

Ploidía de ADN en el pronóstico del cáncer de vejiga

DNA ploidy in bladder cancer prognosis

Dr. Rovegno, A. R.

INTRODUCCIÓN

Las conductas frente al cáncer de vejiga están constantemente cuestionadas por la naturaleza heterogénea de esta neoplasia y por las variables opciones terapéuticas disponibles.

En lo que hace a los tumores superficiales (Ta y T1) que representan más del 75% de los cánceres primarios de vejiga, la información histopatológica no predice con exactitud aquel 50 o 60% de pacientes que experimentarán recurrencia tumoral y que se beneficiarían con terapias intravesicales. Tampoco permiten identificar cuáles pacientes responderán favorablemente a esas terapias.¹

La progresión de los cánceres vesicales superficiales a los infiltrantes del músculo se observa en el 10 a 30% de los Ta y T1, la individualización del grupo de pacientes que sufren esos tumores de alto riesgo justificaría asumir con ellos tratamientos más agresivos. Sin embargo, el seguimiento basado en la cistoscopia sólo permite adoptar una conducta frente a la progresión ya instalada. La disponibilidad de test diagnósticos sensibles y específicos para seleccionar pacientes con riesgo de progresión significaría un sustancial progreso en la conducción de estos enfermos.^{1,2}

En el otro extremo del espectro del cáncer de vejiga están los tumores que invaden el detrusor, 75% de los cuales exponen esa condición en el momento del diagnóstico inicial. El problema más relevante con ellos es determinar su potencial metastático, ya que más de la mitad de los tratados con cistectomía radical mueren por diseminación de la enfermedad. Desafortunadamente no hay parámetros clínicos que permitan predecir cuáles se beneficiarían con quimioterapia adyuvante.^{1,3}

A pesar de la necesidad de disponer de estudios para establecer un pronóstico y de la facilidad con que pueden obtenerse células exfoliadas o productos desprendidos de los tumores vesicales en muestras de orina, los marcadores tumorales adquirieron una pobre relevancia en el manejo clínico del cáncer de vejiga. Los conocimientos en biología tumoral avanzaron muy rápidamente, desembocando en la identificación de numerosos genes y productos genéticos involucrados en la carcinogénesis. Es así como el dosaje de marcadores tumorales, aunque agregaría complejidad y costos a la tecnología requerida para los test rutinarios de diagnóstico, contribuiría a la mejor comprensión de la biología del cáncer vesical y a su carcinogénesis.¹

No obstante, es evidente que en este contexto está emergiendo un rol definido de los marcadores tumorales en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de vejiga que influirá sobre su manejo clínico. Resulta importante entonces entender la naturaleza de esos marcadores, la posibilidad de medirlos en material clínico y los problemas que esos marcadores pueden ayudar a resolver.¹

ANÁLISIS DEL ADN

El contenido anormal de ADN es frecuente en las células neoplásicas y es la resultante de las anomalías cromosómicas de las mismas. Dicho contenido anormal de ADN junto con la fase de síntesis del ciclo celular pueden identificarse usando la citometría de flujo o el análisis de imágenes en material de tejido tumoral o frecuentemente mediante el estudio de la orina.

Principios generales de la citometría de flujo

El citómetro de flujo es un instrumento que permite medir propiedades físicas de la célula, por ejemplo tamaño o granulaciones del citoplasma, antígenos citoplasmáticos o contenido de ADN o ARN, en células individuales incluidas en una suspensión.

En la citometría de flujo las células pasan, una por una, a través de un rayo láser dispersando su luz en diferentes direcciones dependiendo de las características físicas de las células. Esta dispersión es captada y transportada por grupos ópticos hasta detectores capaces de leerla e interpretarla al tiempo que una computadora archiva los datos para luego volcarlos en gráficos.

Los componentes básicos del citómetro de flujo son un dispositivo para transporte de fluidos, un sistema óptico, un detector y una computadora. (Figura 1)

El sistema de transporte de fluidos succiona células en suspensión desde un tubo de ensayo para ingresarlas a la cámara de flujo. Esta cámara está rodeada por una camisa en el interior de la cual circula un flujo laminar de líquido que fuerza a las células de la suspensión en estudio a disponerse una tras otra para ingresar, a través de un embudo especial, en el tubo que las llevará a atravesar la fuente de luz. La velocidad con que circula la suspensión de células debe mantenerse constante durante el análisis para que cada célula permanezca una igual cantidad de tiempo en la región donde es iluminada.⁵ De este modo es posible analizar cerca de 3.000 células por segundo.

