

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Línea de investigación: Tests predictivos de respuesta

**FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE
RESPUESTA EN PACIENTES CON CARCINOMA DE
VEJIGA LOCALMENTE AVANZADO TRATADOS CON
QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE**

Memoria para optar al grado de doctor en Medicina

Presentada por

Pamela Céliz

Bajo la dirección de los doctores

Rafael Rosell Costa

Albert Font Pous

Barcelona, 2012



Universitat Autònoma
de Barcelona

**FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE
RESPUESTA EN PACIENTES CON CARCINOMA DE
VEJIGA LOCALMENTE AVANZADO TRATADOS
CON QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE**

TESIS DOCTORAL

Pamela Céliz

Dr. RAFAEL ROSELL COSTA, Profesor asociado del departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y jefe del Servicio de Oncología Médica del Instituto Català d' Oncologia del Hospital Germans Trias i Pujol

Dr. ALBERT FONT POUS, Doctor en Medicina y médico adjunto del Servicio de Oncología Medica del Instituto Català d' Oncologia del Hospital Germans Trias i Pujol

CERTIFICAN:

Que Pamela Céliz, licenciado en Medicina y especialista en Oncología Médica ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral: **Factores pronósticos y predictivos de respuesta en pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante.**

Revisada la presente memoria, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos, y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendiendo y firmo el presente certificado en

Rafael Rosell Costa

Albert Font Pous

Barcelona a 16 de julio de 2012.

Dr. CELESTINO REY JOLY BARROSO, Profesor titular del departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que Pamela Céliz, licenciado en Medicina y especialista en Oncología Médica ha realizado bajo mi tutoría el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral: **Factores pronósticos y predictivos de respuesta en pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante.**

Revisada la presente memoria, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos, y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en

Celestino Rey Joly Barroso

Barcelona a 16 de julio de 2012

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que me han ayudado en la realización de esta tesis.

Al Dr. Albert Font Pous, uno de los directores de esta tesis, por su predisposición, confianza e infinita paciencia; por su calidad humana.

Al Dr. Rafael Rosell Costa, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

Al Dr. Eduardo Richardet, por introducirme en el mundo de la oncología y porque sin su ayuda inicial quizás nunca hubiese iniciado esta tesis.

A todos mis compañeros del Servicio de Oncología del Hospital Germans Trias i Pujol, por todo el tiempo compartido, y a cada una de las personas que forman parte del servicio. Simplemente, gracias!

Al Dr. Miquel Taron y a todas las personas del laboratorio, por su apoyo y porque no solo transmiten conocimientos, y en especial a Pedro, gracias por tanta paciencia!.

A Montse, por su amistad incondicional desde el primer día que llegué a España. A Carmen, esas hermanitas del alma...

A mis padres, por creer en mí, por transmitirme los valores importantes de este mundo, por el enorme esfuerzo y sacrificio para que pueda educarme y el apoyo incondicional en todos mis proyectos.

A mis hermanas y amigos en Argentina, por entenderme y acompañarme a pesar de la distancia.

A todos los pacientes que cada día colaboran en el progreso de la ciencia

A todas aquellas personas que confiaron en mí y me animaron para seguir adelante, y que con su constante apoyo han contribuido a la culminación de este trabajo

A todos, mi más sincero agradecimiento.

ABREVIATURAS

AANN	Ácidos nucleicos
ADNc	ADN complementario
AEG-1	<i>Astrocyte elevated gen 1</i>
AFH	Astrocitos fetales humanos
AJCC	<i>American Joint Committee of Cancer</i>
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
BRCA1	<i>Breast Cancer susceptibility gen 1</i>
BER	<i>Base excision repair</i> (Reparación por escisión de bases)
Cis	Carcinoma in situ
CMV	Cisplatino, metotrexato, vinblastina
C_T	<i>Cycle threshold</i> , ciclo umbral
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Etilen-diamino-tetra-acético
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
FNT-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
HIF 1-alfa	Factor inducible de hipoxia 1
HR	<i>Homologous recombination</i> , recombinación homóloga
IHQ	Inmunohistoquímica
MMP	Metaloproteasa de matriz
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSKCC	<i>Memorial Sloan- Kettering Cancer Center</i>
MRC	<i>Medical Research Cancer</i>
MTDH	Metadherina
MVAC	Metotrexate, Vinblastina, Doxorubicina, Cisplatino
NER	<i>Nucleotides excision repair</i> , escisión reparadora de nucleótidos
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
4-PBA	4-Aminobifenilo
PCA	Porcentaje de cambio anual

PS	Performance status
RCp	Respuesta completa patológica
RT	Radioterapia
RT-PCR	Reacción en cadena polimerasa transcriptasa reversa
RTU	Resección transuretral
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLP	Supervivencia libre de progresión
SLR	Supervivencia libre de recurrencia
SWOG	<i>South West Oncology Group</i>
TA	Tasa ajustada
TC	Tomografía computada
UIV	Urografía intravenosa

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología: Incidencia y mortalidad.....	2
1.2 Factores de riesgo.....	5
1.3 Histopatología y carcinogénesis.....	8
1.4 Diagnostico y estadificación.....	12
1.4.1 Presentación clínica.....	12
1.4.2 Pruebas de imagen y procedimientos diagnósticos	13
1.4.3 Clasificación TNM.....	15
1.5 Tratamiento del cáncer de vejiga localmente avanzado	17
1.5.1 Cistectomía radical y linfadenectomía.....	17
1.5.2 Papel de la quimioterapia perioperatoria	22
1.5.3 Quimioterapia neoadyuvante: estudios randomizados	23
1.5.4 Situación actual de la quimioterapia neoadyuvante	29
1.5.5 Biomarcadores predictivos de respuesta a la quimioterapia	31
1.6 Resistencia a cisplatino: papel de vías reparadoras del ADN	33
1.6.1 Papel del BRCA1 en la regulación del ciclo celular y reparación del ADN	35
1.6.2 Papel del RAP80 en la reparación del ADN.	44
1.7 Papel del AEG1 en cáncer	46

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	50
2.1 Justificación.....	51
2.2 Objetivos.....	52
3. PACIENTES Y MÉTODOS	53
3.1 Diseño del estudio.....	54
3.2 Pacientes.....	54
3.2.1 Criterios de inclusión.....	54
3.2.2 Estadificación.....	55
3.2.3 Tratamiento.....	56
3.2.4 Análisis anatómico-patológico.....	57
3.2.5 Seguimiento clínico.....	57
3.3 Variables del estudio.....	59
3.4 Muestras tumorales.....	60
3.4.1 Extracción de ARN de las muestras tumorales.....	62
3.5 Análisis de expresión génica.....	65
3.5.1 Retrotranscripción.....	65
3.5.2 Diseño de cebadores y sondas.....	68
3.5.3 Desarrollo de PCR.....	69
3.5.4 Cuantificación de la expresión genica.....	72
3.5.4.1 Introducción.....	72
3.5.4.2 Generalidades de la PCR cuantitativa.....	73
3.5.4.3 Cuantificación absoluta.....	76
3.5.4.4 Cuantificación relativa.....	76
3.5.4.5 Validación experimental de la cuantificación relativa.....	77

3.5.4.6 Análisis de los datos de qPCR.....	78
3.6 Análisis estadístico.....	80
3.6.1 Estadística descriptiva.....	80
3.6.2 Estadística analítica.....	80
4. RESULTADOS.....	82
4.1 Características de los pacientes.....	83
4.1.1 Características clínicas.....	83
4.1.2 Características relacionadas con el tratamiento.....	85
4.1.3 Características patológicas.....	85
4.1.4 Características moleculares: Análisis de expresión de genes.....	87
4.2 Análisis de la respuesta patológica.....	88
4.2.1 Correlación de la respuesta con variables clínico-patológicas.....	88
4.2.2 Correlación de la respuesta con variables moleculares.....	90
4.3 Análisis de supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE).....	92
4.3.1 Relación de la supervivencia global con variables clínicas y patológicas.....	93
4.3.2 Relación de la supervivencia global con variables moleculares.....	100
4.3.2.1 Relación con los niveles de expresión de BRCA1.....	100
4.3.2.2 Relación con los niveles de expresión de RAP80 y AEG1.....	101
4.3.3 Análisis univariante de supervivencia global.....	103
4.3.4 Análisis univariante de supervivencia libre de enfermedad.....	104
4.3.5 Análisis multivariante de supervivencia global y libre de enfermedad.....	106
4.4 Análisis de subgrupo: enfermedad sin invasión ganglionar.....	107
4.4.1 Análisis de los niveles de expresión génica.....	108

4.4.2 Análisis de los factores predictivos de respuesta	109
4.4.2.1 Influencia de las variables clínico-patológicas en la respuesta	109
4.4.2.2 Influencia de los factores moleculares en la respuesta	110
4.4.3 Análisis de supervivencia global y libre de enfermedad	112
4.4.3.1 Influencia de los factores moleculares en la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.....	112
4.4.3.2 Análisis univariante: influencia de los factores pronóstico en la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad	117
4.4.3.3 Análisis multivariante de supervivencia global y libre de enfermedad	120
5. DISCUSIÓN.....	122
6. CONCLUSIONES.....	143
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Incidencia y mortalidad de cáncer de vejiga en España	3
Figura 2 Evolución de la tendencia temporal de la incidencia por cáncer de vejiga en Cataluña , España y regiones de Europa durante 1985-2002.....	4
Figura 3 Evolución de la tendencia temporal de la mortalidad por cáncer de vejiga en Cataluña , España y regiones de Europa durante 1985-2002.....	5
Figura 4 Modelo explicativo de tumorigenesis urotelial y progresión tumoral	10
Figura 5 Estadificación del cáncer de vejiga.....	15
Figura 6 Áreas de la disección linfática pélvica extendida	20
Figura 7 Meta análisis.....	28
Figura 8 Vías de reparación del ADN	33
Figura 9 Esquema de BRCA1 y sitios de interacción proteica	36
Figura 10 Funciones del gen BRCA1	38
Figura 11 Papel del BRCA1 en respuesta a la quimioterapia	42
Figura 12 Funciones del gen AEG1	47
Figura 13 Modelo de vías de transducción de señal entre AEG1 y la vía PI3K-Akt	48
Figura 14 Esquema de análisis de los pacientes	59
Figura 15 Análisis y procesamiento de las muestras	61
Figura 16 Esquema del proceso de retrotranscripción	68
Figura 17 Esquema del proceso de Real-Time PCR.....	72
Figura 18 “Anatomía” de la curva sigmoidea de RT-QPCR	74
Figura 19 Recta patrón obtenida mediante RT-QPCR.....	75
Figura 20 Validación técnica de amplicones de RT-QPCR.....	78

Figura 21 Distribución por edad.....	83
Figura 22 TNM clínico	84
Figura 23 TNM patológico.....	85
Figura 24 Respuesta patológica según niveles de BRCA1	91
Figura 25 Supervivencia Global.....	92
Figura 26 Supervivencia global según estadificación clínica.....	94
Figura 27 Supervivencia global según invasión linfovascular en la RTU	95
Figura 28 Supervivencia global según esquema de quimioterapia.....	96
Figura 29 Supervivencia global según intervención quirúrgica	97
Figura 30 Supervivencia global según extensión de la linfadenectomía.....	97
Figura 31 Supervivencia global según TNM patológico	98
Figura 32 Supervivencia global según tamaño tumoral en la cistectomía	99
Figura 33 Supervivencia global según terciles de BRCA1	100
Figura 34 Supervivencia global BRCA1 T1-2 versus T3	101
Figura 35 Supervivencia global según terciles de RAP80	102
Figura 36 Supervivencia global según terciles de AEG1.....	102
Figura 37 Supervivencia libre de enfermedad según niveles de BRCA1	105
Figura 38 Respuesta patológica según niveles de BRCA1 en pacientes con ganglios negativos..	111
Figura 39 SG según terciles de BRCA1 en pacientes sin invasión ganglionar	113
Figura 40 SG según niveles de BRCA1: T1-2 versus 3.....	114
Figura 41 SG según niveles RAP80 en pacientes sin invasión ganglionar	115
Figura 42 SG según niveles AEG1 en pacientes sin invasión ganglionar.....	116

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación histológica de la OMS de 1973 y 2004	8
Tabla 2A Clasificación patológica TNM de cáncer de vejiga	16
Tabla 2B Sistema TNM de clasificación de tumores	17
Tabla 3 Supervivencia global y libre de recurrencia en pacientes tratados con cistectomía	19
Tabla 4 Estudios prospectivos randomizados de quimioterapia neoadyuvante	25
Tabla 5 Tejido tumoral disponible para análisis de expresión génica	61
Tabla 6 Reactivos y soluciones usadas en la extracción del ARNm.....	63
Tabla 7 Reactivos y soluciones usadas en la reacción de retrotranscripción	66
Tabla 8 Cebadores y sondas utilizadas en los análisis de expresión génica	69
Tabla 9 Reactivos y cantidades empleadas en la reacción de cadena polimerasa	70
Tabla 10 Características de los pacientes	86
Tabla 11 Correlación de respuesta patológica completa con variables clínico patológicas.....	88
Tabla 12 Correlación entre TNM clínico y TNM patológico	89
Tabla 13 Respuesta patológica según niveles de expresión génica	90
Tabla 14 Respuesta patológica completa según niveles de BRCA1.	91
Tabla 15 Causas de muerte	93
Tabla 16 Supervivencia global según TNM patológico	98
Tabla 17 Análisis univariante de supervivencia global	103
Tabla 18 Análisis univariante de supervivencia global según niveles de expresión génica	104
Tabla 19 Análisis multivariante de SG y SLE	106
Tabla 20 Características clínicas y patológicas de los pacientes sin invasión ganglionar	107

Tabla 21 Correlación entre respuesta patológica y variables clinico-patológicas en pacientes sin invasión ganglionar.....	109
Tabla 22 Perfil de expresión génica según respuesta patológica completa	110
Tabla 23 Respuesta patológica completa según niveles de BRCA1 en pacientes sin ganglios	111
Tabla 24 Características de los pacientes según niveles de expresión de BRCA1	112
Tabla 25 Supervivencia mediana según los niveles de expresión génica.....	117
Tabla 26 Análisis univariante de SG en pacientes sin invasión ganglionar.....	118
Tabla 27 Análisis univariante de SLE en pacientes sin afectación ganglionar.....	119
Tabla 28 Análisis multivariante de SG y SLE en pacientes sin invasión ganglionar.....	120
Tabla 29 Respuesta patológica completa tras quimioterapia neoadyuvante.....	129
Tabla 30 Marcadores pronóstico y predictivos de respuesta en cáncer de vejiga	133

INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

INCIDENCIA Y MORTALIDAD

El cáncer de vejiga representa la novena causa más frecuente de cáncer a nivel mundial, constituyendo el 3% de todos los tumores (386.300 nuevos casos en 2008) y es responsable de la muerte de 150.282 personas.

El cáncer de vejiga es más frecuente en los hombres que en las mujeres. A nivel mundial y en Estados Unidos la tasa es 3:1, mientras que en España es 7:1.

La mayor incidencia del cáncer de vejiga se da en países desarrollados, como Europa (sobre todo en el sur y este), Norte América y Australia. También se ha detectado una alta incidencia de cáncer de vejiga, sobre todo del carcinoma de células escamosas, en zonas de África y Oriente Medio, en relación con la mayor frecuencia de infección crónica por *Schistosoma haematobium*.

En el año 2008 se diagnosticaron 133.696 casos nuevos de cáncer de vejiga en Europa, de los que 104.613 se produjeron en varones y 29.083 en mujeres. Representa el 6,2% del total de cánceres en los varones y el 1,9% en las mujeres.

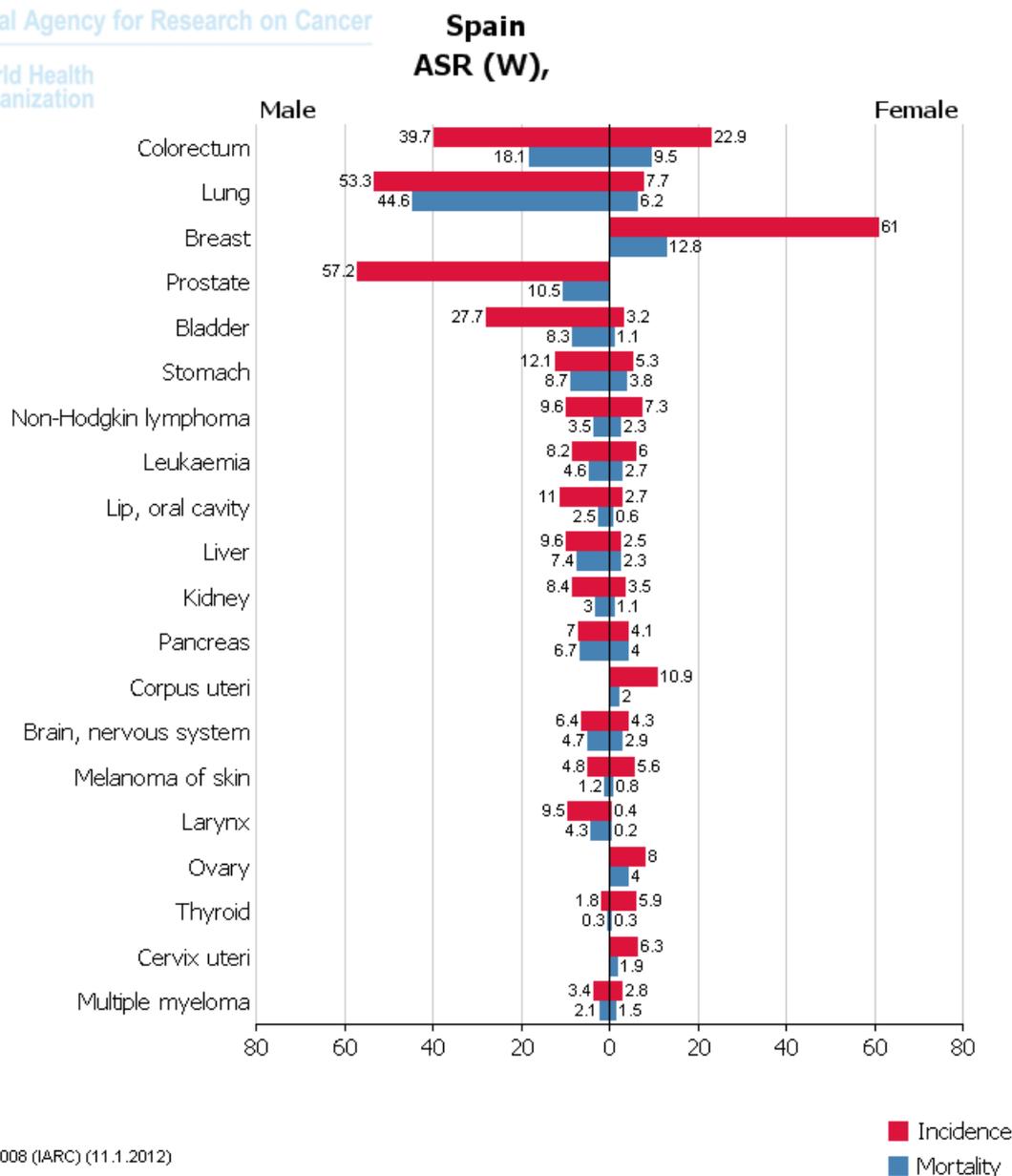
El cáncer de vejiga provocó el 4% y 1,6% del total de muertes por cáncer en los varones y las mujeres, respectivamente.

En España es el cuarto cáncer más frecuente entre los hombres (27.7 por 100.000 hab/año); y en las mujeres ocupa el quinceavo lugar (3.2 por 100.000 hab/año). Se diagnostican 13.008 casos anuales, lo que representa el 9,4% de los tumores del sexo masculino (11.227 casos) y el 2,4% de los femeninos (1.781 casos).

En cuanto a mortalidad, el número de muertes en el sexo masculino es de 3969 personas, con una tasa ajustada para la edad de 8.3 y 851 personas con una tasa de 1.1 en el sexo femenino (Figura 1).

Por su elevada incidencia y relativa baja mortalidad, tienen una evolución crónica constituyendo un problema de salud pública en España.

La edad media al diagnóstico es de 65 años, y raramente se diagnostica antes de los 40 años^{1,2}.



GLOBOCAN 2008 (IARC) (11.1.2012)

Figura 1 Incidencia y mortalidad de cáncer de vejiga en España (GLOBOCAN 2008 (IARC))

En Cataluña, en el año 2002, el número de nuevos casos estimados en varones fue 2.053, el cuarto cáncer más frecuente, con el 11,5% del total de cánceres en varones. En las mujeres, se estimaron 415 nuevos casos, el 3,2% de todos los cánceres en mujeres. Las tasas ajustadas a la población mundial estándar (TA) fueron 36,0 y 5,0 en varones y mujeres respectivamente.

En cuanto a la mortalidad, el número de defunciones producidas por cáncer de vejiga urinaria en 2002 en Cataluña fue de 710 (577 varones y 133 mujeres). Se estimó que en 2008 se producirían un total de defunciones por este cáncer superior en un centenar al de 2002 a expensas del sexo masculino, y que lo mismo sucederá en los años del quinquenio 2015-2019 respecto a 2008.

En el período 1985-2002, la incidencia total del cáncer de vejiga urinaria aumentó un promedio del 2,4% anual, aunque en la primera parte del período (1985-1994) el porcentaje de cambio anual (PCA) fue bastante mayor (5,35%) que en la segunda parte (PCA, 1,26%), siendo éste un patrón similar al que se ha dado en España. En las mujeres se observa un PCA del 1,45% para el conjunto del período 1985-2002, aunque este incremento no es estadísticamente significativo (Figura 2).

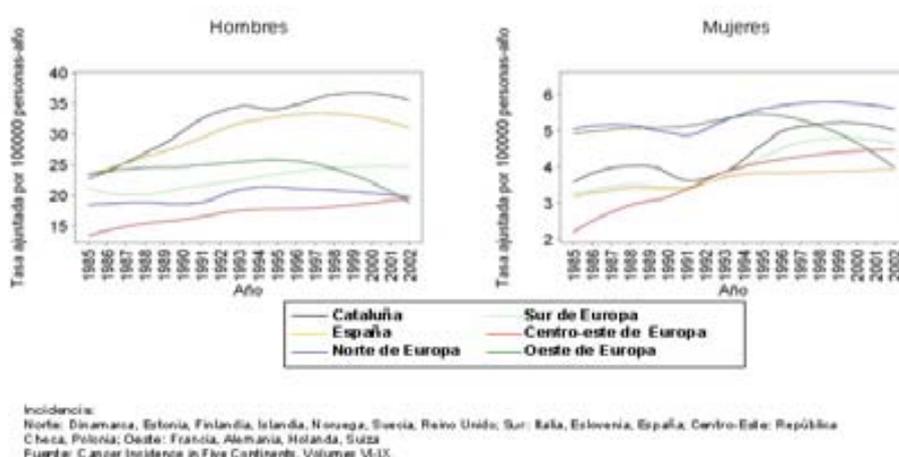


Figura 2 Evolución de la tendencia temporal de la incidencia por cáncer de vejiga en Cataluña, España y regiones de Europa durante 1985- 2002.

En cuanto a la mortalidad, se mantuvo estable en los varones (PCA, $-0,2\%$), mientras que en las mujeres se observó un descenso ($-1,6\%$) no significativo, siguiendo un patrón similar al observado en España³ (Figura 3).

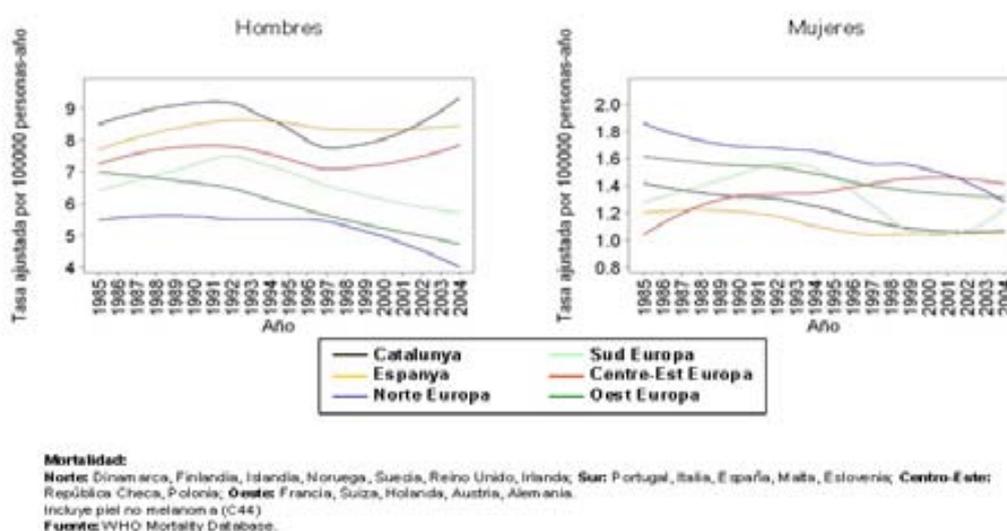


Figura 3 Evolución de la tendencia temporal de la mortalidad por cáncer de vejiga en Cataluña, España y regiones de Europa durante 1985- 2002.

1.2 FACTORES DE RIESGO

La etiopatogenia del cáncer vesical es multifactorial. Existen varios factores de riesgo para desarrollar cáncer de vejiga, siendo los más importantes el hábito de fumar y la exposición prolongada a aminas aromáticas.

➤ TABAQUISMO

Es el factor ambiental más importante, con un riesgo estimado de desarrollar cáncer de vejiga del 50-65% para los hombres y del 20-30% en las mujeres (con respecto a los no fumadores)⁴.

El riesgo de cáncer de vejiga en fumadores es 2 a 6 veces mayor que en no fumadores, aumentando el mismo con la duración e intensidad (nº de cigarrillos al día), triplicándose en aquellos que fuman mas de 40 cigarrillos por día.

Si bien el riesgo disminuye al dejar de fumar, se observa una reducción del 40% en los 1-4 años siguientes a dejar de fumar y del 60% después de 25 años⁵.

Aunque no se sabe exactamente cuales serían los carcinógenos, probablemente participan diversos compuestos químicos que contiene el humo del cigarrillo, como la 2 naftilamina,

acroleína, radicales libres del oxígeno y en particular el potente carcinógeno 4aminobifenilo (4-PBA)⁶.

La persistencia del hábito una vez ya realizado el diagnóstico se asocia con un pronóstico más desfavorable de los pacientes.

➤ FACTORES OCUPACIONALES

Se ha estimado que el contacto con carcinógenos ocupacionales podría causar el 25-30% de todos los tumores de vejiga, siendo el segundo factor de riesgo más importante.

Diversas ocupaciones, como la manufactura de aminas aromáticas, tinturas, caucho, pintura, industria del aluminio y del cuero se han asociado con aumento del riesgo de cáncer de vejiga⁶.

De estos, el más importante es la exposición a aminas aromáticas, particularmente 2-naftilamina y bencidina. Habitualmente estos productos muestran un periodo de latencia prolongado, aunque la exposición masiva, las características individuales y la asociación con otros elementos cancerígenos, pueden acortar dicho periodo⁷.

En un análisis de 11 estudios caso control en Europa se observa un aumento del riesgo debido a la exposición laboral a hidrocarburos policíclicos aromáticos y benzopirenos⁸.

➤ RADIOTERAPIA PÉLVICA Y QUIMIOTERAPIA

Se describen mayores tasas de neoplasias vesicales malignas secundarias después de aplicar radioterapia externa por neoplasias ginecológicas malignas, con un riesgo relativo de entre 2 y 4. Las mujeres tratadas con radioterapia por carcinoma de cérvix tienen un riesgo mayor de desarrollar un cáncer de vejiga comparadas con aquellas tratadas con cirugía, aumentando aun más si también se administra quimioterapia (con ciclofosfamida o sin ella) e incluso si se administra quimioterapia exclusivamente⁹.

El uso de ciclofosfamida se ha correlacionado con el desarrollo posterior de cáncer de vejiga con un periodo de latencia de 6-13 años. La acroleína que es su metabolito sería responsable de la mayor incidencia. Este efecto tiene lugar con independencia de la asociación de la cistitis hemorrágica con el mismo tratamiento¹⁰.

➤ **CISTITIS CRÓNICA**

La esquistosomiasis es la segunda infección parasitaria mas frecuente después del paludismo, con unos 600 millones de personas expuestas a esta infección en África, Asia, Sudamérica y el Caribe y tiene un riesgo asociado cinco veces mayor de padecer cáncer vesical. En Egipto, el 60-75% de todos los carcinomas vesicales son de células escamosas, bien diferenciados, en pacientes más jóvenes y con baja tasas de diseminación local y/o a distancia¹¹.

Algunos autores sugieren una asociación con infecciones del tracto urinario y litiasis con el cáncer vesical escamoso, siendo la irritación crónica del epitelio lo que aumentaría el riesgo¹².

➤ **FACTORES ALIMENTARIOS**

Existen componentes de la dieta que participarían en la etiología del cáncer de vejiga, aunque su asociación es controvertida. Uno de los mejores reconocidos es el papel del consumo de frutas y vegetales en la disminución del riesgo. En un metaanálisis de 38 estudios, el alto consumo de frutas y vegetales disminuyó el riesgo un 30% y un 20%, respectivamente. No se demostró asociación clara con el consumo de carne, retinol ó beta carotenos¹³.

No hay evidencia convincente de que los edulcorantes artificiales, como la sacarina participe en la etiología del cáncer de vejiga.

El alto consumo de fenacetina que contienen algunos analgésicos podría asociarse con un aumento del riesgo de cáncer de vejiga, pelvis renal y uréter.

1.3 HISTOPATOLOGÍA Y CARCINOGENÉISIS

➤ TIPO HISTOLÓGICO

El cáncer de vejiga más frecuente en los países desarrollados es el carcinoma de células transicionales, siendo el responsable del 90% de los cánceres de vejiga en Europa.

Aproximadamente el 10% de estos tumores contienen focos de diferenciación glandular o escamosa, siendo estos más frecuentes en los tumores de alto grado e invasivos, aunque a veces, se observan en los tumores bien diferenciados.

El carcinoma de células escamosas representa el 1,4% y el 3,6% de todos los cánceres de vejiga en hombres y mujeres respectivamente, aunque en áreas endémicas de esquistosomiasis constituye el 75% de los casos.

El adenocarcinoma de vejiga afecta el 1,6% y el 2,3% de hombres y mujeres, respectivamente¹⁴.

➤ GRADO HISTOLÓGICO

En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad internacional de patología urológica (*International Society of Urological Pathology*, ISUP) propusieron una nueva clasificación de los tumores uroteliales que fue publicada por la OMS en 2004^{15,16} (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación histológica de la OMS de 1973 y 2004^{15,16}

	Clasificación 1973	Clasificación 2004 WHO/ISUP
	Papiloma (lesión benigna)	Papiloma
Grado 1	Bien diferenciado	Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno (NUPBPM)
Grado 2	Moderadamente diferenciado	Carcinoma urotelial papilar de bajo grado
Grado 3	Poco diferenciado	Carcinoma urotelial papilar de alto grado

Se recomienda utilizar la clasificación de la OMS de 2004, ya que ello se traduciría en un diagnóstico uniforme de los tumores, que se clasifican mejor según su riesgo potencial. Sin embargo, hasta que dicha clasificación no se haya validado en más estudios clínicos, hay que graduar los tumores mediante las clasificaciones de la OMS de 1973 y 2004^{15,16}.

➤ **VÍAS GENÉTICAS: PAPEL EN LA CARCINOGENESIS Y FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES**

Aproximadamente el 70% se presenta como tumores superficiales (confinados a la mucosa (Ta) ó con invasión de la submucosa o de la lámina propia (T1), en los cuales tras el tratamiento con resección transuretral (RTU) con ó sin quimio ó inmunoterapia endovesical, se logra un control de la enfermedad a largo plazo superior al 75%.

En un 25 % de los casos existe progresión de la enfermedad, desarrollando en posteriores recidivas un carcinoma infiltrante.

El carcinoma in situ (Cis) está presente en un 30% de los casos nuevos diagnosticados, se caracteriza por ser multifocal y es frecuente que acompañe a estadios superiores de la enfermedad. Si la vejiga está afectada por Cis sin tumor infiltrante se considera una enfermedad agresiva, que suele evolucionar en la mayoría de los casos a tumor invasivo.

El 25%-30% de los tumores uroteliales se presentan como tumores infiltrantes desde el inicio, su curso suele ser agresivo, y tras el tratamiento mediante cistoprostatectomía radical se producen metástasis a distancia durante el seguimiento en aproximadamente el 50% de los pacientes.

Solo en un 5% de pacientes, la enfermedad debuta con metástasis, las cuales suelen presentarse en pulmones, hígado ó hueso¹⁷.

Los tumores urológicos presentan un comportamiento biológico diferente que pueden ser el resultado de distintos patrones de alteraciones genéticas. Se reconocen actualmente dos vías en la tumorigenesis del cáncer de vejiga.

En los tumores superficiales, una alteración frecuente es la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 9, pudiendo evolucionar desde hiperplasia urotelial, atipia, hasta tumor papilar de bajo grado. Los tumores papilares de bajo grado tienen tendencia a recurrir localmente y

presentan activación en la vía del receptor tirosina-quinasa Ras, demostrando mutaciones en los genes HRAS y el receptor del factor de crecimiento fibroblástico 3 (FGFR3).

Al contrario, los tumores infiltrantes se caracterizan generalmente por alteraciones en las vías del gen p53 y retinoblastoma (Rb), que regulan el ciclo celular, interactuando con la vía de transducción de señal proteínquinasa activada por mitógeno Ras (Ras-MAPK) (Figura 4).

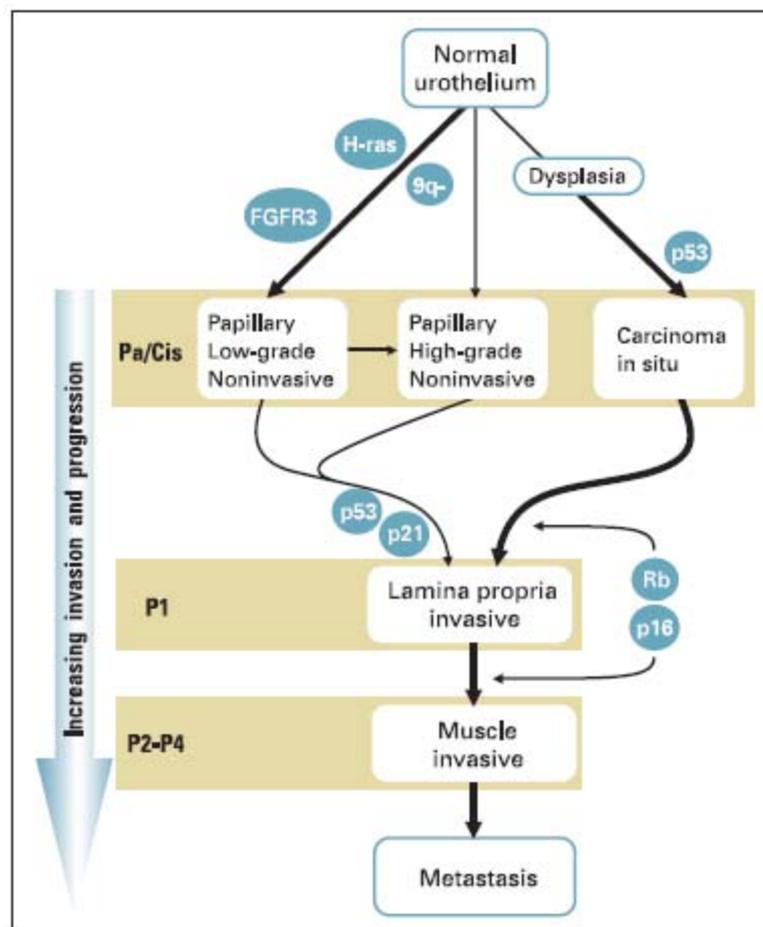


Figura 4 Modelo explicativo de tumorigenesis urotelial y progresión tumoral (Mitra, J Clin Oncol 2006).

Los genes alterados en cáncer de vejiga son principalmente genes que participan en la regulación del ciclo celular, en la transducción celular, en la adhesión celular y en la angiogénesis, y es importante conocer los eventos moleculares clave en las alteraciones de estas vías¹⁸.

p53 es un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 17p13, que codifica una proteína que tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis y la reparación del ADN.

La mutación del gen se traduce en una proteína más estable, resistente a la degradación que se acumula en el núcleo y se ha correlacionado con una mayor recurrencia y una peor supervivencia en pacientes con cáncer de vejiga¹⁹. Sin embargo, en un metaanálisis en el que se incluía más de 10.000 pacientes, los cambios en p53 fueron débilmente predictivos en cuanto a recurrencia, progresión y mortalidad²⁰.

p53 interactúa con otros genes como p21, que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas, que previene la fosforilación de la pRB bloqueando la progresión del ciclo celular, y también ha demostrado ser predictor de recurrencia y mortalidad en tumores infiltrantes²¹.

El gen del retinoblastoma (RB) se localiza en el cromosoma 13q14, y se inactiva por mutación ó deleción en más de un 50% de los tumores infiltrantes. Codifica una proteína que tiene un papel muy importante en la regulación del ciclo celular. Al ser fosforilada libera un factor de transcripción E2F e induce la transcripción de genes que se requieren para la síntesis del ADN²².

Existen datos que indican que las alteraciones combinadas de las proteínas p53, p21 y pRB podrían influir en el pronóstico de los pacientes con cáncer de vejiga²³.

La angiogénesis tumoral contribuye al crecimiento del tumor aportando oxígeno y nutrientes mediante una compleja interacción entre el factor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF), factores de crecimiento fibroblástico (FGF), metaloproteinasas de la matriz (MMP) e interleuquina 8 (IL8). p53 también interviene mediante la regulación de la trombospondina 1 (TSP-1) que es un inhibidor de la angiogénesis¹⁸.

Si bien la mayoría de tumores no invasivos presentan activación de la vía Ras-MAPK, en los tumores infiltrantes pueden existir alteraciones de otras vías. En estudios moleculares se ha implicado a las alteraciones de la vía PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol 3 kinases/serine threonine kinase AKT*) en el cáncer de vejiga, en relación con el fenotipo tumoral y el comportamiento clínico.

Se ha demostrado que la expresión de PTEN (fosfatidilinositol-3, 4,5-trifosfato 3-fosfatasa), que es una fosfatasa multifuncional de la vía PI3K puede estar reducida en el cáncer urotelial, siendo más frecuente en tumores invasivos y asociada con alteraciones en el gen p53. Por ello, el 41% de los tumores con p53 alterado presentan disminución de la expresión de PTEN y esto se asociaría con un peor pronóstico de los pacientes.

Además la vía PI3K también puede ser activada por receptores tirosinquinasa como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) y Her2 neu (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)

A pesar de que la evidencia es conflictiva puede existir sobreexpresión de EGFR y Her2neu en algunos subgrupos de pacientes. El alto nivel de expresión de EGFR se ha asociado con alto grado tumoral y estadio y con una disminución del intervalo libre de recurrencia^{24,25}.

En un estudio, la quinasa glicógeno sintetasa 3 beta (GSK-3 β), que participa en las vías N-kappa Beta y PI3K, se encontró sobreexpresada en tumores de vejiga (91% de los tumores infiltrantes), lo cual se asoció con un alto grado, el desarrollo de metástasis y la peor supervivencia de los pacientes²⁶.

Siguiendo en la misma línea de investigación de las vías de señalización, en un estudio reciente evaluando PTEN, Ki 67, fosfo AKT, c-Myc y fosfoS6 en 132 pacientes tratados con cistectomía radical, la expresión de estos 2 últimos genes se correlacionaba inversamente con la supervivencia libre de progresión y específica por cáncer²⁷.

1.4 DIAGNOSTICO Y ESTADIFICACIÓN

1.4.1 PRESENTACIÓN CLÍNICA

El síntoma más frecuente de presentación es la hematuria, la cual está presente en el 85% de los pacientes. Puede existir sintomatología irritativa, como disuria y polaquiuria, la cual se presenta en un 30% de los pacientes, es más frecuente en mujeres y puede asociarse a un carcinoma in situ multifocal.

En estadios más avanzados puede aparecer dolor lumbar por crecimiento tumoral ó compresión nerviosa y edema en extremidades inferiores.

Los procedimientos que deben realizarse incluyen:

1. Exploración física, incluyendo el tacto rectal y la palpación pélvica bimanual.

En la evaluación inicial debe realizarse el examen pélvico bimanual bajo anestesia antes y después de la biopsia y/o RTU. La presencia de un adelgazamiento de la pared, una masa móvil o fija sugiere la presencia de enfermedad T3 y T4 respectivamente.

2. Ecografía renal y vesical y/o urografía intravenosa.
3. Cistoscopia y RTU.
4. Análisis de orina: sedimento (detecta hematíes) y citologías seriadas (detecta células malignas).

El examen de una muestra de orina en busca de células tumorales exfoliadas tiene una sensibilidad elevada en los tumores de alto grado, por lo que resultaría útil cuando existe una neoplasia maligna de alto grado o un carcinoma in situ.

Cuando se trata de tumores infiltrantes, la evaluación se completa con una Radiografía de tórax y TC abdomino-pélvico. Se realiza gammagrafía ósea si existen síntomas ó hay elevación de la fosfatasa alcalina²⁸.

