

NIVELES ELEVADOS DE ÓXIDO NÍTRICO EN ORINA COMO INDICADOR DE PRESENCIA DE TUMOR TRANSICIONAL DE VEJIGA

GREAT URINE NITRITE IN BLADDER CANCER PATIENTS

Dres. Casabé, A. R.; Piccardo, I.; Riveros, M. D.; Sandes, E. O.; Jasnis, M. A.; Pasik, L.; Malagrino, H.; Porcella, H.; Celeste, F.; S. de Chirife, A. M.; S. de Lustig, E.; Eiján, A. M.

RESUMEN: Introducción: Uno de los mayores desafíos de la oncología es la identificación de pacientes que con carcinoma transicional de vejiga (CTV) superficial tienen alto riesgo de presentar recurrencia o progresar hacia la invasión muscular. Se ha demostrado recientemente en un escaso número de casos la presencia de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en tumores de vejiga. Dado que la iNOS produce altos niveles de óxido nítrico (NO), pensamos que pacientes con CTV podrían tener altos niveles de NO en orina. En este trabajo determinamos los niveles de NO en la orina de pacientes con CTV con evidencia de enfermedad (CEE), comparándolos con pacientes con CTV sin evidencia de enfermedad (SEE), con pacientes con tumores no relacionados y controles sanos; y determinamos la expresión de iNOS en los tumores de vejiga.

Material y Métodos: Se evaluaron 66 pacientes con CTV, 33 CEE y 19 SEE; 19 pacientes con tumores ginecológicos (TG) y 39 personas sanas (Control). Los niveles de NO se determinaron en orina con el reactivo de Griess y se expresan como NO-2uM / 100 mg de creatinina.

Resultados: Los pacientes con CTV-CEE tienen (4,2 uM, rango: 2,1-91,6) significativamente mayores niveles de NO que los CTV-SEE (1,7 uM, rango: 1,2-5,4), que los TG (2,0 uM, rango: 0,8-58,1) y que el grupo control (2,1 uM, rango: 0,4-4,9), ($p=0.000$, análisis estadístico de Kruskal-Wallis). Usando como valor de corte 3uM, la determinación de NO en orina es indicador de presencia de tumor de vejiga con una sensibilidad del 82% y una especificidad del 79%. La iNOS fue detectada por la técnica de "Western blot", en el 52% (13/25) de los tumores de vejiga examinados.

Conclusión: Los niveles de NO en orina son indicadores de presencia de tumor vesical con alta sensibilidad.

(Rev. Arg. de Urol., Vol. 67, N° 1, Pág. 11, 2002)

Palabras clave: Óxido nítrico; Indicador de tumor en la vejiga.

SUMMARY: The aim of this study was to determine urine nitrite levels in bladder cancer patients, and compared with healthy controls and with patients bearing other non related tumors; and to examine inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in bladder cancer tissue. Our results had shown that tumor bladder patients presented significantly higher urine nitrite values than healthy individuals and that other cancer patients. Furthermore, iNOS

Instituto de Oncología Angel H. Roffo. Avenida San Martín
5481, CP 1417, Buenos Aires, Argentina.

Trabajo galardonado con el Premio "Temas Libres",
Congreso Argentino de Urología, 2001.

Key words: Nitrite; Bladder cancer marker.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma transicional de vejiga (CTV) comprende el 90% de los carcinomas vesicales. Los tumores superficiales confinados a la mucosa (pTa) o a la lamina propia (pT1), representan aproximadamente el 80% de los carcinoma diagnosticados⁽¹⁾. Cuando el tejido urotelial adyacente o distante a la lesión papilar superficial es histológicamente normal, la resección transuretral puede ser curativa; sin embargo, si el tumor es invasor es necesaria una terapia más agresiva.

Las recurrencias son comunes en aproximadamente el 50% de los tumores superficiales. El seguimiento de estos pacientes se realiza mediante cistoscopia y citología urinaria, esta última presenta muy baja sensibilidad⁽²⁾. La progresión hacia la invasión muscular es un evento poco frecuente en los tumores pTa bien y moderadamente diferenciados (Gi-GII). Aproximadamente dos tercios de los tumores pT1, tienen riesgo de presentar recurrencias locales, pero no progresan a tumores invasores. Sin embargo, un tercio de estos tumores progresará a lo largo del tiempo hacia la invasión de la capa muscular propia (pT2-pT3), hecho que puede conducir a la diseminación metastásica con la posible muerte del paciente^(3,4). Por lo tanto, uno de los desafíos interesantes de la uro-oncología clínica es la identificación de pacientes con alto riesgo de presentar recurrencia o enfermedad mioinvasora.

