

BIOLOGÍA Y FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA LOCALMENTE AVANZADO

BIOLOGY AND PROGNOSTIC FACTORS IN LOCALLY ADVANCED TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE BLADDER

Dr. Frattini, G.

RESUMEN: *Objetivo:* Tratar de establecer una revisión bibliográfica actualizada de los conocimientos sobre la biología y los factores pronósticos en el carcinoma transicional de vejiga localmente avanzado.

Material y métodos: Se revisó bibliografía obtenida a través de Medline, internet, libros de texto, revistas, etc sobre el tema en estudio.

Resultados: La necesidad de predecir la conducta de los tumores infiltrativos vesicales ha llevado a desarrollar numerosos marcadores que puedan tener utilidad pronóstica.

Además de los ya reconocidos, como el estadio y el grado tumoral, se menciona el volumen tumoral, la hidronefrosis asociada y el patrón de infiltración como indicadores pronósticos.

Las técnicas de inmunohistoquímica han permitido identificar proteínas vinculadas con el ciclo celular, que pueden usarse como marcadores en el cáncer vesical.

En este sentido, las alteraciones de el Ki67, P53, pRb y p21 se han correlacionado bien con pronóstico desfavorable en este tipo de tumores.

Conclusiones: Si bien aún no existen datos concluyentes basados en estudios prospectivos respecto de los marcadores mencionados, es posible que, en el futuro, la combinación de dos o más de estos marcadores puedan aportar información pronóstica en el momento de tomar decisiones terapéuticas.

(Rev. Arg. de Urol., Vol. 66, N° 2, Pág. 61, 2001)

Palabras clave: Cáncer de vejiga; Factores pronósticos; Marcadores tumorales.

SUMMARY: *Objective:* To make a state of the art about biology and prognostic markers in locally advanced transitional cell carcinoma of the bladder.

Material and methods: A bibliographic review was made using the Medline, internet, journals and textbooks, to make an update about this item.

Results: The need to predict the behavior of infiltrative bladder cancer has led to develop many biological makers which can provide prognostic information.

Appart from the recognized prognostic indicators such as tumor grade and stage, the tumoral volume, the hydronephrosis and the histologic pattern of invasion have been proposed as prognostic indicators.

Clínica Privada Pueyrredón
Diagnóstico Urológico Mar del Plata
Jujuy 2176 Tel. 0223-4911989 Fax: 0223-4911608
email: gfrattini@cpuey.com.ar

Immunohistochemistry techniques have permitted to identify several proteins related to cell cycle that can be used as prognostic markers in bladder cancer.

Alterations in these markers, like p51, Ki67, pRb and p21 have been related with worse prognosis.

Conclusions: *Although there is no enough data to make recomendations about the use of these markers in bladder cancer, it is possible that, in the future, the combination of two or more of them can be used to make therapeutic decisions.*

(Rev. Arg. de Urol., Vol. 66, Nº 2, Pág. 62, 2001)

KEYWORDS: Bladder cancer; Prognostic factors; Tumor markers .

INTRODUCCIÓN

El carcinoma transicional de vejiga localmente avanzado es una de las patologías donde el urólogo tiene la sensación de estar "llegando tarde" en el momento de realizar cualquier tratamiento con intención curativa.

Los resultados de la cistectomía, aún hoy considerada el "gold standard" de tratamiento para este tipo de tumores, arrojan resultados muy distantes de ser considerados de "oro", y sobrevidas esperadas cercanas al 50% a los 5 años ^(1,2).

Nuestro grupo ha analizado 78 pacientes sometidos a cistectomía por tumores transicionales T2a y b encontrando una sobrevida global a 5 años del 40% (T2a: 56% T2b: 28%, valor de $p=0,04$) ⁽³⁾.

En vista de estos resultados, que distan de ser óptimos, se han evaluado numerosas alternativas terapéuticas intentando preservar la vejiga.

En este sentido, la radioterapia como único tratamiento, muy popular entre los grupos europeos, tampoco ha demostrado ser de mayor utilidad para tratar este tipo de tumores ^(1,2).

En un estudio retrospectivo realizado en nuestro medio, la radioterapia no mostró diferencias respecto de la RTU sola en el tratamiento de un grupo no seleccionado de tumores infiltrativos vesicales ⁽⁴⁾.

Otras modalidades terapéuticas, muchas de ellas con grupos seleccionados de pacientes, no han arrojado mejores resultados en relación con la sobrevida de estos pacientes ^(1,2,5,6).

Es posible entonces coincidir con el *Dr. Droller* en que "Las fallas en los tratamientos descriptos (cerca del 50%) son frecuentemente debidas a enfermedad metastática más que a recurrencias locales. Esta diseminación precoz es habitualmente indetectable en el momento del tratamiento presuntamente definitivo" ⁽²⁾.

Estos hechos hacen que el diagnóstico de tumor localmente avanzado a través de una RTU, y los métodos de estadificación de que actualmente disponemos sean insuficientes en el momento de elegir un tratamiento.