1.4.2 PRUEBAS DE IMAGEN Y PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS

Ecografía

La ecografía transabdominal permite la caracterización de masas renales voluminosas, la detección de hidronefrosis y la visualización de defectos de llenado intraluminales en la vejiga. Aunque tiene limitaciones para establecer el estadio tumoral, permite valorar el número, localización, tamaño y aspecto morfológico del tumor y de su base de implantación²⁸.

Urografía intravenosa (UIV)

Es una prueba que permite la exploración morfológica y funcional de la vía urinaria, evaluando los riñones y la vía excretora y proporcionando información acerca de la depuración renal.

Es una prueba importante en el diagnóstico de los tumores de vías urinarias altas. Si bien entre un 30-40% de estos tumores desarrollan tumores vesicales, solo un 1% de los tumores de vejiga desarrollarían tumores de vías urinarias. Tiene una sensibilidad para la detección de solo el 54%. Por ello, la prueba se reserva para aquellos tumores recidivantes o en caso de pacientes que presentan reflujo vesicoureteral o citologías positivas con vejiga sana²⁹.

Tomografía computada (TC)

La tomografía computada se utiliza en la evaluación de tumores de vejiga infiltrantes completando la estadificación clínica.

Se utiliza para predecir la extensión local visualizando el tejido perivesical, valorar la presencia de masas endovesicales, el engrosamiento de la pared, y para evaluar la presencia de adenopatías pélvicas, retroperitoneales y de metástasis hepáticas.

La sensibilidad para detectar metástasis ganglionares es baja (48 a 87%), al igual que la especificidad, ya que el aumento del tamaño de los ganglios puede deberse a otras causas.

La exactitud para determinar la extensión extravesical del tumor oscila entre 55% y 92%.

En un estudio comparativo con la resonancia magnética (RM), la TC presentaba una menor sensibilidad (89%) y una mayor especificidad (95%) para diagnosticar la invasión perivesical, si bien las tasas de detección fueron similares. Actualmente, con las reconstrucciones multiplanares de alta resolución se ha conseguido aumentar la sensibilidad para la detección de tumores de vejiga^{30,31}.

Cistoscopia y RTU

El diagnóstico del cáncer de vejiga depende principalmente de la exploración cistoscópica de la vejiga y del examen histológico del tejido resecado.

Es la prueba principal en la evaluación de la hematuria proporcionando información acerca del tamaño, localización y apariencia tumoral dentro de la vejiga.

La RTU permite la extirpación del tumor y realizar biopsias de cualquier lesión sospechosa en cuello, trigono, uretra prostática y paredes laterales para descartar lesiones multifocales y la presencia de carcinoma in situ asociado.

Permite obtener tejido para análisis anatómo-patológico y posterior clasificación tumoral. La modalidad de resección depende del tamaño de la lesión. Los tumores pequeños (menores de 1 cm) pueden researse en bloque; en este caso, la pieza contiene el tumor completo mas una parte de la pared de la vejiga subyacente, incluido musculo vesical, mientras que los tumores grandes tienen que researse por separado en fracciones, que comprenden la parte exofítica del tumor, la pared de la vejiga subyacente con el musculo detrusor y los bordes de la zona de resección²⁸.

1.4.3 CLASIFICACIÓN TNM

La clasificación TNM de la *American Joint Committee of Cancer / Union Internationale Contre le Cancer* de los tumores malignos es el método más usado para la estadificación de los tumores. Recientemente se ha publicado una séptima edición, que está en vigor desde 2010 ³² (Tabla 2, Figura 5).

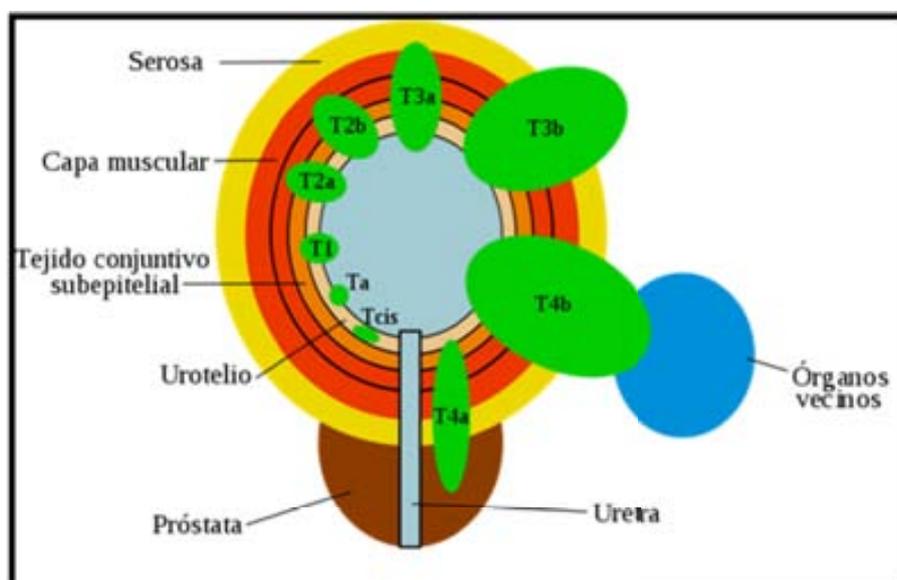


Figura 5 Estadificación del cáncer de vejiga.

**Tabla 2A CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA TNM DE CÁNCER DE VEJIGA
(AJCC, 7ma edición 2010).**

T Tumor primario (pT)	
pTX	Tumor primario no valorable
pT0	No evidencia de tumor primario
pTa	Carcinoma papilar no invasivo
pTis	Carcinoma in situ “ tumor plano”
pT1	El tumor infiltra el tejido conectivo subepitelial
pT2	El tumor invade el músculo vesical
pT2a	El tumor invade el músculo superficial (mitad interna)
pT2b	El tumor invade el músculo profundo (mitad externa)
pT3	El tumor invade el tejido graso perivesical
pT3a	El tumor invade microscópicamente el tejido graso perivesical
pT3b	El tumor invade macroscópicamente el tejido graso perivesical
pT4	El tumor invade próstata, útero, vagina, pared pélvica, pared abdominal.
pT4a	El tumor invade próstata, útero, vagina.
pT4b	El tumor invade pared pélvica, pared abdominal
N Ganglios linfáticos regionales (pN)	
N1	Metástasis en un único ganglio linfático de pelvis verdadera(hipogástrico, obturador, ilíaco externo ó presacro)
N2	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos en pelvis verdadera
N3	Metástasis en ganglios linfáticos iliacos comunes.
M Metástasis a distancia	
MX	No se puede valorar
M0	No hay metástasis
M1	Metástasis a distancia

Tabla 2B. Sistema TNM de clasificación de tumores

ESTADIO	T	N	M
0a	Ta	N0	M0
0is	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a/b	N0	M0
III	T3a/b y T4a	N0	M0
IV	T4b	N0	M0
	Cualquier T	N1-3	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.5 TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE VEJIGA INFILTRANTE

Los carcinomas infiltrantes de la muscular son tumores epiteliales agresivos con una alta tasa de diseminación sistémica precoz y con una supervivencia global a 5 años que depende principalmente del estadio.

1.5.1 CISTECTOMÍA RADICAL Y LINFADENECTOMÍA

La cistectomía radical con disección linfática pélvica bilateral es el tratamiento de elección para el cáncer de vejiga infiltrante. Con este enfoque se logra el control local y se obtiene información pronóstica del tumor³³.

La cistectomía radical en el hombre consiste en la exéresis en bloque de la vejiga urinaria, el fondo de saco peritoneal en contacto con ella, el tejido adiposo perivesical, los uréteres terminales, la próstata, las vesículas seminales y el conducto deferente pélvico.

En la mujer además de la vejiga con su peritoneo, la grasa perivesical y los uréteres terminales; también se reseca la uretra incluido el meato externo, el útero, las trompas de Falopio, los ovarios y la pared vaginal anterior³⁴.

En series actuales de cistectomía con seguimiento prolongado, se demuestra que la cirugía cura la mayoría de los pacientes con enfermedad confinada a la vejiga (pT2), el 50% con enfermedad extravesical (pT3-4) y solo una minoría de los que presentan enfermedad ganglionar³⁵.

Tras la intervención quirúrgica, el 20%-30% de los pacientes con p T2 , el 40%-60% con p T3 , y el 70%-90% con p T4 desarrollaran metástasis a distancia ó recurrencia local y fallecerán por su enfermedad.

En el estudio de Stein y colaboradores que incluía 1054 pacientes con carcinoma de vejiga tratados con cistectomía radical, la supervivencia libre de recurrencia (SLR) y global (SG) a 5 años fue de 68% y 66% y a los 10 años del 60% y 43% , respectivamente.

El estadio patológico y la enfermedad ganglionar positiva se asociaron con una mayor tasa de recurrencia y una menor supervivencia.

En 594 pacientes (56%) con enfermedad localizada (<pT3a) sin compromiso ganglionar, la SLR y SG a 5 años fue del 85% y 78%, respectivamente; mientras que cuando presentaban afectación extravesical (>pT3b) fue del 58% y 47%, respectivamente.

Los 246 pacientes (23%) con enfermedad ganglionar positiva presentaron una SLR y SG a 5 años del 35% y 31%, respectivamente (Tabla 3). Se estratificó a los pacientes según el estadio patológico y el numero de ganglios invadidos, presentando una menor supervivencia cuando más de 5 ganglios eran positivos. En forma similar, la supervivencia fue menor en aquellos con afectación extravesical (p=0.004).

La tasa de mortalidad tras la cistectomía radical fue del 3%, comparable con otras series, y la tasa de complicaciones del 28% en los primeros 30 días tras la cirugía³³.

Posteriormente Madersbacher analizando un grupo homogéneo de 507 pacientes con cáncer de vejiga sin afectación ganglionar tratados con cistectomía más linfadenectomía demostró una supervivencia global y libre de recurrencia a 5 años del 59 y 62% respectivamente. La supervivencia libre de recurrencia en pacientes con pT2N0 fue del 73%, con una tasa de recurrencia local de solo el 3%³⁶.

Tabla 3. Supervivencia en pacientes tratados con cistectomía (Adaptada de Stein y cols, JCO 2001)

ESTADIO PATOLÓGICO	N	SUPERVIENCIA LIBRE DE RECURRENCIA (%)		SUPERVIVENCIA GLOBAL (%)	
		5 AÑOS	10 AÑOS	5 AÑOS	10 AÑOS
		<p T3a N (-)	594	85	82
>p T3b N (-)	214	58	55	47	27
P T1-4 N (+)	246	35	34	31	23

➤ PAPEL DE LA LINFADENECTOMÍA

Cuando se realiza la cistectomía, entre un 14 y 30% de los pacientes tienen metástasis en los ganglios linfáticos, y la incidencia aumenta con el estadio tumoral, encontrándose en 5% de los tumores superficiales, 18% de los T2, 26% de los T3a, y 45% de los tumores extravesicales (T3b y T4)³³.

Si bien existe controversia en cuanto a la extensión de la disección linfática pélvica, existen resultados que sugieren que una disección linfática más extensa permitiría una mejor estadificación patológica, un mejor control loco regional y un posible beneficio terapéutico.

La linfadenectomía estándar debe incluir todos los tejidos linfáticos alrededor de la íliaca común, íliacos intercomunes, grupos íliacos internos y grupos obturadores bilateralmente, estando limitada por la bifurcación aortoíliaca proximalmente, nervio genito femoral lateralmente, vena circunfleja y ganglio de Cloquet distalmente y los vasos ilíacos externos por detrás, incluyendo la fosa obturadora (Figura 6).

Esta técnica permite eliminar el 80% de los ganglios positivos. Si el examen en congelado no demuestra ganglios positivos en la pelvis menor, no es necesario extender la disección cranealmente; de lo contrario debe extenderse hasta arteria mesentérica inferior.

Los límites de la disección extensa están a 1-2 cm por encima de la bifurcación aórtica y vasos ilíacos comunes proximalmente³⁷.

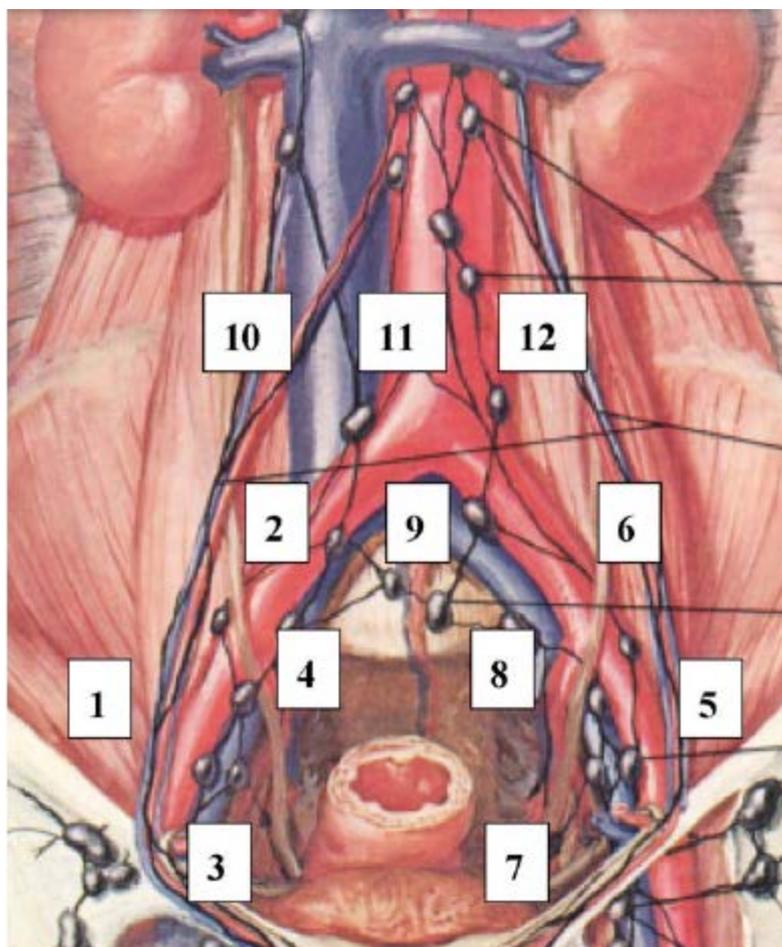


Figura 6 Áreas de la disección linfática pélvica extendida: 1 -iliaca externa, derecha; 2 – ilíaca común derecha; 3 – fosa obturadora derecha; 4 – ilíaca interna derecha; 5 – ilíaca externa izquierda; 6 –ilíaca común izquierda; 7 – fosa obturadora izquierda; 8 – ilíaca interna izquierda; 9 – bifurcación aórtica; 10 – ganglios paracavos; 11 –ganglios interaortocavos; 12 – ganglios paraaórticos (Heidenreich, *European Urology* 2010)

Respecto a la extensión de la linfadenectomía, no existe consenso acerca del número de ganglios que debe disecarse³⁸.

En un análisis retrospectivo de series de cistectomía y de datos del SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) se indicó que la supervivencia global mejoraba al aumentar el número de ganglios linfáticos resecaos³⁹.

En un análisis retrospectivo publicado por Herr y colaboradores en 2004 se evidenció que una linfadenectomía extensa (más de 10 ganglios linfáticos) se asociaba con una mejoría en la supervivencia y tasa de recurrencia, con respecto a la disección mas limitada, con una supervivencia a 5 años del 61% versus 44% respectivamente ($p=0.007$). La ventaja en supervivencia se mantenía al resecar 10 ó más ganglios linfáticos en los pacientes independientemente de que los ganglios fueran positivos ó negativos, permaneciendo como factor pronostico independiente tras ajustar según la administración de quimioterapia neoadyuvante, el compromiso de los márgenes quirúrgicos, y el estadio patológico y ganglionar⁴⁰.

Leissner y colaboradores hallaron que una disección de >16 ganglios se correlacionaba con un mayor porcentaje de pacientes con ganglios positivos, encontrando una correlación entre el número de ganglios resecados y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años en pacientes con pT1, pT2 y pT3⁴¹.

Capitania y cols evaluaron en un estudio la probabilidad de identificar uno ó más ganglios positivos según el número de ganglios resecados. Se determinó que resecando 45 ganglios la probabilidad de encontrar ganglios positivos era del 90%, al resecar 15 del 50% y cuando eran 25 del 75%⁴².

A pesar de que la linfadenectomía extensa tiene un mayor tiempo operatorio, no existen diferencias en la mortalidad ni en las complicaciones postoperatorias.

Además del beneficio terapéutico, la linfadenectomia extendida ofrece una estadificación mas precisa. Dangle y cols hallaron que la linfadenectomia limitada podía perder un 25% de pacientes con ganglios positivos, mientras que la estándar solo un 11%⁴³.

El número de ganglios positivos es un factor pronóstico importante y se correlaciona inversamente con la tasa de recurrencia y de supervivencia.

En uno de los estudios la supervivencia fue mejor si se hallaban menos de 4 ganglios positivos comparado con más de 4 (37% vs 13%)³⁸. Fleischmann y cols evidenciaron una SG a 5 años de 35% y 17% en pacientes con menos de 6 ganglios y más de 6 ganglios, respectivamente⁴⁴. Estos estudios fueron confirmados por un estudio de mayor seguimiento que demostraba una supervivencia libre de recurrencia a 10 años mayor si se

comparaban menos de 8 y más de 8 ganglios (40% versus 10%)⁴⁵.

Así como el número de ganglios resecados y de ganglios invadidos tiene implicancias pronosticas, la densidad linfática ganglionar también se ha investigado como factor pronostico.

Se define como el número de ganglios positivos dividido el total de ganglios resecados y examinados. El punto de corte usado con mayor frecuencia es 20%.

En 2003 analizando una cohorte de 162 pacientes, se demostró que la supervivencia global a 5 años disminuía de 64% cuando el ratio era menor de 20% a 8% cuando era mayor del 20% ⁴⁶.

En forma similar, se evidenció una disminución en la supervivencia libre de recurrencia a 10 años de 43% a 17% cuando la densidad linfática ganglionar era menor y mayor al 20%, respectivamente⁴⁵. Estos hallazgos fueron validados posteriormente permaneciendo con valor pronóstico aun en pacientes que recibían quimioterapia adyuvante ⁴⁷.

En un análisis del MD Anderson y MSKCC la densidad linfática ganglionar fue superior al TNM para predecir la supervivencia específica por cáncer tras la cistectomía radical ⁴⁸.

Como se demuestra, sería una medida de la eficacia de la linfadenectomía a la vez que representa un factor pronóstico independiente en pacientes sometidos a cistectomía radical.

1.5.2 PAPEL DE LA QUIMIOTERAPIA PERIOPERATORIA

El tratamiento estándar del carcinoma de vejiga infiltrante es la cistectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral. Sin embargo, el 50% de los pacientes presentan recurrencias y mueren por su enfermedad durante los 2 años siguientes al diagnóstico. Solo con el tratamiento quirúrgico, la tasa de supervivencia a 5 años es del 80% para enfermedad localizada (T2N0) disminuyendo a un 40-50% cuando existe extensión extravesical y a un 15-35% cuando existe invasión ganglionar. Las recurrencias a distancia son más frecuentes que las locorregionales (20-50% versus 5-15% de los casos), con lo cual se sugiere que la administración de la quimioterapia perioperatoria podría mejorar estos resultados⁴⁹.

La tasa de mortalidad tras la cirugía como tratamiento único justifica combinar como estrategia de tratamiento la modalidad de un mejor tratamiento local (cistectomía) con un tratamiento sistémico efectivo (quimioterapia)⁵⁰.

La quimioterapia adyuvante tiene la ventaja de que no existe un retraso en el tratamiento local y que puede obtenerse una información patológica completa previa administración de un tratamiento sistémico. Entre las desventajas se puede mencionar el retraso en el tratamiento de la enfermedad micrometastásica, una menor tolerancia en el período postoperatorio y la imposibilidad de evaluar la quimiosensibilidad del tumor. Si bien, su beneficio en supervivencia ha sido demostrado en 2 de 6 estudios randomizados y existe un metaanálisis de 491 pacientes que demuestra una disminución relativa del 25% en el riesgo de muerte^{51, 52}, se necesitan datos más definitivos que apoyen su uso en la práctica clínica.

Existe un solo estudio randomizado realizado en el MD Anderson, en el que se comparaba en 140 pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado la quimioterapia neoadyuvante con la adyuvante. Los pacientes fueron randomizados a recibir 2 ciclos del esquema MVAC (Metotrexate, vinblastina, doxorubicina y cisplatino) seguido de cirugía y 3 ciclos adicionales en forma adyuvante versus cistectomía seguida de 5 ciclos de MVAC adyuvante sin hallarse diferencias significativas en los resultados⁵³.

1.5.3 QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE: ESTUDIOS RANDOMIZADOS

El cáncer de vejiga es una enfermedad quimiosensible. El tratamiento con el esquema quimioterápico MVAC se introdujo en 1985 y fue el régimen usado en cáncer de vejiga metastásico, con una tasa de respuesta global del 72%, que incluía un porcentaje de respuesta completa del 36%^{54,55}.

Dada la eficacia demostrada por la quimioterapia basada en platino para mejorar la supervivencia, diversos estudios han analizado el papel de la quimioterapia previa a la cistectomía en pacientes con carcinoma vesical infiltrante con extensión loco-regional (T2-T4a N0 M0).

Los objetivos de la quimioterapia neoadyuvante son reducir el tamaño del tumor facilitando la resección quirúrgica completa y erradicar la presencia de micrometástasis a distancia, mejorando así la supervivencia de los pacientes.

La administración de quimioterapia en forma neoadyuvante tiene varias ventajas como son la mejor tolerancia, con una menor toxicidad dada por el mejor performance status (PS) de los pacientes, permitir la evaluación en vivo de la sensibilidad a la quimioterapia y de la respuesta, la cual tiene un valor pronóstico.

Si bien en los estudios iniciales que intentaron demostrar un beneficio de la quimioterapia neoadyuvante existen limitaciones metodológicas que disminuyen su validez externa, entre ellos el pequeño tamaño de la muestra, los regímenes quimioterapicos subóptimos, el tratamiento local no estandarizado y carecer de un adecuado seguimiento; en estudios más recientes, y en 2 metaanálisis se evidenció el papel preponderante de la quimioterapia preoperatoria demostrando un beneficio en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global⁵¹.

En la Tabla 4 se enumeran algunos de los estudios prospectivos randomizados en los que se evaluó combinaciones basadas en platino previo a la cistectomía.

Tabla 4 Estudios prospectivos randomizados de quimioterapia neoadyuvante

Estudio	Estadio	N	Régimen de quimioterapia	Tratamiento local	Supervivencia (ctrl vs neo)
Nordic I (58)	T1G3T4a (NxM0)	325	CA x 2	RT 20 Gy + cist	SG 5 años 51% vs 58% P = 0.1
Nordic II (59)	T2-T4a (NxM0)	317	CM x 3	Cist	SG 5 años 46% vs 53% P= 0.24
MRC/EORTC (57)	T2G3-T4a	976	CMV x 3	Cist, RT ó RT y cist	SG 7 años 47% vs 53% P=0.04
SWOG 8710 (61)	T2-T4a (N0M0)	317	MVAC x 3	Cist	SG 5 años 43% vs 57% P = 0.06
Abol-Enein (63)	T2 (NxM0)	196	CaMV x 2	Cist	SLE 5 años 42% vs 62% P= 0.013

CA: cisplatino, adriamicina; RT: radioterapia; CaMV: carboplatino, metotrexato, vinblastina.

➤ ESTUDIO MRC/EORTC

En el estudio del MRC (*Medical Research Cancer*) y EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) 976 pacientes de 106 instituciones con cáncer de vejiga estadio T2-T4a, N0-NX, M0 se randomizaron a 3 ciclos de quimioterapia neoadyuvante con cisplatino, metotrexate, vinblastina (CMV) (n=491) versus no quimioterapia (n=485), seguido de tratamiento local (cistectomía radical ó radioterapia). La tasa de respuesta completa patológica en el brazo de neoadyuvancia fue del 33%, superior al 12% en el brazo control. Inicialmente, la tasa de supervivencia a 3 años fue del 55,5% en el brazo de quimioterapia neoadyuvante comparado con 50% en el de tratamiento local (p= 0.075)⁵⁶.

Actualmente, tras un seguimiento de 8 años, la ventaja en supervivencia es del 5%. Los resultados demostraron una reducción significativa del 16% en el riesgo de muerte, (HR 0.84; 95% IC, 0.72- 0.99; $p=0.037$), que se corresponde con un aumento en la supervivencia a 10 años de un 30 a un 36% tras la administración del esquema CMV.

En este estudio se detectó una mortalidad del 1% relacionada con la quimioterapia, una mortalidad operatoria del 3,7%, y no se evidenció un aumento en las complicaciones postoperatorias⁵⁷.

➤ ESTUDIOS NORDIC 1 Y 2

En el análisis combinado de los 2 estudios Nordic fueron randomizados 620 pacientes con estadio T1 de alto grado ó T2-T4NX. En el estudio Nordic 1 el esquema de quimioterapia fue cisplatino-doxorrubicina y todos los pacientes recibían RT previo a la cirugía⁵⁸ y en el estudio Nordic 2 el esquema de quimioterapia fue cisplatino y metotrexate⁵⁹.

Se demostró un beneficio significativo en la supervivencia en favor de la quimioterapia neoadyuvante, con una reducción absoluta del riesgo del 8% tras 5 años de seguimiento. Se detectó un 20% de mejoría en la supervivencia, con un hazard ratio de 0.80 ($p= 0.048$) para los pacientes que recibieron quimioterapia. La tasa de respuesta patológica completa (pT0N0) tras quimioterapia neoadyuvante duplicó a los controles (22,7% vs 12,5%, $p 0.006$). La supervivencia global a 5 años fue del 88,2% en el brazo que recibió quimioterapia neoadyuvante comparada con 57,1% en pacientes que respondieron en el brazo control. ($p=0.001$)⁶⁰.

➤ ESTUDIO SWOG 8710

En el estudio del SWOG (*Southwest Oncology Group*) 317 pacientes con carcinoma urotelial infiltrante de vejiga cT2-4a,N0M0 se asignaron de forma aleatoria a cistectomía sola ó a 3 ciclos de quimioterapia neoadyuvante con MVAC seguidos de cirugía, resultando en una mejoría en la mediana de supervivencia global (77 vs 47 meses, $p=0.06$) y con un beneficio absoluto a 5 años del 14% (57% versus 43%).Una mayor

proporción de pacientes incluidos en el brazo de quimioterapia no presentaron enfermedad residual comparado con el brazo de cistectomía (38% vs 15% $p < 0.001$). El beneficio fue significativo especialmente en aquellos pacientes con respuesta patológica completa (pT0N0M0), con una supervivencia global a 5 años del 85%. En este estudio no hubo muertes relacionadas con el tratamiento. Se registró toxicidad grado 3 en 35% (35/150) y grado 4 en 37% (55/150), la mayoría en relación con granulocitopenia (23% grado 3, 33% grado 4) y estomatitis (10% grado 3)⁶¹.

En un análisis retrospectivo, incluyendo solo los pacientes con márgenes negativos se evidenció un beneficio en la supervivencia en aquellos con respuesta patológica tras la quimioterapia ($p = 0.05$). De los 154 pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante, 68 (44.2%) fueron $< pT2$ en la cistectomía, 46 (29.9%) fueron pT0 y el resto presentaba enfermedad ganglionar o no fueron intervenidos⁶².

➤ METAANÁLISIS

En el primer metaanálisis (ABC: *Advanced Bladder Cancer Meta-analysis Collaboration*) en 2003, se analizaron 2688 pacientes de 10 estudios randomizados de quimioterapia neoadyuvante, con datos de mortalidad disponibles en 9 de ellos. Se informó un HR de 0.91 (95% IC, 0.83-1.01) que se traducía en una reducción en el riesgo de muerte del 9% y una mejoría absoluta en la supervivencia a 5 años del 3% (48 vs 45%), que no era estadísticamente significativa ($p = 0.084$). Al excluir 3 estudios en los que se utilizaba cisplatino en monoterapia, se observó un mayor beneficio, con una reducción en el riesgo de muerte del 13% al usar quimioterapia combinada basada en cisplatino versus el tratamiento local (HR = 0.87, 95% IC 0.78-0.97, $p = 0.016$), lo que equivale a una mejoría absoluta en la supervivencia a 5 años del 5% (50% versus 45%), independientemente del tratamiento local. La quimioterapia también se asoció con una mejoría en la supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.0001$), supervivencia libre de enfermedad locoregional ($p = 0.012$) y supervivencia libre de metástasis ($p = 0.001$)⁶⁴.

En el segundo metaanálisis publicado por Winquisit y colaboradores en el 2004, de 2605 pacientes, la administración de quimioterapia combinada basada en cisplatino logró un beneficio en la supervivencia de 6,5%, de 50% a 56,5%, con un HR de 0.87 (95% IC 0.78-0.96).

La respuesta patológica fue del 14 al 38%, y se asoció con mayor supervivencia en 4 estudios. La respuesta patológica significativa (pT0-1) se halló en 43% de los que recibieron MVAC. Al realizarse el análisis multivariado, fue el único factor predictivo de supervivencia global independiente. La mortalidad por la quimioterapia fue del 1,1%⁶⁵.

En la actualización del meta análisis (ABC) publicado en el año 2005 se incluyeron más de 3000 pacientes tratados en 11 estudios randomizados (se incluyeron pacientes del estudio del SWOG) persistía el beneficio al usarse regímenes de combinaciones con cisplatino.

Se demostró un beneficio en la supervivencia (HR = 0.86, 95% IC 0.77-0.95, p = 0.003) equivalente a una mejoría absoluta en la supervivencia global a 5 años del 5%, con una disminución relativa en el riesgo de muerte del 14%. También se evidencio un beneficio significativo en la supervivencia libre de enfermedad, con mejoría absoluta del 9 % a los 5 años. El beneficio se demostró en todos los pacientes independientemente del tratamiento local⁶⁶ (Figura 7).

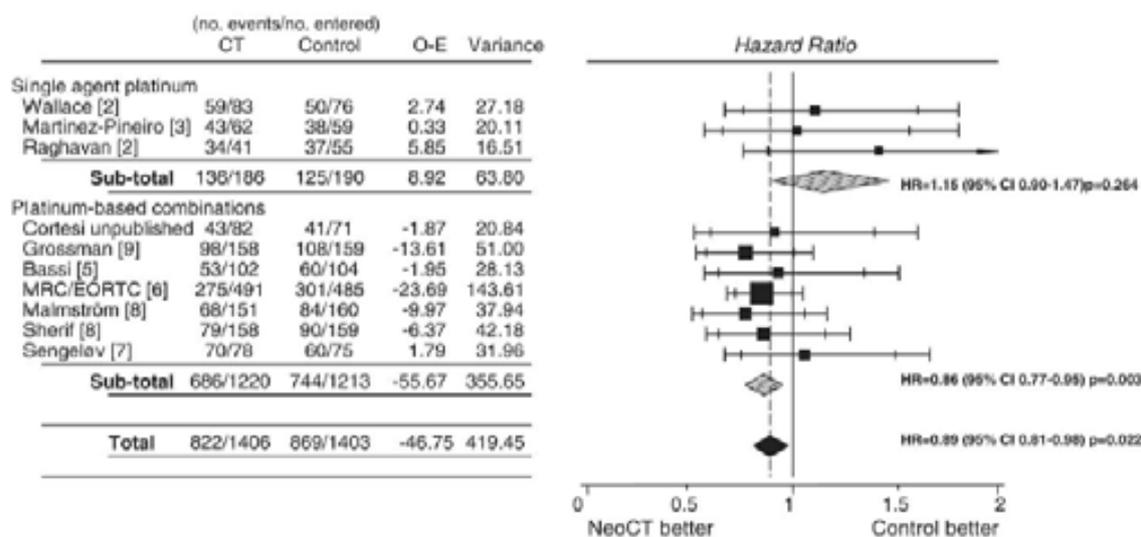


Figura 7 Actualización de metaanálisis ABC (Eur Urol 2005)

1.5.4 SITUACIÓN ACTUAL DE LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

A pesar de los resultados de estos estudios y de la evidencia creciente del beneficio del tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, existe una distancia entre la evidencia y la práctica clínica.

En un estudio realizado en Estados Unidos utilizando la base de datos de cáncer a nivel nacional, en más de 7000 pacientes con cáncer de vejiga estadio III tratados entre 1998 y 2003, la quimioterapia perioperatoria se administraba solo en el 11,6% de los pacientes, siendo en la mayoría de los casos en adyuvancia, y únicamente en el 1,2% se administraba en forma neoadyuvante^{67,68}.

En un análisis publicado recientemente llevado a cabo en más de 40.000 pacientes con cáncer de vejiga estadio II-IV, entre 2003 y 2007, las tasas de cistectomía y radioterapia se mantuvieron estables en el tiempo (42,9% y 16,6%, respectivamente), mientras que la administración de quimioterapia aumentó desde un 27% en 2003 a un 34,5% en 2007. Se observó un incremento del 6% al 13% en el porcentaje de pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante⁶⁹.

En un estudio realizado en centros europeos, únicamente el 12% de los 5000 pacientes en quienes se realizaba la cistectomía anualmente eran considerados para recibir un tratamiento de quimioterapia neoadyuvante⁷⁰.

El uso menos frecuente de la quimioterapia neoadyuvante puede deberse a varias razones, como son el impacto negativo que puede tener el retraso en la realización de la cistectomía en los pacientes que no responden ó progresan. En este sentido existen estudios que indican que un intervalo mayor a 12 semanas entre el diagnóstico y la cistectomía se ha asociado con peores resultados^{71,72}. Sin embargo, en el estudio del SWOG, el porcentaje de pacientes en los que se les practicó la cistectomía radical fue similar en los tratados con quimioterapia neoadyuvante que en los que se realizó cirugía de entrada (82% y 81%, respectivamente) con un mayor porcentaje de respuestas completas patológicas en los pacientes tratados con quimioterapia. Otra de las razones sería el aumento de la morbimortalidad postoperatoria, aunque en ninguno de los estudios se observa un aumento de las complicaciones o de la mortalidad en relación con la quimioterapia.

Por lo tanto, es necesario plantear nuevas estrategias y un enfoque multidisciplinario con el fin de mejorar el tratamiento de estos pacientes.

Basado en esto, aparecen relevantes los resultados de un estudio retrospectivo realizado en Canadá, en el que se analizaron 236 pacientes, evidenciando que las tasas de derivación y de administración de quimioterapia neoadyuvante aumentaban en forma estadísticamente significativa tras la implementación de guías de práctica clínica⁷³.

En cuanto al régimen de quimioterapia administrado, el esquema MVAC que es estándar en enfermedad metastásica, ha sido utilizado en forma neoadyuvante en el estudio clínico del SWOG⁶¹ demostrando una mejoría en la supervivencia global. A pesar de los datos existentes, como mencionamos anteriormente, existe resistencia en la administración de quimioterapia en forma preoperatoria, entre otras causas debido a la toxicidad del esquema MVAC y retrasos en las cistectomías, que llevan a la progresión. Por ello, se han investigado regímenes alternativos. En enfermedad metastásica, el esquema de cisplatino y gemcitabina (CG) ha demostrado eficacia similar al esquema MVAC en términos de respuesta y supervivencia a largo plazo, pero con una menor toxicidad⁷⁴.

Aunque no existen estudios aleatorizados que confirmen la eficacia del esquema CG en neoadyuvancia, en una evaluación retrospectiva de 42 pacientes tratados con el esquema GC previo a cistectomía, realizada por el MSKCC (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*), se evidenció una tasa de pT0 en un 28% de los pacientes y una respuesta menor que pT2 en el 35%, prolongando la supervivencia libre de enfermedad tras 30 meses de seguimiento y con resultados similares a los pacientes tratados con MVAC, con lo que se concluyó que sería un esquema factible⁷⁵.

En los últimos años se ha analizado la actividad de nuevos esquemas de quimioterapia con el objetivo de aumentar la tasa de respuesta completa patológicas y mejorar la supervivencia. En un estudio fase II la combinación de paclitaxel, carboplatino y gemcitabina demostró un 32% de RCp en pacientes con estadio cT2-3N0 y un 17% en pacientes con estadio cT4 y/o invasión ganglionar, sin embargo el estudio se cerró en forma prematura debido a la elevada toxicidad y mortalidad⁷⁶. Actualmente, existen diversos estudios fase II que están analizando la eficacia de nuevas terapias, como Bevacizumab, Sunitinib, Erlotinib, en combinación con quimioterapia, con el objetivo de correlacionar con la tasa de respuesta patológica completa y con la expresión de determinados marcadores genéticos⁴⁹.

Los factores pronóstico clínicos y patológicos conocidos, como el estadio, pueden permitirnos predecir los resultados y el riesgo de recurrencia, pero no son adecuados para predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y permitirnos decidir que pacientes obtendrán un mayor beneficio⁷⁷.

El conocimiento de las interacciones de las vías moleculares implicadas en la progresión del cáncer de vejiga y los avances en la biología molecular puede permitirnos identificar perfiles moleculares, con el objetivo de administrar un tratamiento más individualizado en los pacientes en función de la respuesta al tratamiento.⁷⁸

1.5.5 BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA

Existen diferentes marcadores moleculares que tiene el potencial de predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento en cáncer de vejiga. Algunos de ellos se encuentran en investigación y en diferentes fases de desarrollo preclínico, mientras que otros podrían aplicarse para el manejo de pacientes con alto riesgo de recurrencia de la enfermedad y en la predicción de la respuesta a tratamientos neoadyuvante y adyuvante^{79,80}.

En gen p53 mantiene la integridad genómica y es uno de los marcadores moleculares más investigados en cáncer de vejiga. Además de su discutido rol pronóstico, podría ser predictivo de respuesta al tratamiento⁸¹. En una serie retrospectiva de 90 pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante MVAC y posterior cirugía, la sobreexpresión de p53 previo al tratamiento se asoció a una peor supervivencia ,especialmente en aquellos tumores confinados a la vejiga (T2-3a)⁸².

Por el contrario, en un estudio randomizado de quimioterapia adyuvante utilizando el estado de p53 para administrar quimioterapia versus observación, no se encontraron diferencias en la supervivencia en aquellos pacientes que presentaban alteración de p53 y recibieron un tratamiento de quimioterapia adyuvante⁸³.

En un estudio en el que se analizó el valor pronóstico de las alteraciones de p53, Mdm2 y Bcl2 en pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante, la supervivencia fue inferior cuando los tres marcadores se encontraban anormalmente expresados⁸⁴.

En un estudio, Als y cols realizaron un perfil de expresión génica en 30 pacientes, encontrando 55 genes que se correlacionaban con la supervivencia tras la quimioterapia. Posteriormente analizaron 124 pacientes tratados con quimioterapia y validaron dos proteínas: la expresión de empirina, un modulador de las metaloproteinasas de matriz, y survivina (inhibidor de la apoptosis) fueron identificadas como factores predictivos de respuesta en pacientes con cáncer de vejiga avanzado tratados con quimioterapia basada en platino⁸⁵.

MDR1 (*multidrug resistance gene 1*) es un gen que codifica una glicoproteína P (Pgp), que actúa como una bomba de flujo celular, que reduce las concentraciones intracelulares de drogas como los alcaloides de la vinca, que son componentes del MVAC, resultando en una disminución de la citotoxicidad.

En un estudio alemán se analizó la expresión génica de MDR1 y ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*) en pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado tratados en adyuvancia y se observó que aquellos con niveles altos de ERCC1 y MDR1 presentaban una menor supervivencia libre de progresión sugiriendo a estos genes como factores predictivos de respuesta a cisplatino⁸⁶.

La subunidad 1 del gen de la ribonucleotido reductasa (RRM1) codifica la subunidad de una enzima que participa en la producción de desoxiribonucleotidos para la síntesis y reparación del ADN, y es el blanco de la gemcitabina. En el estudio de Bellmunt, donde los pacientes recibían CG con ó sin paclitaxel, existió una tendencia a un mayor tiempo a la progresión en aquellos pacientes con bajos niveles de expresión⁸⁷.

Takata y colaboradores analizaron el perfil de expresión génica de 27.648 genes en 27 tumores de vejiga invasivos usando ADNc *microarray*. Se compararon los perfiles de los pacientes que respondieron frente a los que no lo hicieron a la quimioterapia neoadyuvante con MVAC desarrollándose un sistema de score de 14 genes predictivos de respuesta^{88, 89}.

En un estudio que analizaba el valor pronóstico de factores angiogénicos (VEGF, bFGF, IL-8) en pacientes con cáncer de vejiga tratados con quimioterapia neoadyuvante con MVAC, los niveles de expresión de VEGF fueron un factor pronóstico independiente de recurrencia de enfermedad. La sobreexpresión del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) en líneas celulares de cáncer de vejiga se asoció con resistencia a cisplatino debido posiblemente a la protección de las células de la apoptosis inducida por cisplatino, y también permitió identificar pacientes con alto riesgo de recurrencia de enfermedad⁹⁰.

1.6 RESISTENCIA A CISPLATINO: PAPEL DE LAS VIAS REPARADORAS DEL ADN

El cisplatino es el tratamiento de referencia en cáncer de vejiga metastásico y localmente avanzado, y la expresión de genes implicados en las vías de reparación del ADN puede ser un mecanismo de resistencia a cisplatino⁹¹.