El óxido nítrico (NO) es generado por una familia de enzimas denominadas NO sintasas (NOS). Dos de ellas, la NOS endotelial y neuronal, se expresan constitutivamente y requieren de la presencia de ión Ca^{+2} y calmodulina para generar bajos niveles de NO. Citocinas inflamatorias y productos bacterianos, usualmente inducen la isoforma Ca^{+2} independiente denominada iNOS. La iNOS se expresa en diferentes células como hepatocitos, macrófagos, células endoteliales y condrocitos y produce grandes cantidades de NO por períodos prolongados⁽⁵⁾. Se ha sugerido que el NO desempeña un rol dual en la biología tumoral, pudiendo ejercer actividad promotora o inhibidora del crecimiento⁽⁶⁾. La actividad iNOS se encuentra elevada durante diferentes patologías del tracto urinario^(7,8). Se ha postulado que la producción de NO podría estar involucrada en la asociación entre inflamación y la aparición de tumores, incluyendo los tumores de vejiga⁽⁹⁾. *Mirvish y col.* concluyen que los N-nitroso compues-

tos, cuyo precursor es el NO, son responsables de la inducción de un significativo número de tumores⁽¹⁰⁾.

Por otro lado, las instilaciones con bacilo *Calmette-Guerin* (BCG), que es una terapia eficiente para tumores superficiales recurrentes y carcinoma *in situ*⁽¹¹⁾, induce la formación local de NO en altas concentraciones y por largo tiempo. Recientemente, por estudios de inmunohistoquímica, se ha demostrado la presencia de iNOS en cortes histológicos tumorales de CTV, pero no en tejido adyacente no tumoral⁽¹³⁾. La iNOS se encuentra expresada tanto en células inflamatorias como en células tumorales del epitelio vesical^(14,15). Dado que la iNOS produce grandes concentraciones de NO, es posible que éstos sean volcados en la orina. Así, la orina de pacientes con CTV podría contener mayores niveles de NO que la orina de personas sanas.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si los niveles de NO en orina podrían servir como marcador de la presencia de tumor vesical. Para ello determinamos los niveles de NO en la orina de pacientes con CTV-CEE y los comparamos con los niveles en pacientes CTV-SEE, en pacientes que tienen un tumor no relacionado que no invade la vejiga y en controles sanos. Determinamos además la expresión de iNOS en homogenatos de tumor de vejiga.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y controles: Los niveles de NO en orina se determinaron en cuatro grupos diferentes:

- Pacientes con carcinoma transicional de vejiga (CTV) con evidencia de enfermedad (CEE):** Se incluyeron 33 pacientes con edad media de 65 (rango: 38-82), de los cuales 28 son hombres y 4 mujeres. El examen de los cortes histológicos de los tumores fue realizado por un único patólogo siguiendo los criterios de la UICC⁽¹⁶⁾ y de la Organización Mundial de la Salud⁽¹⁷⁾. De los 33 pacientes, 21 presentan CTV superficial (19 pT1, 2 pTa), 8 CTV invasor (5pT2, 2 pT3, 1 pT4), 1 carcinoma *in situ* y 3 sin especificar. Según el grado de diferenciación, 12 tumores fueron de bajo grado (2 GI, 10 GII), 19 de alto grado (13 GIII, 6 GIV) y 2 sin especificar.
- Pacientes con CTV, sin evidencia de enfermedad (SEE) en el momento de recolección de la orina:** Se

incluyeron 15 hombres y 4 mujeres con edad media de 54 (rango: 36-81) años. Las muestras de orina se recogieron en el período libre de enfermedad, entre 9-50 meses después de finalizado el tratamiento. Todos los pacientes de este grupo fueron tratados con resección transuretral (RTU) y cuatro recibieron quimioterapia sistémica y 3 BCG intravesical. Los grupos CTV-CEE y CTV-SEE son independientes.

c) *Pacientes con tumores ginecológicos (TG)*: Se incluyeron 19 mujeres con tumores ginecológicos que no invaden la vejiga (13 carcinomas de cérvix, 1 de endometrio, 4 de ovario y 1 de vulva). La edad media fue de 46 (rango: 38-75) años. Se incluyeron además 2 pacientes con cistitis radica y 2 pacientes con carcinoma de colon.

d) *Grupo control*: Constituido por 39 personas sanas (23 hombres y 16 mujeres), edad media 56 (28-88) años.