Las propiedades intrínsecas de la célula, como el tamaño y la granulación citoplasmática, se miden en células no coloreadas por el modo en que dispersan el rayo de luz láser que las incide. Las señales ópticas que se captan son las que salen hacia adelante y las que se dispersan en ángulo recto, las primeras proporcionan el tamaño celular y las otras informan sobre características celulares como granulaciones citoplasmáticas o configuración nuclear.⁴ (Figura 2)

Los elementos o sustancias que constituyen las células pueden estudiarse mediante el sistema de marcado con anticuerpos específicos que previamente se conjugan con fluorocromos. Otro modo de trabajo es teñir directamente el ADN o el ARN con colorantes

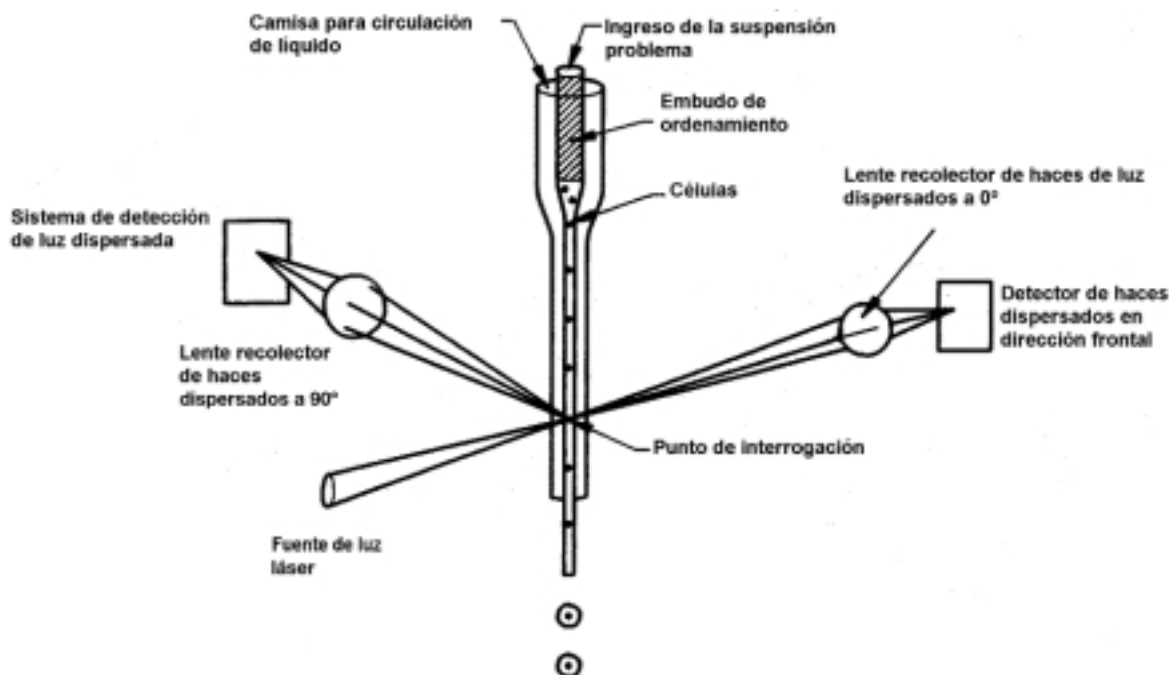


Figura 1. Esquema simplificado del citómetro de flujo. (Tomado de Leith-Willman⁵, pág 256)

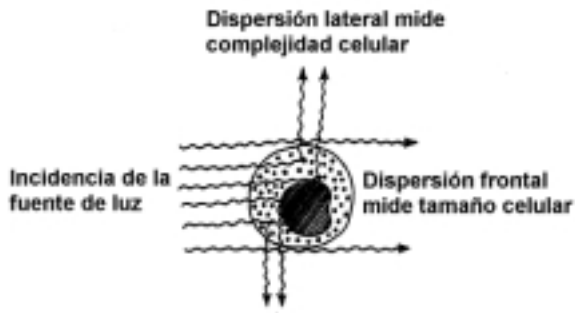


Figura 2. Modos de dispersión del rayo láser cuando incide a una célula. Tomado de Tsieh Sun⁴, pág 4.

fluorescentes específicos como el yoduro de propidio; este tipo de colorantes se unen en forma estequiométrica al ADN de modo que la emisión fluorescente de cada célula será proporcional a su contenido de ADN.

