

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS.

Los carcinomas vesicales superficiales constituyen un heterogéneo grupo de tumores, siendo bien conocido el diferente comportamiento biológico y evolutivo que presentan, a pesar de su aparente similitud desde el punto de vista histológico.

Este problema se acentúa, cuando centramos nuestra atención en los tumores transicionales vesicales superficiales con grado histológico moderadamente diferenciado (G2). Mientras, los tumores vesicales G1 o bien diferenciados, evolucionan favorablemente con escasas recidivas y casi nula progresión, los tumores vesicales G3 o mal diferenciados presentan frecuentes recidivas y suelen progresar a formas invasivas en un elevado porcentaje de casos.

La razón de este comportamiento tan dispar en el grupo de tumores G2, puede venir originado por el hecho, de que aunque a nivel histológico sean tumores muy similares, a nivel molecular parecen existir anomalías tales como, alteraciones en el contenido total de ADN, alteraciones cromosómicas o mutaciones puntuales que los hace intrínsecamente diferentes.

Otro problema añadido a las posibles alteraciones a nivel molecular, radica en la subjetividad del diagnóstico anatómo-patológico. A pesar de que la valoración histológica del tumor por parte del anatómo-patólogo, continúa siendo la base ineludible y sobre la que se sustentan, tanto el tratamiento como la hipótesis pronóstica del enfermo afecto de una tumoración, hoy en día, se impone la búsqueda y desarrollo de nuevas técnicas y marcadores que aporten objetividad y reproducibilidad al diagnóstico histológico.

En la actualidad, los esfuerzos se están dirigiendo hacia el desarrollo y uso de técnicas citogenéticas y de biología molecular, que puedan aportarnos nuevos marcadores de recidiva y/o de progresión tumoral.

Entre estas técnicas se incluye la citometría, tanto de flujo como de imagen. La utilización protocolizada de la citometría de imagen podría paliar estas deficiencias diagnósticas, al permitir la valoración del contenido total del ADN de las células tumorales. La citometría de imagen posee otras características interesantes como son, la posibilidad de visualizar los detalles citológicos de la muestra y seleccionar las células de interés. Además,

aporta un gran número de parámetros objetivos obtenidos a través del programa informático, que podrían ser utilizados a nivel diagnóstico y terapéutico en los tumores vesicales superficiales, tal como se viene haciendo en otros tipos de tumores, como es el caso de los tumores de mama, ovario y próstata, entre otros.

Creemos que los tumores G2pT1 no asociados a *Cis*, constituyen un grupo compacto que debe tener una tendencia de comportamiento específica, dependiendo únicamente de su contenido y estructura nuclear, y ello debe permitir que el análisis por citometría de imagen sea tal vez, el método más adecuado para obtener información pronóstica específica de esta cohorte.

En base a este planteamiento podríamos establecer la hipótesis nula que considera que el contenido de ADN determinado mediante citometría de imagen no tiene capacidad para predecir el desarrollo de recidiva de forma independiente del resto de parámetros clínico-histológicos clásicos y sin relación con el tiempo de evolución. Como hipótesis alternativa se establece que el contenido de ADN determinado por citometría de imagen si puede predecir la recidiva tumoral de forma independiente del resto de parámetros clásicos.

2.2. OBJETIVOS

1- Analizar la asociación entre las variables clínicas e histológicas de los tumores vesicales superficiales y la presencia de recidiva tumoral en nuestra serie global.

2- Determinar el contenido de ADN mediante citometría de imagen y estudiar si existe asociación entre dicho contenido de ADN y el desarrollo de recidiva tumoral en pacientes con tumores G2pT1.

3- Estudiar si la información sobre contenido de ADN aportada por la citometría de imagen tiene un valor predictivo de recidiva tumoral independientemente del tiempo de evolución. Evaluar si dicha información es independiente de la aportada por los parámetros clínicos clásicos, así como, establecer un modelo predictivo y crear grupos de riesgo que permitan estrategias terapéuticas más específicas.

3. *MATERIAL Y MÉTODOS*

3.1. PACIENTES.

Desde enero de 1989 a diciembre de 1993 se diagnosticaron e intervinieron en el servicio de Urología del Hospital del Mar, un total de 300 tumores vesicales superficiales "*de novo*", según datos obtenidos a través del Registro de tumores del Hospital del Mar.

Los criterios de inclusión de los pacientes en el estudio fueron:

- Existencia de muestra representativa tumoral en el bloque de tumor conservado en parafina, a partir del cual se obtendrá la suspensión nuclear.
- Seguimiento del enfermo mínimo de 3 años.
- Ausencia de *Cis* en la muestra y/o en las biopsias vesicales randomizadas²³⁶.

Estos criterios contribuyeron a una reducción de la serie quedando incluidos en el estudio de forma definitiva 82 pacientes, que conforman un grupo de estudio compacto y perfectamente definido. De cada paciente se recogió una hoja de datos en la que se incluyeron:

- Datos identificativos y administrativos.

- Datos clínicos:

- Edad

- Sexo

- Tabaquismo

- Presencia de anilinas

- Síntoma inicial

- Tratamiento:

- Resección transuretral

- Instilaciones endocavotarias (BCG+Mitomicina-C)

- Datos histológicos:

-Grado tumoral según la OMS:	-Grado I -Grado II -Grado III
-Estadio tumoral según TNM:	-pTa -pT1
-Histología tumoral:	-papilar -sólido
-Tamaño tumoral:	-<3 cm ->3cm
-Localización del tumor/es	
-Número de tumores	

- Datos evolutivos:

-Fecha de la primera recidiva tumoral
-Localización de la recidiva
-Fecha del último control clínico
-Estado del paciente en el último control

La Tabla 5 describe la muestra que conforma nuestra serie:

Tabla 5.- Descripción de las características clínicas, histológicas y evolutivas de la muestra.