Muestras de tumor: La expresión de la iNOS se determinó por la técnica de "Western blot" en 25 muestras de tumores transicionales de vejiga. Según el grado de invasión 13 tumores fueron superficiales (2 pTa, 10 pT1) y 12 fueron invasores (8 pT2, 1 pT3, 3 pT4); según el grado de diferenciación, 9 fueron de bajo grado (9 GII) y 17 de alto grado (11 GIII, 6 GIV). Se analizaron 2 muestras adicionales de pacientes CTV-SEE diagnosticadas como tejido inflamatorio. Todas las muestras se obtuvieron por RTU en el Departamento de Urología del Instituto Angel H.Roffo.

SDS-PAGE y Western blot: Para determinar la expresión de la iNOS las muestras de tumor obtenidas por RTU, fueron procesadas inmediatamente. Los tumores se homogeneizaron en buffer (50 mM Tris-ClH, pH: 8.0; 100 ug/ml ClNa; 1% Triton, 1 ug/ml aprotinina, 1 mM PMSF, 2 ug/ml leupeptin, 10 uM EDTA/EGTA), sonicados durante 2 segundos y finalmente centrifugados a 13000 x g durante 40 minutos. Los sobrenadantes se recogieron y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford con una curva estándar de sero-albúmina bovina⁽¹⁸⁾. Las muestras se congelaron a -80 C hasta su utilización.

Cuando estas muestras se descongelaron, se resuspendieron en 50 μ l de buffer de Laemmli y se calentaron durante 3 minutos a 96 C. Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (7,5%) con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)⁽¹⁹⁾. Luego de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y teñidas con el anticuerpo específico (H-174, sc-8310 de Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50. Como segundo anticuerpo se utilizó IgG (cabra anticonejo), conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma).

Muestras de orina: La orina fue recolectada en

frascos estériles, centrifugada a 7000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de la centrifugación se fraccionaron y conservaron a -80 C. La concentración de creatinina fue determinada en cada muestra previo a ser congelada.

Determinación de nitrito (NO₂): El contenido de NO₂, que representa uno de los productos estables del NO, se determinó en la muestras de orina con el reactivo de Griess⁽²⁰⁾. La absorbancia fue determinada a 550 nm con un lector de ELISA (Multiskan Ascent, Labsystem). La concentración de NO₂ fue determinada comparando los datos con una curva estándar de NaNO₂ diluida en solución fisiológica. Los resultados se expresan como NO₂ uM / 100 mg de creatinina.

Analisis estadístico: Se utilizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar los valores de NO₂ entre los diferentes grupos. Para comparar diferentes proporciones se utilizó la prueba de X². Para establecer si los niveles de NO₂ en orina eran predictores de la presencia de tumor independiente de otras variables como sexo, edad, invasión o grado histológico se utilizó un análisis multivariado. Como valor de corte se utilizó la concentración que simultáneamente da mayor sensibilidad y especificidad, correspondiente al percentilo 80 de la población control. A partir de este valor se calcularon la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para la determinación de NO₂ en orina.

RESULTADOS

La distribución de los niveles de NO₂ en la orina se muestran en la Figura 1. La Tabla I muestra el valor de la mediana (Md) y rango para los grupos estudiados. Los valores de NO₂ en orina fueron: pacientes con CTV-CEE de 4,2 uM / 100 mg creatinina, con un rango: 2,1-91,6; pacientes con CTV-SEE 1,7 / 100 mg creatinina, rango: 1,2-5,4; pacientes con TG 2,0 uM / 100 mg creatinina rango: 0,8-58,1 y el grupo control 2,1 uM / 100 mg creatinina, rango: 0,4-4,9.