La citometría de flujo mide el contenido celular de las sustancias marcadas o teñidas de acuerdo con la cantidad de señal fluorescente que éstas emiten. En efecto, las células marcadas con fluorocromos son iluminadas una a una por el rayo láser durante 10-6 segundos, cuando el colorante absorbe luz, los electrones de su molécula son lanzados a un nivel energético más alto, pero cuando el colorante deja la luz los electrones vuelven en 10-9 segundos a su nivel de energía anterior emitiendo fotones de luz que constituyen la señal fluorescente, ésta es detectada por fotodetectores y convertida en una señal electrónica que es analizada por una computadora.⁵

Análisis de ADN por citometría de flujo

El ciclo celular

Todos los tejidos contienen tres poblaciones celulares diferentes. La población principal está compuesta por las células que "ciclan", o sea que se dividen continuamente pasando de una mitosis a otra. Después de un cierto número de ciclos, un pequeño número de células puede dejar el ciclo celular y morir. Hay un tercer grupo celular que abandona el ciclo para mantenerse transitoriamente inactivo y reingresar cuando es estimulado por algún factor del microambiente.⁴

El ciclo celular atraviesa cuatro diferentes fases (Figura 3). La fase inactiva es designada como G₀. La primera fase activa del ciclo se denomina G₁, período de intensa actividad bioquímica dentro de la célula. Es seguida por la fase S o período de síntesis durante el cual se sintetiza activamente ADN. A continuación trans-

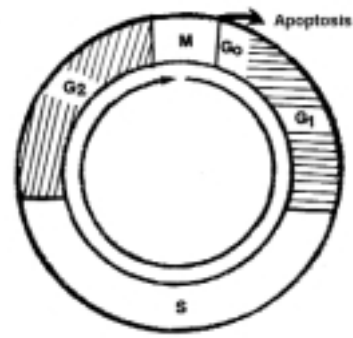


Figura 3. Esquema del ciclo celular. Tomado de Tsieh Sun⁴, pág 198.

curre la fase G₂ en la cual se duplica el ADN y comienza a condensarse para ingresar a la cuarta fase activa, fase M o mitosis en la que se produce la división celular.^{4,6}

Ploidía

El número de cromosomas de las células sexuales o gametos se conoce como haploide o n y el número de cromosomas de las células somáticas como diploide o $2n$. En los seres humanos el número haploide es 23 ($n=23$); y el diploide es 46 ($2n=46$). En los gatos $n=19$ y $2n=38$; los perros tiene $n=39$ y $2n=78$.⁷

La mayoría de las células de un tejido están en la fase G₀/G₁ del ciclo celular, un grupo mínimo está en fase S y otro grupo también reducido está en la fase G₂/M. De este modo, la citometría de flujo correspondiente a las células de un tejido normal teñido con yoduro de propidio tendrá un histograma del tipo que se

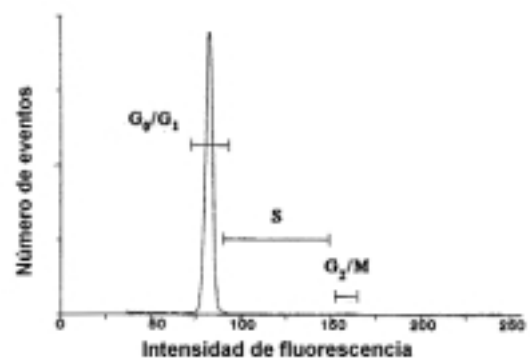


Figura 4. Histograma de una población celular normal. Se estableció como valor diploide las 80 unidades de intensidad de fluorescencia. (Tomado de Frierson-Linder⁸, pág 97).

muestra en la Figura 4. En el eje de las X figura la intensidad de fluorescencia que es expresión del contenido de ADN de las células. En el eje de las Y está el número de células analizado. El mayor número de células corresponde a la fase G0/G1 del ciclo celular y su contenido de ADN está en el rango diploide. Las pocas células con una cantidad creciente de ADN son las que se encuentran en fase S y finalmente, un grupo pequeño, que corresponde a la población celular en fase G2/M, tiene el doble de contenido de ADN ya que lo duplicó para dividirse.

Cualquier cambio en el contenido de ADN de las células que están en fase G0/G1 es considerado anormal y se denomina aneuploide. Si el contenido de ADN es mayor que el normal se llama hiperdiploide, y si es menor hipodiploide. Cuando el contenido anormalmente alto alcanza el doble del normal se utiliza el término tetraploide.