Existe una asociación entre la capacidad de reparar el ADN y el desarrollo de cáncer, la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

El cisplatino es un agente cuyo efecto citotóxico se basa en la formación de enlaces covalentes entre la molécula de platino y el ADN, que llevan a la aparición de enlaces cruzados intra e intercatenarios, los cuales distorsionan la estructura molecular 3D del ADN, provocando cambios estéricos en la doble hélice. Esto lleva a un reconocimiento del daño y reparación, haciendo que continúe la viabilidad celular y aparezca la resistencia a cisplatino. La resistencia a quimioterapia basada en cisplatino puede ser intrínseca o adquirida (tras exponer las células a agentes platinados) y puede ser mediada por factores intra, extracelulares ó dependientes de la membrana celular. Es una resistencia multifactorial. Existen 5 vías reconocidas en la reparación del ADN que protegen a la célula del daño, siendo la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y la reparación de apareamientos incorrectos de bases (MMR) las que tienen un rol importante en la resistencia a cisplatino (Figura 8).

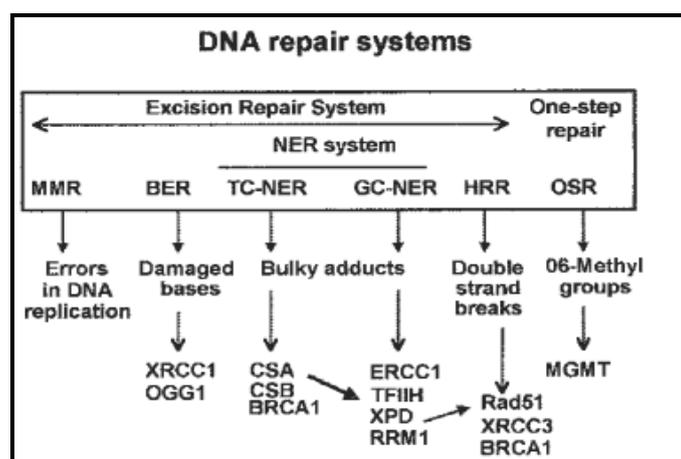


Figura 8 Vías de reparación del ADN (Rosell et al, Sem Oncol 2003)

➤ **REPARACIÓN DE APAREAMIENTOS INCORRECTOS DE BASES (MMR: *Mismatch repair*)**

Es la vía que remueve nucleótidos mal apareados que resultan de errores de la replicación y participa en la detección y reparación de aductos del ADN tras la acción de agentes de quimioterapia basada en cisplatino.

Las proteínas Mut de este sistema reconocen los pares de bases mal apareados durante la replicación y/o las asas de inserción-delección e inician el ensamblaje de otras proteínas, encargadas de escindir el nucleótido mal apareado, solamente en la cadena afectada. A continuación un complejo proteico que incluye una ADN polimerasa, incorpora el nucleótido correcto. Cuando este sistema es deficiente, se acumulan un gran número de nucleótidos mal apareados, especialmente en secuencias repetitivas del ADN como los microsatélites, aumentando las posibilidades de desencadenar un proceso oncogénico. Algunos tumores caracterizados por un déficit en el sistema MMR, presentan un fenómeno llamado inestabilidad de microsatélites. Se requiere un sistema intacto para detectar el daño inducido por cisplatino. Su interacción previene que se complete la reparación y se produce la apoptosis. Al contrario, cuando el sistema es deficiente, las células continúan proliferando a pesar del daño del ADN apareciendo el fenotipo resistente.

➤ **REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER: *Nucleotide excision repair*).**

Actúa en lesiones que distorsionan la estructura 3D de la doble hélice del ADN e interfieren con la replicación y la transcripción. Es importante para evaluar la respuesta a quimioterapia basada en platinos, ya que participa en la reparación de las lesiones inducidas por estos agentes. Tiene 2 ramas: la primera está acoplada a la reparación de secuencias de ADN en transcripción (es altamente específica reparando solo lesiones de genes en transcripción, repara el daño del ADN que impide la progresión de ARN polimerasa II) y la reparación genómica global que actúa en lesiones de todo el genoma.

Se reconoce el daño y se demarca el área afectada. Se forma un complejo que desune la porción dañada y provoca su escisión. Posteriormente se resintetiza y liga esta área para mantener la integridad de la molécula de ADN. La proteína ERCC1 (*excision repair cross-complementation group 1*) tiene un rol central; heterodimeriza con XPF (*xeroderma pigmentosum complementation group F*) formando un complejo que interviene en la

escisión. En estudios in vitro de líneas celulares de cáncer de testículo se demostraban niveles reducidos de ERCC1 y sensibilidad a cisplatino, y en aquellas que desarrollaban resistencia aparecía un aumento de la expresión de ERCC1.

Existen datos de estudios in vitro que demuestran que suprimir la expresión de ERCC1 aumenta o restablece la sensibilidad a platino^{92, 93}.

Los altos niveles de expresión tisular de ERCC1 se han asociado a resistencia en pacientes con cáncer de pulmón, gástrico, cérvix, ovario y colon.

Los mecanismos de resistencia a cisplatino han sido estudiados en varias líneas celulares en cáncer de vejiga y se ha demostrado que algunos genes de las vías reparadoras del ADN tienen un papel en esta resistencia.

La resistencia a platino parecería asociarse a la eliminación de esas lesiones en el ADN mediante el sistema NER. BRCA1 junto a ERCC1 tienen un papel fundamental en NER, y el aumento de su expresión podría causar un fenotipo resistente.

En estudios en modelos celulares de cáncer de vejiga, aquellas con mayor resistencia a cisplatino presentaban niveles más altos de expresión de ERCC1.

En algunos estudios se ha encontrado una relación inversa entre la expresión de ERCC1 y el pronóstico en pacientes con cáncer de vejiga tratados con quimioterapia basada en cisplatino, y podría ser un factor para predecir la eficacia de quimio-radioterapia en tumores infiltrantes⁹⁴.

En un estudio en el que se incluyeron 57 pacientes con cáncer de vejiga metastásico tratados con quimioterapia basada en platino, se asoció la baja expresión de ERCC1 con una mejoría en la supervivencia (25.4 versus 15.4 meses, $p=0.03$), a pesar de que no se observaron diferencias teniendo en cuenta la expresión de BRCA1⁸⁷.

1.6.1 PAPEL DEL BRCA1 EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y REPARACIÓN DEL ADN

El gen de BRCA1 es un gen supresor tumoral, localizado en 17q21.31, compuesto de 24 exones, con un ADN genómico de 81,1 kb de longitud y un ARNm de casi 7,38 kb, y 22 exones codificantes que se traducen en una proteína de 1863 aminoácidos y 220Kd. Tiene un dominio amino terminal, un par de dominios de activación de la transcripción en el extremo C-terminal y un segmento central donde se encuentra el exón 11 que codifica más del 60% de la proteína.

En la figura 9 se muestra la distribución de los 5 dominios proteicos de BRCA1, así como las zonas de unión con las principales proteínas involucradas en la reparación del ADN⁹⁵.

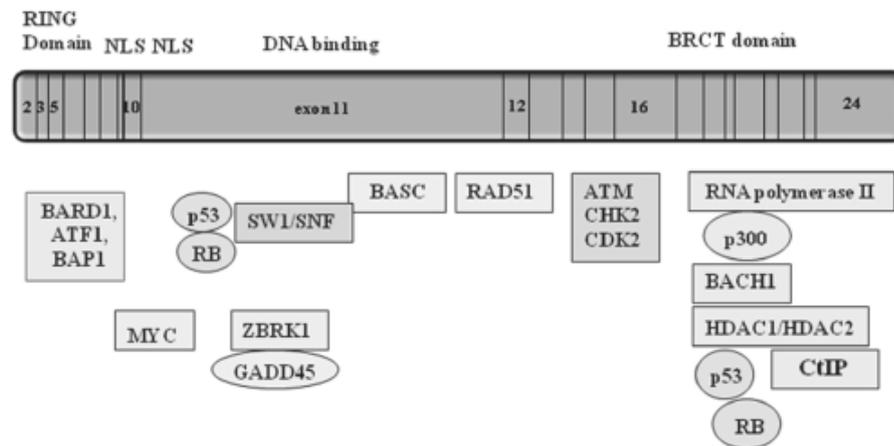


Figura 9 Esquema de BRCA1 y sitios de interacción proteica. Cercano al extremo NH2-terminal está el dominio RING finger (aminoácidos 5-98). Entre los aminoácidos 200 y 300 existen dos señales de localización nuclear (NLS). En el extremo C-terminal tiene 2 dominios (BRCT) que tendrían un papel importante en los puntos de control del ciclo celular en respuesta al daño del ADN (Huen, Nat Rev Mol Cell Biol. 2010)

La proteína BRCA1 tiene un papel central en el mantenimiento de la estabilidad genómica, asociada a procesos celulares como la reparación del ADN, la regulación de la transcripción del ARNm, el control del ciclo celular y la ubiquitilación proteica como se muestra en la Figura 10⁹⁶.

➤ PAPEL DEL BRCA1 EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

BRCA1 interviene en la regulación los diferentes puntos de control del ciclo celular.

Cuando se produce el daño del ADN en la célula, se detiene el ciclo celular para permitir la reparación. Los transcritos de BRCA1 se inducen en fase tardía G1 y son máximos tras fase G1-S. La proteína BRCA1 es hiperfosforilada durante G1 y S, y transitoriamente desfosforilado tras fase M.

Interactúa con múltiples proteínas para la regulación del ciclo celular, como son ATM (Ataxia telangiectasia mutada), ATR (ATM y relacionada con Rad3), BARD1 (proteína 1 con dominio en anillo asociada a BRCA1), RB, p53 y p21.

El mecanismo podría relacionarse en parte, al hallazgo de que BRCA1 puede ser fosforilada por al menos tres quinasas activadas en respuesta al daño del ADN.

BRCA1 es fosforilada por la quinasa ATM en las serinas 1387, 1423, 1457, y 1524 en respuesta a las rupturas de doble cadena cuasadas por la radiación ionizante, por CHK2 (quinasa *checkpoint* del ciclo celular 2) en la serina 988 también en respuesta a radiación ionizante y por ATR en serina 1423, activada por estancamiento de las horquillas de replicación en respuesta a la radiación UV.

La fosforilación en serina 1423 se requiere para activar el punto de control en fase G2/M-, mientras que la fosforilación en serina 1387 se requiere para activar el punto de control en fase S.

La fosforilación de BRCA1 por estas quinasas parece promover la reparación del ADN y prevenir la replicación del ADN dañado mediante la activación de los puntos de control del ciclo celular.

BRCA1 estimula la transcripción de genes p21 y 27, que detienen el ciclo celular en fase G1/S y S, respectivamente, inhibiendo la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2)

BRCA2 y RAD51 forman un complejo que se cree interacciona con FANCD2, que se une a BRCA1. Este complejo promueve la detención del ciclo celular en la fase S ó en G2.

BRCA1 también estimula la transcripción de GADD45, que activa el punto de control G2/M, uniéndose al complejo ciclina B/CDC2, y de WEE1 quinasa, que fosforila e inhibe CDC2 para detener las células en G2/M.

Así, BRCA1 funciona a múltiples niveles en la regulación del ciclo celular, promoviendo la reparación del ADN y previniendo la replicación del ADN dañado^{97, 98} (Figura 10).

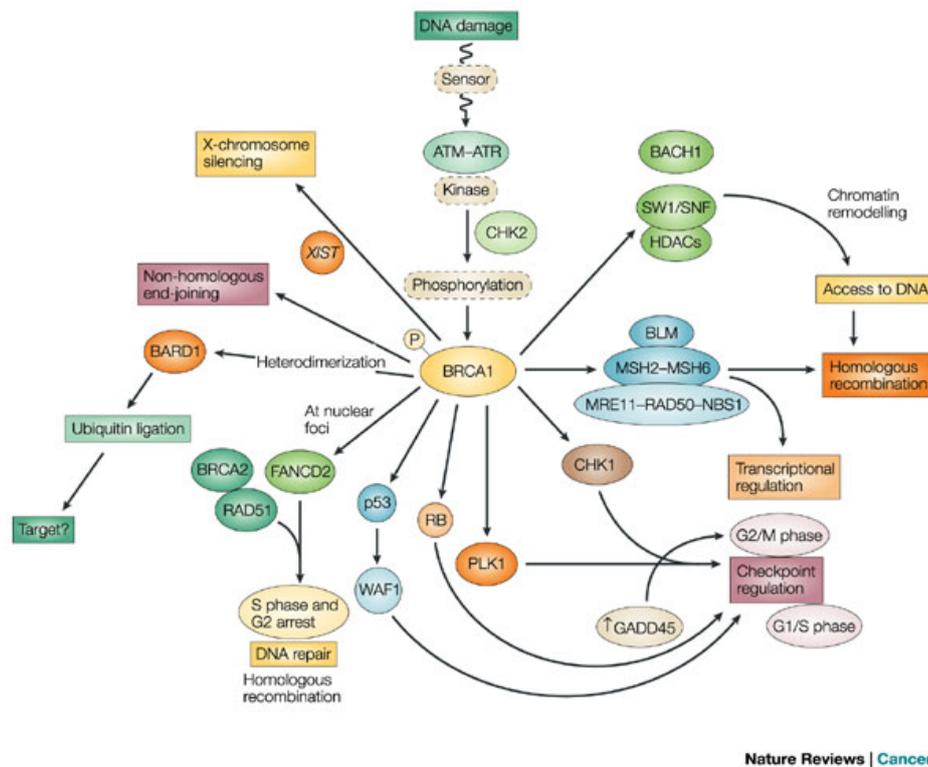


Figura 10 Funciones del gen BRCA1. Papel crucial en las vías que regulan la reparación del ADN, la progresión del ciclo celular y regulación transcripcional (Steven & Foulkes, Nature Reviews 2004)

➤ PAPEL DEL BRCA1 Y LA REPARACIÓN DEL ADN

BRCA1 promueve la supervivencia celular tras el daño del ADN previniendo la apoptosis y participando en las vías reparadoras del ADN.

BRCA1 participa en todos los procesos que se requieren para que la reparación del ADN sea efectiva, mediado en parte a través de la asociación con un complejo proteico llamado BASC (complejo de vigilancia del genoma asociado a BRCA1), que incluye proteínas de detección (ATM, BML helicasa), moléculas de reparación (RAD50, MRE11, NBS1), y moléculas MMR (MLH1, MSH2 y MSH 6).

BRCA1 interactúa con múltiples proteínas, incluyendo PALB2, BRIP1/BACH1, CtIP, TOPBP1, Abraxas y RAP80.

La fosforilación de H2AX (histona 2A) dependiente de ATM/ATR es el paso inicial tras el daño del ADN e instrumental para la acumulación de MDC1 (proteína checkpoint 1 mediadora del daño del ADN). El acoplamiento de MDC1 a la histona modificada permite la retención de múltiples proteínas, incluyendo NBS1, 53BP1 y BRCA1 a los sitios de ruptura del ADN. Como otras proteínas en respuesta al daño, la ubiquitin ligasa E3 RNF8 forma un foco que colocaliza con γ -H2AX y MDC1.

Aparte de la región BRCT, BRCA1 tiene un dominio N-terminal que es responsable de la dimerización con BARD1.

CtIP es uno de los sustratos importantes de BRCA1 para la detención del ciclo celular en respuesta al daño del ADN⁹⁹.

BRCA1 juega un papel importante en diferentes vías de reparación del ADN:

- La recombinación homologa (HR: *Homologous Recombination*) es un método libre de errores de reparar las rupturas de doble cadena que utiliza secuencias homologas de una misma región del genoma y ocurre durante fase S y G2 del ciclo celular. Comienza con la formación de un complejo proteico (BRCA1, RAD50, MRE11, y NBS1) con actividad 5'-3' exonucleasa que expone su extremo 3' a cada lado de la ruptura. La ruptura es luego reparada por uno de dos sistemas:
 - a) Anillamiento de cadena simple: que usa regiones de homología entre las cadenas complementarias para alinear las cadenas de ADN.
 - b) Invasión catenaria, que usa la cromátida hermana como molde para reparar la ruptura. En esta última participaría BRCA1 formando un complejo con BRCA2, RAD51, y el antígeno nuclear de células proliferante (PCNA) en las regiones del daño.
- La reparación por unión de extremos sin homología (NHEJ: *Non homologous end joining*) es menos precisa ya que no utiliza la cromátida hermana como molde, y es activa durante todo el ciclo celular. BRCA1 es importante por su habilidad de regular la microhomología, facilitando el alineamiento de áreas cortas de homología de bases en cada lado de la ruptura antes de la unión.

En ausencia de BRCA1 la recombinación homóloga es deficiente y la unión de extremos no homóloga es menos precisa, lo cual resulta en un defecto en la reparación que aumenta la probabilidad del daño del ADN.

- BRCA1 también participa en la reparación por escisión de nucleótidos, la cual se usa para reparar los aductos de ADN, como los formados por platinos, y puede tener un papel en reparar los enlaces cruzados intercatenarios causados por agentes alquilantes. Se produce la excisión de un fragmento de 24 a 32 bases de la cadena simple que contiene el aducto y posteriormente se produce la resíntesis y ligación, que usa la cadena complementaria como molde. Esta vía puede subdividirse en:

a) Reparación acoplada a la transcripción: se repara ADN transcripcionalmente activo. BRCA1 participa indirectamente formando un complejo con MSH6 y MSH2. Por esta vía podría explicarse el aumento de la sensibilidad a cisplatino en células deficientes, y aunque el mecanismo no es claro, podría mediar la ubiquitilación proteica.

Los aductos asociados al cisplatino bloquean a la ARN polimerasa II, deteniendo la transcripción, lo cual lleva a la ubiquitilación y degradación de la subunidad mayor de la enzima, permitiendo así el acceso de las proteínas reparadoras del ADN.

BRCA1 forma un complejo con BARD1 (Proteína con dominio en anillo asociada a BRCA1) que tiene actividad ubiquitin E3 ligasa y se asocia con la ARN polimerasa II.

Por lo que es posible que BRCA1 este implicado en la ubiquitilación y degradación de la ARN polimerasa II tras detenerse la transcripción.

b) Reparación genómica global: BRCA1 puede modular la activación transcripcional de XPC (proteína xeroderma pigmentosum C), DDB2 (proteína de unión al ADN dañado) y GADD4 (proteína de respuesta al daño del ADN y detención del crecimiento). Explica porque en células deficientes en BRCA1 la reparación de aductos inducidos por luz UV es anormal¹⁰⁰.

➤ **BRCA1 COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA**

Debido a que muchos agentes de quimioterapia actúan dañando directa ó indirectamente el ADN, se ha investigado en varios estudios el papel del BRCA1 como biomarcador predictivo de respuesta.

El BRCA1 y p53 son fosforilados por la proteína ATM en respuesta a la ruptura de las dobles cadenas del ADN, activándose así las vías en respuesta al daño. Se cree que se requiere la pérdida de función del p53 para que la célula tolere la pérdida de función del BRCA1, lo cual sería importante en la respuesta a los agentes que dañan el ADN.

En diversos estudios se ha demostrado que las células con déficit de BRCA1 son altamente sensibles a agentes ICl (*interstrand crosslinking*) como el cisplatino. Los enlaces cruzados intercatenarios producidos por estos agentes irrumpen las fuerzas de replicación durante la fase S y se requiere una reparación de la ruptura de doble cadena mediante recombinación homóloga eficiente para la progresión de la fase S y la supervivencia celular.

BRCA1 también modula la respuesta a agentes que dañan el huso mitótico, como los taxanos y los alcaloides de la vinca, pero esta respuesta parece ser p53 independiente.

Debido a su implicancia en el punto de control del ensamblaje del huso mitótico en el ciclo celular, la disminución de la expresión causa disrupción del huso, que podría explicar la resistencia a agentes antimicrotúbulo.

BRCA1 modula una vía apoptótica en respuesta al daño del huso mitótico y promueve la reparación del ADN y supervivencia celular tras el daño con agentes que dañan el ADN⁹⁶ (Figura 11).

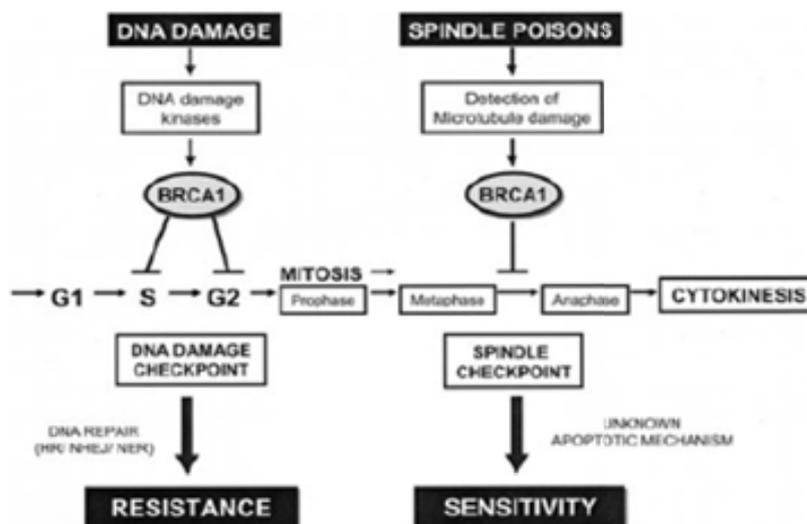


Figura 11 Papel del BRCA1 en los puntos de control del ciclo celular en respuesta a la quimioterapia (Kennedy, JNCI 2004).

La evidencia que documenta la importancia de BRCA1 en respuesta a agentes que dañan el ADN viene de líneas celulares platino-resistentes en cáncer de mama y ovario.

Estas líneas celulares sobreexpresan BRCA1 y su resistencia a cisplatino podría deberse a un aumento de la reparación del ADN dependiente de BRCA1. De acuerdo con esto, la inhibición de BRCA1 por ARN *antisense* en líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3 aumenta la citotoxicidad y sensibilidad a cisplatino¹⁰¹, mientras que la sobreexpresión en células de cáncer de ovario aumenta la resistencia a cisplatino y doxorubicina¹⁰².

La disminución de la expresión en líneas celulares de cáncer de mama lleva a una mayor sensibilidad a cisplatino y etoposido, pero mayor resistencia a agentes antimicrotubulo como paclitaxel, vincristina y vinorelbine¹⁰³.

BRCA1 induce un aumento de 10 a 1000 veces en la resistencia a agentes que dañan el ADN, como el cisplatino, la bleomicina y el etoposido, y un incremento de 800 a 1000 veces en la sensibilidad a agentes antimicrotubulo como paclitaxel y vinorelbine¹⁰⁴.

Las líneas celulares de cáncer de mama HCC1937 son líneas que derivan de pacientes con mutación de BRCA1 y presentan mayor sensibilidad a cisplatino. Al ser reconstituidas con BRCA1 wild-type se observa un aumento de la resistencia a la apoptosis tras tratamiento con bleomicina ó etoposido, que inducen rupturas de doble cadena en el ADN, y al cisplatino, que induce enlaces cruzados inter e intracatenarios¹⁰⁵.

Globalmente, en los resultados preclínicos se indica que BRCA1 funciona como un regulador diferencial de la apoptosis inducida por quimioterapia: inhibe la apoptosis tras agentes que dañan el ADN, pero se requiere para la inducción de la apoptosis en respuesta a agentes antimicrotubulo, especialmente en líneas celulares de cáncer de mama.

Los niveles bajos de expresión de BRCA1 se han asociado con mayor sensibilidad al platino y mayor supervivencia en pacientes con cáncer de ovario, mama y pulmón, y podrían ser un marcador predictivo útil en cáncer de vejiga¹⁰⁶.

En un estudio retrospectivo de 55 pacientes con cáncer de pulmón tratados con cisplatino gemcitabina neoadyuvante y posterior cirugía se analizaron los niveles de expresión de ARNm de BRCA1, dividiéndolos en cuartiles para su análisis. La supervivencia mediana fue superior en aquellos pacientes con niveles bajos de expresión de BRCA1¹⁰⁷.

En una serie de 102 pacientes con cáncer de pulmón metastásico, los niveles altos de BRCA1 se asociaron con una mejor respuesta y una disminución del tiempo a la progresión tras tratamiento con un esquema en primera línea de gemcitabina y docetaxel. Aquellos pacientes con niveles bajos de BRCA1 obtuvieron un mayor beneficio tras una segunda línea con un esquema basado en cisplatino¹⁰⁸.

Este efecto diferencial también se ha demostrado en células tumorales aisladas de derrame pleural en cáncer de pulmón y en tumores gástricos donde se han correlacionado los niveles de BRCA1 negativamente con la sensibilidad a cisplatino y positivamente con la sensibilidad a docetaxel¹⁰⁹.

La deficiencia de BRCA1 se ha evidenciado en más del 72% de cáncer de ovario esporádico. En un análisis retrospectivo de 70 pacientes con cáncer de ovario, aquellos que presentaban niveles bajos e intermedios de BRCA1 tenían una mejor supervivencia comparada con aquellos con niveles altos. (57.2 versus 18.2 meses; p=0.0017). La supervivencia en pacientes con niveles altos mejoraba tras tratamiento con taxanos¹¹⁰.

1.6.2 PAPEL DEL RAP80 EN LA REPARACIÓN DEL ADN TRAS EL DAÑO CELULAR

La proteína asociada al receptor 80 (RAP80) es una proteína nuclear que contiene 2 regiones que interactúan con ubiquitina (UIM) por sus terminales amino y participan en la endocitosis, ubiquitilación, replicación, transcripción y reparación del ADN. Se ha observado una asociación entre RAP80 y diversas proteínas que participan en la activación de los puntos de control del ciclo celular, lo cual sugiere su posible papel en la reparación en respuesta al daño del ADN.

En estudios *in vitro* se observa que RAP80 transloca a los sitios de daño del ADN tras administrar radiación ionizante ó algún agente que provoque la ruptura de la doble cadena de ADN, y las regiones que interactúan con la ubiquitina serían muy importantes en la relocalización del RAP80.

RAP80 forma un complejo con BRCA1, Abraxas y la enzima deubiquitilante BRCC36 (DUB) en las rupturas de doble cadena del ADN, lo cual es esencial en la respuesta al daño y reparación del ADN, además de funcionar con BRCA1 en el control de la fase G2/M del ciclo celular.

MERIT40 (Mediator of RAP80 Interactions and Targeting 40 kD) es una proteína asociada a RAP80, esencial para las interacciones del complejo BRCA1/RAP80 y para el reconocimiento de las rupturas de doble cadena de ADN, que actúa en forma temprana en respuesta al daño y regula la localización del BRCA1 dependiente del daño.

La inhibición de la expresión de RAP80 aumenta la radiosensibilidad, mientras que un aumento de la radioresistencia se observa en células de cáncer de mama MCF-7 con sobreexpresión de RAP80¹¹¹⁻¹¹⁴.

En respuesta a la quimioterapia, se une una proteína mediadora de daño del ADN checkpoint 1 (MDC1) a la cola fosforilada de la histona H2AX facilitando la formación de un foco nuclear de BRCA1 en los sitios de ruptura de la doble cadena. BRCA1 dimeriza con BARD1 (*BRCA1-associated RING domain*) constituyendo una ubiquitin E3 ligasa, a la cual se une RAP 80 en los sitios de ruptura de la doble cadena.

La disminución de RAP80 disminuye la formación del foco nuclear de BRCA1.

La formación del foco de RAP80 y Abraxas es BRCA1 independiente. Por lo que se plantea la hipótesis de que los niveles altos de RAP80 pueden causar resistencia a cisplatino aun en pacientes con niveles bajos de BRCA1.

En un análisis de 200 pacientes con cáncer gástrico metastásico tratados con FOLFOX, se determinaron los niveles de ARNm de BRCA1 y RAP80, con una supervivencia mediana de la serie de 13 meses, comparada con solo 7 meses en aquellos pacientes con niveles intermedios y altos de RAP80¹¹⁵.

En un estudio fase II, Rosell y cols evaluaron la quimioterapia personalizada en 123 pacientes con cáncer de pulmón metastásico, en función del estado del EGFR y los niveles de BRCA1. En aquellos pacientes con la mutación del EGFR se administraba Erlotinib, y en los que no la presentaban, quimioterapia con ó sin cisplatino según los niveles de BRCA1: niveles bajos: cisplatino/gemcitabina; intermedios: cisplatino/docetaxel, y altos solo docetaxel. Se evaluaron también los niveles de RAP80 con el fin de determinar su valor pronóstico. En aquellos pacientes con niveles bajos de BRCA1 y RAP80 la supervivencia mediana fue de 26 meses, comparada con 11 meses en aquellos que solo tenían niveles bajos de BRCA1. RAP80 fue un factor significativo para la supervivencia en los pacientes tratados según los niveles de BRCA1¹¹⁶.

1.7 PAPEL DEL AEG1 EN CÁNCER

AEG-1 (*Astrocyte elevated gene 1*) es un gen que tiene un papel importante en la carcinogénesis participando en una compleja red de vías de señalización oncogénica, regulando la transformación celular y la progresión tumoral.

Inicialmente fue inducido en astrocitos fetales humanos (AFH) tras infección por VIH, y posteriormente con el tratamiento con una glicoproteína viral gp120 ó Factor de necrosis tumoral alfa (FNT-alfa). Tiene 12 exones y 11 intrones y se localiza en el cromosoma 8 (8q22), región que se encuentra amplificada en diversos tumores.

AEG1, también conocido como metadherina (MTDH), codifica una proteína de 64kDa (582 aminoácidos) y se expresa en niveles variables en la mayoría de los tejidos. Participa en diferentes etapas de la progresión tumoral, incluyendo la transformación y evasión de la apoptosis, invasión, metástasis y quimioresistencia.

Se ha demostrado su sobreexpresión en diferentes tipos tumorales asociada generalmente con la progresión y peor supervivencia de los pacientes. Se observa en melanoma, glioma, neuroblastoma, hepatocarcinoma y carcinoma de mama, próstata, y esófago. También en cáncer gástrico, colorrectal y osteosarcoma.

Su papel en el desarrollo y progresión tumoral se encuentra asociado a diferentes cascadas de señal, entre ellas: la activación de la vía NF-kappa Beta a través de interacción directa con p65; la activación de PI3K/AKT, el aumento de la actividad transcripcional de beta-catenina por activación indirecta de MAPK y la promoción de autofagia protectora¹¹⁷.

MTDH/AEG1 funciona como un mediador de la actividad transformante de Ha-Ras y c-Myc. Ha-Ras aumenta la expresión de AEG1 a través de la activación de la vía PI3K/AKT, la cual fosforila e inactiva la kinasa glucógeno sintetasa 3 (GSK3 β), y luego aumenta la estabilización y unión de C-Myc al promotor AEG1.

Su sobreexpresión activa las vías de señal PI3K/ AKT, NF-kappa B, y Wnt/ β -catenina estimulando la proliferación, invasión, supervivencia celular y quimioresistencia.

Tiene un dominio que mediaría en la adhesión de células tumorales a órganos vecinos,

promoviendo así el desarrollo de metástasis¹¹⁸ (Figura 12).

AEG-1 puede aumentar la quimioresistencia promoviendo la supervivencia celular, la cual puede estar mediada, como se menciona anteriormente, por vías como PI3K y NFκB.

En líneas celulares de cáncer se ha encontrado una correlación entre la sobreexpresión de AEG1 y la resistencia a un amplio espectro de compuestos químicos. Análisis de quimioresistencia in vitro y in vivo demuestran que la disminución de AEG1 sensibiliza diferentes líneas celulares de cáncer de mama a paclitaxel, doxorubicina, cisplatino, y radiación UV.

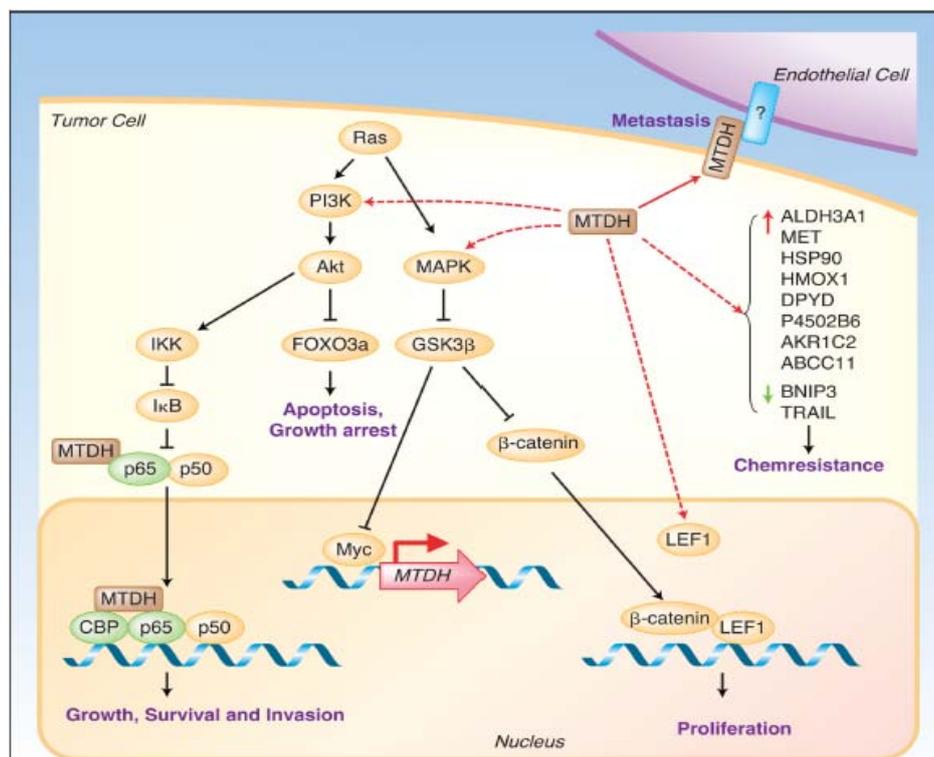


Figura 12 AEG-1 promueve la progresión tumoral mediante la integración de múltiples vías de señal (Guohong Hu, Clin Cancer Res. 2009)

Como se ha evidenciado en varias líneas celulares, AEG-1 transloca al núcleo donde interactúa con la subunidad p65 de la vía NF- kappa Beta aumentando así la expresión génica.

Aumenta la transcripción de IL-8, gen de la vía que regula positivamente la angiogénesis y el desarrollo de metástasis.

Una segunda vía modulada por AEG1 es la PI3K/AKT, que media el crecimiento y supervivencia celular. La expresión de AEG-1 es aumentada por Ha-ras, que activa la vía llevando a la unión del factor c-Myc con una región promotora del AEG, induciendo su transcripción. AEG 1 también induce la expresión de c-Myc.

Ha-ras activa la cascada de señal PI3K, lo cual resulta en un aumento de expresión de AEG1, que activa el factor nuclear kappa B (NF-B) que regula los genes involucrados en la migración e invasión. La vía PI3 AKT activada por AEG1 inhibe la apoptosis a través de la fosforilación de sustratos AKT antiapoptóticos incluyendo kinasa glucogeno sintetasa 3 (GSK3), c-Myc, Bad, murine double minute 2 (MDM2), p53 y p21/mda-6^{119,120} (Figura 13).

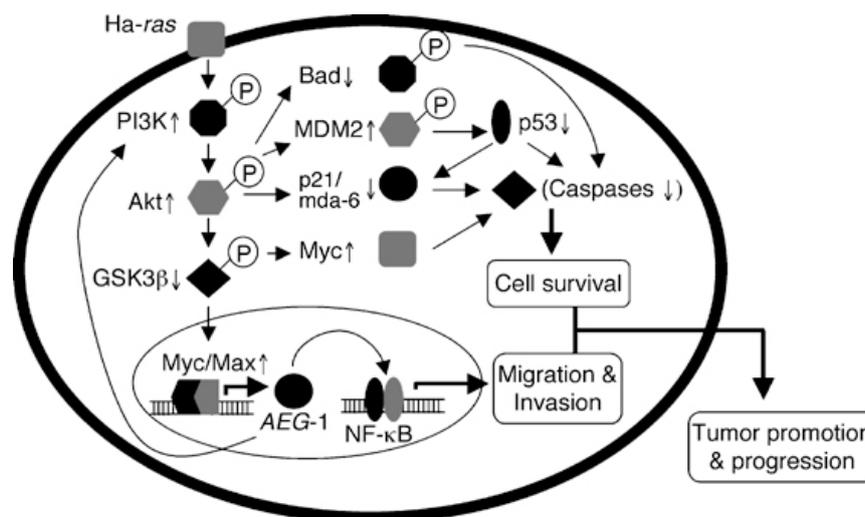


Figura 13 Modelo hipotético de las vías de transducción de señal entre AEG1 y la vía PI3K.Akt. (Lee SG, Oncogene 2008)

AEG1 ha demostrado aumentar la angiogénesis inducida por el tumor, participando también la vía PI3K/AKT. La sobreexpresión de AEG1 aumenta la expresión de marcadores moleculares de angiogénesis, incluyendo angiopietina 1 (Ang 1), metaloproteasa de la matriz (MMP) 2 y factor inducible de hipoxia 1 (HIF 1 alfa)¹²¹.

AEG1/MTDH se encuentra sobre expresado en el 45-47% de los tumores de mama y se correlaciona significativamente con la estadificación clínica, el tamaño tumoral, la diseminación a ganglios linfáticos y a distancia y la peor supervivencia de los pacientes¹²².

En carcinoma escamoso de esófago, pulmón y hepatocarcinoma, la sobreexpresión también se correlaciona con la progresión clínica y el pobre pronóstico de los pacientes.

En un análisis IHQ de 168 pacientes con carcinoma escamoso de esófago, se evidenció sobreexpresión de AEG1 en el 48%, asociado con una supervivencia más corta y siendo un predictor independiente tras el análisis multivariante¹²³⁻¹²⁵.

En pacientes con neuroblastoma, la sobreexpresión de AEG1 se asocia con resultados clínicos desfavorables. En un estudio en líneas celulares de este tumor se observó que al disminuir la expresión de AEG1 se inhibía significativamente la proliferación y aumentaba la quimio sensibilidad a cisplatino y doxorubicina¹²⁶.

En un estudio de 60 pacientes con cáncer de pulmón metastásico tratados con quimioterapia basada en cisplatino en pacientes con EGFR wt (*wild type*) y Erlotinib en aquellos mutados, se analizaron los niveles de expresión de genes involucrados en las vías de EGFR y NF-kappa beta. En aquellos pacientes con niveles bajos de BRCA1 y AEG1, la supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 13 meses, comparada con 5.4 meses en aquellos con niveles altos y 7.7 meses para otras combinaciones. ($p=0.025$)¹²⁷.

En un análisis de 81 pacientes con cáncer de ovario, aquellas con elevados niveles de expresión de AEG1 presentaron una peor supervivencia global y libre de enfermedad.

En un estudio recientemente publicado la sobreexpresión de AEG1 en pacientes con cáncer de ovario metastásico se asoció con un peor pronóstico de los pacientes y resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino¹²⁸.

No existen estudios en cáncer de vejiga en donde se haya estudiado la correlación del AEG1 con los resultados clínicos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS

2.1 JUSTIFICACIÓN

La cistectomía radical es el tratamiento estándar en el carcinoma de vejiga localizado infiltrante; sin embargo la mitad de los pacientes desarrollan metástasis dentro de los 2 años y fallecen por su enfermedad. Si bien la quimioterapia neoadyuvante mejora la supervivencia en estos pacientes, el beneficio es modesto.

Debido a que no todos los pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado se benefician con la quimioterapia neoadyuvante, es importante identificar aquellos en los que el tratamiento quirúrgico solo es insuficiente y mejorar la capacidad de predecir quienes pueden responder a la quimioterapia, desarrollando marcadores predictivos más precisos que nos permitan planificar un tratamiento individualizado de los pacientes.

El uso de parámetros clínicos y patológicos para estratificar el riesgo en pacientes con carcinoma de vejiga es insuficiente, ya que no siempre predicen adecuadamente la evolución tumoral.

El conocimiento de la patogénesis molecular puede ayudarnos a identificar esos biomarcadores, que nos aporten información adicional de la biología tumoral y que puedan usarse para predecir respuesta y determinar pronóstico.

Se han identificado marcadores con potencial para futuro uso clínico, pero aun no existen estudios prospectivos y de validación.

La identificación de marcadores moleculares para predecir la sensibilidad ó resistencia a regímenes de quimioterapia basadas en platino permitiría ayudar a identificar aquellos pacientes que podrían beneficiarse con este tratamiento.

Por ello, nos parece interesante analizar la expresión de genes que participan en la reparación del ADN y en el desarrollo y progresión tumoral y correlacionarlos con parámetros clínicos, patológicos y moleculares para determinar su importancia pronostica, utilizando técnicas de laboratorio reproducibles y aplicables en la practica clínica habitual, intentando así definir factores que nos aporten una información objetiva sobre la evolución y respuesta al tratamiento, lo cual puede permitirnos un mejor abordaje de los pacientes y la elección de una mejor estrategia terapéutica

Además la posibilidad de determinar previamente que pacientes responderán a la quimioterapia neoadyuvante permitiría una mejor selección de los candidatos a recibirla, evitando una quimioterapia innecesaria y un retraso en la cirugía en los pacientes con pocas probabilidades de responder.