El grupo de CTV-CEE presenta valores significativamente mayores que todos los grupos estudiados (p=0.000, por Kruskal-Wallis). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de pacientes CTV-SEE, estableciendo que la determinación de NO₂ en orina es un indicador de la presencia de tumor transicional en la vejiga. El grupo de pacientes con TG presentó niveles medios de NO₂ iguales al grupo control. Nuestros resultados indican que pacientes con otros tumores ginecológicos que no invaden la vejiga tienen niveles bajos de NO₂ en orina.

Como comentario, en dos pacientes con carcinoma de colon sin invasión en vejiga y en dos pacientes con cistitis radica (2.1 y 3.0 uM / 100 mg creatinina, res-

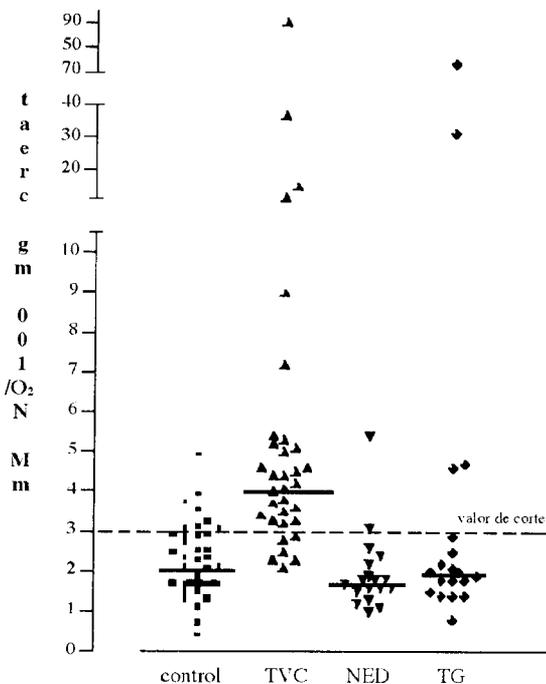


Figura 1: Distribución de los niveles de NO_2 en orina de controles, CTV-CEE, CTV-SEE y TG. El valor de corte es $3 \mu\text{M}/100 \text{ mg creatinina}$. Las líneas indican los valores de la mediana de cada grupo. El grupo de CTV-CEE tiene valores significativamente aumentados con respecto a los demás grupos (* $p=0,000$, mediante el análisis de Kruskal-Wallis. No hay diferencias significativas entre el grupo control y los grupos CTV-SEE y TG.

pectivamente), también se observan niveles bajos de NO_2 en orina. Estas observaciones refuerzan el concepto previo de que la presencia de tumor está asociada con altos niveles de NO_2 en orina.

Teniendo en cuenta la mejor sensibilidad y especificidad, definimos como $3 \mu\text{M}/100 \text{ mg}$ de creatinina, como valor de corte óptimo en el percentilo 80 del grupo control. Los valores de NO_2 que superen el valor de corte son considerados valores positivos y aquellos iguales o menores se estiman negativos. Así, el 82% de los pacientes con CTV tienen valores positivos y el 79% del grupo control valores negativos. Por lo tanto, considerando este valor de corte el ensayo muestra una sensibilidad de 82% y una especificidad del 79%, con valores predictivos positivo y negativo de 77% y 84% respectivamente, para detectar la presencia de CTV.

El análisis multivariado no demostró asociación entre los valores de NO_2 y el sexo (hombres: 1,7, rango: 0,4 - 4,9 y mujeres: 2,6, rango: 1,5-3,7) o la edad.

La Tabla II muestra que no hay diferencias asocia-

Tabla I: Concentración de nitrito en orina NO_2 en orina ($\mu\text{M}/100 \text{ mg creatinina}$)

Grupo	Mediana	rango
CTV-CEE	4,2 *	2,1-91,6
CTV-SEE	1,7	1,2-5,4
TG	2,0	0,8-58,1
CONTROL	2,1	2,1-4,9

Los pacientes con CTV-CEE tienen niveles significativamente elevados de NO_2 en orina comparado con los demás grupos.

* $p=0,000$, Kruskal-Wallis.

das a variables histopatológicas del tumor como grado de diferenciación histológico o invasión tumoral.