Interpretación de los datos

Para determinar la ploidía de las células neoplásicas de un tejido es muy importante establecer el valor diploide normal. Esto se logra de dos maneras, una de ellas es aceptando que en el preparado a analizar existe una población de células normales, por ejemplo linfocitos, junto con las células neoplásicas. La otra, cuando en el espécimen clínico no hay suficientes linfocitos normales que permitan establecer el estándar diploide, es utilizar linfocitos de individuos normales como control, estos pueden medirse separadamente o agregarse en proporción 2:1 o 3:1 al espécimen problema. En este caso el pico del histograma con el mayor número de células será el valor diploide.⁸

Es así como los histogramas de un tejido problema presentan dos registros, uno el correspondiente a las células normales con su valor diploide y tetraploide normales, y otro correspondiente a las células neoplásicas.

Si dentro de la población de células neoplásicas el grupo que está en la fase G0/G1 tiene contenido de ADN normal, o sea diploide, su registro se superpondrá al registro de células normales y se establecerá que su ploidía es diploide.

Cuando el grupo de células neoplásicas que está en fase G0/G1 tiene un contenido de ADN que es el doble del normal, entonces su ploidía es tetraploide, y se expresará en el histograma por la aparición de un pico en el eje de las X a la altura del valor tetraploide. Las células en fase G2/M de esta población tendrán cuatro veces el contenido normal de ADN lo que se observa en el histograma como un pico de menor altura, ya que siempre el número de células en esta fase del ciclo es menor. (Figura 5)

El significado último de esta situación es que en la población neoplásica se han adicionado cromosomas a las células.

El contenido de ADN o ploidía de las células tumorales se establece en relación con células control normales y se expresa como Índice de ADN (DI) que se calcula por la fórmula.

$$DI = \frac{\text{Contenido de ADN de las células problema en fase G0/G1}}{\text{Contenido de ADN de las células control en fase G0/G1}}$$

Si el índice de ADN es igual a 1 significa que la población problema es diploide, si el índice es 2 (en el ejemplo de la Figura 6; 120/60), la población problema es tetraploide, un índice de 1,5 corresponde a una población triploide.

El parámetro de mayor valor en cuanto a la calidad de los histogramas es el coeficiente de variación del pico G0/G1 (CV) que corresponde al desvío estándar del pico dividido por la media y expresa la dispersión de datos alrededor del valor medio. Cuanto más pequeño es el CV, más sensible fue el análisis. Los grandes CV dejan abierta la posibilidad de que esté incluido un pico aneuploide dentro del pico diploide.^{4,8}

Otra variable de interés en el análisis de los histogramas de ADN es el Índice de Proliferación (PI) o

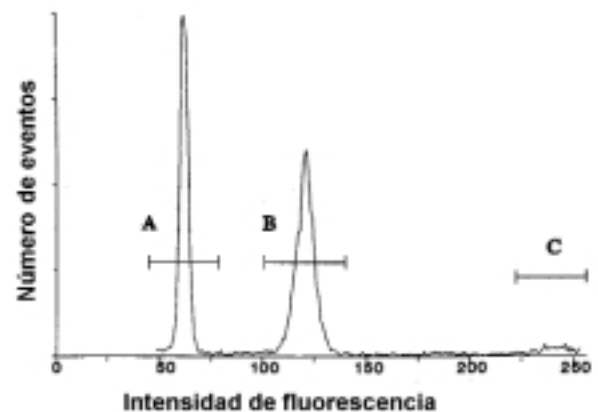


Figura 5. Histograma de una población celular problema. El pico A corresponde al grupo de células normales en fase G0/G1 con ADN en rango diploide establecido en 60 unidades de intensidad de fluorescencia. El pico B es el de la población celular en estudio, cuyo grupo en fase G0/G1 tiene un contenido de ADN de 120 unidades de intensidad, que es el doble del diploide, por lo cual la población tiene contenido de ADN tetraploide. El pico C es el de las células en fase G2/M de la población en estudio, que tienen 4 veces el contenido normal de ADN, expresado por una intensidad de fluorescencia de 240 unidades. (Tomado de Messing, E.⁸, pág 102.)