2.2 OBJETIVOS

Los objetivos se resumen en los siguientes puntos:

- 1- Determinar el valor de la quimioterapia neoadyuvante y los posibles factores pronóstico y predictivos de respuesta en pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado.
- 2- Analizar la correlación de las variables clínicas, patológicas y moleculares con la supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante y cistectomía.
- 3- Analizar la relación entre la respuesta patológica con los factores clínicos, patológicos y moleculares.
- 4- Evaluar el impacto pronóstico y predictivo de respuesta de los niveles de expresión génica en pacientes con carcinoma de vejiga sin invasión ganglionar tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino y posterior cistectomía:
 - a. Analizar la influencia de los niveles de expresión de ARNm de BRCA1, RAP80 y AEG1 en la supervivencia global y libre de enfermedad.
 - b. Determinar la posible relación de los niveles de expresión génica con la respuesta patológica al tratamiento.

PACIENTES Y MÉTODOS

3- PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio retrospectivo de pacientes con carcinoma transicional de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante y posterior cistectomía radical en el Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona e Institut Català d' Oncologia, en un periodo comprendido entre mayo de 1990 y enero del 2011.

3.2 PACIENTES

Se incluyeron en una primera etapa 126 pacientes con carcinoma transicional de vejiga localmente avanzado (T2-4N0/+M0) tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en platino y posterior cistectomía, con datos clínicos disponibles para su análisis. En la Figura 14 se detalla el esquema de análisis de los pacientes.

En una segunda etapa se consideraron solo 100 pacientes de los 126, con cáncer de vejiga localizado sin invasión ganglionar tratados con esquemas basados en cisplatino.

3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los pacientes candidatos a recibir quimioterapia neoadyuvante debían cumplir los siguientes criterios:

1. Diagnóstico confirmado de carcinoma infiltrante de vejiga localmente avanzado (estadio T3-4N0/+M0).
2. Histología de carcinoma urotelial puro ó con componente mixto.
3. Ser considerados candidatos a resección quirúrgica
4. Estado general conservado (PS (*performance status*) 0-2)
5. Adecuada función hematológica, hepática y renal, con Aclaramiento de creatinina > 60 mL/min.

Todos los casos clínicos eran discutidos en el comité de tumores urológicos del hospital para decidir la mejor opción terapéutica para los pacientes.

3.2.2 ESTADIFICACIÓN

Todos los pacientes fueron sometidos a una resección transuretral (RTU) para la confirmación histológica y determinación de la extensión de la enfermedad dentro de la vejiga.

Previo al inicio del tratamiento, se realizaba la estadificación incluyendo:

- Anamnesis y exploración física.
- Cistoscopia y RTU.
- Analítica completa con bioquímica y Aclaramiento de Creatinina.
- TC abdominal y pélvica.
- Radiografía de tórax.
- Gammagrafía ósea en caso de presencia de síntomas ó elevación de fosfatasa alcalina.

La estadificación clínica se estableció según criterio TNM (T, tumor primario; N, ganglios nodales; M, metástasis) de la séptima edición de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) NOTA: ver tabla en Introducción.

3.2.3 TRATAMIENTO

3.2.3.1 QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

En todos los pacientes con carcinoma de vejiga T3-4 y/o ganglios positivos, se realizaba tratamiento neoadyuvante que podía consistir en los siguientes esquemas administrados cada 21 días:

a) En el periodo comprendido entre 1990 y 2000:

Esquema CMV:

- Cisplatino: 100 mg/m² día 2 endovenoso.
- Metotrexato: 30 mg/m² días 1 y 8 endovenoso.
- Vinblastina: 3 mg/m² día 1 y 8 endovenoso.

b) En el periodo comprendido entre 2000 y 2011

- Cisplatino 75 mg/m² día 1 endovenoso.
- Gemcitabina 1250 mg/m², día 1 y 8 endovenoso.

Tras una mediana de 3 ciclos de tratamiento (rango 2- 6), los pacientes eran re-estadificados con TC abdomino-pélvico.

3.2.3.2 CIRUGÍA

Tras la re-estadificación, y en caso de no evidenciar progresión de la enfermedad, los pacientes eran sometidos a cistectomía radical, que consistía en la resección de la vejiga y órganos adyacentes con un margen de tejido adiposo perivesical dentro de los límites musculo-esqueléticos de la pelvis. Se realizaba también la linfadenectomía bilateral ileoobturatriz incluyendo ganglios perivesicales, presacros, ilíacos comunes distales, ilíacos externos, obturadores e hipogástricos, aunque el número de ganglios resecaos ha variado en el periodo de tiempo del estudio.

3.2.4 ANÁLISIS ANATOMOPATOLÓGICO

Las piezas quirúrgicas fueron analizadas por el Servicio de Anatomía Patológica del hospital según protocolo, valorando: el estadio patológico según el sistema TNM, el grado histológico según clasificación de la OMS 2004, y la presencia de invasión linfovascular.

Los pacientes sin evidencia de tumor en la pieza quirúrgica se clasificaron como pT0 (Respuesta completa patológica, RCp).

Se definió la respuesta patológica significativa como la ausencia de tumor en la pieza de cistectomía (RCp) ó solo la presencia de tumor residual superficial (pT0/Tis/T1).

Los pacientes en los que no se realizó linfadenectomía se clasificaron como pNx.

3.2.5 SEGUIMIENTO CLÍNICO

En aquellos pacientes con afectación de márgenes de resección se realizó radioterapia postoperatoria. Se realizó el seguimiento posterior de los pacientes con controles cada 4 meses con Analíticas completa y TC de abdomen y pelvis, los 2 primeros años y cada 6 meses, durante los 3 años siguientes hasta completar los 5 años. Posteriormente se realizó seguimiento anual. Si durante el seguimiento se sospechaba de recidiva tumoral, se realizaban estudios de re-estadificación.

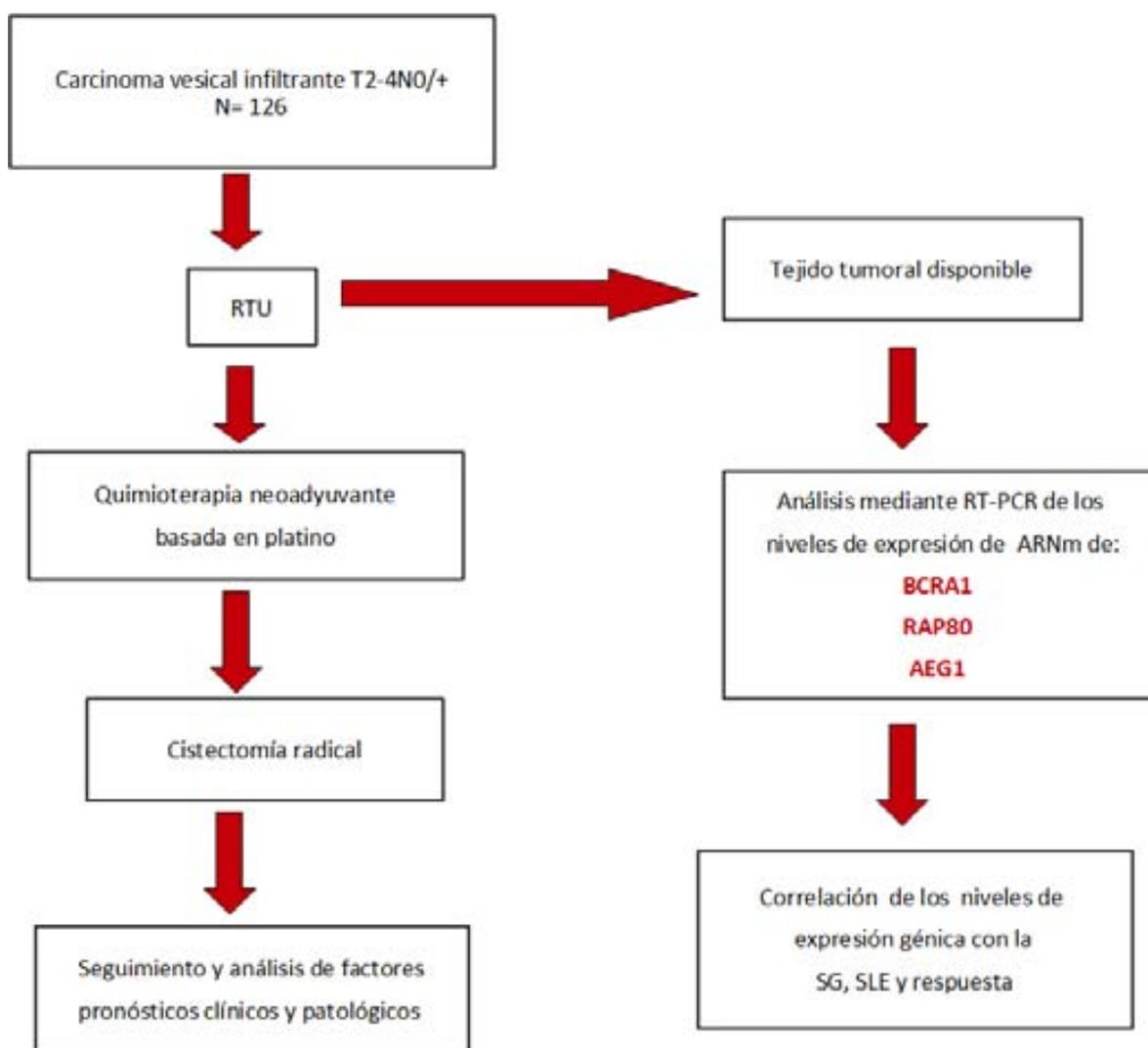


Figura 14 Esquema de análisis de los pacientes

3.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables analizadas de la base datos fueron:

CLÍNICAS	
• Edad	<64 versus > 64 años
• Sexo	Varón / Mujer
• Antecedente de carcinoma superficial	Si /No
• Presencia de hidronefrosis	Si /No
• Estadio Clínico TNM	T0-2/T3-4/N+
• Tipo de quimioterapia neoadyuvante	CMV/ Gemcitabina-Platino

PATOLÓGICAS	
• Grado histológico	Bajo / Alto
• Tipo histológico	Urotelial puro/mixto
• Tipo de cistectomía	RC/RI/ No resección
• Estadio patológico (p TNM)	pT0-1/pT2/pT3-4/N+
• Tamaño tumoral	No tumor. y mic/<3cm/>3 cm
• Invasión linfovascular	Presente /Ausente
• Nº de ganglios resecaados	0-7/>7
• Ganglios invadidos	Si /No

CMV: cisplatino, metotrexato, vinblastina; dif.: diferenciación; RC: resección completa; RI: resección incompleta; mic: microscopico

MOLECULARES	
• Niveles ARNm de BRCA1	Bajo/Intermedio /Alto
• Niveles ARNm de RAP80	Bajo/intermedios/Alto
• Niveles ARNm de AEG1	Bajo/intermedios/Alto

3.4 MUESTRAS TUMORALES

Se obtuvo tejido tumoral de los pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado mediante resección transuretral previo a la administración de quimioterapia neoadyuvante. En el análisis anatómo-patológico se informó: el grado de diferenciación histológica, la profundidad de invasión tumoral (T) y la presencia ó no invasión linfovascular (ILV).

Todas las muestras se fijaron inmediatamente en formol al 10% tamponado y se incluyeron en parafina mediante procedimientos estandarizados.

Las características histo-patológicas, así como la demarcación de las zonas con mayor densidad de células fenotípicamente malignas de cada muestra fueron analizadas por un patólogo en un corte de tejido tumoral teñido con hematoxilina-eosina (H&E).

Cortes seriados de tejido tumoral de 5 µm de grosor se montaron sobre portaobjetos cubiertos con membrana de polietileno-naftalato de 1,35 µm (PEN-Membrane slides, Palm, Oberlensheim, Germany), fueron teñidas con un protocolo de H&E adaptado para evitar la acción de las ARNasas. A partir de estas secciones de tejido, se aislaron mediante microdissección con láser frío de UV (CAPmover Microdissector, Carl Zeiss Microimaging, Barcelona, Spain), un mínimo de 8 mm² de tejido y/o células, con un porcentaje de células tumorales siempre superior al 90%.

En la Figura 15 se observa el esquema de procedimientos seguido para el análisis y procesamiento de las muestras y en la tabla 5 los bloques de parafina de biopsias tumorales disponibles para el análisis de los niveles de expresión génica: En el resto de los pacientes no se logró recuperar la muestra de RTU del diagnóstico inicial ó el material era insuficiente para el análisis.

Tabla 5. Tejido tumoral disponible para análisis de expresión génica

Biopsia tumoral disponible	T2-4N1-3M0 (N=126)	T2-4N0M0 (N= 100)
BRCA1	82	65
RAP80	51	41
AEG1	59	49

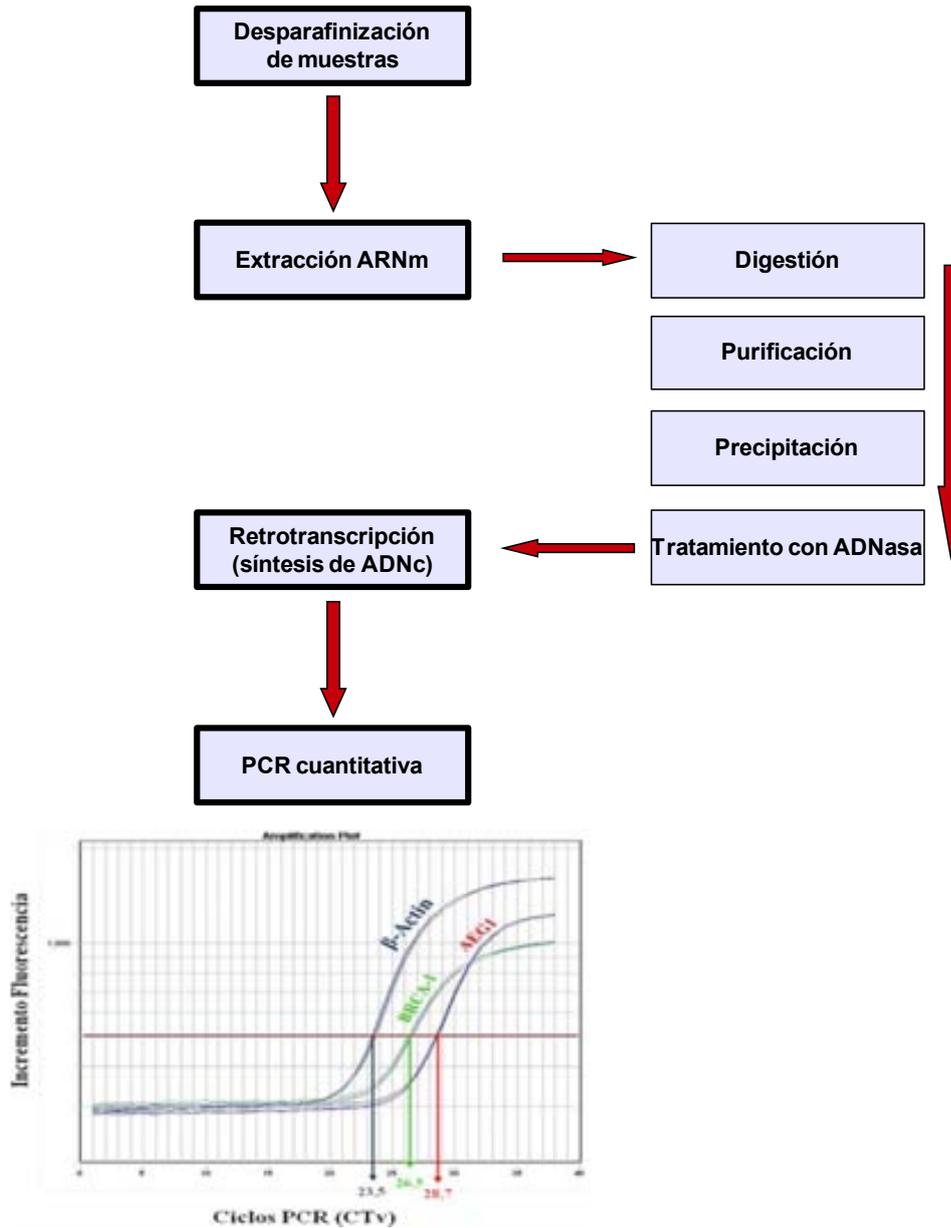


Figura 15 Análisis y procesamiento de las muestras

3.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS MUESTRAS TUMORALES

El formaldehído es el fijador universal en histo-patología, pero no preserva la integridad de los ácidos nucleídos (AANN). Además el poder preservativo del formol se basa en la coagulación de las proteínas modificándolas covalentemente e impidiendo que las digestiones proteolíticas del tejido sean difíciles e incompletas, reduciendo significativamente la cantidad de AANN que se pueden extraer de dichas muestras. Por otro lado, los AANN también sufren modificaciones químicas que los fragmentan e impiden la acción de cualquier enzima sobre dichos AANN, inhibiendo así la PCR, si no se revierten dichas modificaciones químicas. Así que el método de extracción de AANN a partir de tejidos fijados con formol y embebidos en parafina debe poder revertir, tanto como sea posible, dichas modificaciones, tanto en proteínas, como en los AANN.

Tras obtener poblaciones homogéneas de células/tejido tumoral/es a partir de cada muestra mediante microdissección por láser, dichas células fueron incubadas a 60° C durante 16 horas en tampón de digestión. Para completar la lisis del tejido/células se añadió proteinasa K.

Se realizó la extracción del ARN con el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico seguido de la precipitación del ARN con isopropanol en presencia de glicógeno y acetato sódico.

Finalmente, el ARN fue resuspendido en agua de dietil pirocarbonato (DEPC; Ambion Inc., Austin, TX, USA) y tratado con DNasa (DNase Free, Ambion, Austin, TX, USA) para eliminar la posible contaminación de ADN.

Debido a que el ARN es una molécula lábil, susceptible de degradación por las ribonucleasas, siempre se trabajó en condiciones libres de ARNasas.

Los reactivos y soluciones utilizadas se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Reactivos y soluciones usadas en la extracción de ARNm

Reactivos y soluciones	
<ul style="list-style-type: none"> • Tampón lisis. (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0, SDS 2%). • Proteinasa K (20 mg/mL). • Ultra Pure™ Phenol:Water (3.75:1,vol/vol). • Cloroformo:isoaminoalcohol(24:1;vol/vol). • Acetato sódico 3 M pH 4,6. 	<ul style="list-style-type: none"> • Glicógeno (20 mg/mL). • Isopropanol. • Etanol al 70% frío (-20° C). • Agua bidestilada (H₂O_{dd}). • DNasa/DNasabuffer (<i>Ambion</i>). • 10xInactivation buffer (<i>Ambion</i>).
EDTA: ácido Etilen diamino tetraacético, SDS: Dodecil sulfato disódico	

La extracción del ARN de las muestras se realizó según el siguiente protocolo:

3.4.1.1 Digestión:

- Centrifugar el tejido tumoral microdisecado por láser. Y añadir un volumen de 200 µL de tampón de lisis (ver tabla 6). Incubar a 60° C por 16 horas. Luego añadir 10 µL de proteinasa K, e incubar a 60° C durante 15 minutos hasta que el tejido se solubiliza completamente.

3.4.1.2 Purificación:

- Preparar en hielo la solución de fenol y cloroformo:isoamil-alcohol (proporción 5:1 vol:vol).
- Añadir 300 µL de solución de fenol:cloroformo:isoamil-alcohol, mezclar vorteadando e incubar en hielo durante 10 minutos.

- Centrifugar las muestras a 12600 x g durante 10 minutos a 4° C para separar las fases .Se forman 3 fases: una superior acuosa que contiene ARN, una interfase blanca con ADN y restos celulares y una inferior que contiene parte de ADN y proteínas.
- Sin mover los tubos bruscamente, traspasar la fase acuosa a tubos de 1,5 mL nuevos, teniendo cuidado de no arrastrar interfase.

3.4.1.3 Precipitación:

- Añadir a cada muestra 20 µL de acetato sódico 3M pH=4.6; 2.5 µL de glicógeno (20mg/mL) y 300 µL de isopropanol.
- Agitar con el vortex e incubar durante 30 minutos a -20°C.
- Centrifugar durante 10 minutos a 12600 x g a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 150 µL de etanol al 70% frío.
- Centrifugar a 12600 x g durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante, dejando secar el *pellet* de ARN en un termobloque con el tapón del tubo de 1,5 mL abierto para que se evapore el etanol.
- Resuspender las muestras en 53 µL de agua DEPC e incubar durante 5 minutos a 65°C.

3.4.1.4 Tratamiento con ADNasa:

- Añadir a cada muestra 1,5 µL de DNasa y 6 µL de 10xDNasa buffer.
- Vortear las muestras e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Añadir 6 µL de 10x Inactivation buffer para detener la reacción e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar a 12000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente, y traspasar el sobrenadante (que contiene el ARN) a tubos nuevos.
- Etiquetar correctamente los tubos para su identificación y guardar a -80° C para su posterior utilización.

3.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los niveles de expresión de ARNm de BRCA1, RAP80 y AEG1 se determinaron mediante RT-PCRq, que es un procedimiento cuantitativo para el análisis del nivel de expresión de genes, en el cual tiene lugar la retrotranscripción de ARNm en ADNc, (ADN complementario) a partir del cual se lleva a cabo la reacción en cadena polimerasa. Permite cuantificar los productos de PCR durante el desarrollo de la misma y se basa en la detección de señales de fluorescencia durante y/o después de cada ciclo.

3.5.1 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

Para poder analizar cualquier ácido nucleico mediante PCR, es imprescindible que el material genético de partida sea de doble cadena. El ARN, al ser un ácido nucleico de cadena sencilla, no sirve como molde para la PCR. La enzima transcriptasa inversa permite sintetizar la cadena complementaria del ARN y transformarlo así en ADNc de doble cadena

El ADNc puede sintetizarse usando cebadores específicos, hexámeros aleatorios u oligodT. Si llevamos a cabo la retrotranscripción con cebadores específicos, aumentaremos la especificidad y la sensibilidad de la reacción, pero sólo podremos analizar el gen en concreto, mientras que si utilizamos los hexámeros o las colas de dT, tendremos la posibilidad de analizar muchos más genes con una sola RT. Las temperaturas de hibridación variarán en función del tipo de cebador empleado para la retrotranscripción.

En este estudio, el ADN complementario fue sintetizado usando hexámeros aleatorios como cebadores y la enzima M-MLV-RT (*Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase*; Life Technologies), que demostró tener igual rendimiento de retrotranscripción que otras transcriptasas inversas, con la función RNasa H mutada, más eficientes, cuando el ARN de origen era extraído a partir de tejido fijado con formol e incluido en parafina (datos no publicados).

Tabla 7. Reactivos y soluciones usadas en la reacción de retrotranscripción

Mix 1 2 μ L /reacción	Mix 2 8 μ L /reacción
<ul style="list-style-type: none"> 1 μL RM 250 ng/μL (Life Technologies) 1 μL dNTPs 10 mM (Ecogen) 	<ul style="list-style-type: none"> 2 μL DTT 0.1 M 4 μL Buffer 5 \times (Tris HCl 250mM; pH8,3; KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM) 1 μL MMLV (200u) (Life Technologies) 1 μL RNasa Out (40u) (Life Technologies)

RM: random hexamer primer; dNTP: dinucleotidos trifosfato; DTT: detergente ditioneitol; KCl:cloruro de potasio; MgCl₂: cloruro de magnesio; MMLV: enzima transcriptasa reversa virus de la leucemia murina de Moloney

Además de cada una de las muestras a analizar en cada retrotranscripción incluimos los siguientes controles:

- Como controles positivos, utilizamos dos ARNs comerciales procedentes de pulmón e hígado humano (Agilent, Santa Clara, CA, USA): para preparar cada uno de los dos controles pipetear 2 μ L de ARN (1 μ g/ μ L) + 8 μ L de H₂O_{dd}.
- Control negativo de RT: 10 μ L de H₂O_{dd}.

El protocolo detallado fue el siguiente:

- En un tubo de 0,2 mL pipetear 10 μ L de ARN (la concentración de la muestra deberá estar entre 1ng a 5 μ g de ARN).
- En cada uno de los tubos, añadir 2 μ L de Mix 1 (ver tabla 7) y centrifugar las muestras y los controles.
- Colocar las muestras en el termociclador e iniciar la desnaturalización de las cadenas de ARN y los cebadores incubando a 65° C durante 5 minutos. NOTA: Cuando falten 20 segundos para acabar el ciclo, sacar las muestras y colocarlas en hielo inmediatamente, para evitar la renaturalización.
- Esperar a que baje la temperatura de las muestras a 4° C y dejar que la temperatura del termociclador baje también a 25° C.
- Añadir 8 μ L de Mix 2 (ver tabla 7) a cada tubo y colocar en el termociclador para que continúe el proceso.
- Incubar durante 10 minutos a 25° C. Se produce entonces la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias en los ARNm.
- Incubar durante 45 minutos a 37° C, temperatura óptima para que actúe la transcriptasa inversa.
- Una vez acabado el proceso, hacer una dilución de todas las muestras añadiendo 80 μ L de H₂O_d a cada una de las muestras y a los controles (dilución 1:5).

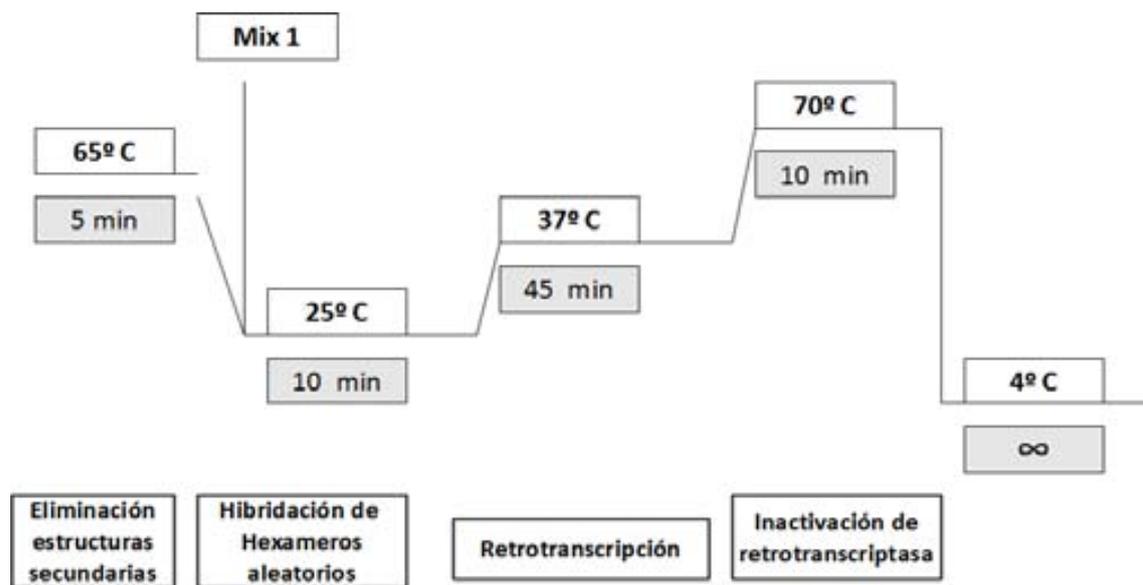


Figura 16 Esquema del proceso de Retrotranscripción.

3.5.2 DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS

Para el diseño de cebadores y sondas, se aplicaron los siguientes parámetros:

- Se utilizó las Refseq de cada gen para el diseño de los amplicones de QPCR, para análisis de expresión (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).
- Amplicones de un máximo de 80 bp para minimizar el efecto de la degradación del ARN y maximizar la eficiencia de PCR.
- Todos los cebadores se diseñaron con una temperatura de hibridación de $60 \pm 1^\circ \text{C}$, y las sondas a $70 \pm 1^\circ \text{C}$, así la expresión de todos los genes se pudo cuantificar a la vez.
- La especificidad de hibridación para los cebadores y sondas Taqman® se verificó mediante los algoritmos BLAST y BLAT.

- Se descartó la presencia de SNPs y/o mutaciones en las regiones de hibridación de los cebadores y sondas Taqman® mediante las herramientas web [ensembl](http://www.ensembl.org/index.html) (<http://www.ensembl.org/index.html>) y SNPcheck v2.1 (<https://ngl.manchester.ac.uk/SNPCheckV2.1/snpcheck.htm>).
- El diseño de cebadores y sondas Taqman® se realizó con el software *Primer Express 2.0*, (*Life Technologies*), ubicando siempre que fuera posible o bien un cebador o bien la sonda Taqman®, en una unión interexónica, para así aumentar la especificidad a la hora de cuantificar la expresión génica. En el caso de la existencia de pseudogenes, se descartó la contaminación con ADNg en el ARN haciendo la cuantificación relativa entre el ADNc de la muestra y el ARN tratado con ADNasa, diluidos de la misma manera.

Tabla 8. Cebadores y sondas utilizadas en los análisis de expresión génica

Gen	Cebador	Secuencia	Sonda Taqman®
Beta-actina	FW	5' TGA GCG CGG CTA CAG CTT 3'	6FAM 5' ACC ACC ACG GCC GAG CGG 3'
	RV	5' TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T 3'	TAMRA
BCRA1	FW	5' GGC TAT CCT CTC AGA GTG ACA TTT TA 3'	6FAM 5' CCA CTC AGC AGA GGG 3' MGB
	RV	5' GCT TTA TCA GGT TAT GTT GCA TGG T 3'	
RAP80	FW	5'ACATCAAGTCTTCAGAAACAGGAGC 3'	6FAM5'TCAGGGTGCCTTCACCA 3' MGB
	RV	5'TGCAGCCTGCCTCTTCAT 3'	
AEG1	FW	5' GGGGAAGGAGTTGGAGTGAC 3'	6FAM 5' AATATTTTCTGGCATTGGGTCTA 3' MGB
	RV	5' GTAGACTGAGAACTGGCTCAGCAG 3'	

3.5.3 RT-PCR: DESARROLLO

La amplificación y cuantificación se llevó a cabo mediante RT-PCR con sondas Taqman en un aparato termociclador con detección de fluorescencia ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (*Life Technologies, Foster City, CA*). Todo el proceso que comienza con la retrotranscripción y finaliza con la cuantificación es automático.

Tras la retrotranscripción, el ADNc se hibrida con una sonda fluorescente diseñada para unirse entre los cebadores. La sonda lleva unida en el extremo 5' un fluoróforo y en el extremo 3' un amortiguador de la fluorescencia. Cuando la sonda está intacta, la proximidad de ambos implica una supresión de la fluorescencia. Durante la reacción de PCR, y gracias a la actividad nucleasa 5'→3' de la enzima ADN polimerasa, ambas moléculas se separan, lo que da como resultado un aumento de la fluorescencia a medida que se forman nuevos productos de PCR.

Es importante el control estricto del Mg²⁺ (magnesio) que afecta la actividad enzimática y aumenta la temperatura de *melting* de la doble cadena de ADN; y de los dNTP, ya que las mezclas desbalanceadas disminuyen la fidelidad de la polimerasa.

En cada muestra se utilizaron los siguientes reactivos y soluciones:

Tabla 9. Reactivos y cantidades empleadas en la reacción de cadena polimerasa

Reactivo	Concentración final en reacción QPCR	Volumen/reacción (μL)
Taqman Universal Master QPCR Mix	1x	6,25
Cebador <i>Forward</i> (Stock 10 μM)	300 nM	0,375
Cebador <i>Reverse</i> (Stock 10 μM)	300 nM	0,375
Sonda 5' (6'FAM) - 3' MGB (Stock 15 μM)	100 nM	0,08
H ₂ O _d	-	2,92

Se prepara una mix común de cada uno de los gen/es problema/s y del gen endógeno (calcular el número de muestras + 30%, multiplicado todo por 3 réplicas).

En todas las reacciones de PCR se procesa paralelamente

Controles de Real-Time PCR:

1.a) Control negativo de PCR para cada gen. Para ello, se pipetea 10 μ l de mix de PCR + cada una de las mixes preparadas.

1.b) Muestra no retrotranscrita (RT (-)): Diluir 1:10 cada una de las muestras de ARN inicial. Esta muestra nos servirá para calcular el porcentaje de contaminación de ADN en el ARN (ver análisis de los datos).

Los controles positivos utilizados fueron los mismos que se utilizaron en la reacción de retrotranscripción.

El protocolo detallado es el siguiente:

- Pipetear 2.5. μ L de cada ADNc en los pocillos correspondientes. NOTA: es importante dispensar todas las réplicas de ADNc con la misma pipeta para así reducir la desviación estándar entre réplicas.
- A parte, en uno de los pocillos añadir 2.5 μ L de cada uno de los RT (-) preparados previamente.
- Añadir 10 μ L de la mix correspondiente en cada uno de los pocillos donde se había pipeteado muestra.
- Sellar la placa con un Clear Adhesive Film MicroAmp y centrifugar a 1440 x g durante 1 minuto para que el contenido de los pocillos vaya al fondo.
- Introducir la placa en el lugar preparado para ello en la ABIPRISM HT7900.
- Iniciar el proceso de PCR a Tiempo Real.

La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones:

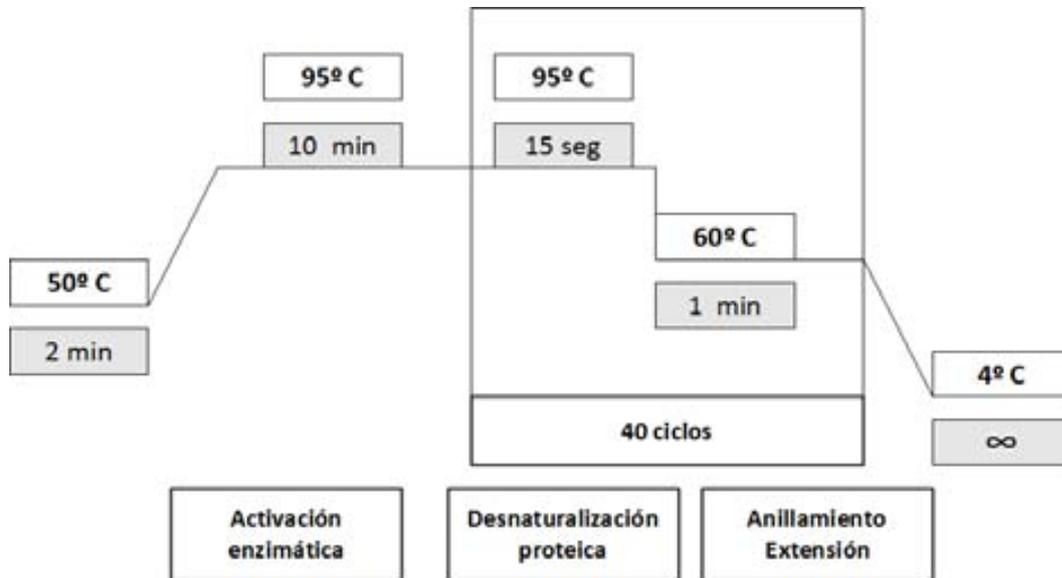


Figura 17 Esquema del proceso de Real-Time PCR.

3.5.4 CUANTIFICACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE QPCR

3.5.4.1 INTRODUCCIÓN

La expresión génica es un proceso biológico mediante el cual la célula transforma la información codificada en el ADN a proteínas a través de la producción de ARNm mediante el proceso de traducción. En condiciones fisiológicas, el hecho de que una célula transcriba (exprese) un gen y además que dicha expresión sea más o menos abundante, refleja las necesidades proteicas de dicha célula en un momento concreto. Si bien es cierto que es frecuente encontrar una correlación entre la cantidad de ARNm y los niveles de proteína para un gen determinado, hay que tener en cuenta que este axioma no siempre se cumple, ya que existen procesos de modificación post-transcripcional y post-traslacional que impactan tanto en los niveles finales de la proteína como en su función.

Existen diversos métodos para la detección y cuantificación de ARNm. El análisis por *Northern blot* es un método antiguo que aporta información acerca del tamaño e integridad de las moléculas de ARNm, pudiendo solamente obtener datos semicuantitativos. La hibridación *in situ* permite estudiar la localización de los transcritos tanto intra como inter-celularmente. Sin embargo, la principal limitación de estas técnicas es la baja sensibilidad. Por otro lado existen métodos de detección y cuantificación masiva, como las micromatrices (*microarrays*) de expresión de ADNc, que permiten obtener perfiles de expresión de miles de genes en una condición experimental determinada, pero su uso se ha visto limitado durante un tiempo debido al elevado coste.

La RT-QPCR es el método de elección para cuantificar ARNm, ya que combina una potente sensibilidad, especificidad y reproducibilidad con una buena flexibilidad para analizar un número importante de genes en un grupo extenso de muestras. Además los análisis son sencillos y los costes competitivos.

3.5.4.2 GENERALIDADES DE LA PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La RT-QPCR ha revolucionado el análisis de la expresión génica, traduciendo la intensidad de las bandas observadas en electroforesis, en números, permitiendo una cuantificación robusta. La finalidad de esta técnica de laboratorio es la de generar un número de copias de un fragmento de ADN o ADNc suficiente como para poder cuantificarlo de manera precisa. En RT-QPCR, la síntesis de nuevos fragmentos de PCR va acoplado a la liberación de fluorescencia y sigue un crecimiento exponencial (2^n). La cinética de la reacción adopta una forma sigmoidea, tal y como se representa en la Figura 18. En la descripción "anatómica" de dicha curva, se diferencian tres fases: una primera llamada **fase basal**, donde las cantidades de fluorescencia generadas durante el proceso de amplificación por PCR no alcanzan el límite de sensibilidad del sistema de detección de RT-QPCR. Una vez la fluorescencia supera el dintel de detección, se observa la segunda llamada **fase exponencial** de amplificación. Por último y una vez algún reactivo de la reacción se agota, la reacción pierde la capacidad de seguir generando copias del fragmento de ADN o ADNc diana, de manera que la reacción adopta una forma **estacionaria** o también llamada de **Plateau**. Una vez la RT-QPCR ha finalizado, de manera independiente para cada gen, se establece una recta paralela al eje de las "x" que ha de cortar todas las curvas de PCR de

dicho gen, en el tercio inferior de la fase exponencial, llamada **recta umbral**. Cuando dicha recta "corta" una curva de amplificación sigmoidea, ésta se proyecta sobre el eje de las "x". El valor que se obtiene en el eje de las "x" es conocido como **ciclo umbral** abreviado del inglés *cycle threshold value* (CTv). El valor CTv es el que se utilizará para calcular los niveles de expresión génica y está inversamente relacionado con la cantidad inicial de ADNc.

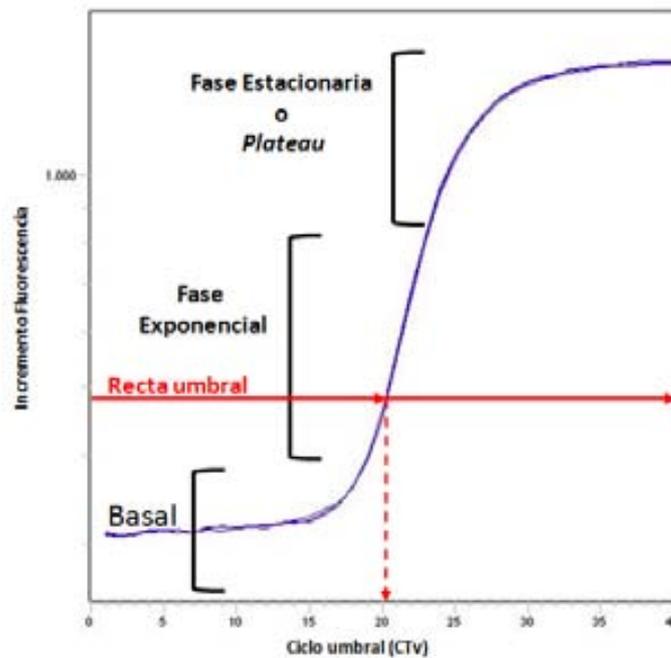


Figura 18 "Anatomía" de la curva sigmoidea de RT-QPCR.