También determinamos la expresión de la iNOS en los tumores de vejiga, ya que esta enzima es la responsable de producir altas cantidades de NO y en consecuencia mayores niveles de NO_2 . La iNOS se determinó por la técnica de *Western blot* en homogenatos de tumores. En la Figura 2, se observan bandas de proteínas con un peso molecular de 130 kDa, reveladas con el anticuerpo específico para iNOS humana. La presencia de iNOS fue detectada en el 52% (13/25) de los tumores. Sin embargo, en 2 muestras que correspondieron a tejido inflamatorio vesical, la iNOS se detectó en una muestra y no en la otra. No se encontraron diferencias significativas entre la expresión de la iNOS y el grado de diferenciación histológico o invasión tumoral (Tabla II).

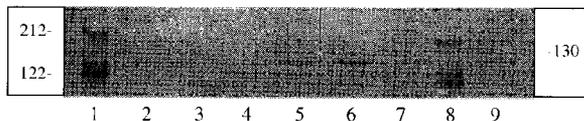


Figura 2: Detección por *Western blot* de la iNOS en homogenatos de tumores de vejiga. En las calles 1 y 8 se observan los marcadores de peso molecular (212 y 122 kDa). Entre las calles 2 a 7 se observan diferentes tumores de vejiga (en las calles 5 y 6 se observa una banda de 130 kDa específica de iNOS) y en la calle 9 se sembró un homogenato de tejido vesical inflamatorio (débil positivo para iNOS).

DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la orina de pacientes con CTV contiene niveles más altos de NO_2

que la orina del grupo de personas sanas. El 57 % de los pacientes con tumor activo tienen niveles superiores a 4 μM / 100 mg creatinina. Coincidentemente en el 52% de los tumores analizados demostramos presencia de iNOS, enzima responsable de la producción de altas concentraciones de NO.

La función que el NO desempeña en la biología tumoral no se comprende completamente, debido a que éste desempeña un rol dual demostrando actividades pro o antitumorales que dependen de sus concentraciones⁽²¹⁾. Asimismo, la concentración de NO y el tiempo de su interacción, pueden afectar tanto la respuesta vascular tumoral como la respuesta inmune del hospedador.

Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la actividad NOS y el grado histológico en tumores ginecológicos tanto de ovario como de endometrio, y en tumores de mama^(22,23). Contrariamente, en tumores de colon se ha demostrado menor expresión de NOS que en la mucosa colónica normal⁽²⁴⁾.

En diferentes procesos patológicos que afectan el tracto urinario se han encontrado cambios en la actividad de la iNOS. Por ejemplo, tanto en infecciones renales como durante el rechazo de trasplantes renales, la actividad iNOS se encuentra incrementada^(7,8). En orina de pacientes con cistitis intersticial, se ha demostrado una actividad iNOS disminuida con respecto a controles sanos⁽²⁵⁾.

Swana y col.⁽¹⁴⁾, han comprobado que en tumores transicionales de vejiga, la iNOS se encuentra expresada tanto en células inflamatorias como en células tumorales aisladas. Nuestros resultados demuestran que la iNOS fue detectada por técnica de *Western blot* en el 52% de las muestras de CTV, sin tener correlación ni

con el grado histológico ni con el estado de invasión tumoral. La iNOS se detectó en uno de los dos tejidos vesicales inflamatorios que estudiamos. Estos resultados sugieren que en tejidos de CTV la iNOS puede estar localizado en las células inflamatorias y aún en las propias células tumorales. Estudios recientes han demostrado por inmunohistoquímica, tinción positiva para iNOS en todas las muestras de tumores de vejiga evaluados, mientras que no se detectó en ningún tejido no tumoral adyacente. Los autores tampoco pudieron establecer ninguna correlación con el grado de diferenciación o el estadio tumoral⁽¹³⁾. Usando una línea celular de carcinoma transicional de vejiga (T24) nosotros observamos que *in vitro* pueden producir aproximadamente 5 nmol $\text{NO}_2^-/10^6$ células. *Morcos y col.*, ha demostrado que la BCG induce la producción de NO en células T24⁽¹²⁾. En conjunto estos resultados indican que no sólo las células inflamatorias pueden producir NO, sino que también las propias células tumorales son capaces de producirlo. Será necesario realizar mayor número de estudios para establecer qué células producen NO en los tumores de vejiga y cuál es su relevancia en el pronóstico de los pacientes.

Por otro lado, nosotros demostramos que pacientes con CTV sin evidencia de tumor en el momento de la obtención de la orina, tienen niveles de NO_2^- similares al grupo control. Estos resultados nos indican que la determinación de NO_2^- en orina podría ser indicador de presencia tumoral.