Fracción en fase S que estima el porcentaje de células en esa fase del ciclo celular y que en muchos tumores tiene un valor pronóstico superior al de la ploidía. El propósito de esta determinación es conocer la actividad proliferativa del tumor que es expresión de su agresividad. Los citómetros de flujo tienen incorporados programas para su medición. La fórmula general para este índice es:

$$PI = \frac{\text{Células en proliferación (S + G2/M)}}{\text{Población celular total (G0/G1 + S + G2/M)}} \times 100$$

El defecto de esta medición consiste en el hecho de que frecuentemente se superponen células normales con células neoplásicas.^{4,8}

Principios generales del análisis de imágenes

En esta técnica, también llamada citometría de imágenes, el espécimen a analizar es un corte de tejido o un extendido citológico dispuestos en un portaobjeto y teñido con la técnica de *Feulgen* colorante que se une de manera estequiométrica con el ADN de las células. Cuando se estudian cortes de tejido hay programas que permiten obtener resultados satisfactorios aun analizando porciones de las células cortadas en el proceso de preparación por la navaja del micrótopo al obtener los cortes de los tacos de parafina en los que se encuentra el tejido a examinar.

Una video-cámara montada sobre un microscopio captura imágenes del preparado. Estas señales analógicas son convertidas mediante un conversor analógico-digital a datos digitales, que se archivan en la memoria de una computadora. En este formato digital, los datos son expuestos en el monitor de la computadora o analizados por el *software* de ella.

Un concepto central en la citometría de imágenes es la noción de píxeles. Cada imagen queda representada en la computadora por un número de píxeles y a cada píxel se le asigna un valor numérico, por ejemplo entre 0 y 250, que representa la intensidad de luz de ese píxel.⁸

La imagen así digitalizada puede someterse a una variedad de mediciones utilizando las distintas herramientas del *software*. El análisis de imágenes se lleva a cabo fundamentalmente evaluando el valor matemático de los píxeles individuales que componen la imagen. Las mediciones incluyen la intensidad de los píxeles, la relación entre un píxel y otro y el número de píxeles de una imagen dada. A través de estas mediciones es posible describir características morfológicas de las células como tamaño, textura, forma de los núcleos, o relacio-

nes entre las células. También es posible establecer la densidad óptica de regiones específicas de la célula, como el núcleo, cuando éste ha sido coloreado con colorantes específicos. Con esta modalidad se determina el contenido de ADN de los núcleos celulares.

Existen diferencias fundamentales entre la citometría de flujo y el análisis de imágenes. En el primer método se analizan una cantidad muy grande de células, pero el operador no interviene en la selección de las mismas. En el análisis de imágenes la cantidad de células analizadas son pocas (por lo general 200 por caso), pero las mismas han sido elegidas por el operador de manera interactiva. En el caso del análisis de ADN los resultados son en general similares, pero la citometría de flujo es superior para la determinación de la fase S. Por otro lado, es casi imposible procesar con el citómetro pequeñas biopsias como vesicales, esofágicas, etc para las cuales el análisis de imágenes es el método de elección.

En los últimos años se han desarrollado múltiples anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos nucleares o citoplasmáticos que se expresan en células que están en la fase de proliferación. En el procedimiento conocido como inmunohistoquímica, secciones o extendidos de tejidos tratados con esos anticuerpos monoclonales pueden examinarse con análisis de imágenes para establecer la proporción de células que contienen el antígeno investigado. Dependiendo del *software* puede establecerse el porcentaje de células de la muestra que tomaron el anticuerpo marcado o la cantidad total de anticuerpo marcado que fue tomado por el tejido problema. Este método que puede llamarse inmunohistoquímica cuantitativa es teóricamente de extrema utilidad, ya que la evaluación habitual de las inmunotinciones es imposible de realizar manualmente. Tiene, sin embargo, el inconveniente del tiempo que necesita el operador para evaluar cada inmunotinción, lo hace extremadamente caro y de casi nula aplicación en la patología quirúrgica diagnóstica estando restringido a programas puntuales de investigación.¹

Análisis de ADN con analizador de imágenes

Para medir el contenido de ADN con análisis de imágenes, el espécimen se trata con la tinción de *Feulgen*, que se une en forma estequiométrica o proporcional al ADN de los núcleos. El analizador de imágenes establece la intensidad de tinción de las células problema, las identifica y las compara con células diploide normales. La intensidad de la señal emitida es directamente proporcional al contenido de ADN del núcleo.⁹

Con el uso de curvas estándares es posible identificar las células con contenido desconocido de ADN. En

los tejidos neoplásicos hay células normales, por ejemplo linfocitos o polimorfonucleares que también quedan teñidos y que sirven como control interno de la medición de las células neoplásicas.