Es por ello que, en virtud de los resultados expuestos, no contamos con una terapéutica que pueda ser

considerada universal, sino que probablemente debemos ajustar el tratamiento de acuerdo con cada caso.

En este sentido, es de vital importancia definir **grupos de riesgo**.

Estos grupos de riesgo pueden ser identificados en relación con diversos factores pronósticos.

El carcinoma vesical es uno de los campos donde el estudio de marcadores ha mostrado un gran desarrollo en los últimos tiempos. El presente trabajo intenta realizar una revisión actualizada sobre este tema.

FACTORES PRONÓSTICOS

Todo factor o marcador pronóstico ideal debería contar con una serie de propiedades para ser considerado de uso universal: Tener una alta sensibilidad y especificidad para discriminar los grupos de riesgo, estar estandarizado, ser reproducible, tener bajo costo y realización sencilla.

Los dos factores de influencia pronóstica reconocidos en el cancer vesical son el *grado* y el *estadio tumoral* ^(1,2,7,8).

Otros factores que se han citado como de importancia pronóstica han sido:

- *El volumen tumoral* ha sido mencionado como un mejor indicador pronóstico que la profundidad de penetración en la capa muscular, hallazgo que ha llevado al grupo del *Dr. Bostwick* a proponer una modificación en la clasificación TNM. ⁽⁹⁾
- *La uronofrosis asociada*. Los tumores con dilatación de la vía urinaria bilateral han mostrado peor sobrevida. ⁽¹⁰⁾
- *El patrón de infiltración microscópica*. El carcinoma transicional muestra tres patrones de infiltración, el más frecuente es en frente amplio (o *Broad Front*), que ocurre en el 65% de los casos, otro de diseminación lateral (10%) y finalmente el patrón tentacular o en islotes (25%) considerado de peor pronóstico. ^(2,11)

Factores genéticos en el desarrollo tumoral

Es indudable que la transición de una célula urotelial normal a desarrollarse en forma tumoral debe in-

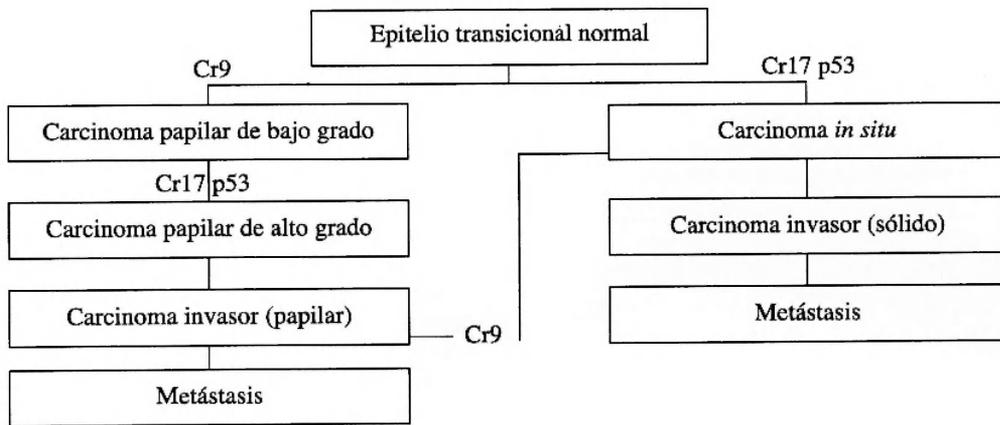


Figura 1. (Droller-AUA, 1999)

cluir ciertas modificaciones a nivel molecular, que le permitan escapar de los niveles de control de crecimiento y diferenciación. Estos cambios, sin duda, están ligados a mutaciones, deleciones o metilaciones, que pueden identificarse en todas las etapas del desarrollo del carcinoma transicional.^(2,12)

En una reciente revisión de 220 pacientes con cáncer vesical, se encontraron aberraciones en el cromosoma 7 en el 93,2% de los casos, en el cromosoma 9 en el 60,9% y en el cromosoma 17 en el 84,7% de los pacientes evaluados.⁽¹³⁾

La Figura 1 muestra la evolución de la carcinogénesis vesical y las alteraciones cromosómicas vinculadas.⁽²⁾

Ciclo celular

En los tejidos adultos, el tamaño de una población celular depende de los índices de proliferación, diferenciación y apoptosis (o muerte programada) de las células.⁽¹⁴⁾

El crecimiento de una población celular puede conseguirse acortando el ciclo celular, pero los factores más importantes que lo afectan son aquéllos que reclutan a las células que están en G0 (o inactivas), al ciclo celular.⁽¹⁵⁾

El ciclo celular está compuesto por fases, su duración aproximada es de 24 horas y en él se identifican claramente dos etapas: la FASE S, donde se replica el ADN (duración: 6 horas), y la FASE M (mitosis o de división celular, duración: 30 minutos). Estos dos períodos están divididos por fases intermedias denominadas G1 y G2, con una duración aproximada de 12 y 6 horas respectivamente.^(Figura 2)⁽¹⁶⁾