Considerando como valor de corte óptimo 3 μM /100 mg creatinina, equivalente al percentilo 80 del grupo control, la determinación de NO_2^- en orina tiene una sensibilidad del 82% y una especificidad del 79%. La

Tabla II: Concentración de NO_2^- en orina y expresión de iNOS según el grado de diferenciación e invasión tumoral.

	NO_2^- en orina (μM / 100 mg creatinina) ^a	Expresión iNOS (% de muestras positivas) ^b
GI-GII	4,5 (2,3-14,7) n=12	56 (5/9)
GIII-GIV	4,4 (2,1-91,6) n= 19	50 (8/16)
pTa- pT1	4,2 (2,3-91,6) n= 21	46 (6/13)
pT2- pT4	4,1 (2,1-5,1) n= 8	67 (8/12)

^a Los datos se expresan como mediana (rango). No se observan diferencias entre la determinación de NO_2^- en orina y el grado de diferenciación histológica o invasión tumoral.

^b El 52% (13/25) de los CTV tienen expresión de proteína iNOS. No hay diferencias significativas, usando el análisis de χ^2 entre los diferentes grupos.

determinación en orina de un antígeno asociado al tumor de vejiga (BTA, *Bard Diagnostic Sciences, Redmond, WA*) tiene menor sensibilidad (58%) y una especificidad (97%) apenas superior a la nuestra⁽²⁶⁾. El ensayo de NMP-22, que determina una proteína nuclear, fue recientemente aprobado por la Oficina de Control de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de Norte América (*Food and Drug Administration*) para el diagnóstico de pacientes con cáncer de vejiga. Este ensayo demuestra una sensibilidad entre el 48 y el 68% y una especificidad del 70-80%^(27,28). La citología urinaria tiene una sensibilidad del 38% y una especificidad del 73%⁽²⁾.

El análisis multivariado de nuestros resultados, indica que al no demostrarse asociación con parámetros histopatológicos, la determinación de NO₂ en orina puede ser considerado un marcador independiente.

Lundberg y col., estudiaron la síntesis de NO durante procesos inflamatorios, utilizando un ensayo de quimioluminiscencia⁽²⁹⁾. Tanto en cistitis infecciosa como en cistitis inducida por BCG o cistitis intersticial se encontraron niveles elevados de NO respecto de controles sanos. En pacientes con cistitis rádica los niveles de NO también fueron mayores que en el grupo control, pero no tanto como en las otras cistitis. Nosotros medimos NO en la orina de sólo dos pacientes con cistitis rádicas. Ambos mostraron niveles de NO₂ inferiores al valor de corte (3uM/100 mg de creatinina). La diferencia con nuestros resultados podría deberse a que el ensayo de quimioluminiscencia es mucho más sensible para determinar NO que la determinación de NO₂ con el reactivo de *Griess* utilizado por nosotros. Por lo tanto, es posible que las cantidades de NO₂ que se producen durante una cistitis por irradiación no sean suficientes para ser detectados por el reactivo de *Griess* utilizado por nosotros.

A modo de resumen final, nuestros resultados demuestran que la determinación de los niveles NO₂ en orina podría utilizarse como marcador de la presencia de carcinoma transicional de vejiga, siendo un ensayo económico y fácil de realizar, con alta sensibilidad y especificidad para detectar tumor primario en la vejiga.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico de la Subsecretaría de Investigación y Tecnología del Ministerio de Salud Pública de la Nación (Beca *Ramón Carrillo* y *Arturo Oñativia*) y por la Universidad de Buenos Aires (UBACYT M012).

Inés Piccardo es Becaria de la Fundación Sales. *Ana María Eiján* pertenece al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

BIBLIOGRAFÍA

1. Catalona W: Urothelial tumors of the urinary tract. En:

Cambell's Urology. Walsh P, Retk A., Satamey J, y col. (eds.) vol 6 Saunders, Philadelphia PA, pp 1094-1158.

2. Nguyen M, Watanabe H, Budson AI, Richie JP y Folkman J: Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 85:241-242, 1993.

3. Mostofi FK, Sobin LH y Toloni H (eds.): Histological typing of urinary bladder tumors. En: International Histological Classification of Tumors. Vol 10 World Health Organization Geneva, 1973.