Así la fórmula que describe la amplificación exponencial por PCR es la siguiente:

Formula 1:
$$E^n = K$$

Donde K representa el número de fragmentos de PCR generados después de n ciclos de PCR. La base de la potencia E refleja la eficiencia de la PCR, donde sus valores están comprendidos entre 1 y 2, siendo 1 una eficiencia de PCR nula y 2 una eficiencia del 100%. Cabe destacar que por consenso y desde un punto de vista teórico, se asume un 100% de eficiencia de PCR y se describe con la siguiente fórmula:

Formula 2:
$$2^n = K$$

Fórmula 3:

$$E = 10^{(-1/a)}$$

Gracias a la PCR, a partir de una sola molécula de ADN ó ADNc y después de 35 ciclos de PCR (siempre y cuando la eficiencia de PCR sea muy cercana al 100% y no se agote ningún reactivo), se podrían obtener más de 3×10^{10} copias del fragmento original. Como se puede intuir, la eficiencia de PCR juega un papel crucial en el rendimiento final de la técnica. Para calcular empíricamente la eficiencia de PCR de un conjunto de oligonucleótidos y sonda de RT-QPCR, se prepara una recta patrón de diluciones seriadas a partir de una muestra de ADN ó ARN de concentración conocida (ng/μL). A continuación se amplifican mediante RT-QPCR en triplicados, todos los puntos de la recta patrón (figura 19A). Tal y como se observa en la figura 19B, cuando se representa gráficamente los CTv de cada punto de la recta patrón en función del logaritmo de su concentración inicial de ADN o ARN, obtenemos la recta patrón. Para finalmente obtener la eficiencia de la PCR en cuestión (E), hemos de tomar el valor de la pendiente de la recta (a) y lo aplicamos en la siguiente fórmula:

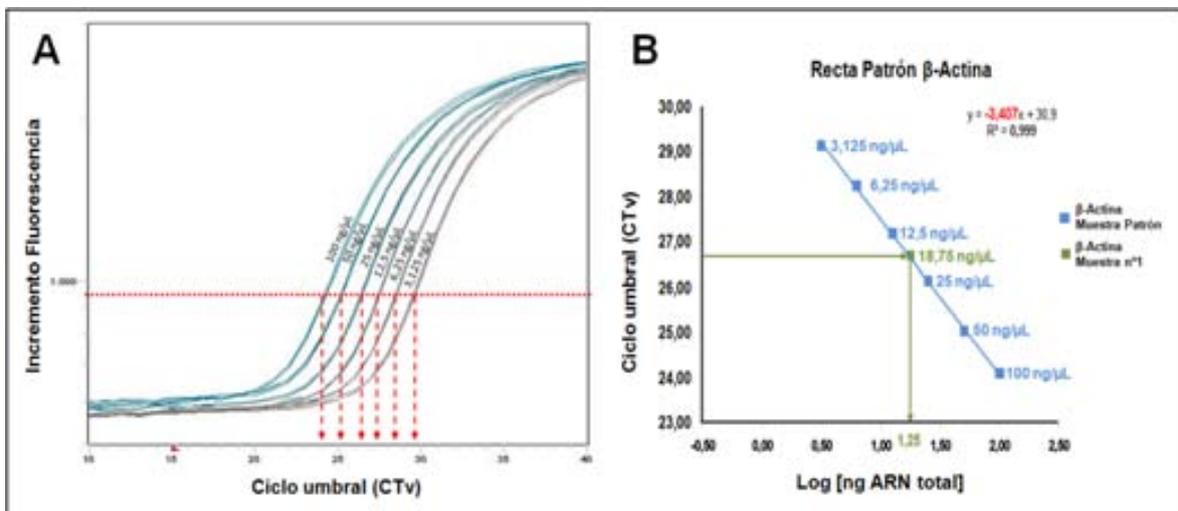


Figura 19 Recta patrón obtenida mediante RT-QPCR. (A) Diluciones seriadas 1:2 de ADNc de una muestra patrón, son amplificadas, en triplicados, por PCR cuantitativa a tiempo real. La interpolación de la recta umbral con cada curva de sigmoidea de PCR genera un CTv. (B) Representación gráfica de los CTv en función del logaritmo de la concentración inicial de ARN. En rojo se aprecia el valor de la pendiente de la recta patrón, imprescindible para calcular la eficiencia de la PCR. En verde se observa el valor de la concentración (ng/μL) del gen β-Actina, obtenida al interpolar el CTv de la muestra 1 sobre la recta patrón.

La cuantificación de ARNm mediante RT-QPCR puede realizarse tanto en términos absolutos como relativos.

3.5.4.3 CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA

El método absoluto permite cuantificar la abundancia de un transcrito en una muestra desconocida, interpolando el CT_v de la muestra sobre la recta patrón (Figura 19B). En cuantificación absoluta, para confeccionar la recta patrón se suelen utilizar plásmidos a los que se les ha insertado la secuencia diana de la PCR. De esta manera, al conocer la secuencia del plásmido, se puede calcular cual es el número de copias del plásmido por ng del mismo.

3.5.4.4 CUANTIFICACIÓN RELATIVA

Aunque existen diversos modelos matemáticos para cuantificar relativamente la expresión génica, la estrategia más común es la del método comparativo de DDCT_v (*Livak, Schmittgen, 2001*), que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre una muestra experimental y una muestra calibrador. Para obtener el valor de expresión relativa del gen A (por ej. BRCA1) en una muestra, es necesario realizar una doble normalización de los datos. La primera (intra-muestra), consiste en relativizar la expresión del gen problema (BRCA1), respecto a uno o varios genes endógenos (en nuestro caso: β -Actina). Una vez tenemos la proporción entre BRCA1 y β -actina para la muestra a analizar, necesitamos esa misma proporción, pero obtenida en una muestra que utilizaremos como referencia en todos los experimentos independientes. Así todas las muestras que se analicen se compararan frente a la misma muestra, permitiendo comparar los resultados entre si.

Además la cuantificación relativa permite cuantificar los niveles de ARNm independientemente de la concentración de ARN de las muestras, siempre que la eficiencia de PCR de los genes endógenos y los genes problema sea aproximadamente la misma (ver apartado: validación experimental de la cuantificación relativa mediante RT-QPCR). NOTA: Definimos gen endógeno (también llamado de control interno ó de referencia) a aquel cuyo nivel de expresión es constante en todas las muestras analizadas y bajo cualquier condición experimental.

3.5.4.5 VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA

Como se ha mencionado previamente, un requerimiento indispensable para que la cuantificación relativa sea válida y robusta, es que la eficiencia de PCR del/los gen/es endógeno/s y los genes problema sea muy similar y en el caso de que así sea, conocer con precisión el rango de concentraciones de ARNm (ADNc) en el que se acota dicha linealidad. Para ello se prepara una recta patrón con al menos ocho puntos de diluciones seriadas 1:2 (vol/vol) de concentraciones (ng/ μ L) conocidas. Esta recta patrón se amplifica mediante RT-QPCR para el gen endógeno y para el/los gen/es problema/s (en triplicados para cada punto de concentración). En la figura 20A se muestran las rectas patrón para tres genes: β -Actina, BRCA1 y PANK2. En un primer caso, β -Actina y BRCA1 tienen una eficiencia de PCR muy similar (como muestran las pendientes de la recta) y por tanto parecerían ser válidos para cuantificación relativa, mientras que PANK2 tiene una eficiencia muy diferente de β -Actina y por lo tanto, ese juego de oligonucleótidos y sonda parecería claro a simple vista que no serviría para cuantificación relativa. Para objetivizar cuando exactamente dos juegos de oligonucleótidos y sondas como los de β -Actina y BRCA1 son realmente compatibles para cuantificación relativa, es necesario representar gráficamente el DCT_v entre el gen problema y el endógeno en función del logaritmo de la concentración de ADNc para cada punto de la recta patrón, como se aprecia en la figura 20B. Si la pendiente de la recta está entre +0,15 y -0,15, entonces se confirma su compatibilidad.

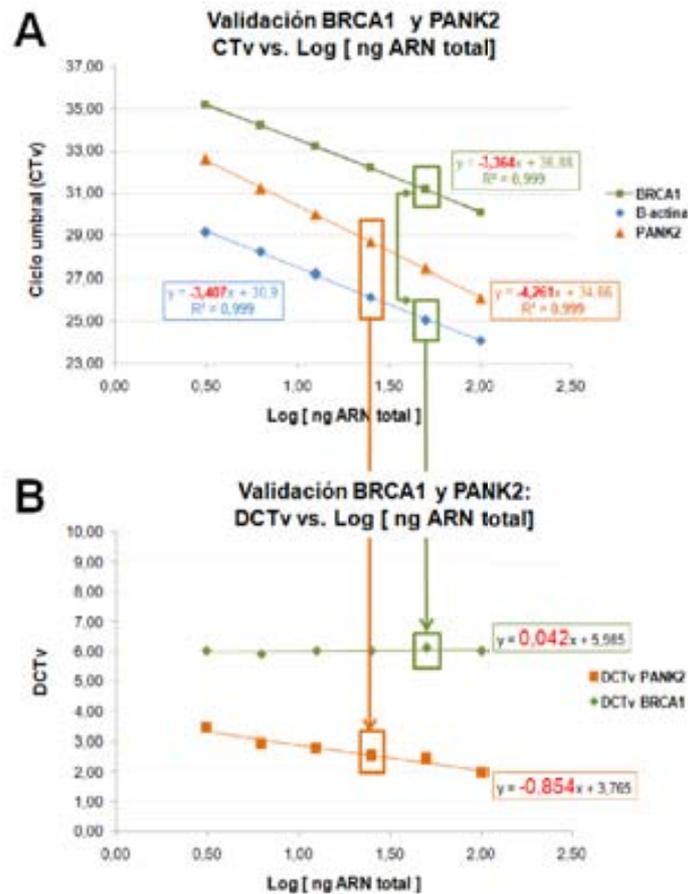


Figura 20. Validación técnica de amplicones de RT-QPCR. (A) Gráfico de rectas patrones para BRCA1 (verde), β -Actina (azul) y PANK2 (naranja). (B) Gráfico de DCTv en función del logaritmo de la concentración de ARN total. En rojo destacan las pendientes de cada una de las rectas patrones. Cada punto representa el promedio de tres réplicas, donde la desviación estándar máxima aceptada fue 0,25

3.5.4.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE RT-QPCR

Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de BRCA1, RAP80 y AEG1 en las muestras de tejido tumoral disponibles de los pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante y posterior cistectomía.

En este estudio, se realizó la cuantificación relativa de la expresión génica de acuerdo al **método comparativo Ct** usando beta-actina como control endógeno y controles de ARN comercial (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*) como calibradores.

Este método, como se mencionó anteriormente, consiste en establecer un valor umbral o *threshold* (C_t) (ciclo umbral, es el punto en que la fluorescencia es registrada como estadísticamente significativa por encima del background., y que se encuentra en la zona de amplificación exponencial) y adoptar para cada una de las muestras analizadas, el ciclo de PCR que corta con este C_t , como valor de expresión.

I- El C_t del gen problema en cada una de las muestras va a ser relativizado con respecto al C_t del gen endógeno, para lo cual se resta la media del gen problema a la media del gen endógeno, en cada uno de los casos, y en los controles, según la siguiente fórmula:

$$\Delta C_t = C_t \text{ gen problema} - C_t \text{ gen endógeno}$$

II- Para que todas las muestras fueran comparables entre ellas, los valores de expresión van a ser normalizados estando todos relacionados con una misma muestra de referencia ó calibrador. Para ello, se calculó la media de los dC_t de los controles (mdC_t), y posteriormente se utiliza la siguiente fórmula:

$$\Delta \Delta C_t = C_t \text{ gen problema} - mdC_t$$

III-Finalmente el valor de expresión, se calcula solo en las muestras como:

$$2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Para cada muestra se realizan tres experimentos independientes para cada gen. En todos los experimentos, solo réplicas con una desviación estándar del valor C_t de < 0.25 fueron aceptadas.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se almacenaron en la hoja de calculo “Excel” (*Microsoft Corporation, EEUU; Versión Windows XP*) y se analizaron con el software estadístico del programa SPSS para Windows versión 15.0 (*Statistical Package for the Social Sciences, SPSS, Inc. Chicago, Illinois, USA*)

3.6.1 Estadística descriptiva

Se realizó un análisis descriptivo de las variables analizadas mediante los estadísticos habituales para variables cuantitativas (media, mediana, máximo y mínimo) y cualitativas (frecuencias absolutas y relativas).

3.6.2 Estadística analítica:

Previo a los análisis de supervivencia se realizaron cálculos para obtener variables temporales necesarias para un análisis posterior:

- **Supervivencia global:** intervalo de tiempo transcurrido entre el diagnostico y la fecha de última revisión ó el exitus ocurrido por cualquier causa.
- **Supervivencia cáncer específica:** intervalo de tiempo entre el diagnostico y la muerte del paciente, exclusivamente, por causa de la progresión tumoral.
- **Supervivencia libre de enfermedad:** intervalo de tiempo transcurrido entre la fecha de tratamiento (cirugía) y la fecha de la recurrencia.

El test exacto de Fisher y la prueba de la Chi cuadrado se usaron para evaluar la asociación entre variables cualitativas. Se utilizaron tablas de contingencia basadas en el test de Chi-cuadrado para analizar la relación de cada variable molecular con la respuesta al tratamiento basado en cisplatino.

Para evaluar las diferencias entre las variables con una distribución continua, se utilizó la t de Student o el test de Mann-Whitney.

La supervivencia global y libre de enfermedad se calculó según el método de Kaplan-Meier y el test de long rank para evaluar sus diferencias entre los distintos grupos con sus intervalos de confianza al 95%.

La influencia de las diferentes variables en la supervivencia se analizó mediante el método de *Log Rank*. Se consideró significación estadística cuando existía una $p < 0,05$.

Las variables que resultaron estadísticamente significativas en el análisis univariante se incluyeron en el análisis multivariante utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox. Mediante este análisis se establece una jerarquía entre los distintos factores pronosticos. La estabilidad del modelo se asegura al introducir las variables con el *sistema de Wald*.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

Los resultados de la tesis se dividen en dos partes: una primera parte que comprende el análisis de las variables clínico-patológicas y moleculares de los 126 pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante y posterior cistectomía y su relación con la supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y respuesta al tratamiento; y una segunda parte en el que se analiza el subgrupo de pacientes con enfermedad ganglionar negativa, evaluando las variables clínico-patológicas y moleculares, como factores pronóstico y predictivos de respuesta.

4.1- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 10.

Ciento diecinueve pacientes (94%) eran hombres. La edad mediana fue de 64 años (rango 35-80), y los mayores de 75 años representaban solo el 7% de los pacientes (Figura 21).

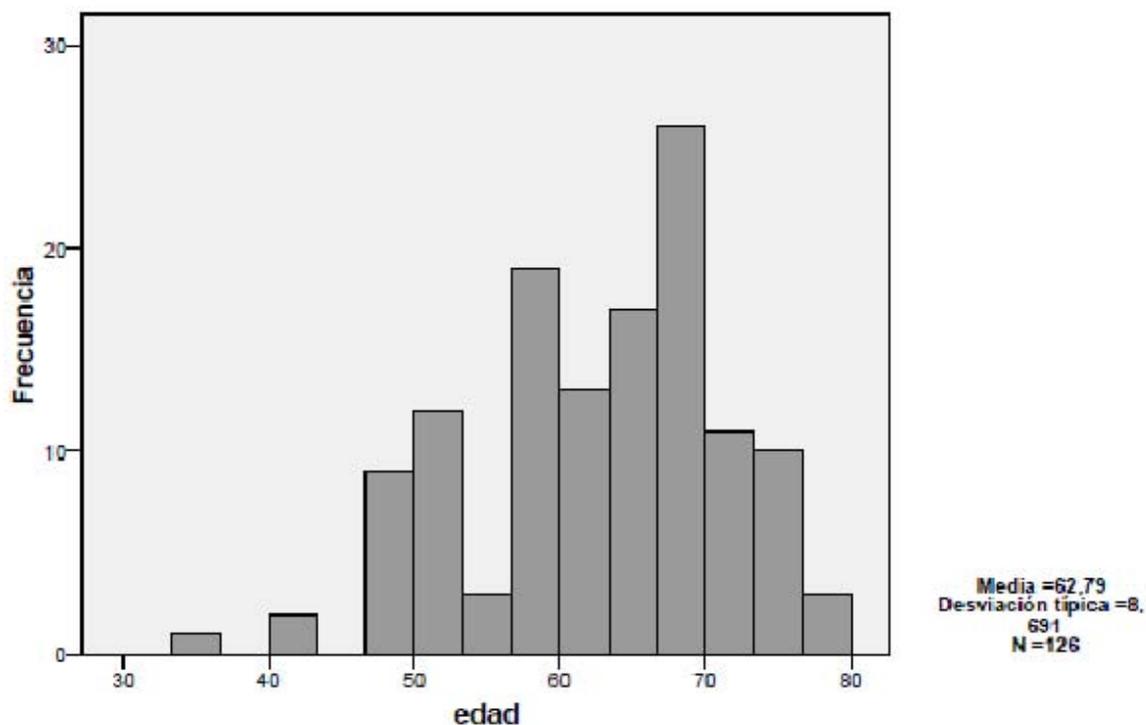


Figura 21 Distribución por edad

Cuarenta y cuatro pacientes (35%) presentaban hidronefrosis en el momento del diagnóstico.

La histología más frecuente fue la de carcinoma de células transicionales puro, que se presentó en 103 pacientes (82%). El 18% restante presentaba histología mixta: tumores con diferenciación escamosa en 17 pacientes (13%) y con diferenciación de adenocarcinoma en 6 (5%).

La mayoría de los pacientes presentó enfermedad de alto grado (96%), y la invasión linfovascular estaba presente solo en 9 pacientes (7%) en la RTU en el diagnóstico inicial. Cuatro pacientes (3%) presentaban estadio T2N0, 67 (53%) T3N0, 33 (26%) estadio T4N0 y 22 pacientes (18%) enfermedad ganglionar pélvica (Figura 22).

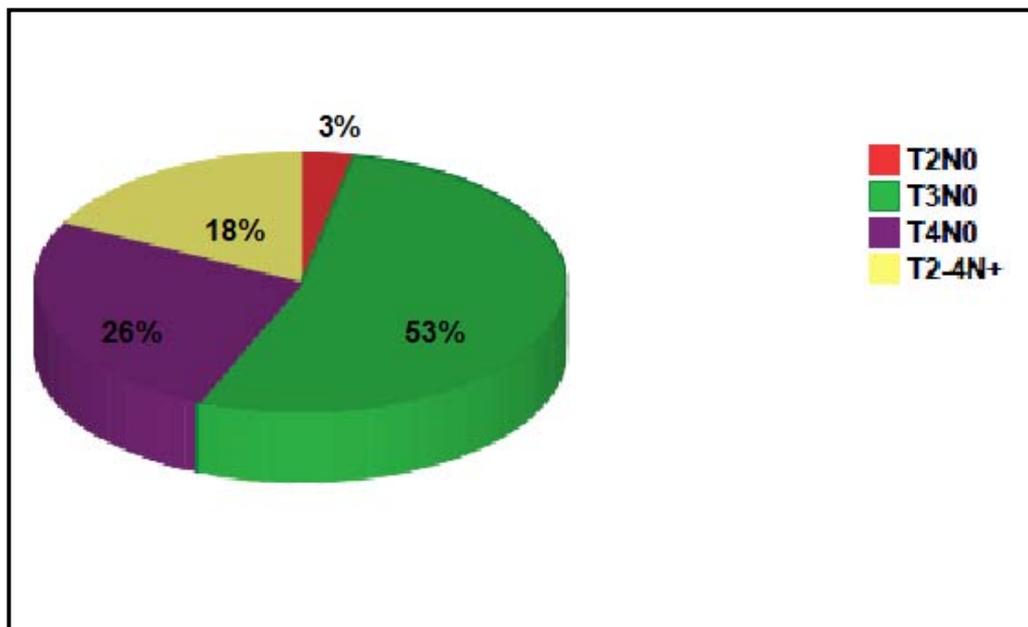


Figura 22 TNM clínico

4.1.2 CARACTERÍSTICAS EN RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO

Los pacientes recibieron una mediana de 3 ciclos de quimioterapia neoadyuvante (rango de 2-6). El esquema CMV se administró en 66 pacientes (52%), cisplatino y gemcitabina en 54 (43%) y gemcitabina y carboplatino en 6 (5%).

Tras la quimioterapia neoadyuvante, se practicó la cistectomía en 118 pacientes (94%). En 106 pacientes (85%) la resección fue completa. Ocho pacientes no fueron elegibles para cirugía debido a progresión tumoral, deterioro clínico ó negativa por parte del paciente.

La linfadenectomía fue realizada en 109 pacientes, con una mediana de 5 ganglios resecados (rango 0-29). La linfadenectomía de más de 7 ganglios se realizó en 34 pacientes (31%).

4.1.3 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Al analizar el estadio patológico se objetivó una respuesta patológica significativa (pT0-1) en 48 pacientes (41%), incluyendo 28 pacientes (24%) con respuesta patológica completa (RCp). 26 pacientes (22%) presentaban infiltración de la capa muscular (pT2N0), 24 pacientes (20%) enfermedad localmente avanzada (pT3-4) y afectación ganglionar en 20 pacientes (17%) (Figura 23).

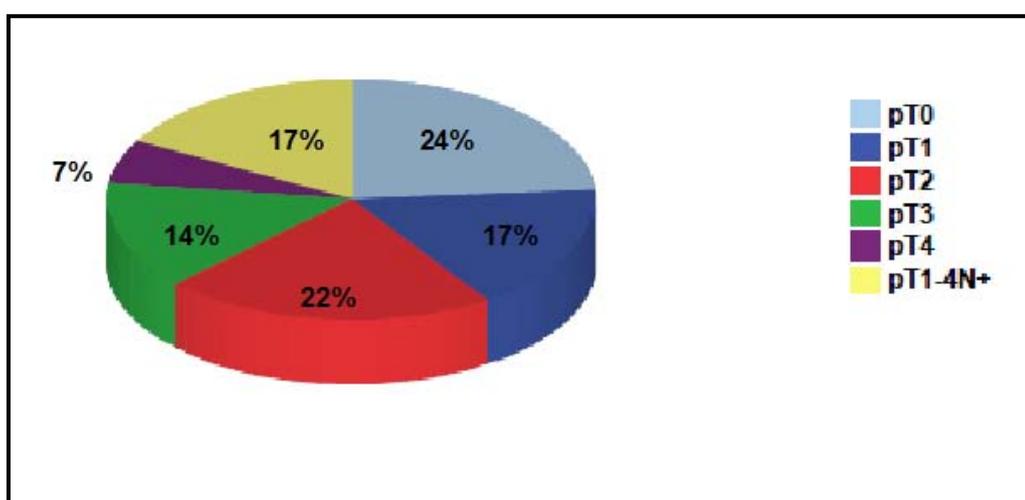


Figura 23 TNM patológico

Tabla 10. Características de los pacientes

Variables	N=126	%
Edad (años)		
Mediana (rango)	64 (35-80)	
Sexo		
▪ Varón	119	94
▪ Mujer	7	6
Hidronefrosis		
▪ Presente	44	35
▪ Ausente	82	65
Histología		
▪ Urotelial puro	103	82
▪ Mixto	23	18
Invasión linfovascular		
▪ Presente	9	7
▪ Ausente	117	93
TNM clínico		
▪ T2N0	4	3
▪ T3N0	67	53
▪ T4N0	33	26
▪ T2-4N+	22	18
Quimioterapia neoadyuvante		
▪ CMV	66	52
▪ Gem-cisplatino	54	43
▪ Gem-carboplatino	6	5
Cirugía		
▪ Resección completa	106	85
▪ Resección incompleta	12	9
▪ No quirúrgico	8	6
Linfadenectomía		
▪ 0-7 ganglios	75	69
▪ > 7 ganglios	34	31
TNM patológico		
▪ pT0	28	24
▪ pT1	20	17
▪ pT2	26	22
▪ pT3-4	24	20
▪ pT1-4N1-2	20	17
Tamaño tumoral		
▪ Notumor/microscópico	43	43
▪ < 3 cm	38	38
▪ > 3 cm	20	20

4.1.4 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES: ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA

Entre los 126 pacientes, se encontraron disponibles bloques de parafina de biopsias tumorales para el análisis de los niveles de expresión génica en: 82 pacientes para niveles de expresión de ARNm de BRCA1, 51 pacientes para niveles de expresión de ARNm de RAP80 y 59 para niveles de expresión de ARNm de AEG1. En el resto de los pacientes no se logró recuperar la muestra de RTU del diagnóstico inicial ó el material era insuficiente para el análisis.

El ARNm de BRCA1 fue detectado en todas las muestras tumorales, existiendo variación considerable en los niveles de expresión, con valores relativos del gen de control interno B-actina de 1.18 a 95.83, y con una mediana de 17.23.

El ARNm de RAP80 fue detectado en todas las muestras tumorales, existiendo variación considerable en los niveles de expresión, con valores relativos del gen de control interno B-actina de 0.68 a 7.22 y con una mediana de 2.13.

El ARNm de AEG1 fue detectado en todas las muestras tumorales, existiendo variación considerable en los niveles de expresión, con valores relativos del gen de control interno B-actina de 0.08 a 5.84 y con una mediana de 0.72.

	BRCA1		RAP80		AEG1	
N	82		51		59	
Mediana	17.23		2.13		0.72	
Rango (min-máx.)	1.18-95.83		0.68-7.22		0.08-5.84	
Terciles						
T1	< 12.0	(N=28)	< 1.51	(N=17)	< 0.54	(N=20)
T2	12.06 – 23.79	(N=27)	1.51 – 2.78	(N=17)	0.54 – 0.94	(N=19)
T3	> 23.79	(N=27)	> 2.78	(N=17)	> 0.94	(N=20)

4.2 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA PATOLÓGICA

4.2.1 CORRELACIÓN DE LA RESPUESTA CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

La respuesta patológica tras la administración de quimioterapia neoadyuvante se evaluó en los 118 pacientes tratados posteriormente mediante cistectomía.

La correlación entre variables clínico-patológicas y la respuesta patológica completa se refleja en la Tabla 11.

Tabla 11. Correlación de respuesta patológica completa con variables clínico patológicas

Variables clínicas y patológicas	TNM patológico		p
	p T0N0	p T1-4/N+	
Edad			
▪ < 64 años	15 (25%)	46 (75%)	0.82
▪ > 64 años	13 (23%)	44 (77%)	
Sexo			
▪ Varón	27 (24%)	85 (76%)	0.67
▪ Mujer	1 (17%)	5 (83%)	
Hidronefrosis			
▪ Presente	10 (25%)	30 (75%)	0.81
▪ Ausente	18 (23%)	60 (77%)	
TNM clínico			
▪ T2-4N0	26 (27%)	71 (73%)	0.09
▪ T2-4N+	2 (10%)	19 (90%)	
Histología			
▪ Urot. puro	23 (24%)	74 (76%)	0.99
▪ Mixto	5 (24%)	16 (76%)	
Invasión linfovascular			
▪ Presente	4 (50%)	4 (50%)	0.07
▪ Ausente	24 (22%)	86 (78%)	
Quimioterapia			
▪ CMV/Gem-cispl	27 (24%)	87 (76%)	0.95
▪ Gem-carbop.	1 (25%)	3 (75%)	

Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las características clínicas y patológicas y la respuesta patológica, cabe destacar que la respuesta patológica fue completa en el 27% (26 de 97) de los pacientes sin invasión ganglionar en la estadificación inicial, mientras que solo en un 10% (2 de 21) en aquellos con ganglios invadidos inicialmente ($p=0.09$).

La correlación entre la estadificación clínica y la patológica se observa con más detalle en la tabla 12.

Tabla 12. Correlación entre TNM clínico y TNM patológico

		TNM patológico					Total
		pT0	pT1	pT2	pT3-4	N+	
TNM clínico	T2	2 (50%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	4
	T3	17 (27%)	15 (24%)	13 (21%)	9 (15%)	8 (13%)	62
	T4	7 (23%)	4 (13%)	9 (28%)	7 (23%)	4 (13%)	31
	N+	2 (9,5%)	0 (0%)	4 (19%)	7 (33,5%)	8 (38%)	21
Total		28	20	26	24	20	118

4.2.2 CORRELACIÓN DE LA RESPUESTA CON LAS VARIABLES MOLECULARES

La respuesta patológica completa fue analizada según los niveles de expresión de ARNm de los 3 genes, como se especifica en la Tabla 13.

En los pacientes con niveles bajos (T1) e intermedios (T2) de expresión de BRCA1, la tasa de respuesta patológica completa fue similar, por lo que se decidió combinar los terciles para su posterior análisis.

Se destaca un aumento importante en el porcentaje de respuestas completas patológicas según los niveles de BRCA1.

La respuesta patológica fue completa en el 31% (16 de 52) de los pacientes con niveles bajos e intermedios, frente a un 11% (3 de 26) en aquellos con niveles altos de BRCA1 ($p=0.06$).

Tabla 13. Respuesta patológica según niveles de expresión génica

GENES	TNM patológico		p
	p T0N0	p T1-4/N+	
BRCA1			
T1 (< 12.06)	9 (35%)	17 (65%)	0.14
T2 (12.06- 23.79)	7 (27%)	19 (73%)	
T3 (>23.79)	3 (11%)	23 (89%)	
RAP80			
T1 (< 1.51)	4 (25%)	12 (75%)	1.0
T2 (1.51- 2.78)	4 (25%)	12 (75%)	
T3 (> 2.78)	4 (25%)	12 (75%)	
AEG1			
T1 (< 0.54)	3 (16%)	16 (84%)	0.83
T2 (0.54- 0.94)	4 (23%)	13 (77%)	
T3 (> 0.94)	4 (21%)	15 (79%)	

No existía correlación al analizar la respuesta patológica completa según los niveles de expresión de RAP80 y AEG1.

14. Respuesta patológica completa según niveles de BRCA1.

BRCA1			
Respuesta patológica	T1-2 (< 23.79)	T3 (> 23.79)	p
pT0N0	16 (31%)	3 (11%)	0.06
pT1-4N0/+	36 (69%)	23 (89%)	
Total	52	26	

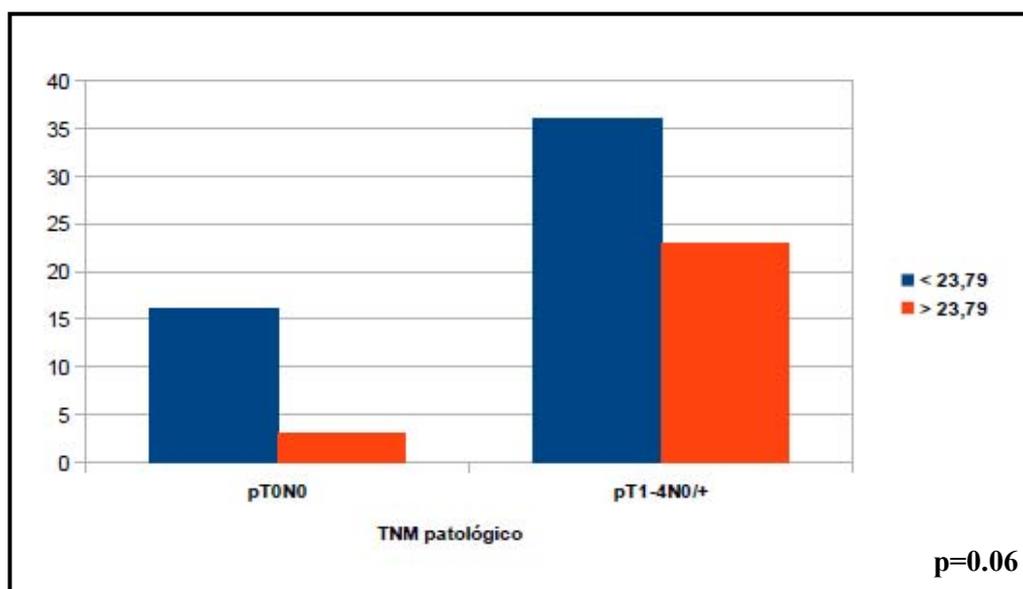


Figura 24 Respuesta patológica según niveles de BRCA1

4.3 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

La mediana de supervivencia global (SG) de la serie de 126 pacientes fue de 52 meses (95% IC, 33.9-70) con una supervivencia a 5 y 10 años del 45% y 38%, respectivamente (Figura 25). La probabilidad de supervivencia específica por cáncer a 5 años fue del 60%.

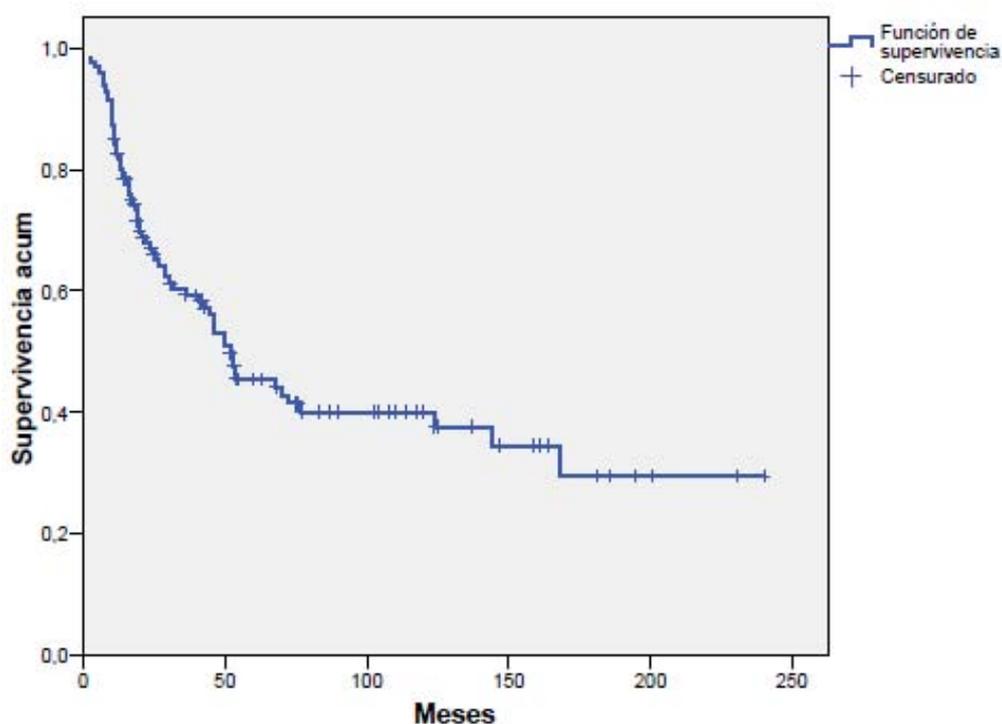


Figura 25 Supervivencia global

La mediana de seguimiento fue de 61.5 meses (11-240). En el último control, 48 pacientes (38%) se encontraban vivos libres de enfermedad, y 70 (56%) habían fallecido: 45 pacientes (64%) por progresión tumoral, 11 (16%) por otras neoplasias y 10 pacientes (14%) por otras causas.

Tabla 15. Causas de muerte

Causa de muerte	N (%)
Progresión tumoral	45 (64)
Segundas neoplasias	11 (16)
▪ Cáncer de pulmón célula pequeña	4
▪ Cáncer de próstata	3
▪ Cáncer de esófago	1
▪ Cáncer de colon	2
▪ Leucemia	1
Complicaciones del tratamiento	2 (3)
▪ Toxicidad a la quimioterapia	1
▪ Postquirúrgico	1
Otras causas	8 (11)
▪ Sepsis de origen urinario	4
▪ Insuficiencia cardíaca	1
▪ Ictus isquémico	1
▪ Colecistitis aguda	1
▪ Perforación de colon	1

4.3.1 RELACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL CON VARIABLES CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS

La supervivencia mediana fue de 77 meses (95% IC, 0-160.8) para el grupo de menos de 64 años, superior a 46 meses (95% IC, 29.3- 62.6) para los mayores de 64 (p= 0.05).

No hubo diferencias significativas en la supervivencia teniendo en cuenta el sexo, el antecedente de carcinoma superficial, el grado y el tipo histológico.

Los pacientes con hidronefrosis tuvieron una mediana de supervivencia de 45 meses (95% IC, 20.3-69.2), menor que los pacientes que no la presentaban en los cuales fue de 68 meses (95% IC, 41.4-94.5), sin alcanzar la significancia estadística (p= 0.08).

Al analizar según el TNM clínico, en aquellos pacientes que presentaban estadio T2N0 la supervivencia mediana fue de 52 meses (95% IC, 0-103.9), con T3N0 de 54 meses (95% IC, 26.1-81.8), T4N0 de 144 meses (95% IC, 3.6-284.3) y en aquellos con enfermedad ganglionar de 22 meses (95% IC, 11.2-32.7) ($p= 0.03$) (Figura 26).

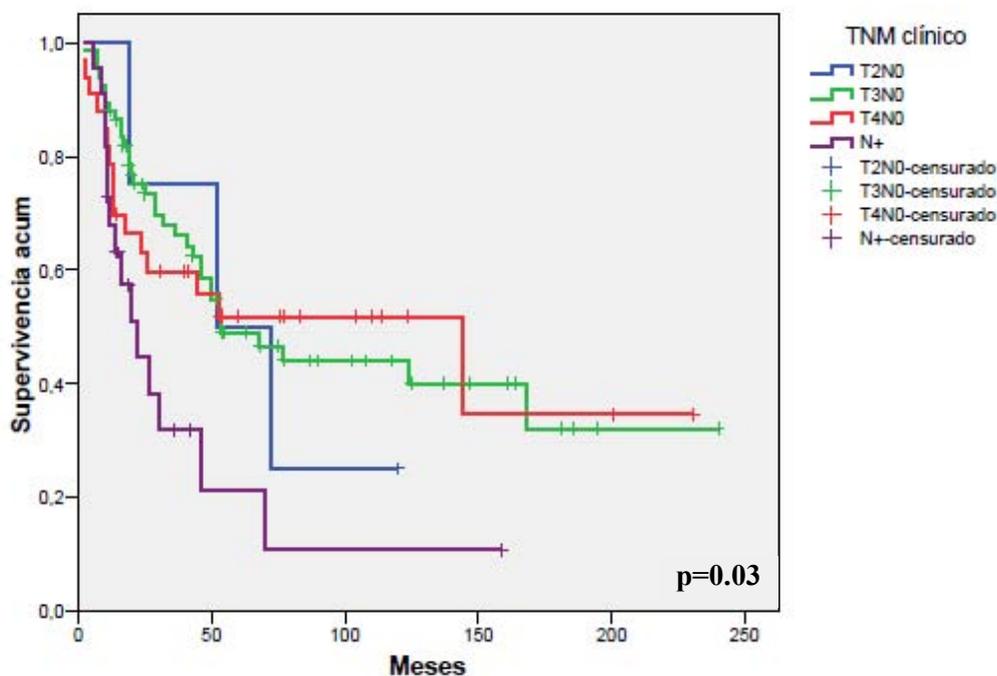


Figura 26 Supervivencia global según estadificación clínica

En los pacientes que no presentaban invasión linfovascular, la mediana de supervivencia fue de 53 meses (95% IC, 35.5-70.4) comparada con 32 meses (95% IC, 1.9-62), en los que si la presentaban ($p= 0.03$) (Figura 27).

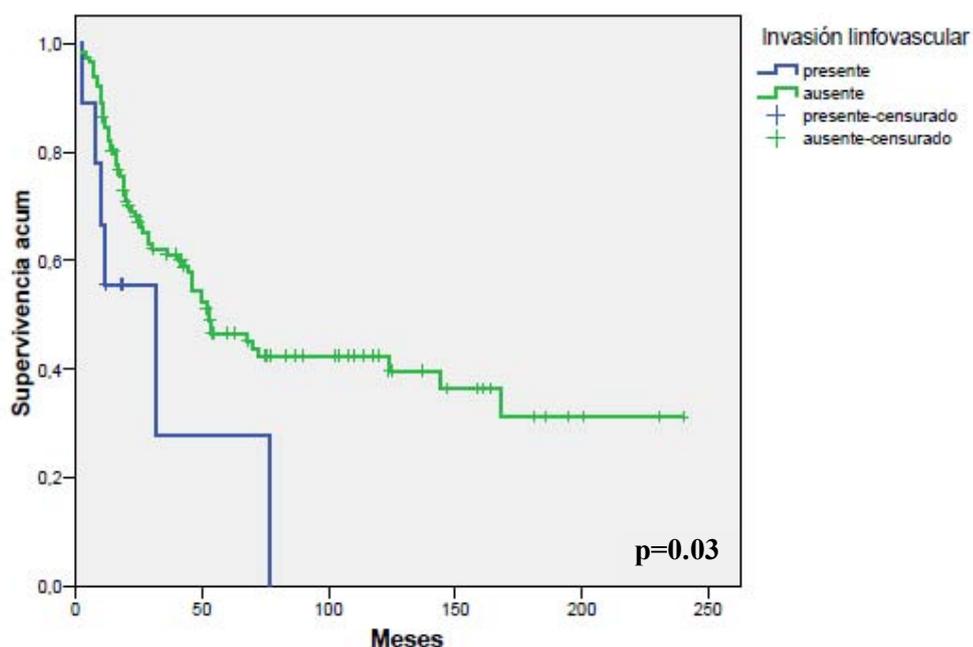


Figura 27 Supervivencia global según invasión linfovascular

Por el contrario, el esquema de quimioterapia neoadyuvante no tuvo influencia en el pronóstico. Según el esquema administrado, la supervivencia mediana fue de 53 meses (95% IC, 28.6-77.3) para CMV, de 70 meses (95% IC, 28.1-111.8) en los tratados con cisplatino y gemcitabina, y 18 meses (95% IC, 2.4- 33.6) con gemcitabina y carboplatino, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.07$) (Figura 28).

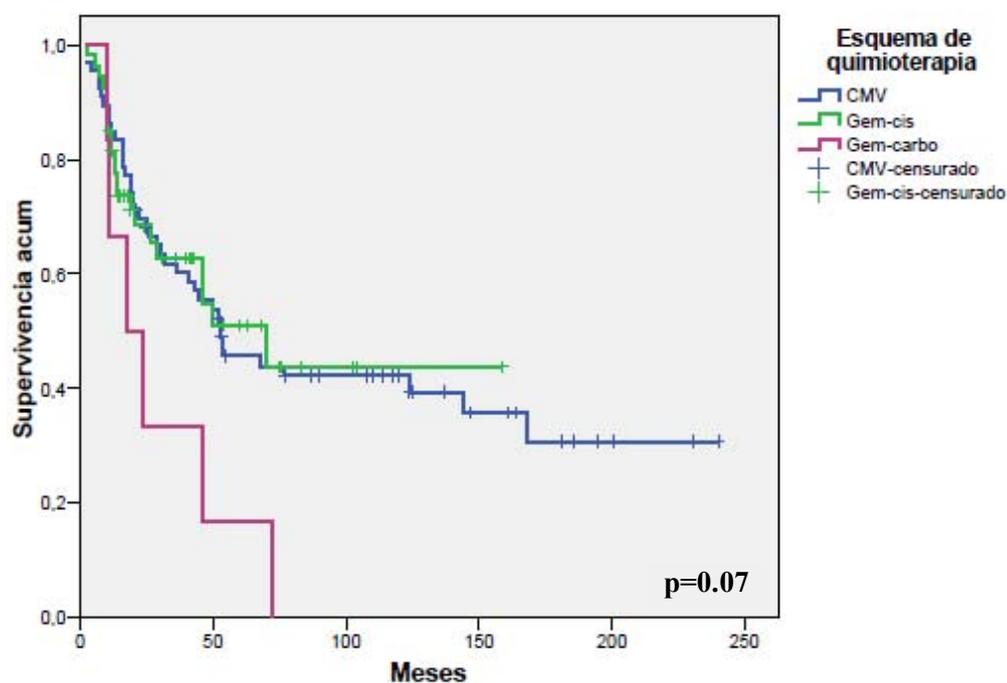


Figura 28 Supervivencia global según esquema de quimioterapia

Respecto al valor pronóstico de la cirugía, la supervivencia fue superior en aquellos pacientes en los que la resección quirúrgica fue completa, en forma estadísticamente significativa ($p < 0.001$), con una mediana de 70 meses (95% IC, 11.6-128.3) comparada con 13 meses (95% IC, 6.2-19.7) en aquellos con resección incompleta y 9 meses (95% IC, 0-18.7) en los pacientes no intervenidos quirúrgicamente (Figura 29).