La función principal del ciclo celular es la de asegurarse de que el ADN se duplicará durante la Fase S y que éste se dividirá entre dos células iguales durante la fase M.⁽¹⁶⁾

Existe un punto clave en el ciclo celular denominado punto de restricción, que comprende la transición

entre la fase G1 y S, es decir, es el punto donde se desencadena la duplicación celular. En el control de este pasaje y de los otros procesos del ciclo intervienen numerosas proteínas denominadas ciclinas, y kinasas dependientes de ciclinas.⁽¹⁷⁾

Las ciclinas que controlan la transición G1-S son denominadas D y E.⁽¹⁷⁾

Las kinasas dependientes de la ciclina D fosforilan sustratos cuya modificación es necesaria para la salida de la fase G1. La proteína del gen supresor del retinoblastoma (pRb) es uno de esos blancos, que se halla hipofosforilado (activo) durante las fases G0-G1, y se lo encuentra hiperfosforilado (inactivo) durante las fases S y G2.^(17,18)

El gen del p53 es otro de los que son regulados por estas proteínas.

El proceso oncogénico ejerce su efecto más importante en la modificación de los reguladores de la transición G1-S.

Durante la fase G1, la célula responde a señales extracelulares para avanzar hacia otra división celular o para salir del ciclo y entrar en la fase G0 (o estado de reposo, donde se produce la diferenciación celular).

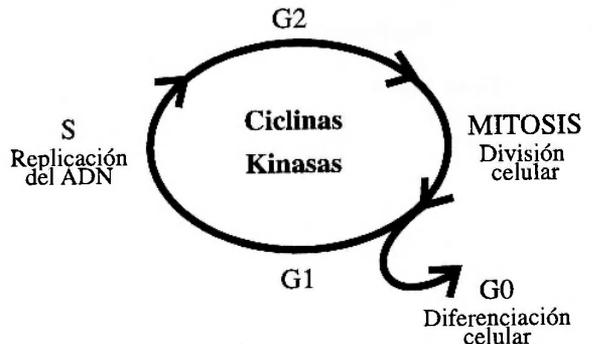


Figura 2. Ciclo celular

A diferencia del tránsito entre las fases S-G2-y M (que es automático), la progresión de la fase G1 se activa por la presencia de mitógenos y puede bloquearse por citocinas antiproliferativas.

Las células cancerosas abandonan este control y tienden a permanecer en el ciclo, y debido a esto, la maduración y la diferenciación celular se ven afectadas.⁽¹⁷⁾

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE PROGRESIÓN Y METÁSTASIS EN EL CA. TRANSICIONAL LOCALMENTE AVANZADO

La conducta biológica del carcinoma transicional localmente avanzado no puede considerarse uniforme, y su historia natural está regida por numerosos factores.

Algunos de estos factores han sido expuestos en los párrafos anteriores; sin embargo, los avances en el terreno de la biología molecular de los tumores vesicales han aportado numerosos datos que podrían ser tenidos en cuenta como elementos de orientación pronóstica.

Se han dividido a estos indicadores en relación a 5 puntos considerados de importancia en el desarrollo de progresión tumoral y metástasis.⁽¹⁸⁾

- 1- Escape del control inmunológico
- 2- Desdiferenciación celular
- 3- Aumento de la replicación celular
- 4- Inmortalización celular
- 5- Factores que intervienen en el desarrollo de metástasis

1) *Escape del control inmunológico*

El sistema inmune ejerce un permanente control para prevenir el crecimiento de células consideradas anómalas.

El desarrollo tumoral y su diseminación a sitios remotos se ve facilitado si sus células "escapan" de esta vigilancia inmunológica.

En este sentido, la disminución de la actividad linfocítica antitumoral se ha sugerido como un factor pronóstico en el cáncer vesical.⁽¹⁹⁾

2) *Desdiferenciación celular*

Aquellas células tumorales que se encuentran permanentemente ciclando, comienzan a presentar cambios en relación al corto tiempo que poseen para su maduración y diferenciación celular.

Algunos de estos cambios incluyen las alteraciones en la ploidía y en los receptores de membrana.

a) *Ploidía:*

La duplicación permanente del ADN puede llevar a alteraciones numéricas en la carga genética celular (ploidía).

La ploidía del ADN se determina por citometría de flujo, y requiere de un equipamiento que no lo hace accesible en todos los medios.

Las células normales son diploides.

