokinin 1 receptor-dependent genes and transcription regulatory elements. *BMC Urol.* 2007;22:7-8.

Salzman GC, Singham SB, Johnston RG, Bohren CF: Light scattering and cytometry. In: *Flow Cytometry and Sorting*, Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML (eds). Wiley-Liss, New York, 1990;81–107.

Sand PK, Winkler HA. Analysis of long-term Elmiron therapy for interstitial cystitis. *Urology* 1997;49(Suppl 5A):93-99.

---

Sanders C, Egger M, Donovan J, Tallon D, Frankel S. Reporting on quality of life in randomized controlled trials: bibliographic study. *BMJ* 1998; 317: 1191-4.

Sant GR, LaRock DR. Standard intravesical therapies for interstitial cystitis. *Urol Clin North Am* 1994;21:73-83.

Sant GR, Propert KJ, Hanno PM, Burks D, Culkin D, Diokno AC, Hardy C, et. al, Interstitial Cystitis Clinical Trials Group. A pilot clinical trial of oral pentosan polysulfate and oral hydroxyzine in patients with interstitial cystitis. *J Urol.* 2003;170(3):810-5.

Sant GR, Theoharides TC. The role of the mast cell in interstitial cystitis. *Urol Clin North Am.* 1994;21:41-53.

Sant GR. Interstitial cystitis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1997;9(5):332-6.

Sasaki K, Smith CP, Chuang YC, Lee JY, Kim JC, Chancellor MB. Oral gabapentin (neurontin) treatment of refractory genitourinary tract pain. *Tech Urol* 2001;7:47-9.

---

Schrohl AS, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J, et al. Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:378-387.

Shingleton WB, Fleishmann J. Urinary interleukin-2 inhibitor and the voiding symptoms in women patients with interstitial cystitis. *Semen Urol* 1991; 9:120-21.

Simon LJ, Landis JR, Erickson DR, Nyberg LM. The Interstitial Cystitis Data Base Study: concepts and preliminary baseline descriptive statistics. *Urology*. 1997;49:64-75.

Slobodv G, Felones M, Gran Ch, Kyker KD, Hurst RE, Culkin DJ. Abnormal expression of molecular markers for bladder impermeability and differentiation in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2004;171:1554-58.

Smith SD, Wheeler MA, Foster HE et al, Urinary nitric oxide synthase activity and cyclic GMP levels are decreased with interstitial cystitis and increased with urinary tract infections. *J Urol* 1996;55:1432-35.

---

Sorensen RB. Chondroitin sulphate in the treatment of interstitial cystitis and chronic inflammatory disease of the urinary bladder. *Eur Urol* 2003;16-8.

Soucy F, Grégoire M. Efficacy of prednisone for severe refractory ulcerative interstitial cystitis. *J Urol* 2005;173:841-3;

Sugrue MM, Wang Y, Rideout HJ, Chalmers-Redman RME, Tatton WG. Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 123-30.

Sun Y, Chen M, Lowentritt BH, Van Zijl PS, Koch KR, Keay S, Simard JM, Chai TC. EGF and HB-EGF modulate inward potassium current in human bladder urothelial cells from normal and interstitial cystitis patients. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:106-14.

Swat W, Ignatowicz L, Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4181 thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Meth* 137:79–87, 1981.

Teichman JM, The role of the bladder surface in interstitial cystitis/painful bladder syndrome..*Can J Urol*. 2007;14:3599-607.

---

Temml C, Wehrberger C, Riedl C, Ponholzer A, Marszalek M, Madersbacher S. Prevalence and correlates for interstitial cystitis symptoms in women participating in a health screening project. *Eur Urol* 2007;51(3):803-8;

Theoharides TC. Hydroxyzine in the treatment of interstitial cystitis. *Urol Clin North Am* 1994;21:113-9.

Thorne ID, Resnick MI. A methodology for the characterization of urinary glycosaminoglycans. *J Urol*. 1984;131:995-9.

Ueda T, Tamaki M, Ogawa O, Yamauchi T, Yoshimura N. Improvement of interstitial cystitis symptoms and problems that developed during treatment with oral IPD-1151T. *J Urol* 2000; 164:1917-20.

van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P, Bouchelouche K, Cervigni M, Daha LK, Elneil S, Fall M, Hohlbrugger G, Irwin P, Mortensen S, van Ophoven A, Osborne JL, Peeker R, Richter B, Riedl C, Sairanen J, Tinzi M, Wyndaele JJ. Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal. *Eur Urol* 2008;53:60-7

---

van Ophoven A, Oberpenning F, Hertle L. Long-term results of trigone-preserving orthotopic substitution enterocystoplasty for interstitial cystitis. *J Urol* 2002;167:603-7.

van Ophoven A, Pokupic S, Heinecke A, Hertle L. A prospective, randomized, placebo controlled, double-blind study of amitriptyline for the treatment of interstitial cystitis. *J Urol* 2004;172: 533-6.

Vicencio, J , Galluzzi, L , Tajeddine, N , Ortiz,, C , Criollo A , Tasdemir, E , Morselli, E , Younes, A , Maiuri, M , Lavandero, S , Kroemer, G 2008 Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology* 54: 92-99

von Garrelts B. Interstitial cystitis: thirteen patients treated operatively with intestinal bladder substitutes. *Acta Chir Scand* 1966;132:436-43.

Warren JW, Brown J, Tracy JK, Langenberg P, Wesselmann U, Greenberg P. Evidence-based criteria for pain of interstitial cystitis/ painful bladder syndrome in women. *Urology*. 2008;71:444-8.

Warren JW, Meyer WA, Greenberg P, Horne L, Diggs C, Tracy JK. Using the International Continence Society's definition of painful bladder syndrome. *Urology* 2006;67:1138-42.

---

Warren JW. Interstitial cystitis as an infectious disease. *Urol Clin North Am.* 1994;21:31-9.

Warren JW. Is interstitial cystitis an infectious disease? *Med Hypotheses.* 1994;43:183-6.

Warwick R, Ashkan M. The functional results of partial, subtotal and total cystoplasty with special reference to ureterocecocystoplasty, selective sphincterotomy and cystoplasty. *Br J Urol* 1967;39:3-12.

Webster DC, Brennan T. Use and effectiveness of physical self-care strategies for interstitial cystitis. *Nurse Pract* 1994;19: 55-61.

Whitmore KE, Payne CK, Diokno AC, Lukban JC. Sacral neuromodulation in patients with interstitial cystitis: a multicenter clinical trial. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2003;14:305-8.

Whitmore KE. Self-care regimens for patients with interstitial cystitis. *Urol Clin North Am.* 1994;21:121-30.

Wilkinson DR, Erickson AD Urinary and Serologic Markers for Interstitial Cystitis: An Update. *Curr Urol Rep.* 2006;7: 414-22.

---

Y Kanda, Investigation of the freely available easy to use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation*. 2013; 48: 452–58.

Zhang CO, Li ZL, Shoenfelt JL, Kong CZ, Chai TC, Erickson DR, Peters KM, Rovner ES, Keay S. Comparison of APF activity and epithelial growth factor levels in urine from Chinese, African-American, and white American patients with interstitial cystitis. *Urology*. 2003;61:897-901

Zuraw BL, Sugimoto S, Parsons CL et al. Activation of urinary Kallikrein in patients with interstitial cystitis. *J Urol*, 1994;152:874-878.