La medición de la intensidad de la señal que emite la población celular permite la preparación de histogramas de ADN en los cuales el contenido de ADN está expresado en el eje horizontal y el número de células analizado en el eje vertical. Este histograma es similar al que se obtiene con la citometría de flujo, con el mayor número de células en fase G0/G1, un pequeño número en fase G2 y fase mitótica, llamado pico G2/M, siendo la distancia entre ambos picos la correspondiente a las células en fase S. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de histograma obtenido por análisis de imágenes.

Sobre estos histogramas también se calcula el índice de ADN, el coeficiente de variación y el índice de proliferación tal como en los histogramas de la citometría de flujo. Mediante una fórmula matemática se establece otro parámetro conocido como grado de malignidad que generalmente maneja valores entre 0 y 3.¹³

Muchos de los factores que afectan los histogramas de la citometría de flujo, también complican los del análisis de imágenes. Restos necróticos, células inflamatorias o autólisis del espécimen afectan la forma de las curvas y su interpretación, si bien estos artefactos al ser el operador el que elige las células puede reducirse o eliminarse.

Pero pese a las diferencias técnicas entre ambos métodos, hay una gran concordancia entre las mediciones de ploidía que proporcionan. Es así como la elección de una técnica para aplicación clínica depende de preferencias de los operadores. Conceptualmente, el

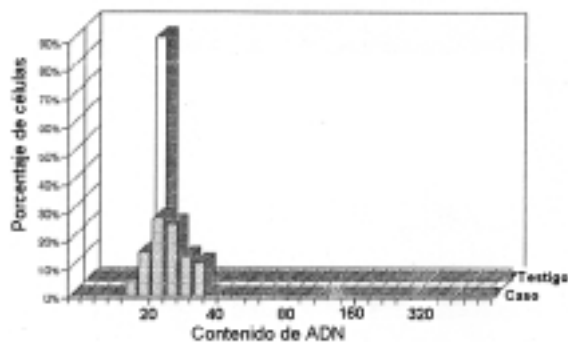


Figura 6. La muestra estudiada (caso) revela un histograma de distribución de ADN en el rango de valores aneuploides (contenido anormal de ADN) "near diploide". Índice de ADN 1,17; índice de proliferación de 17,6% y un grado de malignidad de 0,127. El coeficiente de variación del testigo es 4,58% y el del caso problema 17,6%. N° de células analizadas en el caso 102.

análisis por imágenes examina menor número de células y permite la observación individual de cada una, por esto resulta preferible para estudiar la celularidad del centrifugado urinario donde el número de células es escaso. La citometría de flujo investiga un gran número de células logrando resultados en un corto tiempo, pero si las células problema son infrecuentes en la población estudiada, se transforman en indetectables para este método. Aunque más lento y demandante de mayor labor en el operador, el análisis de imágenes analiza la morfología de cada célula individualmente seleccionándose específicamente el atributo que se desea analizar. Esto le da a la citometría por imágenes mayor sensibilidad y por lo tanto mayor utilidad clínica en algunas circunstancias.^{10,15}

Análisis de ADN en el pronóstico de cáncer de vejiga

Las anomalías cromosómicas son un evento sobresaliente en las células cancerosas de manera que el análisis de ADN fue investigado exhaustivamente por su potencial impacto en el pronóstico de las neoplasias. Sin embargo, tanto la ploidía como el porcentaje de células en fase S (o índice de proliferación) mostraron un valor limitado en el pronóstico de pacientes con neoplasias, circunstancia que se refleja en los resultados discordantes entre los cientos de artículos sobre el tema que se encuentran en la literatura. Las causas para esta disparidad de datos son numerosas e incluyen variaciones en la selección de pacientes, número y tipo de especímenes, uso de material fresco o archivado, métodos de coloración y purificación de las muestras, criterios para interpretación del histograma, etcétera.⁸

En cáncer de vejiga, los elementos habitualmente considerados para el pronóstico son el grado y estadio tumoral. En los cánceres superficiales, para estimar riesgo de recidiva y progresión, se tiene en cuenta también el tamaño, multiplicidad, configuración, tasa de recurrencia, asociación con *ca in situ* o displasias uroteliales y recurrencia en la primera cistoscopia de control. El significado pronóstico de muchos de estos factores está bien documentado, pero el valor relativo de cada uno es incierto.^{2,11} El interés de esta revisión es descubrir el papel del análisis de ADN en el pronóstico del carcinoma transicional de vejiga.