Los tumores aneuploides muestran un curso clínico más agresivo y tienden a ser más indiferenciados.⁽²⁰⁾

Se ha demostrado que aquellos tumores superficiales que muestran alteraciones en la ploidía tienen peor pronóstico, con un mayor riesgo de progresión.⁽²⁰⁾

La alteración en la ploidía, en asociación con la positividad en el p53 en los tumores invasores tienen, según ciertos informes, una fuerte asociación con la sobrevida de los pacientes.⁽²¹⁾

Algunos autores han sugerido que la ploidía, en conjunto con el estadio (T), es un importante factor pronóstico en el carcinoma localmente invasor, y que los tumores aneuploides tienen un mayor porcentaje de ganglios positivos en el momento de la cistectomía. Sin embargo, la determinación de la ploidía no es todavía un estudio estandarizado, y no hay consenso en su utilidad como marcador pronóstico.⁽²²⁻²⁴⁾

b) *Cambios en los receptores de membrana:*

La desdiferenciación celular puede llevar a cambios en la expresión de ciertos receptores que las células normalmente expresan en su membrana plasmática.⁽²⁵⁾

En 1975 *De Cenzo* fue el primero en estudiar la expresión de *antígenos de grupos sanguíneos (ABH)* en las células de los tumores superficiales de vejiga. Estos antígenos están presentes en el 75 al 80% de los pacientes, y su ausencia se ha indicado como de mal pronóstico sólo en los tumores superficiales, aunque no hay datos concluyentes basados en grandes series.⁽²⁶⁻²⁹⁾

Algunas series han demostrado, también en tumores superficiales, que la positividad de receptores de HCG en la membrana de los carcinomas transicionales, o su presencia en la orina en los tumores invasores, sería un factor de mal pronóstico. Estos receptores actuarían como factores de crecimiento tumoral.⁽³⁰⁻³²⁾

El receptor del Epidermal growth factor (EGF-R) es una proteína que está codificada por el gen *c-erb-1* (que es similar a los oncogenes *c-erbB2* y *c-erbB1*).⁽³³⁾

Este receptor es estimulado por el *epidermal growth factor (EGF)* y el *Transforming growth factor alfa* del medio extracelular. Su activación resulta en la fosforilación de kinasas intracelulares con la subsecuente proliferación, transformación y división celulares.⁽³³⁾

Puede ser identificado en la membrana de las células de tumores transicionales con técnicas de inmunohistoquímica, y se ha observado una fuerte correlación entre la sobreexpresión del EGF-R y un alto estadio y grado tumoral, así como con alteraciones en la ploidía y progresión tumoral.⁽³³⁾

Sin embargo, no se han observado diferencias en la sobrevida entre los pacientes con EGF-R positivo y ne-

gativo en tumores localmente avanzados, por lo que sólo serviría como marcador en tumores superficiales.⁽³³⁻³⁶⁾

Se ha sugerido que los *transforming growth factors (TGF) alfa y beta* servirían como indicadores pronósticos.

Ravery demuestra correlación entre los niveles tisulares de TGF alfa y la muerte por cáncer vesical.⁽³⁷⁾

Coombs y Tokunaga coinciden en que el descenso de *receptores de TGF beta* se relaciona con mal pronóstico.^(38,39)

En relación con los factores anteriormente expuestos, no existe consenso actualmente para su uso rutinario como marcadores pronósticos, y su utilidad clínica generalizada está aún supeditada a futuras investigaciones.

3) Aumento de la replicación celular

El aumento de la replicación celular es indispensable para el crecimiento tumoral, y es sabido que aquellos tumores que desarrollan conductas más agresivas, presentan un alto índice de proliferación.^(33,40)

La determinación de esta fracción de células en replicación (o fracción de crecimiento- *growth fraction*), puede servir entonces como un indicador pronóstico.

Analizaremos en primer lugar los métodos para cuantificar esta porción celular activa, y luego los cambios ultraestructurales evaluables que facilitan la división celular.

a) *Cuantificación de la población celular en crecimiento:*

El *índice mitótico* ha sido por mucho tiempo el único modo para evaluar a esta población de células que están duplicándose. Tiene en su contra el ser un método laborioso, no siempre se correlaciona con el total de células que están dividiéndose, requiere del conteo de un número muy grande de células, es muy dependiente del operador y además, sólo evalúa un pequeño segmento del ciclo celular (el más corto).^(41,42)

Por estos motivos, el *índice mitótico* no puede ser considerado un buen factor pronóstico.

La incorporación de isótopos radioactivos como la *timidina tritiada* o la *citometría de flujo* son métodos muy certeros, pero requieren de un sofisticado equipamiento que los hace poco prácticos en el momento de estandarizar una conducta.^(20,42)

En los últimos años, las técnicas de inmunohistoquímica han permitido identificar ciertas proteínas involucradas en el ciclo celular, que permiten individualizar a las células que están replicándose.

El marcador ideal es aquella proteína que se encuentre solamente en la fase S (*S phase fraction*) y que pueda ser identificable con estos métodos, ya que sólo marcará a aquellas células que terminarán dividiéndose, dado que no todas las células que entran en el ciclo llegan a la mitosis.