<i>Características</i>	<i>Nº pacientes</i>	<i>(%)</i>
<i>Sexo:</i>		
<i>Mujer</i>	10	(12.2)
<i>Hombre</i>	72	(87.8)
<i>Tabaquismo</i>	58	(70.7)
<i>Anilinas</i>	3	(3.7)
<i>Grado:</i>		
<i>I</i>	8	(9.8)
<i>II</i>	58	(70.7)
<i>III</i>	16	(19.5)
<i>Estadio:</i>		
<i>pTa</i>	32	(39)

<i>pT1</i>	50	(61)
<i>Histología:</i>		
<i> papilar</i>	76	(92.7)
<i> sólido</i>	6	(7.3)
<i>Tamaño:</i>		
<i> < 3cm</i>	40	(48.8)
<i> > 3cm</i>	42	(51.2)
<i>Número tumores:</i>		
<i> 1 ó 2 tumores</i>	53	(64.6)
<i> ≥ 3 tumores</i>	29	(35.4)
<i>Recidiva:</i>		
<i> No</i>	44	(53.7)
<i> Si</i>	38	(46.3)

3.1.1. EDAD Y SEXO

La edad media de los pacientes es de 70 años, oscilando entre un mínimo de 45 años y un máximo de 95 años. La desviación estándar fue de 10.39 años y la mediana de 70 años.

Las mujeres de nuestra serie presentaron una edad media de 74.1 años (rango: 45-95 años) y desviación estándar de 14.3 años, mientras que los varones presentaron una edad media de 69.5 años (rango:52-86 años), desviación estándar de 9.5. La relación varón:mujer fue de 7:1.

3.1.2. TABAQUISMO

Aunque se recogió el dato correspondiente al número de cigarrillos consumidos por cada paciente, únicamente se valoró el hecho del hábito tabáquico como presente vs. ausente.

3.1.3. SÍNTOMAS QUE ORIGINARON EL DIAGNOSTICO

El síntoma más frecuente a raíz del cual se llegó al diagnóstico fue la hematuria, en el 81.7% de los casos estudiados.

3.1.4. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO Y TRATAMIENTO.

El estudio histológico de nuestra serie agrupó a los pacientes en función del grado

histológico y del nivel de infiltración tumoral tal como muestra la Tabla 6:

Tabla 6.- Distribución de los pacientes según grado histológico y nivel de infiltración.

Grado/pT	Nº pacientes	(%)
<i>Grado I</i>	8	(9.8)
<i>pTa</i>	7	(87.5)
<i>pT1</i>	1	(12.5)
<i>Grado II</i>	58	(70.7)
<i>pTa</i>	22	(37.9)
<i>pT1</i>	36	(62.1)
<i>Grado III</i>	16	(19.5)
<i>pTa</i>	3	(18.7)
<i>pT1</i>	13	(81.3)

En 76 pacientes (93%) se reseccionaron tumores papilares y sólo en 6 enfermos (7%) se reseccó una tumoración de aspecto papilar-sólido.

Tras el diagnóstico, a todos los pacientes se les practicó resección transuretral (RTU) de la lesión o lesiones tumorales endovesicales, seguido de quimioprofilaxis endocavitaria con mitomicina-C y BCG.

3.1.5. RECIDIVA TUMORAL

Tras el tratamiento inicial, los tumores grado II y grado III mostraron un comportamiento con respecto a la recidiva bastante parejo, de forma que recidivaron el 47,4% de los tumores grado II y el 37.5% de los tumores grado III.

3.1.6. LOCALIZACIÓN DE LA RECIDIVA TUMORAL.

Los tumores que presentaron recidiva lo hicieron a un área vesical diferente a la que debutaron en un 24.4% de los casos y a la misma zona de origen en el 15.8%.

3.1.7. TRATAMIENTO ADYUVANTE POST-CIRUGIA.

Todos los enfermos recibieron quimioterapia endovesical en forma de instilaciones mensuales alternas de Mitomicina-C y BCG según protocolo, durante un año.

3.2. METODOLOGÍA. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ADN.

3.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA PARA CONSEGUIR LA SUSPENSIÓN NUCLEAR.

Una vez localizado en la tumoroteca el bloque que contenía el tumor fijado en formalina y embebido en parafina, se realizó un corte de 5 micras para tinción con hematoxilina-eosina, con la finalidad de comprobar la existencia de material tumoral representativo, y un corte de 50 micras a partir del cual se conseguiría la suspensión nuclear de la forma que se expone a continuación.

Los tubos de ensayo que contenían las muestras tumorales de 50 micras junto con 5 ml de xilol, eran introducidos en un baño de agua a 60°C, durante 30-45 minutos, agitándose los tubos periódicamente.

Tras este tiempo, se eliminaba el xilol y se cambiaba por otros 5 ml del mismo, permaneciendo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Nuevamente, se eliminaba el xilol, y a partir de este momento se procedía a rehidratar la muestra, realizando lavados con alcoholes en concentración decreciente acabando con lavados con agua destilada. La inmersión de la muestra en cada concentración de alcohol se realizaba durante siete minutos y se repetía dos veces (100% ^{2x} 95% ^{2x} 70% ^{2x} 50% ^{2x} Agua destilada). Durante todo el proceso los tubos se agitaban periódicamente. El último baño con agua destilada se dejaba en el tubo y se procedía a centrifugar durante cinco minutos a 1320 rpm.

Tras la centrifugación se eliminaba el sobrenadante y se añadían 5 ml de pepsina al 0.5% con cloruro de sodio y un pH de 1.5. Nuevamente eran sumergidas en un baño de agua a 37°C durante 60 minutos.

Posteriormente se filtraba todo el contenido del tubo de ensayo a través de una malla de 80 micras de poro, en un nuevo tubo de ensayo que contenía PBS frío (Solución tampón salina). Se procedía a centrifugar, según las condiciones descritas previamente, y se eliminaba el sobrenadante. Nuevamente se agregaba PBS frío (3ml) y se volvía a centrifugar en idénticas condiciones. El sobrenadante era eliminado y el precipitado se extendía en un portaobjetos dejándose secar a temperatura ambiente.