4. Koss LG: Tumors of the urinary bladder. En: Atlas of Tumor Pathology. Fascicle 11, 2nd series. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1975.

5. Knowles RG y Moncada S: Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 198: 249-258, 1994.

6. Eiján AM, Davel K, Rueda H, Rozenberg G, Lustig ES de, Jasnis MA. Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different murine mammary tumor cell lines. *Int J Mol Med* 2: 625-630, 1998.

7. Smith SD, Wheeler MA, Zhang R, Weiss RM, Lorber MI, Sessa WC y Weiss RM: Nitric Oxide synthase induction with renal transplant rejection or infection. *Kidney Int.* 50: 2088-2093, 1996.

8. Wheeler MA, Smith SD, García-Cardena, G, Nathan CF, Weiss RM y Sessa WC: Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest* 99: 110-114, 1997.

9. Ohshima H y Bartsch H: Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factor: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 305: 253-257, 1994.

10. Mirvish SS: Role of N-nitroso compound (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposure to NOC. *Cancer Lett* 93: 17-21, 1995.

11. Nseyo WO y Lamm DL: Immunotherapy of bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 13: 342-349, 1997.

12. Morcos E, Jansson OT, Adolfsson J, Ehren I y Wiklund NP: Bacillus Calmette-Guerin induces long-term via the induction of nitric oxide synthase activity in urothelial cell. *J Urol* 165: 678-682, 2001.

13. Wolf H, Haeckel C, Roessner A: Inducible nitric oxide synthase expression in human urinary bladder cancer. *Virchows Arch* 437: 662-666, 2000.

14. Swana HS, Smith SD, Perrotta PL, Saito N, Wheeler MA y Weiss RM: Inducible nitric oxide synthase with transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 161: 630-634, 1999.

15. Klotz T, Bloch W, Jacobs G, Niggemanns S, Engelmann U y Addicks K: Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer. *Urology* 54: 416-419, 1999.

16. Sobin LH y Wittekind CJ (eds): UICC TNM classification of malignant tumors. 5th edition. New York, Inc, 1997.

17. World Health Organization. International Histological classification of tumors. World Health Organization. 1969-1981. 2nd edition Springer-Verlag, Berlin, 1988.

18. Bradford, MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

19. Laemmli UK: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

20. Granger DL, Hidds JB, Perfect JR y Durack DT: Metabolic fate of L-arginine inhalation to microbiostatec capability

- of murine macrophages. *J Clin Invest* 85: 264-273, 1990.
21. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC y Moncada S: Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc, Natl Acad Sci USA* 92: 4392-4395, 1995.
 22. Thomsen LL, Lawton FG, Knowle RG, Beesley JE, Rive-roso-Moreno V y Moncada S: Nitric Oxide synthase Activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 54: 1352-1354, 1994.
 23. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG y Moncada S: Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer*: 72: 41-44, 1995.
 24. Chatwal VJ, Ngoi SS, Chan STF, Chia YW and Moochala SM: Aberrant expression of nitric oxide synthase in human polyps, neoplastic colonic mucosa and surrounding peritumoral normal mucosa. *Carcinogenesis* 15: 2081-2084, 1994.
 25. Smith SD, Wheeler MA, Foster HE Jr y Weiss RM: Urinary nitric oxide synthase activity and cyclic GMP levels are decreased with interstitial cystitis and increased with urinary tract infections. *J Urol* 155: 1432-1435, 1996.
 26. Ellis WJ, Blumenstein BA, Ishak LM, Enfield DL y The Multicenter Study Group: Clinical evaluation of the BTA Trak assay and comparison to voided urine cytology and BTA test in patients with recurrent bladder tumors. *Urology* 50: 882-887, 1997.
 27. Soloway MS, Briggman JV, Carpinito GA, Chodak GW, Church PA, Lamm DL y col.: Use of a new tumor marker, urinary NMP-22, in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 156: 363-367, 1996.
 28. Landman J, Chang Y, Kavaler E, Doller MJ y Liu BC-S: Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* 52: 398-402, 1998.
 29. Lundberg JON, Ehrén Im Jansson O, Sdolfsson J, Lundberg JM, Weitzberg E, Alving K y Wiklund NP: Elevated nitric oxide in the urinary bladder in infections and noninfections cystitis. *Urology* 48: 700-702, 1996.