Uno de las primeras proteínas investigadas fue el *Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)*. Este antígeno tiene un importante papel en la duplicación del ADN, y se ha hallado una fuerte relación entre su positividad y la proliferación celular.^(20,42)

Una desventaja del PCNA es que tiñe en casi todas las fases del ciclo celular, por lo que a veces, no todas las células que marcan PCNA positivo van a dividirse.^(42,43)

Se ha visto que aquellos tumores de grado y estadio más alto, presentan positividad del PCNA; sin embargo, aún no hay estudios que avalen su uso como marcador en el carcinoma transicional localmente avanzado.^(20,42)

El *antígeno Ki 67* es una proteína nuclear no muy bien caracterizada aún, aunque se sabe que está implicada en el complejo de duplicación del ADN.⁽⁴⁴⁾

Está codificada por un gen localizado en el cromosoma 10 y su porción más estable se detecta con el anticuerpo monoclonal MIB-1 en todas las fases del ciclo celular con excepción de G0.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾

Estudios comparativos de proliferación con marcadores radioisotópicos avalan al Ki67 como marcador de células en proliferación sin embargo, como el PCNA, marca también en G1, etapa en la que la división no necesariamente ocurrirá.⁽⁴²⁾

Okamura y Mudler han hallado correlación entre la positividad del Ki67 y el grado y estadio tumoral; sin embargo la correlación con el estadio no fue factible de comprobar en la serie de *Cohen*.^(42,48,49)

Ki-67 INDEX: Es el porcentaje de células que se tiñen con el anticuerpo monoclonal.

Se considera positivo un valor superior al 15-30%.^(42,50)

Varios estudios han confirmado que la presencia de un Ki67 index alto se correlaciona con alto índice de recurrencias y progresión tumoral.^(42,51,52)

Según *Stein* existe suficiente evidencia para sugerir que el Ki67 index puede complementar el rutinario uso del estadio y el grado para establecer la agresividad tumoral.⁽³³⁾

b) *Cambios ultraestructurales en las proteínas que regulan el ciclo celular:*

La proliferación celular normal ocurre ordenadamente a través del ciclo celular, el cual es regulado por proteínas como las ciclinas y las quinasas dependientes de éstas.⁽³³⁾

La alteración de estas proteínas, como la p53, la proteína del retinoblastoma (pRb) o la p21 han sido evaluadas como factores pronósticos.

p53

El *gen supresor de tumor p53* se halla ubicado en el cromosoma 17p13 y es el encargado de producir una proteína que produce arresto celular en G1, lo que le permite a la célula, en caso de encontrar un daño en el ADN, repararlo, o, de no poder hacerlo, derivarla a la apoptosis. Esta proteína tiene una vida media muy

ha encontrado que la asociación entre p53 positivo (>20%) y Ki-67 positivo (>32%) se correlaciona con mal pronóstico.⁽⁵⁰⁾

Estos datos no han podido ser corroborados por Moch, quien halló que la positividad de ambos marcadores implica un mal pronóstico para los tumores T1, pero no observó diferencias significativas en los cánceres infiltrativos de músculo.⁽⁸³⁾

4) Inmortalización celular

Toda célula que se duplica continuamente llega a una etapa denominada "período de crisis", más allá del cual no puede seguir dividiéndose.⁽¹⁸⁾

Durante estas sucesivas divisiones, los extremos de los cromosomas van acortándose hasta que la célula llega a ser incapaz de dividirse y muere.⁽¹⁸⁾

Existe una enzima, denominada telomerasa, que se encarga de reparar estos acortamientos, permitiendo a la célula "inmortalizarse", por lo que, aquellos tumores que presentan un crecimiento ilimitado deben expresar esta enzima.^(18,75,84)

No existen estudios disponibles sobre el uso de la telomerasa como factor pronóstico en el cáncer localmente avanzado.

5) Factores que intervienen en el desarrollo de metástasis

a) *Angiogénesis*: Es el proceso por el cual un tumor genera vasos de neoformación que le permiten seguir creciendo.⁽⁸⁵⁾ Se cree que este mecanismo es necesario también para el desarrollo de metástasis.⁽⁸⁶⁾

Esta angiogénesis se ve estimulada por la presencia de péptidos extracelulares como el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) que son producidos por las células tumorales.^(33,87)

La angiogénesis se evalúa con técnicas de inmunohistoquímica y se puede cuantificar (*Microvessel density*)⁽³³⁾

El aumento en esta densidad microvascular se ha asociado con progresión tumoral y mala sobrevida.⁽³³⁾

Bochner y Philip, en sus respectivos estudios, han demostrado que la angiogénesis es un importante factor de predicción de progresión y sobrevida en los pacientes con tumores localmente avanzados.^(88,89)

Hawke, sin embargo, informa que la angiogénesis tumoral no guarda relación con la sobrevida.⁽⁹⁰⁾

b) *Pérdida de la adhesividad tisular*: Existen ciertas proteínas de membrana que le proporcionan a la célula la capacidad de unirse con otras.⁽³³⁾