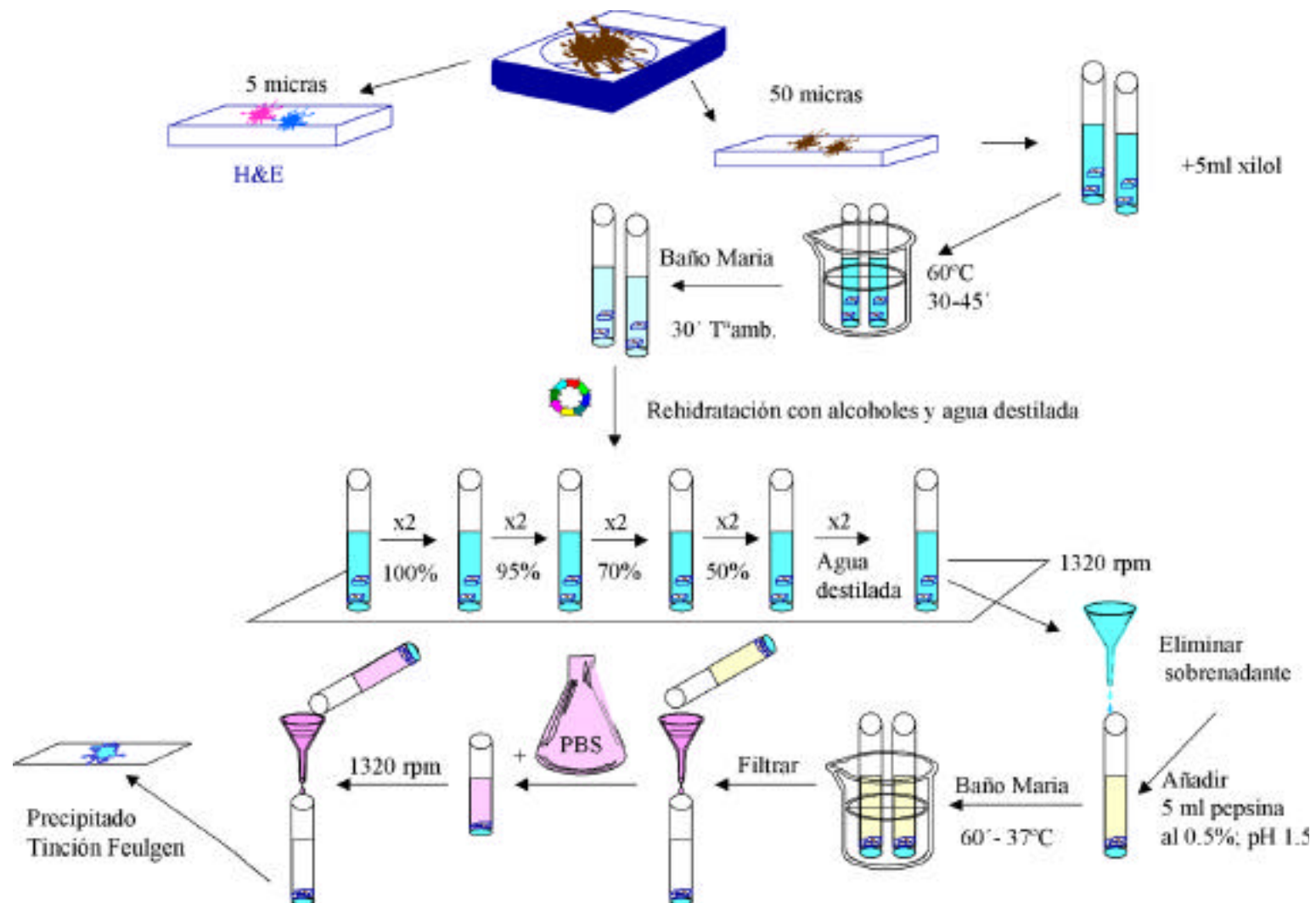


Figura 23.- Tratamiento de las muestras para conseguir la suspensión nuclear.

Una vez aquí, se realizaba la tinción de Feulgen tal como se describe a continuación.

3.2.2. TINCIÓN DE FEULGEN.

La reacción de Feulgen consta de los siguientes pasos:

- *Hidrólisis ácida.* Se introduce directamente el portaobjetos en una solución de CIH 6N durante 60 minutos a una temperatura de 25°C,
- *Lavado en agua corriente* durante un minuto, seguido de otros dos lavados de un minuto en agua destilada. Se agitan suavemente los portaobjetos con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de impurezas.
- *Tratamiento con el reactivo de Schiff* durante una hora a una temperatura de 25°C y en la oscuridad. Se procura que los portaobjetos tengan la menor cantidad de agua posible al entrar en el reactivo de Schiff, pero evitando que se sequen. Durante todo el proceso los portaobjetos son agitados suave y periódicamente. Con el fin de obtener la estandarización de la técnica y de los resultados se ha utilizado siempre el mismo reactivo de Schiff comercial. Tras teñir 75 preparaciones se cambia el baño reactivo antes de que adquiera un color rosado.
- *Lavado en baño sulfuroso* durante un minuto, a temperatura ambiente tres veces consecutivas para eliminar el exceso de colorante.
- *Lavado en agua corriente* de 10 minutos de duración.
- *Deshidratación y montaje* de las muestras para su estudio.

Las soluciones de trabajo fueron preparadas de la siguiente forma:

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| - Solución de CIH 6N: | CIH 36.5%.....50 cc |
| | Agua destilada.....50 cc |
| - Reactivo de Schiff: | Reagent Merck Ref. 9033 |
| - Solución de baños sulfurosos: | Metasulfito Sódico.....0.5 cc |
| | CIH 1N.....5 cc |
| - Agua destilada | hasta 1000 cc. |

Es imprescindible incluir en cada lote de preparaciones problema, al menos un portaobjetos que contenga núcleos con una cantidad de ADN conocida, con la finalidad de que sirvan de referencia externa y permitan controlar la linealidad del sistema. En este estudio se han utilizado improntas de hepatocitos de rata.

3.2.3. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO Y METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS CITOMÉTRICO DEL ADN.

El equipo de análisis de imagen utilizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar consta de:

- Microscopio.....Axioskop 20 (Zeiss)
- Video cámara CCD.....JVC Profesional (KY-F30E)
- PC.....Compaq Prolinea 4/66
- Monitores.....Sony-Trinitron y Super Fine Pitch
- Software.....SAMBA 2005

Para la cuantificación de los parámetros morfométricos y densitométricos mencionados anteriormente, se usó el programa de análisis de imagen Ploidy 4.1 diseñado en el entorno del procesador SAMBA 2005 (Alcatel-TITN, Grenoble, France), que permite cuantificar la cantidad total del ADN de los núcleos teñidos según el método de Feulgen.