La supervivencia fue superior en aquellos pacientes en los que se realizó una linfadenectomía más amplia (resección de más de 7 ganglios linfáticos), 168 versus 50 meses en aquellos con resección menor ó igual a 7 ganglios ($p= 0.06$) (Figura 30).

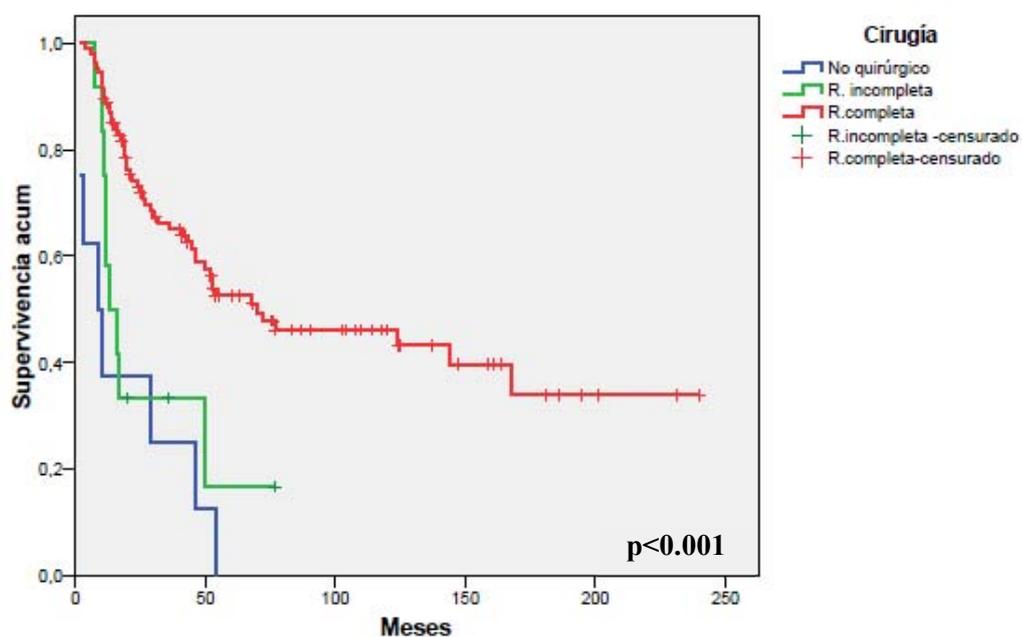


Figura 29 Supervivencia global según tipo de intervención quirúrgica.

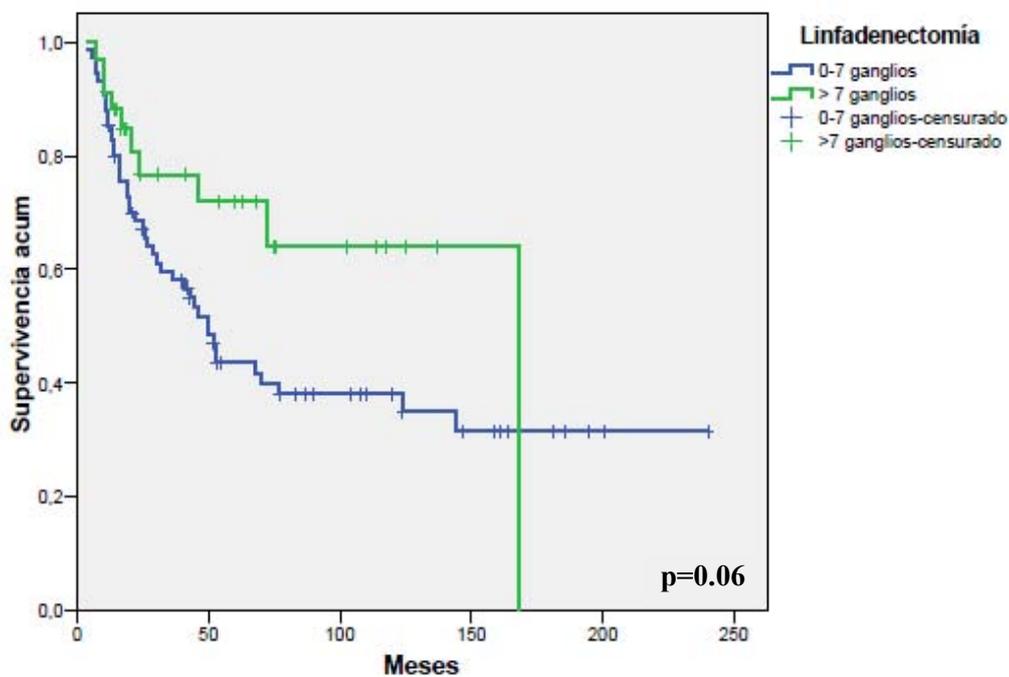


Figura 30 Supervivencia global según extensión de la linfadenectomía

Al analizar la supervivencia según el TNM patológico, en los pacientes con respuesta patológica significativa (p T0-1) la supervivencia a 5 años fue del 75%, mientras que en aquellos pacientes que no respondieron a la quimioterapia neoadyuvante (\geq p T3N0), la supervivencia a 5 años fue únicamente del 12% (Tabla 16, Figura 31).

Tabla 16. Supervivencia global según TNM patológico

TNM patológico	N	SG (meses)	SG 5 años (%)	95% IC
p T0N0	28	-	78	-
p T1N0	20	-	62	-
p T2N0	26	144	50	0 - 297.3
p T3-4N0	24	19	10	16.8 - 21.1
p T2-4N1-2	20	13	18	8.6 - 17.3

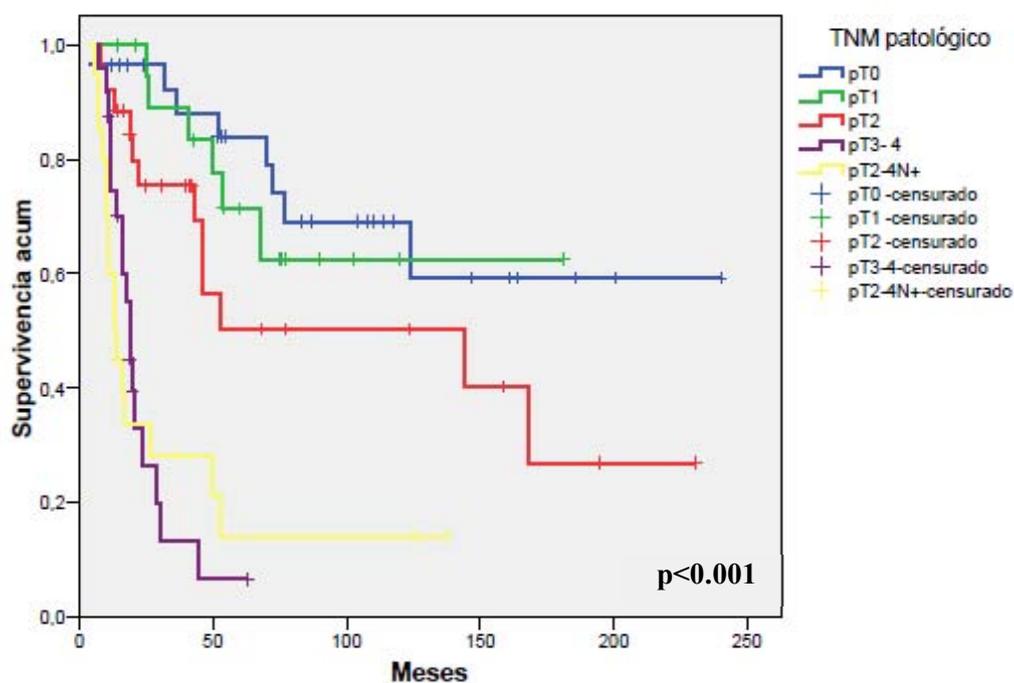


Figura 31 Supervivencia global según TNM patológico

Con respecto al tamaño tumoral en la cistectomía, los pacientes sin evidencia de tumor o microscópico presentaron una supervivencia mediana de 144 meses, comparados con aquellos menores de 3 cm que era de 29 meses (95% IC, 1-57) y de 20 meses (95% IC, 0-52.2) en aquellos con tumores de más de 3 cm, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (Figura 32).

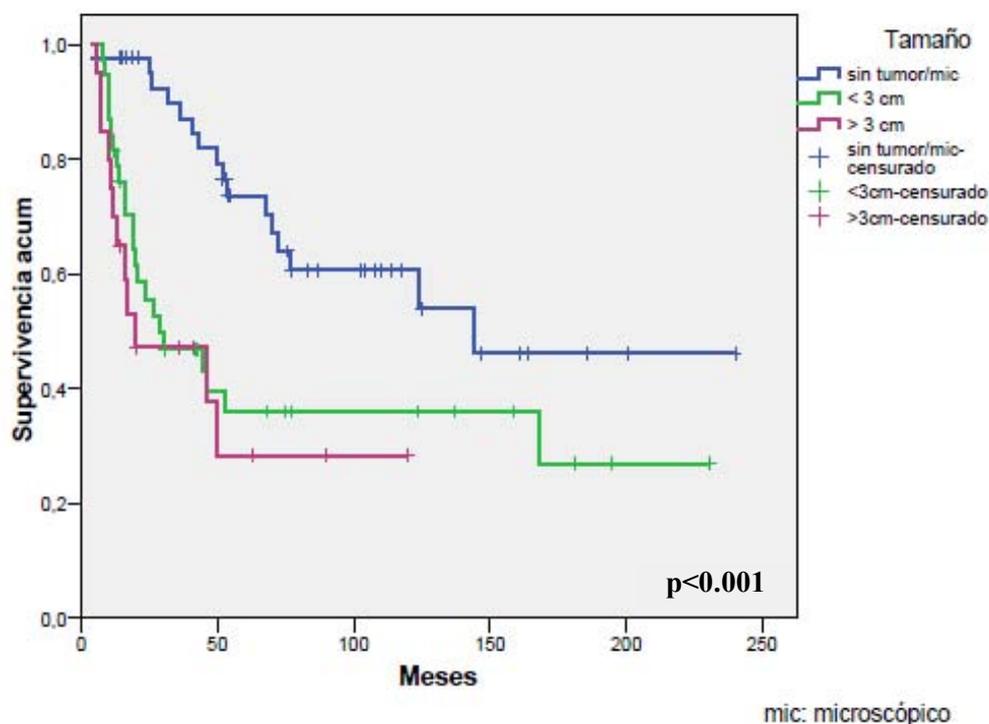


Figura 32 Supervivencia global según tamaño tumoral en la cistectomía

4.3.2 RELACIÓN DE SUPERVIVENCIA GLOBAL CON VARIABLES MOLECULARES

4.3.2.1 RELACIÓN CON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE BRCA1

La supervivencia mediana global en los pacientes con niveles bajos fue de 53 meses (95% IC, 0-127.3), con niveles intermedios de 168 meses (0- 412.8) y de 46 meses (95% IC, 35-56.9) en aquellos pacientes con niveles altos (p= 0.35) (Figura 33).

Debido a que la supervivencia a 5 años en los terciles más bajos e intermedios era similar, se combinaron para su análisis. Los pacientes con niveles bajos e intermedios presentaban una supervivencia mediana de 124 meses (95% IC 31.2- 216.7), superior a los pacientes con niveles altos que era de 46 meses (95% IC, 35- 46.9) (p= 0.16) (Figura 34).

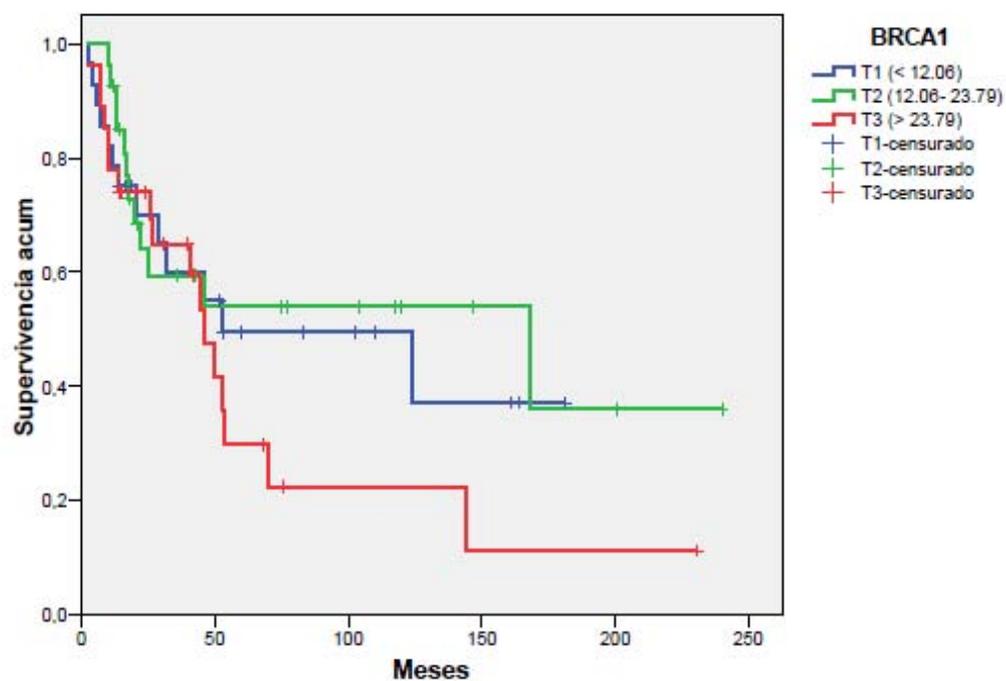


Figura 33 Supervivencia global según terciles de BRCA1

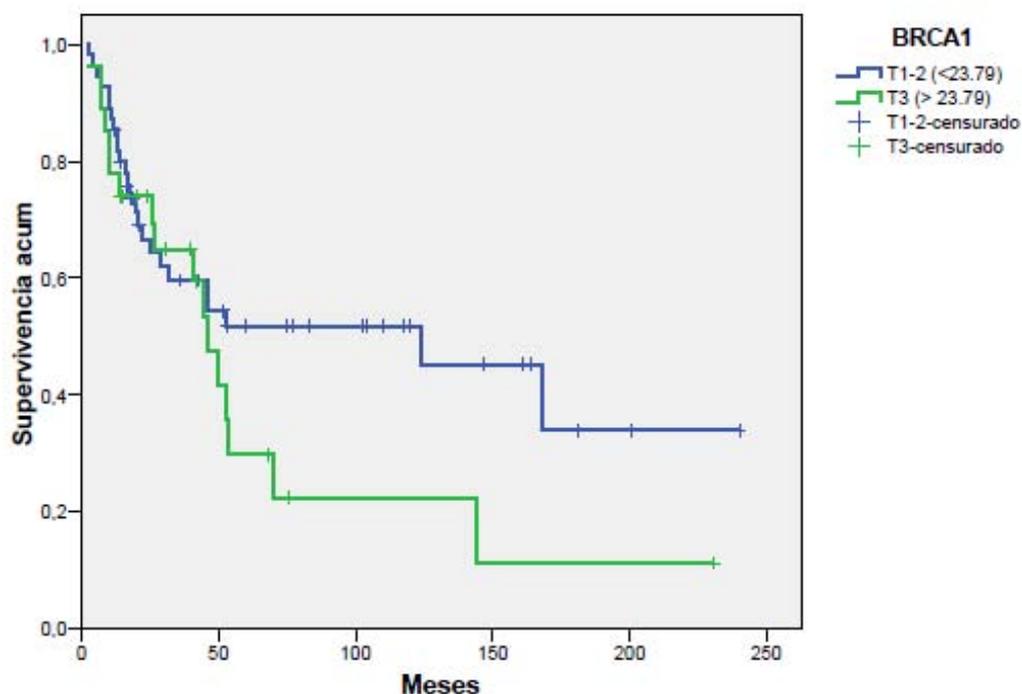


Figura 34 Supervivencia global: BRCA1 T1-2 versus T3

4.3.2.2 RELACIÓN CON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAP80 Y AEG1

La supervivencia mediana global en los pacientes con niveles bajos de RAP80 fue de 20 meses (95% IC, 14.9 -25), mientras que no se alcanzó en aquellos con niveles intermedios y altos ($p= 0.18$) (Figura 35).

Los pacientes con niveles bajos de expresión de AEG1 presentaban una supervivencia mediana de 53 meses (95% IC 0-113), con niveles intermedios de 46 meses (44.2-47.7) y con niveles altos era de 50 meses (95% IC, 0- 103) ($p= 0.47$) (Figura 36).

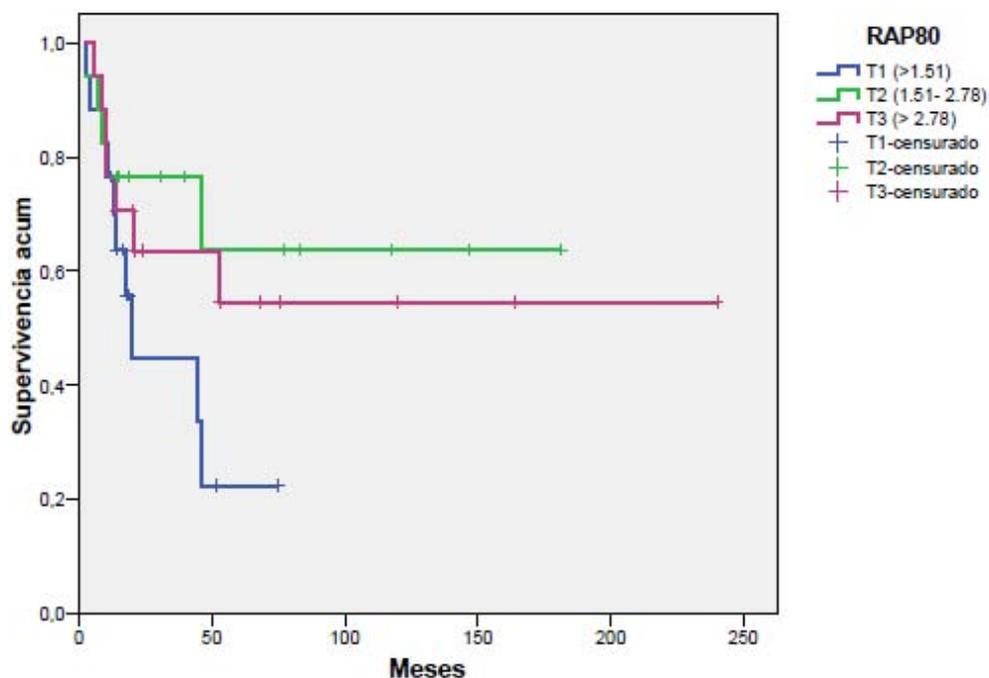


Figura 35 Supervivencia global según niveles de RAP80

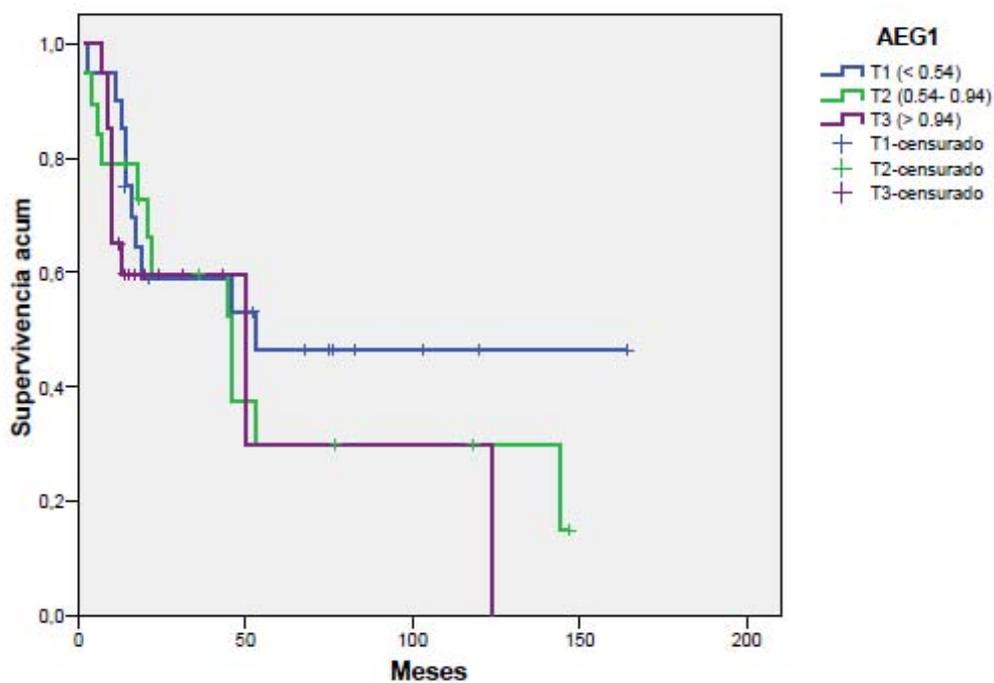


Figura 36 Supervivencia global según niveles de AEG-1

4.3.3 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

En el análisis univariante la edad, el estadio clínico, la resección completa en la cistectomía, la invasión linfovascular en la RTU, el estadio patológico y el tamaño del tumor se asociaron con la supervivencia global en forma estadísticamente significativa.

Existió una tendencia a la significancia con la hidronefrosis ($p= 0.08$) y la linfadenectomía superior a 7 ganglios linfáticos ($p= 0.06$). (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis univariante de supervivencia global según variables clínicas y patológicas

Variables	N	SG (meses)	IC 95%	p
Sexo				
Varón	119	53	35.7- 70.2	0.20
Mujer	7	29	15.6- 42.3	
Edad				
< 64 años	64	77	0- 160.8	0.05
> 64 años	62	46	29.3- 62.6	
Hidronefrosis				
Presente	44	45	19.1-62.8	0.08
Ausente	82	68	42.2-93.7	
Histología				
Urotelial puro	103	53	31- 74.9	0.27
Mixto	23	32	0- 69.5	
Invasión linfovascular				
Presente	9	32	1.9-62	0.03
Ausente	117	53	35.5-70.4	
TNM clínico				
T2-4 N0	104	54	28.4-79.5	0.004
N+	22	22	11.2-32.7	
Quimioterapia				
CMV	66	53	28.6- 77.3	0.07
Cisplatino- gemcitabina (CG)	54	70	28.1-111.8	
Carboplatino- gemcitabina	6	18	2.4- 33.6	
Cirugía				
Resección completa	106	70	11.6-128.3	<0.0001
Resección incompleta	12	13	6.2-19.7	
No quirúrgico	8	9	0-18.7	
Linfadenectomía				
<7 ganglios	75	50	39.7-60.9	0.06
≥7 ganglios	34	168	-	
TNM patológico				
pT0	28	-	-	<0.0001
pT1	20	-	-	
pT2	26	144	0-297.3	
pT3-4	24	19	16.8-21	
N+	20	13	8.6-17.3	
Tamaño tumoral				
0/mic	43	144	-	0.001
<3 cm	38	29	1-57	
>3 cm	20	20	0-52.2	

Tabla 18. Análisis univariante de supervivencia global según niveles de expresión génica

Variabes	N	SG (meses)	IC 95%	p
BRCA1				
T1 (< 12.06)	28	53	0-127.3	0.35
T2 (12.06- 23.79)	27	168	0-412.8	
T3 (> 23.79)	27	46	35- 56.9	
BCRA1				
T1-2 (<23,79)	55	124	31.2- 216.7	0.16
T3 (>23,79)	27	46	35- 56.9	
RAP80				
T1 (<1,51)	17	20	14.9- 25	0.18
T2 (1,51- 2,78)	17	-	-	
T3 (>2,78)	17	-	-	
AEG-1				
T1 (<0.54)	20	53	-	0.47
T2 (0.54- 0,94)	19	46	19.3- 72.6	
T3 (>0,94)	20	50	0- 103	

4.3.4 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN RELACIÓN CON LOS FACTORES CLÍNICOS, PATOLÓGICOS Y MOLECULARES. ANÁLISIS UNIVARIANTE

La supervivencia libre de enfermedad de la serie fue de 43 meses (95% IC, 26.9-59).

Durante el seguimiento 44 pacientes presentaron recurrencia del tumor (35%).

La supervivencia libre de enfermedad fue superior en aquellos pacientes con menor estadio clínico en el diagnóstico inicial. En aquellos que presentaban estadio T2-4N0 la supervivencia libre de enfermedad mediana fue de 54 meses (95% IC, 0-111.7) comparada con 11 meses (95% IC, 5.8-16.1) en aquellos con enfermedad ganglionar positiva ($p=0.002$). Los pacientes con hidronefrosis tuvieron una mediana de supervivencia libre de enfermedad de 24 meses (95% IC, 0- 49.6), menor que los pacientes que no la presentaban en los cuales fue de 54 meses (IC 95%, 0- 121.49) ($p=0.04$).

En los pacientes que no presentaban invasión linfovascular en la RTU, la mediana de supervivencia fue de 47 meses comparada con 14 meses, en los que si la presentaban ($p=0.013$).

La supervivencia libre de enfermedad fue superior en aquellos pacientes en los que la resección quirúrgica fue completa ($p < 0.001$), con una disección ganglionar linfática superior a 7 ($p=0.03$) y con una mayor respuesta patológica tras la quimioterapia neoadyuvante ($p < 0.0001$).

Al analizar la supervivencia libre de enfermedad considerando los niveles de expresión génica, no se encontraron diferencias significativas según los niveles de expresión de ARNm de RAP80 y AEG1.

La supervivencia libre de enfermedad en pacientes con niveles bajos de BRCA1 fue de 43 meses, con niveles intermedios de 168 meses y 42 meses en aquellos con niveles altos.

Al combinar los pacientes con niveles bajos e intermedios, la SLE fue superior aunque sin alcanzar la significancia estadística (120 meses versus 42 meses, $p= 0.13$).

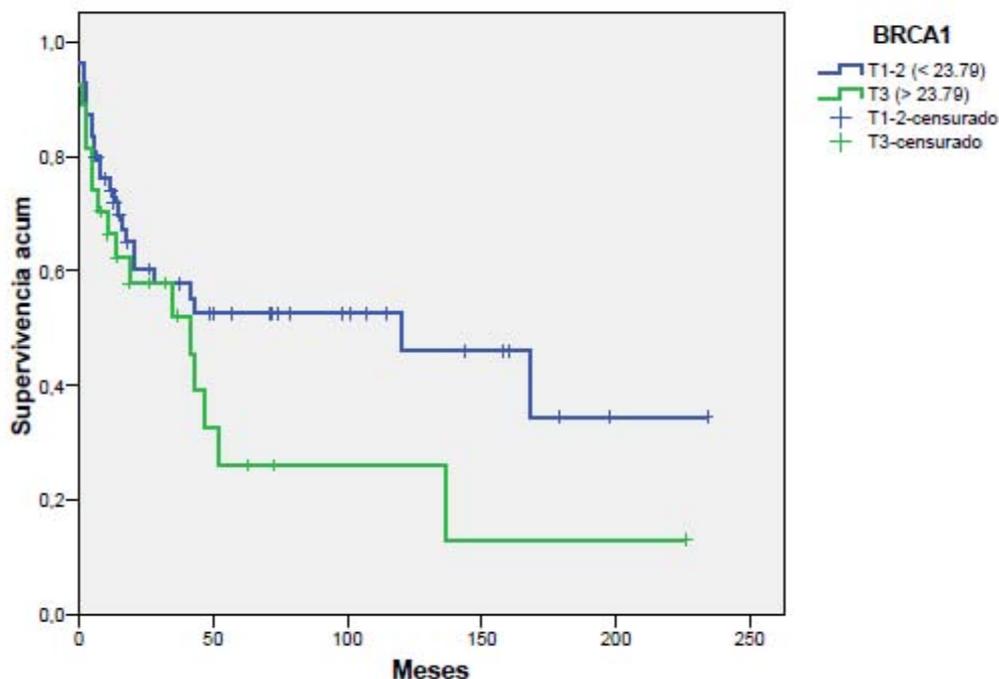


Figura 37 Supervivencia libre de enfermedad según niveles de BRCA1

4.3.5 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

Tras introducir las variables significativas del análisis univariante, se observó como variables independientes asociadas a la supervivencia global a la **invasión linfocelular**, el **estadio patológico** y el **compromiso de los ganglios linfáticos**; mientras que la **invasión linfocelular** ($p= 0.002$), el **estadio patológico** ($p= 0.003$), la **linfadenectomía superior a 7** ($p=0.05$) persistieron como predictores independientes de la supervivencia libre de enfermedad (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis multivariante de SG y SLE

Característica	Supervivencia Global		Supervivencia libre de enfermedad	
	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p
Invasión linfocelular				
Presente	5.4 (1.4-19.8)	0.01	8.09 (2.14-30.5)	0.002
Ausente	1ref		1 ref.	
TNM patológico				
T0-1	1ref	0.005	1ref	0.003
T2-4N0/+	3.29 (0.97-10.8)		10.29 (3-39.4)	
Linfadenectomía				
<7 ganglios	2.06 (0.88-4.7)	0.09	2.33 (0.98-5.5)	0.05
>7 ganglios	1ref		1ref	

4.4 ANÁLISIS DE SUBGRUPO: PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA GANGLIOS NEGATIVOS

Se analizaron los pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado, con enfermedad ganglionar negativa, que realizaron quimioterapia neoadyuvante, excluyéndose los que realizaron esquema de gemcitabina y carboplatino, con el fin de homogeneizar la muestra.

Se incluyeron en este análisis 100 pacientes de la base de datos de 126.

Las características clínicas y patológicas de los pacientes se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20 Características clínicas y patológicas de los pacientes sin invasión ganglionar

Características clínico-patológicas	N (%)
Sexo	
▪ Varón	95 (95)
▪ Mujer	5 (5)
Edad mediana (años, rango)	64 (35-78)
▪ <64 años	53 (53)
▪ >64 años	47 (47)
Hidronefrosis	
▪ Presente	31 (31)
▪ Ausente	69 (69)
Histología	
▪ Urotelial	81 (81)
▪ Mixto	19 (19)
Invasión linfovascular	
▪ Presente	7 (7)
▪ Ausente	93 (93)
TNM clínico	
▪ T2N0	3 (3)
▪ T3N0	66 (66)
▪ T4N0	31 (31)
Quimioterapia neoadyuvante	
▪ CMV	60 (60)
▪ Gem-cisplatino	40 (40)
Cirugía	
▪ Resección completa	86 (86)
▪ Resección incompleta	8 (8)
▪ No quirúrgico	6 (6)
Linfadenectomía	
▪ <7 ganglios	62 (69)
▪ >7 ganglios	28 (31)
TNM patológico	
▪ pT0	25 (27%)
▪ pT1	20 (21%)
▪ pT2	22 (23%)
▪ pT3	10 (11%)
▪ pT4	5 (5%)
▪ pT1-4N+	12 (13%)

4.4.1 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA

El análisis de los niveles de expresión de ARNm de BRCA1, RAP80 y AEG1 se realizó en 65, 41 y 49 biopsias de tejido tumoral disponible, respectivamente y se correlacionaron con la supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y la respuesta.

El ARNm de BRCA1 fue detectado en todas las muestras tumorales, existiendo variación considerable en los niveles de expresión, con valores relativos del gen de control interno B- actina de 1.18 a 73.36 y con una mediana de 16.92.

El ARNm de RAP80 fue detectado en todas las muestras tumorales, existiendo variación considerable en los niveles de expresión, con valores relativos del gen de control interno B- actina de 0.68 a 7.22 y con una mediana de 2.28.

El ARNm de AEG-1 fue detectado en todas las muestras tumorales, existiendo variación considerable en los niveles de expresión, con valores relativos del gen de control interno B- actina de 0.08 a 5.84 y con una mediana de 0.71.

	BRCA1		RAP80		AEG1	
N	82		51		59	
Mediana	16.92		2.28		0.71	
Rango (min-max)	1.18-73.36		0.68-7.22		0.08-5.84	
Terciles						
T1	< 12.06	(N=23)	< 1.51	(N=14)	< 0.54	(N=15)
T2	12.06 – 23.79	(N=21)	1.51 – 2.78	(N=14)	0.54 – 0.94	(N=16)
T3	> 23.79	(N=21)	> 2.78	(N=13)	> 0.94	(N=15)

4.4.2 ANÁLISIS DE LOS FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA

4.4.2.1 INFLUENCIA DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS EN LA RESPUESTA

La tabla 21 resume el análisis de asociación de la respuesta patológica con las variables clínico-patológicas, en el cual no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 21. Correlación entre respuesta patológica y variables clínico-patológicas en pacientes sin invasión ganglionar

Variables clínicas y patológicas	TNM patológico		p
	p T0N0	p T1-4/N+	
Edad			
▪ < 64 años	15 (30%)	35 (70%)	0.42
▪ > 64 años	10 (23%)	34 (77%)	
Sexo			
▪ Varón	24 (27%)	66 (73%)	0.94
▪ Mujer	1 (25%)	3 (75%)	
Hidronefrosis			
▪ Presente	8 (28%)	21 (72%)	0.88
▪ Ausente	17 (26%)	48 (74%)	
TNM clínico			
▪ T2-3N0	18 (28%)	47 (72%)	0.71
▪ T4N0	7 (24%)	22 (76%)	
Histología			
▪ Urotelial puro	20 (26%)	57 (74%)	0.77
▪ Mixto	5 (29%)	12 (71%)	
Invasión linfovascular			
▪ Presente	4 (67%)	2 (33%)	0.02
▪ Ausente	21 (24%)	67(76%)	
Quimioterapia			
▪ CMV	20 (35%)	37 (65%)	0.02
▪ Gem-cisplatino	5 (13%)	32 (87%)	

4.4.2.2 INFLUENCIA DE LOS FACTORES MOLECULARES EN LA RESPUESTA

Al evaluar la respuesta patológica según los niveles de expresión de ARNm de BRCA1, existe un incremento significativo en la tasa de respuesta patológica.

La respuesta patológica fue completa en el 38% (16 de 42) de los pacientes con niveles bajos e intermedios, frente a un 5% (1 de 20) en aquellos con niveles altos de BRCA1, diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.006$).

No se encontraron diferencias significativas en la tasas de respuesta patológica según los niveles de expresión de ARNm de RAP80 y AEG1 (Tabla 22).

Tabla 22. Perfil de expresión génica según respuesta patológica completa

GENES	TNM patológico		p
	p T0N0	p T1-4/N+	
BRCA1			
T1 (< 12.06)	9 (43%)	12 (57%)	0.01
T2 (12.06- 23.79)	7 (33%)	14 (67%)	
T3 (>23.79)	1 (5%)	19 (95%)	
T1 y 2 (< 23.79)	16 (38%)	26 (62%)	0.006
T3 (>23.79)	1 (5%)	19 (95%)	
RAP80			
T1 (< 1.51)	5 (39%)	8 (61%)	0.64
T2 (1.51- 2.78)	3 (23%)	10 (77%)	
T3 (> 2.78)	3 (25%)	9 (75%)	
AEG1			
T1 (< 0.54)	3 (21%)	11 (79%)	0.92
T2 (0.54- 0.94)	4 (27%)	11 (73%)	
T3 (> 0.94)	3 (21%)	11 (79%)	

Tabla 23. Respuesta patológica completa según niveles de BRCA1

BRCA1			
Respuesta patológica	T1-2 (< 23.79)	T3 (> 23.79)	p
pT0N0	16 (38%)	1 (5%)	0.006
pT1-4N+	26 (62%)	19 (95%)	
Total	42	20	

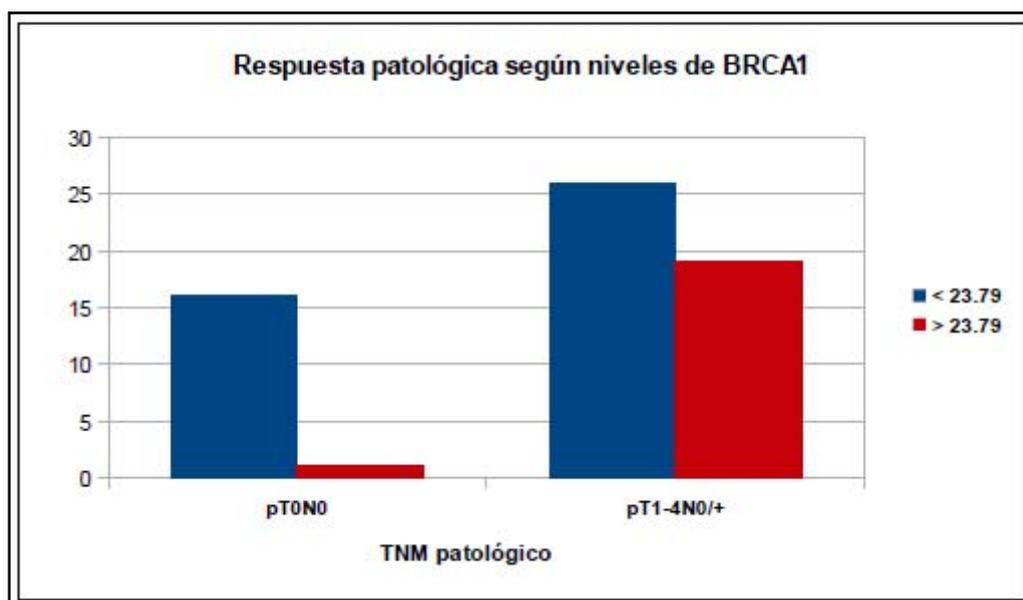


Figura 38 Respuesta patológica completa según niveles de BRCA1

4.4.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

La supervivencia global (SG) mediana de esta serie de pacientes fue de 68 meses (95% IC, 2- 134) tras una mediana de seguimiento de 75.5 meses (12 -240). La supervivencia global a 5 y 10 años fue del 50% y 45%, respectivamente.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue de 54 meses (95% IC, 0- 122.7), y a 5 años del 50%.

4.4.3.1 INFLUENCIA DE LOS FACTORES MOLECULARES EN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

4.4.3.1.1 Análisis de los niveles de expresión de ARNm BRCA1

No se hallaron diferencias en las principales características de los pacientes según los niveles de expresión de BRCA1. Tabla 24

Tabla 24. Características de los pacientes según niveles de expresión de BRCA1

Características	Niveles bajos/intermedios BRCA1	Niveles altos de BRCA1	p
Sexo			
▪ Varón	40 (91%)	21 (100%)	0.15
▪ Mujer	4 (9%)	0 (0%)	
Edad			
▪ <64	21 (48%)	11(52%)	0.72
▪ >64	23 (52%)	10 (48%)	
Hidronefrosis			
▪ Presente	13 (29,5%)	8 (38%)	0.49
▪ Ausente	31 (70,5%)	13 (62%)	
Histología			
▪ Urotelial puro	38 (86%)	17 (81%)	0.57
▪ Mixto	6 (14%)	4 (19%)	
Invasión linfovascular			
▪ Presente	4 (9%)	1 (5%)	0.54
▪ Ausente	40 (91%)	20 (95%)	
TNM clínico			
▪ T2-3N0	30 (68%)	13 (62%)	0.61
▪ T4N0	14 (32%)	8 (38%)	
Quimioterapia			
▪ CMV	23 (52%)	10 (47,6%)	0.72
▪ Gem-cisplatino	21 (48%)	11 (52,4%)	

La supervivencia mediana global en los pacientes con niveles bajos fue de 124 meses (95% IC, 10.4- 237.5), con niveles intermedios de 168 meses y fue de 45 meses (95% IC, 17.2-72.7) en aquellos pacientes con niveles altos (Figura 39).