Una de las más estudiadas es la *E-cadherin*.⁽³³⁾

Las caderinas tienen además la función de controlar la polaridad a la célula, su ordenamiento, y la morfología tisular.⁽⁹¹⁾

Para que una célula pueda migrar hacia sitios remotos debe perder esta capacidad de adhesión, por lo que la pérdida de estas proteínas favorecería el desarrollo de metástasis.⁽³³⁾

Varios investigadores han demostrado que la pérdida en la expresión de E-caderina u otras moléculas de adhesión tisular como las *cateninas alfa y beta*, se correlacionan con tumores en alto grado y estadio, y con mal pronóstico.^(33,91,92,93)

c) *Aumento de la invasividad tisular*: Se han identificado proteínas de membrana cuya función puede tener una función en la invasividad tisular.⁽³³⁾

El aumento en la actividad de las metaloproteinasas favorece la disrupción de la membrana basal en el cáncer vesical y favorece la invasión.⁽⁹⁴⁾

Del mismo modo, la sobreexpresión de integrinas, proteínas que mediarían la adhesividad y los movimientos celulares en la matriz extracelular, puede predisponer a la migración celular.^(33,95)

CONCLUSIONES

Si bien no hay datos firmes actualmente que permitan hacer recomendaciones para incorporar marcadores como factores pronósticos auxiliares al grado y al estadio tumoral, existe una fuerte tendencia a considerar que no será uno, sino la combinación de varios marcadores, los que puedan predecir la conducta de un tumor, permitiendo seleccionar mejor la terapéutica a emplear en cada caso.⁽³³⁾

BIBLIOGRAFÍA

1. Messing E y Catalona W.: Bladder cancer. En Campbell's Urology, Seventh ed., pp 2329.
2. Droller M. y col.: Bladder Cancer, 9913 PG, 94th anual meeting AUA, Dallas, 1999.
3. Frattini G. y col.: Cistectomía radical como tratamiento del carcinoma transicional de vejiga localmente avanzado. Congreso Argentino de Urología, 1999.
4. Frattini G. y col.: Radioterapia en al carcinoma transicional de vejiga invasor de músculo. *Rev Arg. Urol.* 113:57, 1992.
5. Solsona E. y col.: Feasibility of transurethral resection for muscle infiltrating carcinoma of the bladder: long term followup of a prospective study. *J. Urol.* 95:159, 1998.
6. Seretta V. y col.: The fate of patients with locally advanced bladder cancer treated conservatively with neoadjuvant chemotherapy, extensive transurethral resection and radiotherapy: 10 years experience. *J. Urol.*, 159:1187, 1998.
7. Bassi P. y col: *J. Urol.* 161:1494, 1999.
8. Droller M: Bladder cancer: State of the art care. *Cancer: A cancer journal for clinicians* 48:269, 1998.
9. Liang Cheng y col.: Tumor size predicts the survival of patients with pathologic stage T2 bladder carcinoma. *Cancer* 85:2638, 1999.
10. Haleblan G. y col.: Hidronefrosis as a prognostic indicator in bladder cancer patients. *J.Urol.* 160:2011, 1998.
11. Jewett HJ y col.: Carcinoma of the bladder: Characteristic modes of local invasion. *J. Urol.* 83:383, 1960.