Este programa permite captar con la videocámara CCD imágenes microscópicas de los núcleos celulares. Así mismo, el programa permite revisar las imágenes digitalizadas y grabadas en cualquier momento del análisis, por medio de la opción llamada "galeria" que ofrece el programa.

En el tratamiento de las imágenes se distinguen dos partes:

- 1.- Captación y procesado de la imagen.
- 2.- Análisis de los datos de la imagen procesada.

El análisis se inicia con el “*set up*” o puesta a punto del sistema, durante el cual se fijan las condiciones de captación y medida de las imágenes que requiere el equipo instrumental para efectuar las medidas densitométricas, así como, la identificación de la muestra y del paciente, el tipo de tinción, la resolución óptica y la fijación de los criterios morfométricos de inclusión y exclusión de los núcleos. Estas condiciones varían en función de las características de cada muestra.

Las imágenes son captadas en una escala de 256 niveles de grises (blanco y negro) y en la elaboración de estas imágenes intervienen varias funciones:

- 1) Sustracción de la imagen de fondo: consistente en restar la imagen de fondo captada previamente a la imagen problema.
- 2) Umbralización automática por segmentación interactiva: permite discriminar los núcleos del fondo.
- 3) Normalización de los niveles de grises de la imagen frente a los que corresponden al patrón externo.

Básicamente existen dos formas de proceder durante el análisis de ADN:

- 1.- El *contaje sistemático* de células tumorales de forma aleatoria, y sin poner especial interés en representar aquellas zonas formadas por los grupos celulares más atípicos.
- 2.- El *contaje selectivo* de células tumorales que implica revisar toda la muestra celular y representar todas las zonas que muestran mayor atípicidad celular.

Ya que el enfoque de este estudio está orientado a predecir el comportamiento biológico tumoral hemos considerado más indicado el *contaje selectivo* de células tumorales, siendo conscientes de que los valores obtenidos serán menos reproducibles y comparables, pero por el contrario, reflejarán mejor la presencia de distintas poblaciones tumorales atípicas. Con esto se pretende aportar mayor sensibilidad al método, permitiendo establecer un pronóstico más individualizado de cada paciente.

Una vez aclarados estos puntos se describe de forma sucinta el proceso analítico, el

cual consta de los siguientes pasos:

- Establecer las condiciones de iluminación de Köhler en el microscopio.
- Identificación del paciente y de la muestra según el protocolo establecido.
- Ajuste de los parámetros morfológicos (diámetro máximo y diámetro mínimo), que permiten rechazar artefactos y elegir los núcleos incluidos en el estudio.
- Utilización del objetivo de 40x que proporciona una resolución óptica de $0.16\mu\text{m}^2$
- Determinación de los factores de corrección obtenidos a partir de la referencia externa (hepatocito de ratón con valor de $c = 5 \text{ pg}$), con respecto a la muestra problema (especie humana, valor de $c = 6 \text{ pg}$). El factor de corrección que se obtiene es de 1.2.
- Calibración de la técnica mediante el análisis de la referencia externa. En nuestro estudio se han utilizado núcleos de hepatocitos de rata, lo cual nos permitirá la graduación del eje X del histograma de ADN. Esto implica determinar la DOI que equivale a $2c$. Así mismo, se debe realizar el análisis de la referencia interna, por medio de la cual se calibra y obtiene el factor de corrección que se requiere para cada una de las muestras analizadas. El proceso consiste en captar la imagen de fondo (campo blanco) previamente a la imagen problema, y se establecen las condiciones de intensidad de luz entre 200 y 230 expresado en función de la escala de grises. A continuación, las imágenes nucleares digitalizadas son depuradas comparándolas con las imágenes de fondo, la cual es restada de la imagen problema, corrigiéndose así las alteraciones de iluminación debidas al sistema óptico y/o fuente lumínica. Posteriormente, los valores de las densidades ópticas integradas obtenidas son normalizadas y relacionadas con la concentración de ADN, obteniéndose el histograma que

representará la distribución de frecuencia de los núcleos en función de su contenido de ADN.

Es obvio que la intensidad lumínica ha de permanecer constante durante todo el análisis.

- Análisis de la referencia externa. En este estudio se seleccionaron y cuantificaron entre 50 y 100 núcleos de hepatocito de rata como referencia externa. Se aceptó como calibrado válido coeficientes de varianza comprendidos entre 0 y 8. Una misma referencia externa es válida

para todas aquellas muestra tumorales teñidos en el mismo baño de tinción.

- Análisis de la muestra tumoral y de la referencia interna. Se cuantificaron 200 núcleos tumorales seleccionados según criterios morfológicos propios de las características de las células tumorales (tamaño, pleomorfismo, hiperchromasia y textura cromatínica). Se procedió a revisar toda la muestra, con el fin de representar aquellas zonas con células tumorales que pudieran relacionarse con un pronóstico menos favorable. Se puso mucha atención en que los núcleos seleccionados estuviesen en el enfoque óptico correcto y que la membrana nuclear se conservara intacta. Al iniciar el análisis se determina la referencia interna. Según las características de la muestra se escogieron linfocitos o fibroblastos. En aquellos casos en que se escogieron linfocitos se evitaron los linfocitos picnóticos y se elegían aquellos que presentaban una textura cromatínica apreciable. Los linfocitos densos poseen un 20 a 30% menos de cantidad de ADN por efecto de la condensación cromatínica. Simultáneamente, se seleccionaron de 20 a 30 núcleos procedentes de células normales incluidas en la muestra tumoral con la finalidad de confirmar el pico 2c. En ocasiones, para obtener el pico en 2c, el programa aplica un factor de corrección en función de la referencia interna que corrige la desviación respecto a 2c de los núcleos que constituyen la muestra problema. Una vez confirmada la exactitud del pico 2c este conjunto de núcleos normales son eliminados del histograma a través de la galería.

3.2.4. OBTENCIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL ANÁLISIS CITOMÉTRICO.

En la introducción hemos descrito las características de todas las variables obtenidas durante el análisis citofotométrico de ADN (apartado 1.6).

Entre estas variables se distinguen una densitométrica, la *DOI* y una morfométrica, el área media nuclear (AMN).