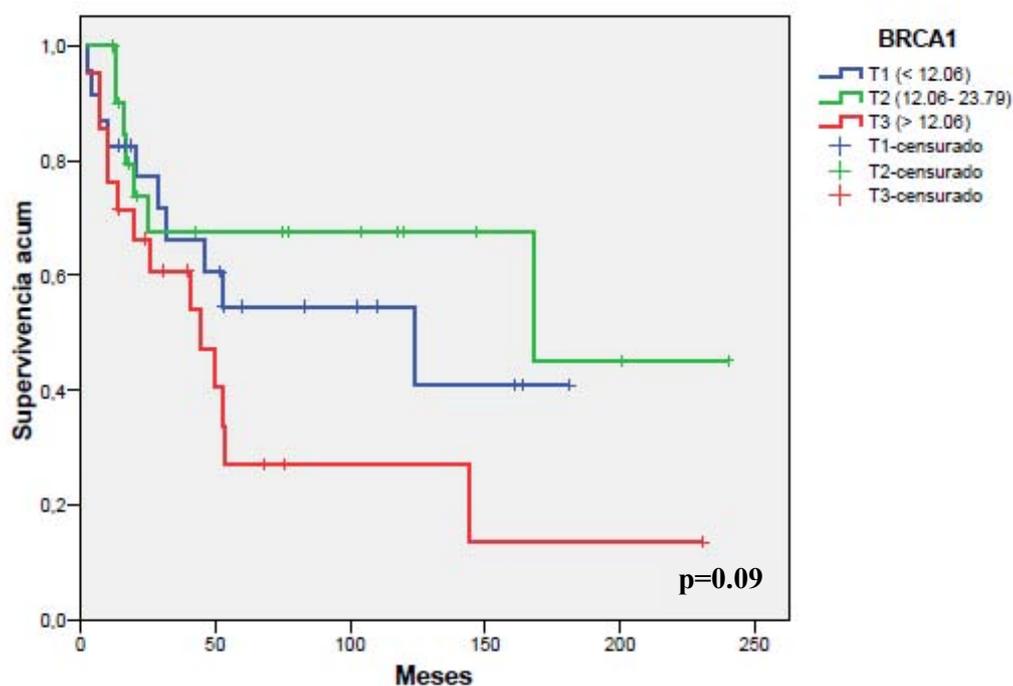
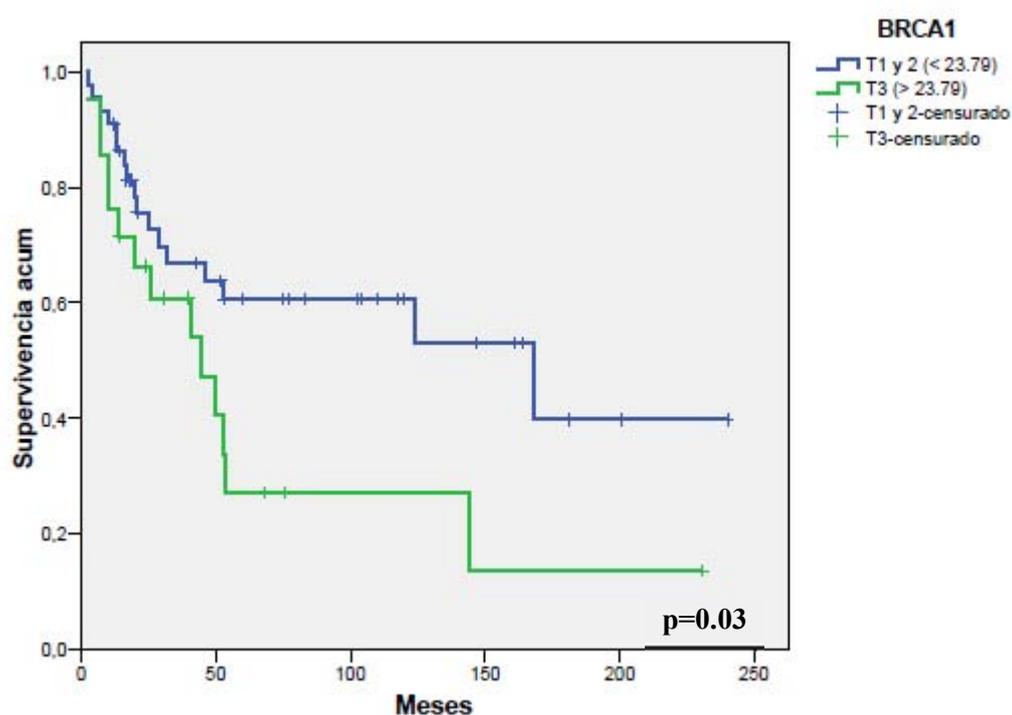


Figura 39 Supervivencia global según terciles de BRCA1

Debido a que la supervivencia fue similar en pacientes con niveles bajos e intermedios, se combinaron estos grupos para un análisis posterior. Los pacientes con niveles bajos e intermedios presentaban una supervivencia mediana de 168 meses (95% IC, 19.5-316.4), superior a los pacientes con niveles altos que era de 45 meses (95% IC, 17.2-72.7) diferencia estadísticamente significativa ($p=0.03$) (Figura 40).



BRCA1	N	SG (mediana)	SG 5 años	p
T1-2 (<23.79)	44	168	64.%	0.03
T3 (>23.79)	21	45	28.%	

Figura 40 Supervivencia global según niveles de BRCA1: T 1 y 2 versus 3

Con respecto a la supervivencia libre de enfermedad, en los pacientes con niveles bajos de BRCA1 fue de 120 meses (95% IC, 0-280.6), con niveles intermedios de 168 meses y fue de 35 meses (95% IC, 0-74) en aquellos pacientes con niveles altos ($p= 0.09$).

Al combinar los pacientes, aquellos con niveles bajos e intermedios presentaban una SLE de 168 meses (95% IC, 7.2- 328.7), superior a la presentada con niveles altos que era de 35 meses (95% IC, 0-74), diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.03$).

4.4.3.1.2 Análisis de los niveles de expresión de ARNm de RAP80

La supervivencia global mediana no se alcanzó en pacientes con niveles bajos e intermedios de RAP80, y fue de 53 meses en aquellos con niveles altos, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.51$) (Figura 41).

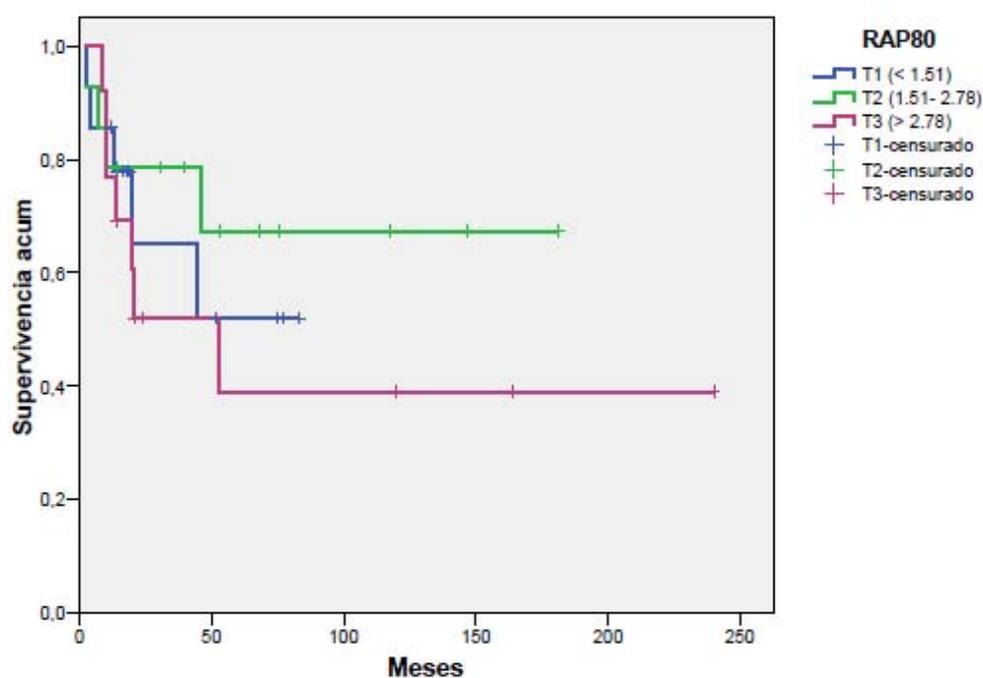


Figura 41 Supervivencia global según niveles de RAP80

4.4.3.1.3 Análisis de los niveles de expresión de ARNm de AEG1 y su relación con la supervivencia global y libre de enfermedad

No hubo diferencias en la supervivencia mediana según los niveles de expresión de ARNm de AEG1, siendo de 53 meses en pacientes con niveles bajos e intermedios y de 50 meses en aquellos con niveles altos ($p=0.54$) (Figura 42).

En aquellos pacientes con niveles bajos de AEG1 la supervivencia libre de enfermedad fue de 47 meses (IC 95%, 0- 112.4), de 28 meses (IC95%, 0- 57.3) con niveles intermedios, y 43 meses (IC 95%, 0-91.9) en los que presentaban niveles altos ($p=0.7$).

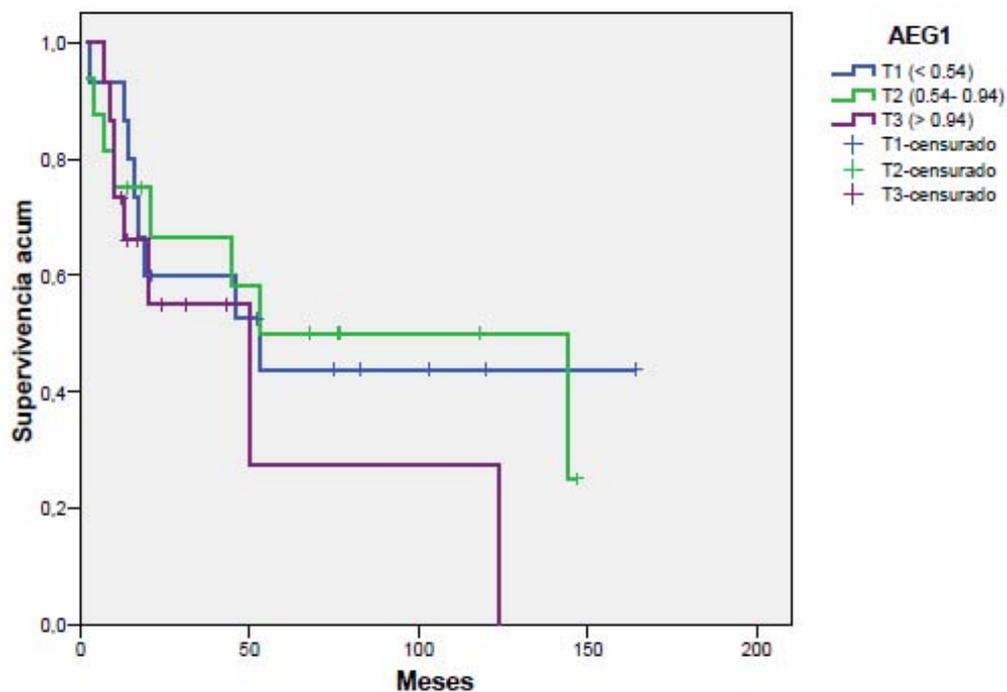


Figura 42 Supervivencia global según niveles de AEG1

En resumen, la supervivencia mediana de los pacientes según los niveles de expresión génica se especifica en la siguiente tabla:

Tabla 25. Supervivencia mediana según los niveles de expresión génica

Gen	N	SM (meses)	IC 95%	p
BRCA1				
T1 ($\leq 12,06$)	22	124	19.8-228.1	0.09
T2 (12,06 - 23,79)	22	168	-	
T3 ($> 23,79$)	21	45	17.2-72.7	
BRCA1				
T1 y2 (< 23.79)	44	168	19.5-316.4	0.03
T3 (> 23.79)	21	45	17.2-72.7	
RAP80				
T1 ($< 1,51$)	14	-	-	0.5
T2 (1,51-2,78)	14	-	-	
T3 ($> 2,78$)	13	53	6.5-99.4	
AEG1				
T1 ($< 0,54$)	15	53	0-108.4	0.5
T2 (0,54- 0,94)	16	53	0-133.4	
T3 ($> 0,94$)	15	50	5.6-94.3	

4.4.3.2 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Al realizar el análisis univariante de este subgrupo de pacientes con cáncer de vejiga sin invasión ganglionar, la edad, la resección quirúrgica completa, la invasión linfovascular en la RTU, el estadio patológico, el tamaño tumoral y los niveles de ARNm de BRCA1 se asociaron con la supervivencia global y libre de enfermedad en forma estadísticamente significativa. La linfadenectomía superior a 7 ganglios linfáticos fue predictor de supervivencia libre de enfermedad en forma significativa y con tendencia a la significancia para la supervivencia global (Tabla 26 y 27).

Tabla 26. Análisis univariante de supervivencia global en pacientes sin invasión ganglionar

Variables	N	SG (meses)	IC 95%	p
Sexo				
Varón	95	68	4.4- 131.5	0.51
Mujer	5	29	14.3 -43.7	
Edad				
< 64 años	53	124	-	0.03
> 64 años	47	41	17.1- 64.8	
Hidronefrosis				
Presente	31	50	16.2-83.7	0.16
Ausente	69	77	0-168.3	
Histología				
Urotelial puro	81	77	0- 159.4	0.18
Mixto	19	41	0- 88.7	
Invasión linfovascular				
Presente	7	32	0-65.5	0.015
Ausente	93	68	0-136.7	
TNM clínico				
T2N0	3	52	0- 104.8	0.94
T3N0	66	54	26.1- 81.8	
T4N0	31	144	0- 301.6	
Quimioterapia				
CMV	60	68	2,6-133,3	0.85
Cisplatino y gemcitabina	40	-	-	
Cirugía				
Resección completa	86	144	57.2-230.7	<0.0001
Resección incompleta	8	13	6-19.9	
No quirúrgico	6	3	0-11.4	
Linfadenectomía				
<7 ganglios	62	53	23.8-82.1	0.07
≥7 ganglios	28	168	-	
TNM patológico				
pT0	25	-	-	<0.0001
pT1	20	-	-	
pT2	22	144	5.9- 282	
pT3	10	19	14.2- 23.7	
pT4	5	12	7.7- 16.2	
N+	12	13	6.6- 19.3	
Tamaño tumoral				
0/mic	40	144	-	0.003
<3 cm	29	45	0-91.5	
>3 cm	15	20	12.9-27	
BCRA1				
T1 (<12.06)	23	124	10.4- 237.5	0.09
T2 (12.06- 23.79)	21	168	-	
T3 (> 23.79)	21	45	17.2- 72.7	
BCRA1				
T1-2 (<23,79)	44	168	19.5-316.4	0.03
T3 (>23,79)	21	45	17.2-72.7	
RAP80				
T1 (<1,51)	14	-	-	0.51
T2 (1,51- 2,78)	14	-	-	
T3 (>2,78)	13	53	6.5- 99.4	
AEG-1				
T1 (<0.54)	15	53	0-108.4	0.54
T2 (0.54- 0,94)	16	53	0-133.4	
T3 (>0,94)	15	50	5.6-94.3	

Tabla 27. Análisis univariante de supervivencialibre de enfermedad en pacientes sin invasión ganglionar

Variables	N	SLE (meses)	IC 95%	p
Sexo				
Varón	95	64	0- 132.3	0.50
Mujer	5	21	7.7-34.2	
Edad				
< 64 años	53	-	-	0.05
> 64 años	47	36	11.2- 60.7	
Hidronefrosis				
Presente	31	28	1.3-54.6	0.13
Ausente	69	120	42.1-197.8	
Histología				
Urotelial puro	81	64	0- 169.7	0.17
Mixto	19	35	0- 90.9	
Invasión linfovascular				
Presente	7	14	0-34.5	0.008
Ausente	93	120	32.7-207.2	
TNM clínico				
T2N0	3	24	0- 48	0.89
T3N0	66	52	26.4- 77.5	
T4N0	31	137	0- 324.6	
Quimioterapia				
CMV	60	54	0-140.5	0.88
Cisplatino y gemcitabina	40	-	-	
Cirugía				
Resección completa	86	137	36.2-237.7	<0.0001
Resección incompleta	8	5	0-13.3	
No quirúrgico	6	2	0-6.2	
Linfadenectomía				
<7 ganglios	62	46	14.99-77	0.05
≥7 ganglios	28	168		
TNM patológico				
pT0	25	-	-	<0.0001
pT1	20	-	-	
pT2	22	137	6.2- 267.8	
pT3	10	9	4.6- 13.3	
pT4	5	3	0- 7.2	
N+	12	6	1.3- 10.6	
Tamaño tumoral				
0/mic	40	-	-	0.004
<3 cm	29	16	0-67	
>3 cm	15	14	3.6-24.3	
BCRA1				
T1 (< 12.06)	23	120	0-280.5	0.09
T2 (12.06- 23,79)	21	168	-	
T3 (> 23.79)	21	35	0- 74	
BCRA1				
T1-2 (<23,79)	44	168	7.2-328.7	0.03
T3 (>23,79)	21	35	0-74	
RAP80				
T1 (<1,51)	14	-	-	0.45
T2 (1,51- 2,78)	14	-	-	
T3 (>2,78)	13	28	8.2- 47.7	
AEG-1				
T1 (<0.54)	15	47	0-107.3	0.67
T2 (0.54- 0.94)	16	137	2.28-271.7	
T3 (>0.94)	15	43	5.9-80	

4.4.3.3 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

Con el fin de determinar el impacto pronóstico real de las variables clínicas, patológicas y moleculares en la SG y SLE se realizó un análisis multivariante según el método de Cox, incluyendo aquellas variables que fueron significativas en el análisis univariante.

Las variables que persistieron asociadas en forma significativa a la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad fueron: la invasión linfovascular, el tamaño del tumor y los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis multivariante de SG y SLE en pacientes con carcinoma de vejiga sin invasión ganglionar

Característica	Supervivencia Global		Supervivencia libre de enfermedad		
	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p	
Invasión linfovascular					
• Presente	6.97 (2.43-19.1)	<0.001	10 (1-97.8)	0.04	
• Ausente	1 ref.		1 ref.		
Tamaño tumoral					
• 0-mic	1 ref	0.012	1 ref.	0.04	
• <3cm	1.13 (0.28-1.64)		1.13 (0.26-1.69)		0.01
• >3cm	1.14 (0.32-1.68)		1.16 (0.3-1.77)		0.02
Niveles BRCA1 (Terciles)					
• Bajo/inter medio	1ref	0.02	1 ref.	0.02	
• Alto	2.46 (1.15-5.24)		2.23 (0.82- 5.40)		

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El cáncer de vejiga representa en España un importante problema de salud por su morbilidad y mortalidad.

La cistectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral es el tratamiento de referencia en pacientes con carcinoma de vejiga infiltrante. Sin embargo, un 50% de pacientes mueren por la enfermedad debido a la presencia de micrometástasis no detectadas al momento del diagnóstico³³.

En cáncer de mama, colon y pulmón, está bien establecido el valor de la quimioterapia neoadyuvante en enfermedad operable ó localmente avanzada, con mejorías en la supervivencia.

Sin embargo, en cáncer de vejiga, la quimioterapia neoadyuvante ha demostrado un beneficio modesto en la supervivencia. En el estudio de la EORTC/MRC⁵⁶ se demostró un beneficio en la supervivencia a 5 años del 6% con el esquema CMV. En el estudio del SWOG⁶¹ se evidenció una mejoría en la supervivencia (77 versus 46 meses), con una reducción del 25% en el riesgo de muerte con el esquema MVAC. En dos meta-análisis publicadas en los últimos años se evidencia un beneficio moderado de la quimioterapia neoadyuvante, con una mejoría absoluta en la supervivencia a 5 años entre el 5 y 6,5%^{64,65}.

A pesar de estos resultados, la quimioterapia neoadyuvante no es un tratamiento habitual en la mayoría de las instituciones debido a varios factores, entre ellos: la toxicidad relacionada con el tratamiento, el probable impacto negativo de retrasar la cistectomía en pacientes quimiorrefractarios y la ausencia de marcadores predictivos que permitan identificar que pacientes responderán a la quimioterapia neoadyuvante^{67,71}.

En nuestro estudio hemos analizado de forma retrospectiva un total de 126 pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado tratadas con quimioterapia neoadyuvante y posterior cistectomía entre 1990 y 2011, analizando las variables clínicas, patológicas y moleculares que pudieran influir en el pronóstico de los pacientes y en la respuesta al tratamiento. La supervivencia global y específica por cáncer a 5 años fue del 45% y 60%, respectivamente; lo que sugiere un impacto positivo de la quimioterapia neoadyuvante considerando que la mayoría de nuestros pacientes presentaban tumores localmente avanzado (tumores T3-4 o con ganglios regionales invadidos).

Posteriormente y con el fin de homogeneizar la muestra, se analizó el subgrupo de pacientes con enfermedad ganglionar negativa, excluyendo aquellos pacientes con esquema que incluyera carboplatino, valorando las mismas variables y su correlación con la supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad, y respuesta patológica, con el fin de determinar su participación como factores pronósticos y predictivos de respuesta.

La significancia de los factores pronósticos en cáncer de vejiga depende del estadio y del tratamiento de la enfermedad. En tumores superficiales el objetivo es el control local de la enfermedad y los factores pronósticos útiles son aquellos que pueden predecir la recurrencia ó la progresión a enfermedad infiltrante. En los tumores infiltrantes, como los analizados en nuestro estudio, los factores pronóstico deben poder predecir la evolución del tumor, mientras que los factores predictivos nos permitirán conocer que tumores responderán a un determinado tratamiento.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que existen ciertos factores clínicos y patológicos con efecto pronóstico significativo.

Entre los factores pronóstico clínicos analizados, en nuestro estudio observamos un mejor pronóstico en los pacientes más jóvenes (< 64 años), como ya ha sido descrito en el estudio del SWOG⁶¹, aunque no fue significativo en el análisis multivariante.

En los tumores infiltrantes, el estadio es uno de los factores pronósticos más importantes para la progresión y la supervivencia global.

A pesar de los avances en la tecnología, existe una discrepancia entre la estadificación clínica y patológica. El examen bimanual es preciso en predecir enfermedad localizada (T2-3) solo en el 41% de los pacientes, con sobreestadificación e infraestadificación en el 11% y 31%, respectivamente. Un 66% de los pacientes con estadio pT2 pueden ser incorrectamente estadificados, con un 42% siendo sobreestadificados tras la cistectomía. Además un estadio superior a T2 se encuentra en un 40% de los pacientes en la cistectomía en aquellos que habían sido inicialmente estadificados como tumores no infiltrantes^{129,130}. Los normogramas existentes solo mejoran la precisión de la estadificación en forma modesta, por lo que el análisis genético y molecular podría ser útil en mejorar estos resultados.

En nuestra serie, en aquellos pacientes con afectación ganglionar por TC en la estadificación inicial se observó un peor pronóstico ($p=0.03$), respecto a los pacientes con tumores localmente avanzados pero sin evidencia de afectación extravesical.

La incidencia de hidronefrosis preoperatoria en pacientes con cáncer de vejiga varía desde 7 a 54% y es un predictor independiente de enfermedad más avanzada y peor pronóstico en algunos estudios. La presencia de hidronefrosis preoperatoria se ha asociado con peores resultados en pacientes con tumores de vejiga en los que se realiza la cistectomía radical y podría predecir enfermedad extra vesical y ganglionar positiva, lo cual sería útil para seleccionar los pacientes para un tratamiento de quimioterapia neoadyuvante^{131,132}.

En nuestra serie, se evidenció la presencia de hidronefrosis en el 25% (16 de 67) de los pacientes con estadio T3, en el 42% (14 de 33) con estadio T4, y en el 46% (10 de 24) de los pacientes con invasión ganglionar ($p=0.060$), confirmando su valor predictivo de enfermedad más avanzada.

Globalmente se presentó en el 35% de los pacientes, asociada a una peor supervivencia global (45 versus 68 meses, $p=0.08$) al igual que para la supervivencia libre de enfermedad. También se encontraron diferencias en los pacientes sin afectación ganglionar aunque no fueron significativas.

Con respecto a la histología, en un nuevo análisis del estudio del SWOG⁶¹ presentado en 2010 se evidenció que los pacientes con tumores que presentan diferenciación escamosa o de adenocarcinoma tendrían el mismo beneficio con la quimioterapia neoadyuvante que aquellos con tumores uroteliales puros¹³³. De acuerdo con esto, en nuestra serie de pacientes, si bien la mayoría presentaba histología de urotelial puro, no hubo diferencias en la supervivencia ni en la tasa de respuesta al tratamiento teniendo en cuenta el tipo histológico.

Dentro de los factores asociados a un mal pronóstico, la invasión linfovascular (ILV) en el momento del diagnóstico y en la cistectomía puede ser una característica histológica que se asocia a un peor pronóstico en los pacientes con carcinoma de vejiga. Sin embargo su papel como factor pronóstico es controvertido en algunos estudios, debido a la falta de estandarización en su evaluación y a la validación insuficiente en estudios prospectivos¹³⁴.

En un estudio se evidenció que la presencia de ILV en la RTU podía predecir la invasión linfovascular en 65% de las cistectomías y la presencia de ganglios linfáticos en el 41%, con lo cual podría identificarse pacientes de alto riesgo que se beneficiarían de un tratamiento neoadyuvante¹³⁵.

En el estudio de Millikan de quimioterapia perioperatoria, un 60% de los pacientes con enfermedad localizada (T2) presentaban invasión linfovascular en la RTU en el diagnóstico inicial y un pronóstico similar a los que presentaban estadio T3-4, con lo cual se sugiere que la ILV podría identificar un grupo de aparente bajo riesgo que tiene mal pronóstico como los pacientes que presentan enfermedad extravesical⁵³.

En nuestra serie de pacientes la presencia de invasión linfovascular fue solo del 7%, siendo un predictor independiente de supervivencia global y libre de enfermedad tanto en enfermedad ganglionar positiva como negativa, persistiendo su valor pronóstico en el análisis multivariante (HR 6.97, $p < 0.0001$).

Aunque la invasión linfovascular parece considerarse un predictor de peor pronóstico, llama la atención que la respuesta patológica completa fue superior en aquellos pacientes que presentaban invasión linfovascular en la RTU. Una posible hipótesis sería que en tumores más vasculares puede existir una mayor concentración de quimioterapia y oxígeno, y con ello una mayor respuesta, si bien el número de pacientes es escaso para poder sacar conclusiones.

Por lo tanto, es importante determinar la invasión linfovascular en la RTU, y considerar a los pacientes como de alto riesgo para enfermedad extravesical y por ello candidatos a realizar un tratamiento de quimioterapia neoadyuvante. Sin embargo, no es aún una herramienta que nos permita tomar decisiones clínicas, sino un foco para validación prospectiva.

En diversos estudios se ha indicado que la calidad de la cirugía influye en el resultado de los pacientes. La supervivencia tras la cistectomía depende principalmente del estadio patológico, del compromiso de los márgenes quirúrgicos y de la invasión ganglionar.

Las variables quirúrgicas que se han asociado a una mayor supervivencia en la literatura son la resección completa del tumor y la disección ganglionar linfática extendida⁴⁰.

En nuestro estudio, en el 85% de los pacientes en que la resección quirúrgica fue completa el beneficio en la supervivencia fue significativo, comparado con aquellos pacientes en quienes la resección fue incompleta ($p < 0.0001$).

Con la quimioterapia neoadyuvante se obtiene un mayor beneficio cuando se ha realizado una cirugía adecuada.

En un análisis retrospectivo de un subgrupo de pacientes del SWOG⁶¹, de los 154 pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante 44% presentaron $< p$ T2 y un 30% p T0. En

aquellos pacientes con márgenes quirúrgicos negativos, y respuesta patológica completa la supervivencia global fue superior⁶².

Existe evidencia que indica que la calidad de la cistectomía y la extensión de la linfadenectomía impactan tanto en la estadificación como en la supervivencia de los pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado.

En series de cistectomías se ha demostrado que la supervivencia global mejora al aumentar el número de ganglios examinados, tanto si estos son negativos como positivos^{39,40}.

En un análisis retrospectivo de 258 pacientes con ganglios negativos, se evidenció que la supervivencia era superior cuando más de 8 ganglios linfáticos eran resecaos, independientemente del estadio tumoral primario³⁸. La mayoría de los autores coinciden que el número de los ganglios resecaos influye en el pronóstico de los pacientes. En nuestro estudio la mediana de ganglios resecaos fue de 5 y se analizó la disección ganglionar con el fin de valorar su impacto pronóstico.

En el período 1990-2000 la linfadenectomía superior a 7 ganglios se realizó solo en el 12% de los pacientes, mientras que a partir del 2001 se ha realizado en el 57% de los pacientes, reflejando no solo la variabilidad quirúrgica existente a lo largo del tiempo, sino también la mejoría en la calidad de la cirugía efectuada en nuestro hospital en los últimos años a partir de la evidencia publicada en diversos estudios del beneficio de la extensión de la linfadenectomía y de la realización de una cirugía adecuada.

En nuestra serie de pacientes se resecaron más de 7 ganglios linfáticos en 34 pacientes (31%) y se objetivó que el número de ganglios linfáticos resecaos impactó en la supervivencia global, tanto en pacientes con invasión ganglionar positiva como negativa. La supervivencia mediana en aquellos en los que la disección fue mas extensa (más de 7 ganglios linfáticos resecaos) fue de 168 meses comparada con 50 meses, en los que fueron menos de 7 ($p=0.06$). La supervivencia libre de enfermedad también fue superior, siendo significativa en el análisis multivariante.

Al analizar únicamente aquellos pacientes con ganglios linfáticos negativos, la supervivencia global a 5 años fue del 78% para la linfadenectomía superior a 7 comparada con 45%, cuando se reseocaban menos de 7 ganglios.

La diferencia en los resultados en los pacientes sin afectación ganglionar basada en el número de ganglios examinados podría deberse a dos motivos. Por un lado, algunos cirujanos realizan una resección más completa y una disección más meticulosa, mejorando así la supervivencia. En esta línea, se ha demostrado en algunos estudios que la supervivencia es mejor en pacientes con ganglios linfáticos positivos al reseñar un mayor número de ganglios.

Además, algunos pacientes con invasión ganglionar son falsamente categorizados como p N0, debido a un insuficiente número de ganglios analizados por parte del patólogo. Cuando un mayor número de ganglios es analizado, mayor es la probabilidad de que sean correctamente clasificados como enfermedad ganglionar positiva.

Por tanto, el resultado de un adecuado número de ganglios en la disección linfática determina una mejoría en la supervivencia en pacientes con ganglios linfáticos positivos y negativos.

En la actualidad, no existen guías que recomienden cual es el número adecuado de ganglios que deben ser extirpados durante la linfadenectomía pélvica en cáncer de vejiga, por lo que es importante que se adopte un enfoque estandarizado y prospectivamente validado al realizar la disección linfática pélvica. Esto sería importante no solo para el manejo individual de los pacientes, sino también para el diseño y evaluación de estudios de quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de vejiga.

Una de las principales ventajas de la quimioterapia neoadyuvante es que permite la evaluación de la respuesta en el tumor primario.

El estadio patológico es uno de los factores pronóstico más importantes para la supervivencia. Está bien establecido que en aquellos pacientes en quienes se obtiene una respuesta completa patológica tienen una mayor probabilidad de supervivencia que en los que persiste enfermedad residual ^{61, 136}.

Las combinaciones de quimioterapia basada en platino producen tasas de respuesta completa patológica (RCp) que oscilan entre el 14 y 38%, en los diferentes estudios.

En series publicadas, se observa una supervivencia a largo plazo en el 80% de los pacientes con p T0-1, comparado con un 42% en aquellos sin respuesta a la quimioterapia. En un análisis retrospectivo de 147 pacientes tratados con MVAC (90% de los pacientes) y metotrexato- cisplatino (10%), se observó una respuesta patológica significativa (pT0-1) en el 41 %, con una supervivencia a 5 años del 75%, comparado con solo un 20% en aquellos

pacientes sin respuesta al tratamiento ¹³⁷.

En el estudio del SWOG⁶¹ se evidenció una RCp en el 50% y 30% de los pacientes con estadio T2 y T3-4a, respectivamente, utilizando el esquema M-VAC. La supervivencia a 5 años fue del 85% en aquellos con p T0, comparado con un 45% en aquellos que presentaban enfermedad residual. En una serie retrospectiva, se evidenció una tasa de pT0 en el 26% de los pacientes que recibieron 4 ciclos de Gemcitabina-cisplatino ⁷⁵.

Nuestros resultados coinciden en gran parte con otras series publicadas. (Ver tabla 29)

En nuestro estudio, un 41% de los pacientes presentaron respuesta patológica significativa (pT0-1), incluyendo un 24% con respuesta completa patológica (RCp).

En los pacientes con estadio patológico pT0-1, la supervivencia global a 5 años fue del 75 %, mientras que en aquellos que no respondieron a la quimioterapia (> pT3) fue del 12%. Esta ventaja en supervivencia se evidenció también en pacientes sin compromiso ganglionar ($p < 0.0001$), y al evaluar la supervivencia libre de enfermedad.

Se ha demostrado que el estadio clínico inicial estaría correlacionado con la respuesta patológica que puede obtenerse. Schutz y cols evaluaron 111 pacientes en los cuales, en los tumores con estadio T2/3a y T3b/4 se obtenían tasas de respuesta completa (pT0) en 34 y 9% respectivamente¹³⁸.

En nuestra serie de pacientes, la respuesta patológica fue significativa (pT0-1) en el 47% de los pacientes sin invasión ganglionar, frente a un 10% cuando presentaban ganglios invadidos en la estadificación inicial ($p=0.001$).

Tabla29. Respuesta completa patológica tras quimioterapia neoadyuvante.

Estudio	Nº pacientes	Régimen de QT	pT0	Supervivencia (pT0 vs enfermedad residual)
MRC/EORTC (56)	976	CMV x 3	33%	NR
Cueto, España (139)	122	Cisplatino x 3	18%	73 vs 27% a 6.5años
Abol-Enein(63)	196	CaMV x 2	14%	NR
INT0080 (61)	317	MVAC x 3	38%	85 vs 45% a 5 años
GISTV, Italia (140)	171	MVEC x 3	28%	NR
Millikan, MDACC(53)	63	MVAC x 2	40%	NR
MSKCC (75)	42	GC x4	28%	NR
Tesis	126	CMV x 3 /GC x3	24%	78 vs 12% a 5 años

CMV: cisplatino, metotrexato, vinblastina; MVAC: cisplatino, metotrexato, vinblastina, doxorrubicina; CaMV: carboplatino, metotrexato, vinblastina; MVEC: metotrexato, vinblastina, epirrubicina, cisplatino

En la última década, el esquema de cisplatino y gemcitabina (CG) ha reemplazado al esquema MVAC en enfermedad metastásica, debido al mejor perfil de toxicidad sin diferencias importantes en la eficacia. Si bien no existe un estudio randomizado en neoadyuvancia que compare MVAC con CG, como se ha detallado en la introducción, en una serie retrospectiva realizada por el MSKCC la quimioterapia neoadyuvante demostró una eficacia similar a la cohorte histórica de pacientes que recibieron M-VAC⁷⁵.

Un punto de controversia a discutir en este punto es la elección del esquema de quimioterapia. En nuestro estudio no se observaron diferencias en la supervivencia de los pacientes según el esquema de quimioterapia neoadyuvante administrado (CMV versus CG), con lo cual podría sugerirse que en el tratamiento neoadyuvante, al igual que en enfermedad avanzada, el esquema CG podría sustituir a los esquemas clásicos (CMV ó MVAC).

Sin embargo, conviene destacar, que aunque no existieron diferencias significativas en la supervivencia según el esquema utilizado, la tasa de pT0 con el esquema CMV fue del 35%, similar al estudio de la EORTC⁵⁶ que fue de 32%, y al estudio del SWOG⁶¹ que fue del 38% con MVAC. Por el contrario, en nuestro estudio, con el esquema de CG la tasa de pT0 fue del 14%.

Si bien en el estudio de los pacientes del MD Anderson tratados con CG la tasa de RCp fue del 26%, en otro estudio retrospectivo, solo el 7% de los pacientes presentaron RCp con este esquema de quimioterapia¹⁴¹.

Abol Enein y cols evaluaron la eficacia de un esquema de quimioterapia con carboplatino, metotrexato y vinblastina (CaMV) randomizando 196 pacientes con cáncer de vejiga T2 a 2 ciclos versus la no administración de quimioterapia preoperatoria seguido de cistectomía. La quimioterapia neoadyuvante se asoció a una mejoría en la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años (62% versus 42%, $p=0.013$), con una RCp del 14%, y el estudio fue incluido en un metaanálisis⁶³. En un estudio fase II evaluando el mismo esquema en 47 pacientes la tasa de respuesta completa patológica fue del 26%¹⁴².

En nuestra serie de pacientes, al sustituir cisplatino por carboplatino, la supervivencia era inferior, mientras que la tasa de respuesta completa era del 25%.

Si bien existe evidencia de que los regímenes de neoadyuvancia que contienen solo cisplatino ó quimioterapia combinada basada en carboplatino tienen resultados inferiores comparados con M-VAC, existen datos insuficientes para definir un esquema de quimioterapia que pueda ser mejor. La evidencia indica que deberían ser esquemas basados en cisplatino.

En resumen, la calidad de la cirugía practicada en estos pacientes, basado en la realización de una linfadenectomía más extensa con adecuados márgenes de resección y la quimiosensibilidad del tumor que permita obtener una buena respuesta patológica a la quimioterapia parecen ser, en nuestra experiencia, los factores cruciales que determinan el pronóstico en los pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante.

Estos resultados reflejan la necesidad de encontrar marcadores pronósticos y predictivos de respuesta, que nos permitan identificar aquellos pacientes que se beneficien con un tratamiento preoperatorio.

En esta línea, aparece importante el desarrollo de la investigación para el mejor conocimiento de la biología del tumor y de los mecanismos de progresión tumoral y resistencia a la quimioterapia, lo cual puede permitirnos seleccionar subgrupos de diferente pronóstico, sobre los cuales se puedan individualizar las estrategias terapéuticas.

Los estudios realizados sobre la expresión de genes en otros tumores han permitido establecer nuevos factores pronóstico ó predictivos de respuesta. Por lo que el análisis de

genes en tumores infiltrantes de vejiga y su relación con los resultados puede aportar información acerca de la evolución, el pronóstico, y la respuesta al tratamiento.

Existen pocos marcadores genéticos que hayan demostrado predecir la eficacia de la quimioterapia en cáncer de vejiga (Ver Tabla 30).

La expresión de empirina y survivina se identificaron como factores pronóstico de respuesta y supervivencia en pacientes tratados con quimioterapia basada en cisplatino⁸⁵. Al contrario, alteraciones en p53 y otros marcadores del ciclo celular demuestran resultados contradictorios.

Las mutaciones en el gen P53 y las alteraciones en la proteína p53 se han asociado con progresión en cáncer de vejiga, aunque puede existir discordancia entre ellos.

En un estudio con secuenciamiento completo del p53, se demostró que la alteración en el gen y la proteína podía identificar subgrupos de peor pronóstico y que determinadas mutaciones podían no afectar de la misma manera el resultado de los pacientes¹⁴³.

En un estudio realizado en neoadyuvancia, aquellos pacientes con mutación del P53 presentaban peores resultados a la quimioterapia neoadyuvante con MVAC⁸². Por el contrario, en otro estudio, no se pudo establecer asociación entre la expresión de p53 y el beneficio de la quimioterapia adyuvante⁸³.

Theodorescu y cols desarrollaron un sistema bioinformático conocido como COXEN (Coexpression Extrapolation) que usaba los datos de perfiles de expresión génica y de sensibilidad a drogas disponibles de un panel de línea celular NCI-60 conocido como “Rosetta Stone” para predecir la sensibilidad a la quimioterapia, en líneas celulares de cáncer de mama, ovario y vejiga, permitiendo en los tumores de vejiga estratificar la quimiosensibilidad y predecir la supervivencia a 3 años tras tratamiento con MVAC¹⁴⁴.

En un estudio se analizó una matriz de genes, identificando 14 de ellos en relación con la respuesta a M-VAC. La supervivencia global para pacientes con score de expresión génica favorable fue de 81% versus 33% en aquellos con scores desfavorables⁸⁸.

Un modelo de expresión génica de 20 genes ha demostrado ser efectivo en predecir el estadio patológico ganglionar, permitiendo seleccionar pacientes de alto riesgo para quimioterapia neoadyuvante, en base al riesgo de enfermedad ganglionar positiva¹⁴⁵.

En un estudio publicado recientemente de perfiles de expresión génica se definieron cinco subtipos moleculares de carcinoma urotelial, con pronósticos diferentes y diferente perfil de expresión de genes reguladores del ciclo celular, receptores tirosin-quinasa (FGFR3, ERBB2 y EGFR), citoqueratinas y genes de adhesión celular, al igual que con respecto a la

frecuencia de mutación de PIK3CA y p53. Los tumores urobasales A se caracterizaban por expresión elevada de FGFR3, CCND1, y TP63, ser no infiltrantes, de bajo grado y buen pronóstico; el genómicamente inestable presentaba mutaciones frecuentes en P53, CCNE y expresión de Her2neu y baja expresión de citoqueratinas, PTEN y genes de adhesión celular, siendo el 40% infiltrantes y la mayoría de alto grado; el tipo carcinoma escamoso presentaba expresión elevada de queratinas basales normalmente no expresadas en el urotelio normal, siendo de mal pronóstico y más frecuente en mujeres; y el urobasal B con características similares al tipo A, pero con mutaciones en P53 y expresión de queratinas del tipo escamoso, siendo el 50% infiltrantes¹⁴⁶.

Este enfoque podría permitirnos seleccionar los pacientes según su fenotipo molecular y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

También se han descrito los niveles de expresión de factores angiogénicos en relación a mayor recurrencia y metástasis en pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante. En un estudio de Inoue y colaboradores los niveles de expresión de factores angiogénicos detectados por hibridación in situ se correlacionaron con una alta tasa de recurrencia y metástasis en pacientes con cáncer de vejiga tratados con MVAC neoadyuvante y posterior cistectomía⁹⁰.