12. Reznikoff C. y col.: A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Seminars in Oncology* 23:571, 1996.
13. Pycha A. y col: Numerical aberrations of chromosomes 7,9 and 17 in squamous cell and transitional cell carcinoma of the bladder: a comparative study performed by fluorescence in situ hybridization. *J.Urol*, 160:737, 1998.
14. Mc Carthy N. y col.: Apoptosis in the development of the immune system: Growth factors, clonal selection and bcl-2. *Cancer metastasis Rev*. 11:157,1992.
15. Baserga R.: The biology of cell reproduction. Cambridge, Ma, Harvard University Press, 1985.
16. Murray AW, Hunt T: The cell cycle. An introduction. New York, Freeman, 1993.
17. Sherr Ch.: Cancer cell cycles. *Science*, 274:1672, 1996.
18. Fair W. Y col.: An overview of cancer biology. En Campbell's Urology, 7th ed. Chapt. 75, pp 2259.
19. Mizutani Y. y col: Prognostic significance of circulating cytotoxic lymphocytes against autologous tumors in patients with bladder cancer. *J.Urol.*, 155:888,1996.
20. Blomjourns E. y col: The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. *Am.J.Clin.Pathol.*, 91,243,1989.
21. Nakopoulou L. y col.: Evaluation of overexpression of p53 tumor suppressor protein in superficial and invasive transitional cell bladder cancer. Comparison with DNA ploidy. *Urology*, 46:334, 1995.
22. Lee S y col: Prognostic factors for survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder: evaluation by histopathologic grade, pathologic stage and flow-cytometric analysis. *Eur. Urol.* 29:193,1996.
23. De Vere White R. y col: Contemporary management of bladder carcinoma. 9968 PM, 94th. Annual meeting, AUA, Dallas, 1999.
24. Lee S y col.: Flow cytometric determination of the DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder: predictability of ploidy with regard to pelvic lymph node metastasis. *Int. J.Urol.*, 1:232, 1994.
25. Hakomori S: Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res*. 45:2405, 1985.
26. De Cenzo J. y col: Antigenic deletion and prognosis of patients with stage A transitional cell carcinoma. *J.Urol*, 114:874, 1975.
27. Lange P: Tissue blood groups antigens and prognosis in low stage transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol.*, 119:52, 1978.
28. Young A. y col.: The prognostic value of cell surface antigens in low grade, non invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 122:462, 1979.
29. Cordon Cardo C. y col: Blood group related antigens in human urothelium: Enhanced expression of precursors, LeX and LeY determinants in urothelial carcinoma. *Cancer Res*. 48:4113, 1988.
30. Iles R y col.: Urinary concentration of human chorionic gonadotrophin and its fragments as a prognostic marker in bladder cancer. *Br. J.Urol.*, 77:61, 1996
31. Fodor M. y col.: Transitional carcinoma of the bladder, evaluation of prognostic factors. *Medicina*, 53:413, 1993.
32. Dirnhofner S. y col.: Production of trophoblastic hormones by transitional cell carcinoma of the bladder. Association to tumor stage and grade. *Hum. Pathol.*, 29:377, 1998.
33. Stein J. y col: Prognostic markers in bladder cancer: A contemporary review of the literature. *J.Urol*, 160:645, 1998.
34. Neal D. y col: Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet*, 1:366, 1985.
35. Messing E. y col: Epidermal growth factor interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J.Urol*. 138, 1329, 1987.
36. Mellon K. y col: Bladder cancer: Long term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J.Urol.*, 153:919,1995.
37. Ravery L y col: Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha epidermal growth factor and cerbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol. Res*. 25:9, 1997
38. Tokunaga H. y col: Decreased expression of TGFbeta receptor type 1 is associated with poor prognosis in bladder transitional cell carcinoma patients. Abstract 670, poster session, AUA, Dallas, 1999.
39. Coombs L y col: Reduced expression of TGFbeta is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma. *Brit. J. Cancer*, 67:578,1993
40. King E.: Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression. *J.Urol*. 155:316, 1996.
41. Quinn C. y col: The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J.Pathol*. 160:93, 1990.
42. Cohen M. y col: Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol*. 24:772, 1993.
43. Van Dierendonck J. y col.: Cell cycle related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison of BrdUrd labelling and Ki67 staining. *Am.J.Pathol*. 138:1165, 1991.
44. Loke S. y col: Inhibition in vitro DNA synthesis by the monoclonal antibody Ki67. *Blood*, 70:1579, 1987.
45. Gerdes J. y col: Immunobiochemical and molecular biological characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki67. *Am.J. Pathol*. 138:867, 1991.
46. Mazelolles C. y col: Usefulness of MIB1 monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma, comparison with Ki67 antibody. *Histopathology*, 25:563, 1994.
47. Gerdes J. y col.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody. *J. Immunol*. 133:1710, 1984.
48. Okamura K y col.: Growth fraction of transitional cell carcinoma of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki67. *J.Urol.*, 144:875, 1990.
49. Mudler A. y col.: Histological parameters and expression of a cell cycle related nuclear antigen (Ki67). *J Pathol*, 166:37, 1992.
50. Tsuji M. y col: Prognostic value of Ki67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: Immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br.J.Urol*. 79:367, 1997.
51. Fontana D. y col: Monoclonal antibody Ki67 in the study of proliferative activity of bladder carcinoma. *J.Urol*. 148:1149, 1992
52. Tsujihaski H. y col.: Cell proliferation of human bladder tumors determined by BrdUrd and Ki67 immunostaining. *J.Urol*. 145:846, 1991.