La *DOI* se expresa en unidades arbitrarias (u.a.), que opcionalmente pueden ser transformadas automáticamente por el programa en unidades de contenido en ADN nuclear, ya que ambas unidades son proporcionales entre sí (2100 u.a.= un contenido total en ADN nuclear de 2c).

El programa genera los histogramas de distribución de frecuencias de los núcleos (200 núcleos) en función de su contenido total en ADN y proporciona las variables citométricas relacionadas referidas a las distintas subpoblaciones del conjunto de la muestra tumoral (DP, DH, IP).

Las variables citométricas deducidas de los histogramas de ADN son muchas, pero solamente un número reducido de éstas se ha podido relacionar con el comportamiento biológico del tumor.

En este estudio hemos utilizado cuatro variables en función del contenido total en ADN nuclear, con la finalidad de obtener una valoración lo más objetiva posible del comportamiento maligno del tumor. Son:

1) Clasificación de tipos de histograma de ADN

Los histogramas de ADN representan la distribución de la población de núcleos frente a su contenido en ADN.

Del análisis de muestras tumorales se obtienen distintos histogramas de ADN. Las diferentes representaciones gráficas de estos histogramas, que dependen de la distribución del contenido total en ADN nuclear de cada muestra, permiten la clasificación de histogramas según tipos. En relación al tipo de histograma identificado, se le asigna un patrón de ploidía de ADN.

En este estudio hemos clasificado los histogramas según los criterios descritos por A.Sampedro (1996)¹⁹⁴.

Aplicando estos criterios, los histogramas de ADN se han clasificado en diploides, tetraploides y aneuploides:

- *Diploides*, muestran un pico en la región diploide o cercano a diploide, con IADN 0.9 y 1.1, y los núcleos en la posición tetraploide (4c) son inferiores al 20% (Figura 24).
- *Tetraploides*, muestran un pico anómalo que representa más del 20% del total de los núcleos situados en la región 4c, con un IADN entre 1.8 y 2.2 .y además la presencia de algunos

núcleos en la región comprendida entre los valores 4c y 8c (Figura 25).

- *Aneuploides*, se subdividen en dos tipos,

a) el *hiperdiploide*, con un pico anómalo que comprende a más del 15% de los núcleos analizados en la región entre 2c y 4c, con IADN = 1.2 y 1.8, () y

b) el *hipertetraploide*, que presenta un pico o un conjunto de picos anómalos por encima de la región 4c los cuales comprende a más del 15% de los núcleos y un IADN > 2.2 (Figura 27.- Histograma de ADN tipo hipertetraploide.).

Para nuestro estudio, hemos considerado los tumores diploides como euploides, y hemos clasificado como aneuploides, no sólo los tumores hiperdiploides e hipertetraploides, sino también los tetraploides.

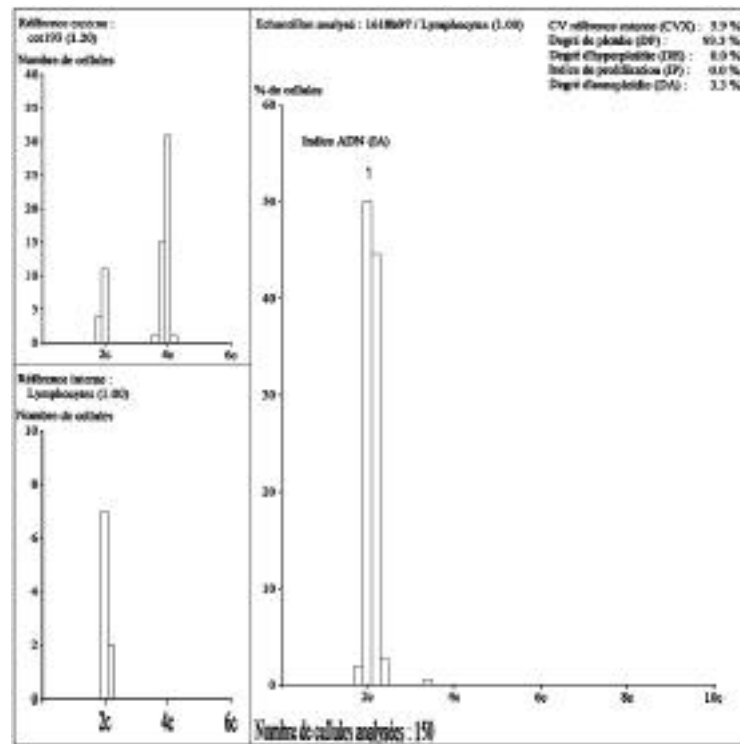


Figura 24.- Histograma de ADN tipo diploide (tejido normal).

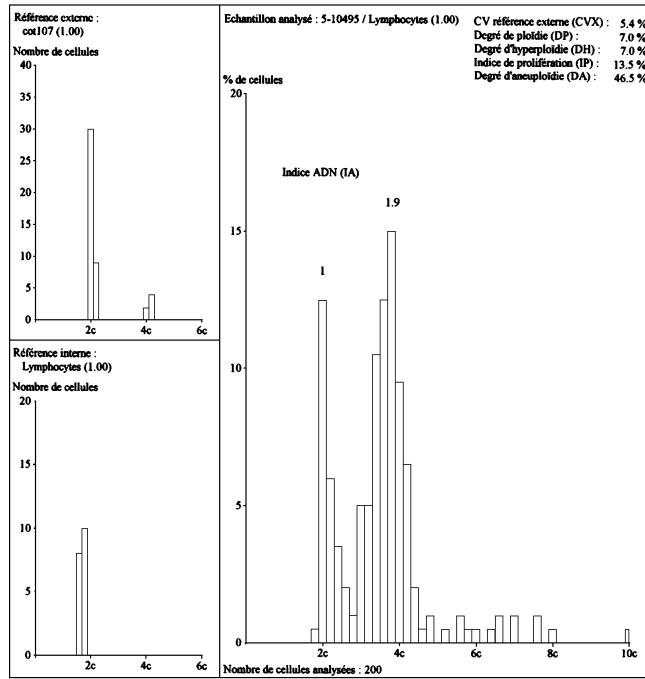


Figura 25.- Histograma de ADN tipo tetraploide.