Las HSPs (*del inglés Heat shock proteins*) son proteínas que participan en respuesta a condiciones celulares de estrés. En un estudio realizado por Urushibara y cols, los niveles de expresión positivos de HSP60 fueron predictivos de respuesta y supervivencia en pacientes con cáncer de vejiga tratados con quimio-radioterapia neoadyuvante¹⁴⁷.

Tabla 30. Marcadores pronóstico y predictivos de respuesta en cáncer de vejiga

Marcadores	Función	Relación con cáncer de vejiga
p53	Supresor tumoral, daño ADN, apoptosis	Mutación asociada a progresión
ERCC1	Reparación del ADN	Baja expresión asociada a respuesta a cisplatino.
RRM1	Síntesis de desoxiribonucleótidos	Alta expresión asociada a mejoría en supervivencia.
MDR1	Glicoproteína de eflujo celular	Alta expresión asociada a resistencia a QT
Bcl-2	Proteína antiapoptótica	Asociada a estadio más avanzado y peor pronóstico.
BRCA1	Reparación del ADN	Baja expresión asociada con mayor respuesta y supervivencia.

La quimioterapia basada en cisplatino es el tratamiento de referencia en el cáncer de vejiga localmente avanzado y metastásico y su mecanismo de acción implica el daño del ADN, por lo que resulta de gran interés la investigación de genes que participan en las vías reparadoras del mismo.

En un estudio en cáncer de vejiga metastásico tratado con cisplatino, se midieron los niveles de expresión de diferentes genes vinculados con la reparación del ADN. Los niveles de ERCC1 se asociaron con mejoría de los resultados, a pesar de que no hubo diferencias con respecto a los niveles de BRCA1, RRM1 y caveolina1. De todos modos, en 75% de los pacientes se administró paclitaxel en combinación con gemcitabina y cisplatino, y la adición del taxano podría haber contrarrestado el impacto positivo de los bajos niveles de expresión de BRCA1⁹⁴.

En el presente estudio se evaluaron genes que participan en la reparación del ADN como BRCA1 y RAP80; y también el gen AEG1 que activando vías NF-kappa Beta y PI3K/AKT podría causar quimioresistencia y determinar un peor pronóstico en los pacientes.

BRCA1 está implicado en la respuesta al daño del ADN, participando en varias funciones celulares, que incluyen la regulación de la transcripción de ARNm, el control de del ciclo celular, la apoptosis, y la reparación del ADN, por lo que la ausencia ó sobreexpresión de BRCA1 puede afectar la respuesta a la quimioterapia con un valor predictivo, ó puede determinar el pronóstico de los pacientes que aun no han recibido un tratamiento de quimioterapia.

En un análisis de 126 pacientes con cáncer de pulmón tratados con cirugía, en los 83 pacientes con niveles bajos de BRCA1 no se alcanzó la supervivencia mediana, mientras que en aquellos con niveles altos fue de 29 meses ($p=0.04$)¹⁴⁸.

En cáncer de mama esporádico, la disminución en la expresión de BRCA1 se ha asociado a enfermedad más avanzada y peores resultados en los pacientes¹⁴⁹.

BRCA1 tiene un papel central en las vías de reparación del ADN, especialmente en la reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción, como así también en la recombinación homóloga y en la reparación de apareamientos incorrectos de bases, y la modulación de su expresión se relaciona con resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia. Los bajos niveles de expresión se han asociado a sensibilidad al cisplatino en tumores de pulmón, mama y ovario.

En una serie retrospectiva de pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimioterapia con cisplatino y gemcitabina, los bajos niveles de expresión de BRCA1 se asociaron a una mayor supervivencia¹⁰⁷. Mientras que en otro estudio se beneficiaron los pacientes con altos niveles de expresión de BRCA1 tratados con un esquema que incluía taxanos¹⁰⁸. Siguiendo la misma línea en un estudio fase II de quimioterapia individualizada en pacientes con cáncer de pulmón metastásico, se administraba la quimioterapia según los niveles de expresión de BRCA1 y existía mejoría en los resultados de los pacientes¹¹⁶.

En un estudio de 129 pacientes con cáncer de pulmón metastásico con mutaciones en EGFR tratados con Erlotinib, los niveles bajos de BRCA1 se asociaron con una mayor supervivencia libre de progresión, probablemente por neutralización del efecto negativo de la mutación T790M. La disminución de BRCA1 aumentaría la citotoxicidad de Erlotinib¹⁵⁰.

En el estudio de Wei y cols, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 en 133 pacientes con cáncer gástrico metastásico, de los 59 pacientes que recibieron una segunda línea con docetaxel, la supervivencia fue de 25.8 meses en aquellos con niveles altos, 19.1 en niveles intermedios y 9.5 meses en aquellos con niveles bajos ($p=0.0067$), reforzando que los niveles altos de expresión se asociaban a la sensibilidad con agentes antimicrotubulo ¹⁵¹.

En un estudio publicado recientemente, se analizaron por IHQ los niveles de expresión de BRCA1 en 292 pacientes con cáncer de ovario esporádico tratados con quimioterapia basada en platino. La disminución de la expresión se asoció con una mejoría en la respuesta a la quimioterapia, en la supervivencia global y en la supervivencia libre de progresión, siendo un factor predictivo de respuesta y de buen pronóstico en los pacientes. La adición de taxanos mejoraba la respuesta, pero en forma independiente a la expresión de BRCA1 ¹⁵².

En un estudio de Margeli y cols de 41 pacientes con cáncer de mama esporádico tratadas con quimioterapia basada en antraciclinas, los bajos niveles de expresión de BRCA1 y receptor de progesterona positivo fueron los únicos factores asociados a una mayor supervivencia global ¹⁵³.

Estos estudios sugieren que BRCA1 puede tener una función dual como factor pronóstico y predictivo de sensibilidad al tratamiento con cisplatino y taxanos. Sin embargo, los datos disponibles en la literatura acerca del valor pronóstico y predictivo de respuesta de BRCA1 en cáncer de vejiga son escasos.

En un estudio retrospectivo realizado por Font y cols, se analizaron los niveles de expresión de BRCA1 en 57 pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en platino. La respuesta patológica fue significativa ($pT0-1$) en 66% de los pacientes con niveles bajos/intermedios de ARNm de BRCA1 comparado con un 22% en aquellos con niveles altos ($p=0,01$). La supervivencia global a 5 años fue del 64% en aquellos pacientes con niveles bajos/intermedios de BRCA1 comparada con un 12% en los que presentaban niveles altos ($p= 0,002$). En el análisis multivariante, los niveles de expresión de BRCA1 y la invasión linfovascular fueron factores pronósticos independientes ¹⁵⁴.

Así, en nuestra experiencia en cáncer de vejiga localmente avanzado, la expresión de ARNm de BRCA1 se ha asociado a una mayor tasa de respuesta patológica y a una mayor supervivencia, por lo que en las muestras de tejidos disponibles se determina el nivel de

expresión de BRCA1 en todos los pacientes candidatos a recibir quimioterapia neoadyuvante.

En nuestro estudio, los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 se determinaron por QRT-PCR, que permite la cuantificación precisa y reproducible del ARN obtenido de pequeñas cantidades de tejido parafinado. Posteriormente se dividió a los pacientes en terciles para su análisis.

Al analizar la población de 126 pacientes, en 82 muestras tumorales disponibles, los niveles de expresión de BRCA1 bajos e intermedios se asociaron a una mejor supervivencia global y libre de enfermedad, aunque no se alcanzó la significancia estadística.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de BRCA1 y el resto de los parámetros clínico patológicas.

En el análisis del subgrupo de pacientes sin enfermedad ganglionar (T2-4N0M0) se determinaron los niveles de BRCA1 en 65 muestras disponibles. Debido a que la supervivencia fue similar en pacientes con niveles bajos e intermedios, se combinaron estos grupos para un análisis posterior. Los pacientes con niveles bajos e intermedios presentaron una supervivencia global a 5 años del 64%, superior al 27% en los pacientes con niveles altos. La expresión de BRCA1 influyó también en la supervivencia libre de enfermedad, siendo significativamente menor (35 versus 168 meses) que en aquellos que presentaban niveles altos.

En el análisis multivariante, los niveles de BRCA1 continuaban siendo un factor pronóstico independiente de supervivencia (HR 2.46, $p= 0.02$).

Estos resultados confirman los obtenidos por nuestro grupo en el estudio realizado previamente¹⁵⁴.

Estos efectos podrían explicarse por la pérdida en los puntos de control del ciclo celular y en la reparación de las lesiones en el ADN inducidas por cisplatino.

Los niveles de expresión de BRCA1 pueden predecir los resultados tras quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino, modulando la respuesta. Se observó una correlación significativa entre la respuesta patológica y el nivel de expresión de ARNm de BRCA1. La tasa de respuesta patológica completa fue del 38% en aquellos pacientes con niveles bajos e intermedios de ARNm de BRCA1 comparado con un 5% en aquellos con niveles altos ($p= 0.006$).

La influencia de la expresión de BRCA1 en la respuesta patológica observada en este estudio refuerza el papel como marcador predictivo de respuesta, haciendo que sea una herramienta potencialmente útil para seleccionar pacientes que se beneficien de la quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino.

Es probable que los pacientes con altos niveles de expresión de BCRA1 no se beneficien de los esquemas basados en cisplatino, pero si tengan una mayor sensibilidad a esquemas que incluyan taxanos. Estudios en el futuro deberían focalizarse en definir este punto.

Además de la evidencia existente de que BRCA1 podría utilizarse como marcador pronóstico y predictivo de respuesta, se plantea la posibilidad de mejorar el resultado en estos pacientes con disminución de BRCA1 mediante la investigación de nuevos tratamientos.

PARP1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1) es una enzima que reconoce las rupturas de cadena simple y participa en la reparación por escisión de bases (BER) e interactúa con otras proteínas como XRCC1, ADN ligasa III y ADN polimerasa beta. En ausencia de PARP1, permanecen las rupturas de cadena simple aumentando la posibilidad de que colapsen las fuerzas de replicación y se generen rupturas de doble cadena, que pueden repararse por recombinación homóloga ó unión de extremos no homologa (NHEJ), vías en las que participa BRCA1. Por ello, células deficientes en BRCA1 podrían tener un aumento de la sensibilidad a los inhibidores de PARP. En estudios de xenoinjertos en cáncer de mama y pulmón, la combinación de cisplatino con un inhibidor de PARP provoca una mayor disminución del volumen tumoral al compararlo con la monoterapia con cisplatino. Esto nos daría la posibilidad de poder administrar un tratamiento que nos permita mejorar los resultados.

Los niveles de expresión de BRCA1 están relacionados con la expresión de otros genes, como es el RAP80 y el AEG-1.

La unión de una proteína checkpoint 1 mediadora del daño del ADN (MDC1) a la cola fosforilada de la histona H2AX facilita la formación de un foco nuclear de BRCA1 en los sitios de doble ruptura de la cadena del ADN inducidos por RT ó quimioterapia. La proteína con dominio en anillo asociada a BRCA1 (BARD1) dimeriza con BRCA1 formando una ubiquitin E3 ligasa, a la cual se une RAP80 a través de la interacción con CCDC98 (Abraxas).

La proteína asociada al receptor 80 (RAP80) tiene un papel crucial en la respuesta al daño del ADN y en el mantenimiento de la integridad genómica.

BRCA1 es reclutado a los sitios de ruptura del ADN, participando en la reparación del mismo y en el control del ciclo celular. RAP80 se requiere para la acumulación del BRCA1 en los sitios de daño del ADN. En las células con depleción de RAP80, se suprime el reclutamiento del complejo BRCA1 y se altera la reparación de las rupturas de doble cadena del ADN, presentando estas células una hipersensibilidad a la irradiación.

En estudios preclínicos, RAP80 podría reemplazar la función reparadora del BRCA1 en células deficientes.

En estudios de cáncer de pulmón no célula pequeña y cáncer gástrico, los niveles de RAP80 parecen influir en la supervivencia^{102,103}. RAP80 parece desarrollar un papel importante en la respuesta celular al daño en el ADN inducido por la quimioterapia, por lo que decidimos incorporar su determinación al presente estudio. Sin embargo, en nuestro estudio, RAP80 no demostró valor pronóstico y predictivo de respuesta. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia global, y supervivencia libre de enfermedad, y tasa de respuesta patológica.

En algunos estudios no aparecen alteraciones en la recombinación homóloga y en la unión de extremos no homologa (NHEJ) ni hipersensibilidad a la irradiación ó agentes como el cisplatino, lo cual sugeriría que RAP80 puede tener una función específica en la reparación del ADN y actuar en forma independiente de BRCA1.

En nuestro estudio se analizó también el valor pronóstico y predictivo del gen AEG1.

La vía de señalización PI3K activada por Ha-ras aumenta la expresión de AEG1, que es un oncogén multifuncional, que mediante activación de otras vías, como NF kappa Beta, regula la migración e invasión celular, además de inhibir la apoptosis. Además, MYC induce la expresión tanto de AEG1, como de BRCA1.

Múltiples referencias muestran evidencias de que AEG1 tiene un papel importante en la progresión tumoral y en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia.

En líneas celulares de cáncer de cérvix, las células con disminución de la expresión de AEG1 presentaron un aumento de la radiosensibilidad y se evidenció un debilitamiento en la reparación de las rupturas de doble cadena inducidas por la radioterapia¹⁵⁵.

En la literatura, en varios estudios se correlaciona su sobreexpresión con quimioresistencia en cáncer de mama y peor pronóstico en cáncer de pulmón no célula pequeña^{122, 124}.

La sobreexpresión de AEG1 también se ha asociado con un peor pronóstico y resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino en cáncer de ovario metastásico¹²⁸.

En nuestro estudio, los niveles de ARNm de AEG 1 fueron analizados por RT-PCR en las muestras tumorales disponibles y su expresión no tuvo efecto pronóstico alguno sobre ninguno de los parámetros de supervivencia estudiados, a diferencia de los resultados obtenidos en pacientes con cáncer de pulmón no célula pequeña y otros tumores.

A pesar de que la expresión de la proteína AEG1 se encuentra aumentada en un número significativo de pacientes, el gen se amplifica solo en un pequeño subgrupo, por lo que aun se requiere una investigación más profunda.

A pesar de ello, creemos que la sobreexpresión de AEG1 podría usarse como biomarcador para identificar subgrupos de pacientes que requieran tratamientos más agresivos ó combinaciones con inhibidores de MTDH/AEG1 que ayuden a aumentar la eficacia de la quimioterapia, por lo que sería necesario estudios prospectivos con un mayor numero de pacientes.

A pesar de existir limitaciones, como la naturaleza retrospectiva del estudio, y quizás la falta de análisis de un perfil genético más amplio, cabe destacar que el análisis de esta serie homogénea de pacientes con carcinoma de vejiga localmente avanzado nos permite destacar el valor de la quimioterapia neoadyuvante seguido de cistectomía como un tratamiento de referencia en pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado, como así también el valor de ciertos factores clínicos, patológicos y quirúrgicos que pueden considerarse al diseñar estudios clínicos en un futuro..

No existen aun biomarcadores que se hayan incorporado en la práctica clínica , debido a validación insuficiente y falta de datos prospectivos, y probablemente debido a que la biología tumoral estaría influenciada por más de un biomarcador.

En nuestro estudio, se ha observado que al menos un marcador tumoral molecular, que es BRCA1, ha sido de valor pronóstico y predictivo de respuesta.

Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con una cierta precaución, debido a que se trata de un estudio retrospectivo de un número limitado de pacientes. Es necesaria la realización de estudios amplios y bien diseñados, para validar la utilidad pronostica de la expresión de los niveles de ARNm de BRCA1, y de estudios adicionales que exploren más profundamente las influencia pronostica de las alteraciones en esta vía, incluyendo el estudio simultáneo de otros componentes, y también su aplicación en diferentes poblaciones específicas de tumores vesicales.

También sería importante el desarrollo de estudios prospectivos que nos permitan un mejor conocimiento de los factores pronósticos clínico-patológicos y de los posibles marcadores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta.

La posibilidad de identificar tumores con mayor sensibilidad a ciertos agentes de quimioterapia puede permitirnos seleccionar el tratamiento de los pacientes de acuerdo a un perfil genético individual y nos llevan a plantear la evaluación del ARNm de BRCA1 para personalizar el tratamiento y mejorar los resultados en pacientes con cáncer de vejiga.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. En nuestra serie de pacientes, la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de vejiga localmente avanzado parece aportar un beneficio superior al tratamiento quirúrgico, con una supervivencia global y específica por cáncer a 5 años del 48% y 60%, respectivamente.
2. El estudio de los factores clínicos, patológicos y moleculares contribuye a predecir la evolución y respuesta a la quimioterapia de los pacientes.
3. El estadio clínico localizado al diagnóstico, la ausencia de invasión linfovascular en la RTU, la respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante y el menor tamaño tumoral se relacionaron con una mayor supervivencia en forma estadísticamente significativa.
4. La resección quirúrgica completa y la linfadenectomía superior a 7 ganglios fueron los factores quirúrgicos más relevantes en el pronóstico de los pacientes.
5. En el análisis multivariante, solo la invasión linfovascular y el estadio patológico determinaron su valor como factores pronóstico independiente de supervivencia global.
6. En el análisis de subgrupo de pacientes sin enfermedad ganglionar, los niveles bajos e intermedios de expresión de ARNm de BRCA1 se asocian a una mejor supervivencia al compararlos con niveles altos, en forma estadísticamente significativa.
7. Existe una correlación significativa entre los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 y la respuesta patológica: los pacientes con niveles bajos e intermedios de BRCA1 presentaron una mayor tasa de respuesta patológica completa (pT0), al compararlos con pacientes con niveles altos.

8. No existe correlación significativa entre la expresión de RAP80 y AEG1 con la respuesta patológica tras la quimioterapia neoadyuvante, ni con los resultados de supervivencia.
9. En pacientes con carcinoma de vejiga sin invasión ganglionar tratados con quimioterapia neoadyuvante y posterior cistectomía, únicamente la presencia de invasión linfovascular en la RTU y los niveles altos de BRCA1 determinaron una peor supervivencia.
10. Los niveles bajos de expresión de ARNm de BRCA1, determinados por q RT-PCR tienen valor pronóstico y predictivo de respuesta en pacientes con cáncer de vejiga localizado con ó sin invasión ganglionar tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en platino y posterior cistectomía.
11. En nuestro estudio se sugiere que la determinación de los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 en cáncer infiltrante de vejiga localmente avanzado puede ser útil en la selección de candidatos a tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, si bien se requiere la confirmación en estudios prospectivos randomizados con un mayor número de pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Referencias bibliográficas

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2):69-90.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12):2893-917.
3. Galceran J, Ameijide A, Piñol JLL, et al. Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019: cáncer de vejiga urinaria. *Med Clin* 2008; 131: 67-71.
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004; 83:1 1438.
5. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case control studies. *Int J Cancer* 2000; 86(2):289-94.
6. Negri E, La VC. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10(1):7-14.
7. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, et al. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract* 2002; 10(6):31122.
8. Kogevinas M, Mannetje A, Cordier S, et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes and Control* 2003; 14(10):907-14.
9. Quilty PM, Kerr GR. Bladder cancer following low or high dose pelvic irradiation. *Clin Radiol* 1987; 38(6):583-5.
10. Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(7):524-30.
11. Felix AS, Soliman AS, Khaled H, et al. The changing patterns of cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes Control* 2008; 19(4):421-9.
12. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, et al. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* 1984; 119(4):510-5.
13. Steinmaus CM, Nunez S, Smith AH. Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *Am J Epidemiol* 2000; 151(7):693-702.
14. Kaufman D, Shipley W, Feldman. Bladder cancer. *Lancet* 2009; 374: 239-49.
15. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(12):1435-48.

16. Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of classification of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press 2004, pp. 29-34.
17. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005; 66 (1):4-34.
18. Mitra A, Datar RH, Cote RJ, et al. Molecular Pathways in Invasive Bladder Cancer: New Insights into Mechanisms, Progression, and Target Identification. *J Clin Oncol* 2006; 24:5552-64.
19. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 331:1259-1264, 1994.
20. Malats N, Bustos A, Nasciminetto CM, et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: A meta-analysis and review. *Lancet Oncol* 2005; 6:678-86.
21. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, et al. Effect of p21 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1072-79.
22. Mitra AP, Lin H, Datar RH, et al: Molecular biology of bladder cancer: Prognostic and clinical implications. *Clin Genitourin Cancer* 2006; 5:67-77.
23. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, et al. Combined Effects of p53, p21, and pRb expression in the Progression of Bladder Transitional Cell Carcinoma .*J Clin Oncol*, 2004:1007-1013.
24. Ching CB, Hansel DE. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Laboratory Investigation* 2010; 90(10):1406-14.
25. Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Metastasis Rev* 2009; 28:305-316.
26. Naito S, Bilim V, Yuuki K, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 β : A Prognostic Marker and a Potential Therapeutic Target in Human Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:5124-32.
27. Schultz L , Albadine R , Hicks J et al .Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy . *Cancer* 2010; 116: 5517-26.
28. Wijkstrom H, Norming U, Lagerkvist M, et al. Evaluation of clinical staging before cystectomy in transitional cell bladder carcinoma: a long-term follow-up of 276 consecutive patients. *Br J Urol* 1998; 81(5):686-91.
29. Goessl C, Knispel HH, Millar K, et al. Is routine excretory urography necessary at first diagnosis of bladder cancer?. *J Urol* 1997; 157(2):480-1.

30. Kim JK, Park SY, Ahn HJ, et al. Bladder cancer: analysis of multi-detector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging. *Radiology* 2004; 231(3):725-31.
31. Kundra V, Silverman PM. Imaging in oncology from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Imaging in the diagnosis, staging, and follow-up of cancer of the urinary bladder. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180(4):1045-54.
32. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C (eds). TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009; pp. 262-265.
33. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1054 patients. *J Clin Oncol* 2001; 19: 666-75.
34. Stenzl A, Nagele U, Kuczyk M, et al. Cystectomy-Technical Considerations in Male and Female Patients. *EAU Update Series* 2005; 3:138-46.
35. Dalbagni G, Genega E, Hashibe M, et al. Cystectomy for bladder cancer: a contemporary series. *J Urol* 2001; 165:1111-6.
36. Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, et al. Radical cystectomy for bladder cancer today-a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*. 2003; 21:690-6.
37. Heidenreich A, Pfister D, et al. Anatomic Extent of Pelvic Lymphadenectomy in Bladder Cancer. *European Urology Supplements* 2010; 9: 419-423.
38. Herr HW, Bochner BH, Dalbagni G, et al. Impact of the number of lymph nodes retrieved on outcome in patients with muscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2002; 167(3): 1295-8.
39. Konety BR, Joslyn SA, O'Donnell MA. Extent of pelvic lymphadenectomy and its impact on outcome in patients diagnosed with bladder cancer: analysis of data from the surveillance, epidemiology and end results program data base. *J Urol* 2003; 169:946.
40. Herr HW, Faulkner JR, Grossman HB, et al. Surgical factors influence bladder cancer outcomes: A cooperative group report. *J Clin Oncol* 2004; 22:2781-89.
41. Leissner J, Hohenfellner R, Thuroff JW, et al. Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of the bladder: significance for staging and prognosis. *BJU Int* 2000; 85:817.
42. Capitanio U, Suardi N, Shariat SF, et al. Assessing the minimum number of lymph nodes needed at radical cystectomy in patients with bladder cancer. *BJU Int*. 2009; 103(10):1359-62.
43. Dangle P, Gong M, Bahnson R, et al. How do commonly performed lymphadenectomy templates influence bladder cancer nodal stage? *J Urol* 2010; 183, (2): 499-504.
44. Fleischmann A, Thalmann GN, Markwalder R, et al. Extracapsular extension of pelvic lymph node metastases from urothelial carcinoma of the bladder is an independent prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2005; 23(10):2358–2365.

45. Stein JP, Cai J, Groshen S, Skinner DG. Risk factors for patients with pelvic lymph node metastases following radical cystectomy with en bloc pelvic lymphadenectomy: the concept of lymph node density. *J Urol.* 2003; 170(1):35-41.
46. Herr HW, et al. Superiority of Ratio Based Lymph Node Staging for Bladder Cancer. *J Urol* 2003;169 (3) :943-945.
47. Kassouf W, Leibovici D, Munsell MF, et al. Evaluation of the relevance of lymph node density in a contemporary series of patients undergoing radical cystectomy. *J Urol.* 2006; 176(1):53-57.
48. Kassouf W, Agarwal PK, Herr HW, et al. Lymph node density is superior to TNM nodal status in predicting disease-specific survival after radical cystectomy for bladder cancer: analysis of pooled data from MDACC and MSKCC. *J Clin Oncol.* 2008; 26(1):121–126.
49. Meeks JJ, et al. A Systematic Review of Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2012.05.048>
50. Herr HW, Dotan Z, Donat SM, Bajorin DF. Defining optimal therapy for muscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2007; 177:437-43.
51. Calabro` F, Sternberg CN. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009; 55:348-58.
52. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Eur Urol* 2005; 48:189-201.
53. Millikan RE, Dinney C, Swanson D, et al. Integrated Therapy for Locally Advanced Bladder Cancer. Final Report of a Randomized Trial of Cystectomy plus Adjuvant M-VAC vs. Cystectomy with both Pre-and Post-Operative M-VAC. *J Clin Oncol* 2001; 19(20):4005-13.
54. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI et al. Preliminary results of MVAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Urol* 1985; 133: 403-7.
55. Logothetis CJ, Dexeus FH, Finn L et al. A prospective randomized trial comparing MVAC and CISCA chemotherapy for metastatic urothelial tumors. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1050-55.
56. International Collaboration of Trialists. Neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 354:533-40.
57. Griffiths G, Hall R, Sylvester R, et al. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol* 2011; 29:2171-7.

58. Malmstrom PU, Rintala E, Wahlqvist et al. Five year follow-up of a prospective trial of radical cystectomy and neo-adjuvant chemotherapy: Nordic Cystectomy Trial I. *J Urol* 1996; 155: 1903-1906.
59. Sherif A, Rintala E, Mestad O et al. Neo-adjuvant cisplatin-methotrexate chemotherapy for invasive bladder cancer—Nordic Cystectomy Trial II. *Scand J Urol Nephrol* 2002; 36: 419-25.
60. Sherif A, Holmberg L, Rintala E, et al., Nordic Urothelial Cancer Group. Neoadjuvant cisplatin based combination chemotherapy in patients with invasive bladder cancer: a combined analysis of two Nordic studies. *Eur Urol* 2004; 45:297-303.
61. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM et al. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 859–866.
62. Sonpavde G, Goldman BH, Speights VO, et al. Quality of pathologic response and surgery correlate with survival for patients with completely resected bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy *Cancer* 2009;15;115(18):4104-9.
63. Abol-Enein H, El-Mekresh M, El-Baz M, Ghoneim MA. Neo-adjuvant chemotherapy in the treatment of invasive transitional bladder cancer. A controlled prospective randomised study. *Br J Urol* 1997; 79 (4): 174.
64. Advanced Bladder Cancer Meta-Analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta- analysis. *Lancet* 2003; 361:1927-34.
65. Winquist E, Kirchner TS, Segal R, et al. Neoadjuvant chemotherapy for transitional cell carcinoma of the bladder: a systematic review and meta-analysis. *J Urol* 2004; 171:561-9
66. Advanced Bladder Cancer Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: an update of systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Eur Urol* 2005; 48: 202-6
67. Hussain M, Wood D, et al. Bladder Cancer: Narrowing the Gap between Evidence and Practice. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5680-84.
68. David KA, Milowsky MI, Ritchey J, et al. Low incidence of perioperative chemotherapy for stage III bladder cancer 1998 to 2003: a report from the National Cancer Data Base. *J Urol* 2007; 178:451-4.
69. Fedeli U, Stacey A, Ward E. Treatment of muscle invasive bladder cancer: evidence from the National Cancer Database, 2003 to 2007. *J Urol* 2011; 185: 72-78.
70. Burger M, Mulders P, et al. Use of Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer Is Low Among Major European Centres: Results of a Feasibility Questionnaire. *European Urol* 2012; 61 (5): 1070-1.

71. Sanchez-Ortiz R, Huang WC, Mick R, et al. An interval longer than 12 weeks between the diagnosis of muscle invasion and cystectomy is associated with worse outcome in bladder carcinoma. *J Urol* 2003; 169:110-5.
72. Lee CT, Madii R, Daignault S, et al. Cystectomy delay more than 3 months from initial bladder cancer diagnosis results in decreased disease specific and overall survival. *J Urol* 2006; 175:1262-7.
73. Miles BJ, Fairey AS, Eliasziw M, et al. Referral and treatment rates of neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer before and after publication of a clinical practice guideline. *Can Urol Assoc J.* 2010; 4(4):263-7.
74. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(21):4602-8.
75. Dash A, Pettus JA, Herr HW, et al. A role for neoadjuvant gemcitabine plus cisplatin in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a retrospective experience. *Cancer* 2008; 113:2471-7.
76. Smith DC, Mackler NJ, Dunn RL, et al. Phase II trial of paclitaxel, carboplatin and gemcitabine in patients with locally advanced carcinoma of the bladder. *J Urol* 2008; 180:2384–8.
77. Bassi P, Ferrante GD, Piazza N, et al. Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort. *J Urol* 1999; 161:1494-96.
78. Gakis G, Schwentner C, Todenhöfer T, et al. Current status of molecular markers for prognostication and outcome in invasive bladder cancer. *BJUI* 2012; 110:233-37.
79. Matsushita K, Cha E, Matsumoto K, Baba S, Shariat SF, et al. Immunohistochemical biomarkers for bladder cancer prognosis. *International J Urol* 2011; 18, 616–629.
80. Bolenz C, Lotan Y. Translational research in bladder cancer: From molecular pathogenesis to useful tissue biomarkers. *Cancer Biology & Therapy* 2010; 10:5:407-415.
81. Qureshi KN, Griffiths TR, Robinson MC, et al. TP53 accumulation predicts improved survival in patients resistant to systemic cisplatin-based chemotherapy for muscle invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3500-07.
82. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter Ve, et al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1995; 13:1384-90.
83. Stadler WM, Lerner SP, Groshen S, et al. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. *J Clin Oncol* 2011; 29; (25): 3443-9.

84. Maluf FC, Cordon-Cardo C, Verbel DA et al. Assessing interactions between mdm-2, p53, and bcl-2 as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment. *Ann Oncol* 2006; 17: 1677–1686.
85. Als AB, Dyrskjot L, von del Maase, et al. Empirin and surviving predict response and survival following cisplatin-containing in patients with advanced bladder cancer. *Clin cancer Res* 2007; 13:4407-14.
86. Hoffmann AC, Wild P, Leicht C, et al. MDR1 and ERCC1 expression predict outcome of patients with locally advanced bladder cancer receiving adjuvant chemotherapy. *Neoplasia* 2010; 12; (8): 628–636.
87. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2007; 18:522-8.
88. Takata R, Katagiri T, Kanehira M, et al. Predicting response to methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer through genome-wide gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005; 11:2625-36.
89. Takata R, Katagiri T, Kanehira M, et al. Validation study of the prediction system for clinical response of M-VAC neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Science* 2007; 98:113-7.
90. Inoue K, Slaton JW, Karashima T et al. The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 4866-73.
91. Jalal S, Earley J, Turchi J. DNA Repair: From Genome Maintenance to Biomarker and Therapeutic Target. *Clin Cancer Res* 2011; 17(22); 6973-84.
92. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2011; 1-15.
93. Martin LP, Hamilton T, Schilder R. Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways *Clin Cancer Res* 2008; 14:1291-95.
94. Kawashima A, Nakayama M, Kakuta Y, et al. Excision repair cross-complementing group 1 may predict the efficacy of chemoradiation therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17:2561-69.
95. Huen M, Chen, J, et al. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2010; 11(2): 138-148.
96. Kennedy R, Quinn J, Mullan PB, et al. The Role of BRCA1 in the Cellular Response to .Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1659-68.
97. Deng C. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution *Nucleic Acids Research* 2006; 34, 5:1416–26.

98. Wang Q, Zhang H, Fishel R, Greene MI. BRCA1 and cell signaling. *Oncogene* 2000; 19: 6152–6158.
99. Huen M, Chen J. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Research* 2008; 18:8-16.
100. Zhang J, Powell SN. The Role of the BRCA1 Tumor Suppressor in DNA Double-Strand Break Repair *Mol Cancer Res* 2005; 3:531-539.
101. Husain A, He G, Venkatraman ES, et al. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 1998; 58:1120 -3.
102. Sylvain V, Lafarge S, Bignon YJ. Dominant-negative activity of a Brca1 truncation mutant: effects on proliferation, tumorigenicity in vivo, and chemosensitivity in a mouse ovarian cancer cell line. *Int J Oncol* 2002; 20:845–53.
103. Lafarge, S., Sylvain, V., Ferrara, M. and Bignon, Y.J. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene* 2001, 20: 6597–6606.
104. Quinn, J.E., Kennedy, R.D., Mullan, P.B, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2003, 63:6221-28.
105. Tomlinson, G.E., Chen, T.T.L., Stastny, V.A., et al. Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. *Cancer Res.* 1998, 58, 3237–3242.
106. Kennedy RD, Quinn JE, Johnston PG, et al. BRCA1: mechanisms of inactivation and implications for management of patients. *Lancet* 2002; 360:1007-14.
107. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet.* 2004 Oct 15; 13(20):2443-9.
108. Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, et al. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 2008; 3: e3695.
109. Wang L, Wei J, Qian X, et al. ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel. *BMC Cancer* 2008; 8: 97.
110. Quinn JE, James CR, Stewart GE, et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13:7413-20.
111. Kim H, et al. Ubiquitin-Binding Protein RAP80 Mediates BRCA1-Dependent DNA damage response. *Science* 2007; 316:1202-4.
112. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA response. *Science* 2007; 316:1194-8.

113. Sobhian B, et al. RAP80 Targets BRCA1 to Specific Ubiquitin Structures at DNA Damage Sites. *Science* 2007; 316, 1198-1201.
114. Yan J, Kim Y, Yang X, et al. The Ubiquitin-Interacting Motif-Containing Protein RAP80 Interacts with BRCA1 and Functions in DNA Damage Repair Response. *Cancer Res* 2007;67:6647-6656.
115. Wei J, Yu L, Costa C, Taron M, Rosell R, Liu B, et al. BRCA1 and RAP80 mRNA levels and median survival (MS) of advanced gastric cancer patients (p) treated with oxaliplatin plus 5-fluorouracil (FOLFOX). *J Clin Oncol* 2010; 28 (suppl; abstr e14602)
116. Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. *PLoS One* 2009; 4: e5133.
117. Ying Z, Li J, Li M. Astrocyte elevated gene 1: biological functions and molecular mechanism in cancer and beyond, *Cell & Bioscience* 2011; 1:36.
118. Hu G, Wei Y, Kang Y. The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(18): 5615-5620.
119. Sarkar D, Emdad L, Lee SG, et al. Astrocyte Elevated Gene-1: Far More Than Just a Gene Regulated in Astrocytes. *Cancer Res* 2009; 69:8529-8535.
120. Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Sarkar D, Franke TF, Fisher PB, et al. Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt signaling. *Oncogene* 2008, 27:1114-1121.
121. Emdad L, Lee SG, Su ZZ, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106:21300-21305.
122. Li J, Zhang N, Song LB, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a novel prognostic marker for breast cancer progression and overall patient survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3319-3326.
123. Yu C, Chen K, Zheng H, et al. Overexpression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is associated with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) progression and pathogenesis. *Carcinogenesis* 2009; 30:894-901.
124. Song L, Li W, Zhang H, et al. Overexpression of AEG-1 significantly associates with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2009; 219:317-326.
125. Yoo BK, Emdad L, Su ZZ, et al. Astrocyte elevated gene-1 regulates hepatocellular carcinoma development and progression. *J Clin Invest* 2009; 119:465-477.
126. Liu H, Song X, Liu C, et al. Knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibits proliferation and enhancing chemo-sensitivity to cisplatin or doxorubicin in neuroblastoma cells, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2009; 28:19.

127. Santarpia M, Magri I, Sanchez-Ronco M, Costa C, Rosell R, et al. mRNA expression levels and genetic status of genes involved in the EGFR and NF-B pathways in metastatic non-small-cell lung cancer patients. *Journal of Translational Medicine* 2011; 9:163.
128. Li C, Li Y, Wang X, et al. Elevated expression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is correlated with cisplatin-based chemoresistance and shortened outcome in patients with stages III-IV serous ovarian carcinoma. *Histopathology* 2012; 60(6):953-63.
129. Ploeg M, Kiemeny LA, Smits GA, et al. Discrepancy between clinical staging through bimanual palpation and pathological staging after cystectomy. *Urol Oncol* 2012; 30:247-51.
130. Svatek RS, Shariat SF, Novara G, et al. Discrepancy between clinical and pathological stage: external validation of the impact on prognosis in an international radical cystectomy cohort. *BJU Int* 2011; 107:898-904.
131. Halebian GE, Skinner EC, Dickinson MG, et al. Hydronephrosis as a prognostic indicator in bladder cancer patients. *J Urol* 1998; 160: 2011-4.
132. Stimson CJ, Cookson MS, Barocas DA, et al. Preoperative hydronephrosis predicts extravesical and node positive disease in patients undergoing cystectomy for bladder cancer. *J Urol* 2010; 183: 1732-37.
133. Scosyrev E, Ely BW, Messing EM, et al. Do mixed histological features affect survival benefit from neoadjuvant platinum-based chemotherapy in patients with locally advanced bladder cancer? A secondary analysis of Southwest Oncology Group-Directed Intergroup Study (S8710). *BJU Int* 2010.
134. Streeper NM, Simons CM, Konety BR, et al. The significance of lymphovascular invasion in transurethral resection of bladder tumour and cystectomy specimens on the survival of patients with urothelial bladder cancer. *BJU Int* 2008; 103, 475-79.
135. Kunju LP, You L, Zhang Y, et al. Lymphovascular invasion of urothelial cancer in matched transurethral bladder tumor resection and radical cystectomy specimens. *J Urol*. 2008 Nov;180(5):1928-32.
136. Rosenblatt R, Sherif A, Rintala E, et al; the Nordic Urothelial Cancer Group.: Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increases survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle invasive urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2011.
137. Splinter TA, Scher HI, Denis L, et al. The prognostic value of the pathological response to combination chemotherapy before cystectomy in patients with invasive bladder cancer. European Organization for Research on Treatment of Cancer- Genitourinary Group. *J Urol* 1992; 147: 606.

138. Schultz PK, Herr HW, Zhang ZF et al. Neo-adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: prognostic factors for survival of patients treated with M-VAC with 5-year follow-up. *J Clin Oncol* 1994; 15: 1394-1401.
139. Martinez-Pineiro JA, Gonzalez Martin M, Arocena F, et al. Neoadjuvant cisplatin chemotherapy before radical cystectomy in invasive transitional cell carcinoma of the bladder: prospective randomized phase III study. *J Urol* 1995; 153:964–73.
140. GITSV (Italian Bladder Cancer Study Group): Neoadjuvant treatment for locally advanced bladder cancer: A randomized prospective clinical trial *J Chemother* 1996;8: 345-346.
141. Weight CJ, Garcia JA, Hansel DE, et al. Lack of pathologic downstaging with neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a contemporary series. *Cancer* 2009; 115:792-9.
142. Bellmunt J, Ribas A, Albanell J, et al. M-CAVI, a neoadjuvant carboplatin based regimen for the treatment of T2-4N0M0 carcinoma of the bladder. *Am J Clin Oncol* 1996; 19:344–8.
143. George B, Datar RH, Wu L, et al. p53 Gene and Protein Status: The Role of p53 Alterations in Predicting Outcome in Patients with Bladder Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5352-5358.
144. Theodorescu D, et al. A strategy for predicting the chemosensitivity of human cancers and its application to drug discovery. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104; 32:13086-13091.
145. Smith SC, Baras AS, Dancik G, et al. A 20-gene model for molecular nodal staging of bladder cancer: development and prospective assessment. *Lancet Oncol.* 2011; 12(2):137-143.
146. Sjödaahl G, Lauss M, Lövgren K, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(12):3377-86.
147. Urushibara M, Kageyama Y, Akashi T, et al. HSP60 may predict good pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2007 Jan; 37(1):56-61.
148. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2007; 2: e1129
149. Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, et al. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol* 2008; 39: 857–865.
150. Rosell R, Molina MA, Costa C, et al. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(5):1160-8.
151. Wei J, Costa C, Ding Y, et al. mRNA Expression of BRCA1, PIAS1, and PIAS4 and Survival After Second-line Docetaxel in Advanced Gastric Cancer *J Natl Cancer Inst* 2011;103(20):1552-1556.

152. Carsen JE, Quinn JE, Michie CO, et al. BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2011 Dec; 123(3):492-8.
153. Margeli M, Cirauqui B, Castella E, Tapia G, Costa C, Rosell R, et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PLoS One.* 2010; 3; 5(3).
154. Font A, Taron M, Gago JL, Costa C, Sánchez JJ, Rosell R, et al. BRCA1 mRNA expression and outcome to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *Ann Oncol.* 2011; 22(1):139-44.
155. Zhao Y, Moran MS, Yang Q, et al. Metadherin regulates radioresistance in cervical cancer cells. *Oncol Rep.* 2012 May; 27(5):1520-6