53. Lane D. y col.: Cancer, p53 guardian of genome. *Nature*, 15:358,1992.
54. Kastan M. y col.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51:6304, 1991.
55. Dalbagni G. y col.: Tumor supressor alterations in bladder cancer. Translation correlates to clinical practice. *Surg.Oncol.Clin North.Amer.*, 4:231, 1995.
56. Wynford-Thomas D.: p53 in tumor pathology. Can we trust in immunohistochemistry?. *J.Pathol.*, 166:329, 1992.
57. Montenarh M. y col.: Biochemical properties of the growth suppressor onncoprotein p53. *Oncogene*, 7:1673, 1992.
58. Hollstein M y col.: p53 mutations in human cancers. *Science*, 253:49,1991.
59. Oyasu R. y col.: p53 gene mutations in human urotelial carcinomas: Analysis by immunohistochemistry and single strand conformation polymorphism. *Modern Pathology*, 8:170, 1995.
60. Grossman B.: Incorporating biomarkers into bladder cancer clinical trials. En: Novel molecular approaches for the diagnosis and therapy of superficial bladder cancer. ASCO educational book, pág. 507, 1999.
61. Milner J. y col.: Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild type p53 protein into the mutant conformation. *Cell*, 65:765, 1991.
62. Herr H. y col.: Can p53 help select patients with invasive bladder cancer for bladder preservation? *J.Urol.*, 161:20, 1999.
63. De Vere White R. y col.: Contemporary management of bladder carcinoma. 9968 PM course, 94th anual meeting AUA, Dallas , 1999.
64. Linn J. y col.: The molecular characteristic of bladder cancer in young patients. *J.Urol.* 159:1493, 1998.
65. Esrig D. y col.: Acumulation nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *NEJM*, 331:1259, 1994.
66. Sarkis A. y col.: Prognostic value of overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J.Clin.Oncol.*, 13:1384, 1995.
67. Sarkis A. y col.: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell carcinoma: a marker for disease progression. *J.Nat.Cancer Inst.*, 85:53, 1993.
68. Jahnsen S y col.: Predictive value of pRb and p53 immunostaining in locally advanced bladder cancer treated with cystectomy. *J.Urol.*, 160:1291, 1998.
69. Jahnsen S y col.: The predictive value of p53 and pRb immunostaining in advanced bladder cancer treated with cystectomy. *J.Urol.*, 160, 1291, 1998.
70. Fung y col.: Structural evidence for the authenticity of human retinoblastoma gene. *Science*, 236:1653, 1987.
71. Wang J. y col.: The retinoblastoma tumor supressor protein. *Adv.Cancer Res.*, 64:25, 1994.
72. Geradts J. y col.: Aberrant Rb gene expression in routinely processed archival tumors tissues determined by three different anti-Rb antibodies. *Int.J.Cancer*, 58:161, 1994.
73. Cote R y col.: Elevated and absent pRb expression associated with bladder cancer progression and has a cooperative effect with p53. *Cancer Res.*, 58,1090,1998.
74. Benedict W y col.: Level of retinoblastoma protein expression correlates with p16 status in bladder cancer. *Oncogene*, 18:1197, 1999.
75. Reznikoff K y col.: A molecular genetic model of human bladder cancer. *Seminars in oncology*, 23:571, 1996.
76. Cordon Cardo C. y col.: Altered expression of the retinoblastoma gene products: prognostic indicators in bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, 84:1251, 1992.
77. Logothetis C y col.: Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, 84:1256,1992.
78. Cordon Cardo C. y col.: Mutation of cell cycle regulators: Biological and clinical implication of human neoplasia. *Am.J.Pathol.*, 147:545, 1995.
79. Stein J. y col.: The effect of p21 expression on tumor progression in p53 altered bladder cancer. *J.Urol.*, part 2, 155:628^a, abstract 1270, 1996.
80. Wagner U y col.: Evaluation of prognostic markers in urinary bladder cancer usin tumor tissue arrays.AUA 94th meeting, abstract 672 (poster),Dallas, 1999.
81. Esrig D. y col.: Prognostic importance of pRb and p53 alterations in transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol.*, part 2, 153:362^a, abstract 536, 1995.
82. Lerner S. y col.: Correlation of retinoblastomaprotein expression with established pathologic prognostic features in radical cystectomy specimens. *J.Urol.*, part 2, 153:353^a, abstract 537, 1995.
83. Moch H. y col.: p53 but no erb-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. *Hum.Pathol*, 25:1346, 1994
84. Sidransky D.: Molecular detection of superficial bladder cancer. En: Novel molecular approaches for the diagnosis and therapy of superficial bladder cancer. Educational Book, ASCO, pág. 503, 1999.
85. Weidner N y col.: Tumour angiogenesis: Review of current applications in tumour prognostication. *Semin. Diagn.Pathol.*, 10:302, 1993
86. Folkman J. y col.: What is the evidence that tumor is angiogenesis dependent? *J.Nat.Cancer Inst.*, 82:4, 1990.
87. Lequerrec A y col.: Tumor angiogenesis. *Bailleres Clin Haematol.*, 6:711, 1993
88. Philip E. y col.: Prognostic significance of angiogenesis in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br.J.Urol.*, 77:352, 1996.
89. Bochner B. y col.: Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J.Natl.Cancer Inst.*, 87:1603, 1995.
90. Hawke C. y col.: Microvessel density as a prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *Br.J.Urol.*, 81:585, 1998.
91. Takeichi M: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251:1451,1991. Binguier P. y col.: Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res.*, 53:3241, 1993.
92. Lipponen P. y col.: Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121:303, 1995.
93. Shimazui T. y col.: Prognostic value of cadherin associated molecules in bladder tumors. *Cancer Res.*, 56:4154, 1996.
94. Liu B.: Comentary on metalloproteinases and bladder carcinoma. *J.Urol.*, 160:1219, 1998.
95. Saito T. y col.: Correlation between integrin alpha 5 expression and the malignant phenotype of transitional cell carcinoma. *Brit.J.Cancer*,73:327, 1996.