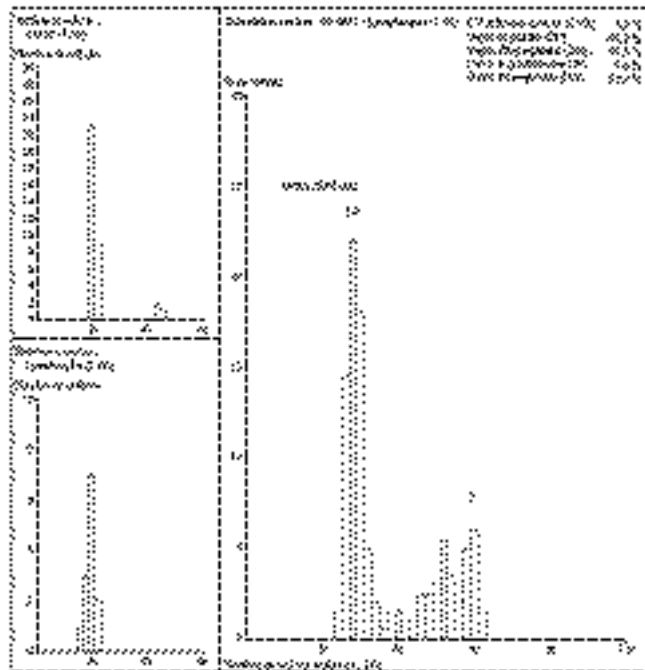


Figura 26.- Histograma de ADN tipo hiperdiploide

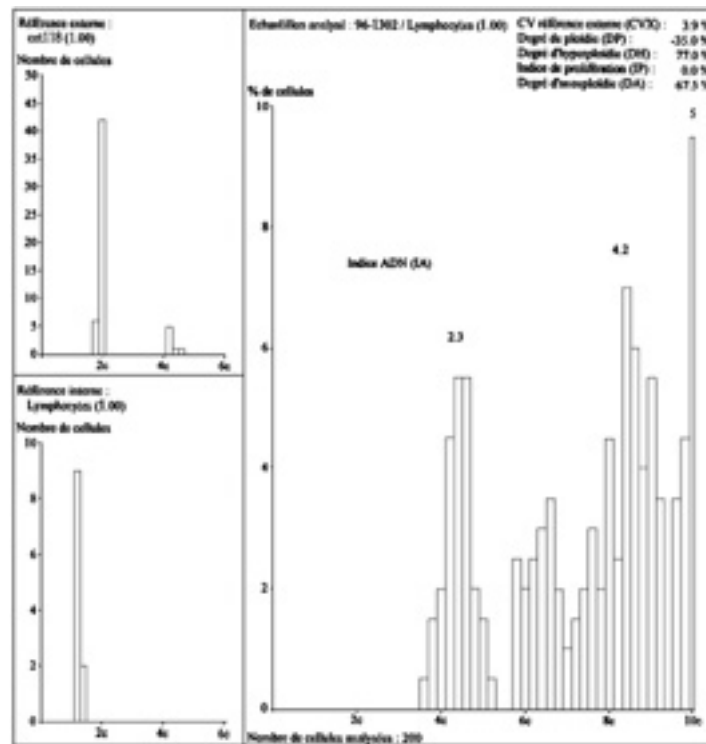


Figura 27.- Histograma de ADN tipo hipertetraploide.

Así mismo, y siguiendo los criterios descritos por Auer et al. en 1984¹⁹⁵, se clasificaron los histogramas en cuatro tipos:

- *Tipo I*: histogramas con un único pico diploide (2c) y escasas células desviadas del valor normal.

- *Tipo II*: pueden darse dos posibilidades,

1) un pico en la región tetraploide (4c) ó

2) dos picos, uno en 2c y otro en 4c con escasas células comprendidas entre dichos picos o entre 4c y 8c.

- *Tipo III*: difiere del tipo II en que presenta un número elevado de células con contenido de ADN entre 2c y 4c, además existe una proporción de células consideradas en fase S que indican la presencia de un proceso proliferativo.

- *Tipo IV*: presentan aneuploidía marcada de ADN con valores comprendidos entre 2c y 6c ó igual ó mayor a 8c.

Ya que en la literatura revisada la agrupación de histogramas propuesta por Auer es discutida en cuanto a su utilidad como factor pronóstico, junto al hecho de que la agrupación en un tipo u otro está sujeta a la subjetividad del ojo humano, se ha introducido un nuevo parámetro, el grado de malignidad, propuesto por Böcking et al¹⁶⁷.

2) Grado de hiperploidía (DH)

El cálculo del DH lo ejecuta el programa utilizado. Su valor expresa el % de los núcleos existentes en la población considerada cuyo contenido total en ADN nuclear es superior a 5c. Este valor también se expresa como 5cER.

Cuanto más alto es el valor del DH, mayor es el contenido total en ADN nuclear anómalo presente en la muestra tumoral. Este valor se relaciona directamente con el potencial maligno del tumor analizado.

3) Índice de proliferación (IP)

Indica el número de núcleos comprendidos entre los picos 2c y 4c representando el porcentaje de células que se encuentran en fase S o fase de síntesis de ADN.

Su valor se calcula, al igual que el grado de ploidía dividiendo los histogramas en 10 clases tal como se muestra en la Figura 28. El índice de proliferación (IP) es igual a la suma de porcentajes de células proliferantes (CP) estimadas dentro de las clases de ploidía situadas entre los picos principales (MP y MP*) que son euploides o aneuploides.

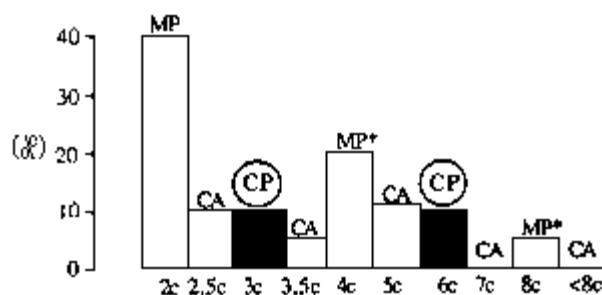


Figura 28.- Cálculo del índice de proliferación.