Entre los tumores de vejiga, aquellos que resultan diploides en el análisis de ADN, tienden a ser de menor grado y menor estadio y el pronóstico es más favorable. Los tumores aneuploides en cambio, tienen características patológicas desfavorables y el pronóstico de los pacientes es pobre. Parecería que los pacientes con tumores tetraploides tienen mejor pronóstico que

aquellos con tumores triploides. Los tumores diploides son los de mejor pronóstico.^{9,12}

El índice de proliferación se correlaciona con la progresión tumoral en cáncer de vejiga, pero como la fase S es una fracción de muy breve duración en el ciclo celular, la cantidad de células que pueden capturarse en esa fase aun en los tumores muy agresivos es escasa, resultando un índice artificialmente bajo, que le quita valor al parámetro.⁹

En 1992 se llevó a cabo una Conferencia de Consenso para evaluar el estado de los conocimientos en utilidad clínica del análisis de ADN y formular recomendaciones en cuanto a la metodología para realizarlo. Allí se estableció que la medición de ADN provee información pronóstica sobre el riesgo de progresión en pacientes con tumores de vejiga superficiales (Ta, T1 y Tis), pero no en los cánceres con invasión muscular (T2-T4). En coincidencia con estas aseveraciones, en un estudio sobre 350 pacientes con diagnóstico reciente de tumores Ta y T1, la aneuploidía no fue capaz de predecir altas tasas de recurrencia.¹

Sin embargo, un artículo de la literatura nacional¹³ halló que el incremento en los índices de ADN se vinculó con el aumento de recidivas y muerte en 25 pacientes analizados con carcinoma transicional de vejiga, de los cuales 6 eran infiltrantes del músculo. En ese mismo grupo de enfermos hallaron que la mayoría de los pacientes libres de enfermedad con un seguimiento mínimo de 2 años, tenían un grado de malignidad menor de 0,5, mientras que todos menos uno de los que tenían grado de malignidad mayor de 0,5 habían recidivado o fallecido.

También Hemstreet y colaboradores¹⁴ observaron que los predictores más importantes de muerte y recurrencia en los tumores de vejiga Ta-T1 Grado 1 fueron la aneuploidía y la presencia de células con ADN > a 5C, respectivamente. (Debe entenderse "> a 5C" como "> a 5N")

En un artículo reciente² dirigido a establecer factores pronósticos de recurrencia y progresión en tumores superficiales de vejiga, se demostró que estadio tumoral, ploidía de ADN, multiplicidad, historia de recurrencia, configuración tumoral y tipo de terapia adyuvante afectan independientemente la tasa de recurrencia luego de la resección de un tumor superficial. En esta misma comunicación, los únicos predictores de progresión a invasión muscular fueron la recurrencia en el primer control cistoscópico a los 3 meses, el grado histológico y la ploidía de ADN.

Del mismo modo, progresos técnicos en el análisis de imágenes acontecidos en el último tiempo parecen haber mejorado el valor pronóstico del análisis de ADN en cuanto a recidiva de los tumores superficiales.

En efecto, el Dr. Jan Baak, patólogo noruego, automatizó el análisis de imágenes logrando superar sus limitaciones previas que eran principalmente el bajo número de células que permitía analizar, cierto sesgo por parte del patólogo en la selección de las células de interés y el prolongado tiempo que este análisis requería. Desarrolló un analizador de imágenes ultrarrápido, altamente automatizado y exacto, que elimina las limitaciones del método conservando sus ventajas frente a la citometría de flujo. Con este recurso, en un estudio sobre 228 pacientes con carcinomas uroteliales Ta-T1 el análisis de ADN predijo recurrencia y progresión tumoral con mayor exactitud que los factores pronósticos clásicos. Los tumores diploides (Índice de ADN o DI = a 1) mostraron recurrencia y/o progresión con menor frecuencia que los aneuploides (DI > a 1).¹⁵

Utilizando un recurso técnico similar, o sea combinación de examen citológico y ploidía celular por análisis de imágenes, otros autores ya habían comunicado la posibilidad de detectar mediante estudio citológico del centrifugado urinario la recidiva de carcinoma vesical antes de que aparecieran evidencias clínicas del evento.^{10,16}

En conclusión, sobre la coincidencia inicial de que la ploidía de ADN sólo permite establecer pronóstico de progresión para los tumores superficiales de vejiga, comunicaciones posteriores y adelantos técnicos recientes dan lugar a expectativas sobre un rol más valioso de esta determinación en materia de identificar aquellos pacientes con carcinomas uroteliales que tienen mayor riesgo de recidiva.