4) Grado de malignidad (GM-ADN)

El GM-ADN es una variable compleja obtenida a partir de dos variables simples. El programa utilizado no suministra su valor por lo que se ha de calcular aparte.

Böcking et al. en 1984¹⁶⁷ fueron los primeros en describir y utilizar esta variable en un estudio citofotométrico de ADN en el cáncer de mama. En estudios sobre distintos tipos de neoplasias estos autores observaron que el GM-ADN mostraba un elevado significado biológico.

El cálculo del GM-ADN requiere la obtención previa del DH y del índice de desviación respecto 2c (2cDI).

En el apartado anterior hemos definido el DH, como aquel valor que representa el % de la población celular con contenido en ADN nuclear superior a 5c.

El cálculo del 2cDI es más laborioso. La información de partida es la DOI, dato suministrado por el programa para cada núcleo de la muestra.

Teniendo en cuenta los factores de corrección obtenidos a partir de las referencias interna y externa, el valor de la DOI de cada núcleo se transforma en valor de contenido en ADN expresado en múltiplos de 1c.

El siguiente paso es el sumatorio de las diferencias al cuadrado entre el contenido de

ADN de cada núcleo (c_i) y el del valor de referencia $2c$. La suma se divide por el número total de núcleos cuantificados y el resultado obtenido es el 2cDI expresado en unidades de c^2 .

La expresión matemática del 2cDI es:

$$2cDI = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (c_i^2)$$

El producto del 2cDI por el DH se define como *índice de malignidad* (IM-ADN) que matemáticamente se expresa como:

$$\text{"IM - ADN"} = 2cDI \cdot DH$$

Finalmente el GM-ADN según Böcking, se obtiene con la fórmula siguiente, en la que los valores de GM-ADN correspondientes al mínimo y al máximo valor de IM-ADN son 0 y 3 respectivamente.

$$\text{"GM - ADN"} = 3 \times \frac{\log(\text{"IM - ADN"} + 1)}{\log(\text{"IM - ADN"} \text{ máx de las muestras})}$$

Se ha observado que cuanto más maligno es el tumor, tanto mayores y más dispersos son los valores de contenido total en ADN nuclear. El 2cDI aumenta con la dispersión y con el incremento de los valores obtenidos, considerándose en su cálculo el contenido total en ADN nuclear de todas las células cuantificadas en la muestra tumoral.

Aunque el potencial maligno de los tumores aumenta con el tamaño de la fracción de células aneuploides con un contenido total en ADN nuclear superior a $5c$ ($5cER$), el IM-ADN tiene un significado biológico más elevado que sus variables por separado. Recordemos que el IM-ADN es el producto formado por el 2cDI y el $5cER$.

5) Área media nuclear (AMN)

De la medida del área nuclear (AN) derivan dos parámetros, el área media nuclear (AMN) y la media de las áreas medias nucleares (MAMN). El AN es una característica del

núcleo, el AMN se refiere a una población celular y la MAMN a una serie de casos estudiados.

Los valores de AN y de AMN los suministra directamente el programa SAMBA 2005. El AN es igual a la suma del número total de píxeles abarcados por la representación del núcleo, de manera que, conociendo la correspondencia entre píxel y área, la obtención de ésta es directa. En nuestro estudio hemos expresado el área en píxeles.

El AMN es la suma de los valores de AN de cada núcleo de la muestra, dividido por el número total de núcleos que la constituyen. En este estudio, siempre hemos incluido un total de 200 núcleos.

La media del AMN es la suma del AMN de todas las muestras pertenecientes a una serie, dividida por el número de muestras agrupadas en esa serie.

La interpretación biológica de la medida del AN se basa en su relación directa con el tamaño del núcleo y su contenido en ADN. En general, se verifica que cuanto más alto es el contenido en ADN, mayor es el tamaño del núcleo y el de su AN.

El valor del AMN correspondiente a una muestra tumoral está relacionado con el promedio de su contenido total en ADN. Al aumentar el tamaño promedio de los núcleos también aumenta el promedio de su contenido en ADN anómalo. Se observa una mayor atípia nuclear en la población celular que se identifica con un grado nuclear más elevado.

3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Tanto los datos clínicos de los pacientes que comprende nuestra serie, como los obtenidos del estudio citométrico de las muestras tumorales correspondientes, fueron recogidos y almacenados en el soporte magnético de un ordenador PC Pentium configurando la base de datos de nuestro estudio.

Se realizó un estudio estadístico descriptivo de la serie y un estudio estadístico comparativo o inferencial. Todas las pruebas estadísticas se hicieron con una significación de

0.05 y las estimaciones con un intervalo de confianza del 95%. La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando el programa estadístico SPSS-PC versión 8.0.

3.2.6. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Se realizó un análisis de la distribución de frecuencias de las variables cualitativas y un cálculo de distintos estadísticos de distribución cuantitativa (media aritmética, mediana, desviación típica y valores máximos y mínimos) mediante las fórmulas habituales.

3.2.6.1. Estadística descriptiva

Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar el ajuste a la distribución normal o de Gauss. Se emplearon diversos métodos estadísticos comparativos para analizar las diferencias de los distintos parámetros clínicos y citométricos.

3.2.6.2. Análisis univariante

3.2.6.2.1. Test de significación estadística para variables cualitativas

Para el estudio de la asociación entre dos variables cualitativas, se ha utilizado la prueba Chi-cuadrado aplicando el test exacto de Fisher en aquellos casos en los que uno de los números esperados en alguna de las casillas de la tabla de contingencia tuviera un valor inferior a cinco.

La prueba de tendencia (variable de la prueba Chi-cuadrado), fue útil para analizar una variable binomial y otra variable categorizada de forma ordinal. Determina si los porcentajes de la variable respuesta están relacionados con el orden propio de la variable de clasificación (tendencia positiva o negativa). La significación estadística indica que la probabilidad de respuesta tiende a cambiar de un grupo a otro de acuerdo con el orden entre ellos.

3.2.6.2.2. Test de significación estadística para variables continuas.

Para comparar una variable continua y una variable cualitativa de dos categorías el test estadístico utilizado fue el Test-t de Student.

Cuando la comparación de medias de los descriptores citométricos entre grupos no fue normal, se utilizó el test no paramétrico de U de Mann-Whitney.

El análisis de la varianza de un factor (ANOVA) se empleó para la comparación de medias muestrales de más de dos categorías independientes. Si la distribución de variables continuas no era normal, el contraste se resolvió mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

La relación entre variables citométricas cuantitativas se ha medido mediante el test de correlación lineal de Pearson. Cuantifica esta relación de forma que coeficientes próximos a 1 indican gran correlación y un coeficiente 0 supone ausencia de correlación.

Dado que en nuestro estudio se considera como dato útil el considerar la aparición del fenómeno "recidiva tumoral", en cualquier momento en el tiempo de la evolución del enfermo, no se han realizado pruebas estadísticas con poder para definir este evento como la prueba de regresión de Cox.

Igualmente y dado que sólo hemos considerado el fenómeno biológico de recidiva tumoral y no el de progresión tumoral no se ha realizado análisis del tiempo de supervivencia ni del tiempo libre de progresión mediante el método actuarial de Kaplan-Meier.

3.2.6.3. Análisis multivariante. Regresión logística.

En investigación clínica, a menudo nos interesa conocer si un cierto evento (variable respuesta), importante en el curso de la enfermedad, ocurrirá o no y los factores (variables explicativas) que potencialmente pueden influir en la aparición del evento. Tal es el caso de la aparición de recidiva o progresión de la enfermedad tras una intervención quirúrgica por un determinado proceso neoplásico. El examen de cada factor por métodos univariantes nos ofrece una idea previa de la importancia que presenta la variable de forma aislada. Para conocer su importancia relativa teniendo en cuenta la posible interrelación con otras variables, es preciso examinarlas de modo simultáneo. De esta forma, llegamos a conocer el valor específico de la influencia de cada una de las variables en la ocurrencia del evento estudiado.

Teniendo en cuenta que, el objetivo principal de este estudio era determinar la

capacidad para predecir la recidiva tumoral en los tumores pT1 G2 a partir de la información aportada por una serie de variables explicativas procedentes del estudio morfométrico y de contenido de ADN, se decidió utilizar un modelo matemático de regresión logística. Dicho modelo es el análisis estadístico multivariante más adecuado para determinar la asociación entre un conjunto de variables explicativas continuas o categóricas y una variable respuesta de carácter binario.

El modelo de regresión logística estima directamente la probabilidad de que un evento ocurra. Cuando se introducen más de una variable explicativa, viene definido por la siguiente fórmula:

$$\text{Probabilidad de que el evento ocurra} = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$

Donde Z es la combinación lineal de $B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p$. A su vez, los B son los coeficientes estimados a partir de los datos, X son el conjunto de variables explicativas introducidas en el modelo y e es la base natural de logaritmos que aproximadamente es 2.718.

3.2.6.3.1. Desarrollo de la regresión logística

Para llevar a cabo el análisis, en primer lugar, se determinaron las variables que deberían ser consideradas como respuesta y como explicativas. Con relación a la variable respuesta, se considero "*recidiva*" a la presencia de tumor en la misma localización donde se resecó el tumor primario o bien en otra localización, siempre y cuando mediara un intervalo de 6 meses desde la RTU y con una evaluación cistoscopia previa limpia. Como variables explicativas se introdujeron todas aquellas derivadas del estudio morfométrico y de contenido de ADN.

Las variables explicativas con dos categorías fueron codificadas como 0 y 1 y consideradas como binarias. En las variables explicativas con más de dos categorías, se crearon también $n-1$ variables *dummy* tomando el primer valor como categoría de referencia.

De esta forma se pudo estimar el diferente efecto de pasar de una categoría a otra sobre la variable respuesta.

Para la estimación de los coeficientes del modelo se utilizó el método de máxima verosimilitud. Para testar la hipótesis de que los coeficientes obtenidos eran diferentes a 0 se utilizó el estadístico de Wald (valor del coeficiente obtenido dividido por su error estándar al cuadrado).

La interpretación de los coeficientes en la regresión logística fue directa y expresan la unidad de cambio en la variable respuesta por cada unidad de cambio en la variable explicativa. Se realizó mediante el exponencial del coeficiente que permite su interpretación en términos clínicos. Su valor es el factor por el cual se multiplica la odds de la respuesta estudiada al incrementarse en una unidad el valor de la variable predictora.

La bondad de ajuste del modelo se realizó mediante la comparación entre los casos predichos como recidiva y los casos observados realmente. Igualmente, se dibujaron histogramas de la probabilidad estimada de recaer *versus* no recaer para cada caso. De esta forma se pudo comprobar la dispersión de los casos con relación al punto de corte 0.5.

La selección de las variables con capacidad predictiva se realizó mediante procedimiento por pasos (stepwise) hacia adelante condicional (forward) y hacia atrás (backward) observando los cambios en los valores de los coeficientes para detectar cualquier evento de interacción o confusión. Se emplearon todos los posibles conjuntos de variables. El test de la ratio-probabilidad se utilizó para estimar si una variable debía o no ser introducida en el modelo.

3.2.6.3.2. Estrategia de análisis

La recidiva es un hecho consustancial a la historia natural del tumor superficial de vejiga. La probabilidad de su aparición se relaciona directamente con el estadio patológico y grado de diferenciación de malignidad. Otros factores asociados son el tamaño del tumor primario y la multiplicidad tumoral. El objetivo principal de la presente tesis era estudiar si las variables derivadas del estudio morfométrico y del contenido de ADN aportan información predictiva de recidiva tumoral independiente de la aportada por el resto de factores

considerados como clásicos. De esta forma, una vez seleccionado el grupo de tumores G2pT1, realizamos una regresión logística utilizando como variables explicativas únicamente a los factores pronósticos considerados como clásicos: tamaño tumoral y multiplicidad tumoral. Además, la edad del paciente fue introducida como variable categorizada. En segundo lugar, realizamos una regresión logística incluyendo como variables explicativas las procedentes del estudio morfométrico y del contenido de ADN. Por último, para determinar si la información predictiva aportada por estas variables mejoraba la capacidad predictiva de los factores clásicos se realizó un tercer análisis de regresión logística. En este último análisis, como variables explicativas, se introdujeron todas las variables conjuntamente.