El autor agradece al Prof. Dr. Boris Elsner sus aportes en el tema y la corrección del original.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fradet Yves y Cordon-Cardo Carlos: Tumor markers in the management of bladder cancer. Principles and Practice of Genitourinary Oncology, edited by Derek Raghavan, Howard I. Scher, Steven A. Leibel and Paul H. Lange. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. USA. 1997. Chapter 21: 231-238.
2. Ali-El-Dein B, Sarhan O, Hinev A, Ibrahiem El-H I, Nabeeh A y Ghoneim MA: Superficial bladder tumours: analysis of prognostic factors and construction of a predictive index. *B J U Int* . 2003 Sep; 92 (4): 393-399.
3. Tiguert R, Lessard A, So A, Fradet Y: Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2002; 20 (3): 190-195.
4. Tsieh Sun: Flow Cytometric Analysis of Hematologic Neoplasms. Igaku-Shoin Medical Publishers, New York, New York. USA. 1993. Chapter 2. Pag 3-8.
5. Leith Catherine P. y Willman Cheryl L.: Flow cytometric analysis of hematologic specimens. Neoplastic Hematopathology. Edited by Daniel M. Knowles. Lippincott

- Williams and Wilkins. Philadelphia. USA 2001. Chapter 5. Pag 255-269.
6. Curtis Helena, Sue Barnes N.: *Biología* 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 1993. Capítulo 7. Pag. 170-183.
 7. Curtis Helena, Sue Barnes N.: *Biología* 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 1993. Capítulo 12. Pag. 274-286.
 8. Frierson Henry F.(Jr), Linder James: *Flow and image cytometry. Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*. 3rd Ed. Edited by SG Silverberg, R A Delellis and WJ Frable. Churchill Livingstone New York. USA 1997. Chapter 7. Pag 95-111.
 9. Messing Edgard M.: *Urothelial tumors of the urinary tract*. Campbell 'S Urology. Editor-in-chief, Patrick C. Walsh; editors Alan B. Retik, E. Darracott Vaughan, Jr., Alan J. Wein. 8th edition. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. USA. 2002. Chapter 76: 2732-2784.
 10. Richman AM, Mayne ST, Jekel JF y Albertsen P.: Image analysis combined with visual cytology in the early detection of recurrent bladder carcinoma. *Cancer* 1998; 82 (9): 1738- 1748.
 11. Chopin DK, Popov Z, Ravery V, Bellot J, Hoznek A, Pataud JJ, Abbou CC, Colombel M.: Prognostic factors in superficial bladder cancer. *World J Urol*. 1993; 11 (3): 148-152.
 12. Korman HJ, Watson RB, Soloway MS: Superficial transitional cell carcinoma of the bladder: management and prognosis. *Urologic Oncology* . Edited by J.E. Oesterling and J. Richie. W.B. Saunders Company. Philadelphia. Pennsylvania. USA. 1997. Chapter 17: 256-274.
 13. Fodor M, Alonso E, Bellotti M, Elsner B, Aparisis I, Pisilli L: Carcinoma transicional de vejiga. Evaluación de factores pronósticos. *Medicina* 1993; 53: 413-418.
 14. Hemstreet GP, Rollins S, Jones P, Yu Rao J, Hurst RE, Bonner RB, Hewett T y Smith BG: Identification of a high risk subgroup of grade 1 transitional cell carcinoma using image analysis based deoxyribonucleic acid ploidy analysis of tumor tissue. *J Urol* 1991; 146: 1525-1529.
 15. Baak JPA, Bol MGW, van Diermen B, Janssen EAM, Bühr-Wildhagen SBK, Mestad O, OGREID P and Kjelle-vold K-H: DNA cytometric features in biopsies of TaT1 urothelial cell cancer predict recurrence and stage progression more accurately than stage, grade, or treatment modality. *Urology* 2003; 61 (6): 1266-1272.
 16. Slaton JW, Dinney CPN, Veltri RW, Craig Miller M, Liebert M, O'Dowd GJ y Barton Grosman H.: Deoxyribonucleic acid ploidy enhances the cytological prediction of recurrent transicional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1997; 158: 806-811.