ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de la sobreexpresión de proteína HER2 en cáncer vesical no músculo invasivo con énfasis en el grado tumoral y en la recurrencia

A. Janane^{a,*}, F. Hajji^a, T.O. Ismail^a, J.C. Elondo^a, M. Ghadouane^a, A. Ameer^a,
M. Abbar^a y A. Bouzidi^b

^a Departamento de Urología, Hospital Militar Universitario Mohamed V, Rabat, Marruecos

^b Departamento de Patología, Hospital Militar Universitario Mohamed V, Rabat, Marruecos

Recibido el 5 de septiembre de 2010; aceptado el 16 de noviembre de 2010

PALABRAS CLAVE

Proteína HER2;
Marcador pronóstico;
CCT vesical;
Comportamiento
tumoral

Resumen

Objetivo: evaluar el valor pronóstico de la expresión de la HER2 en carcinoma vesical de células transicionales (CCT) no músculo invasivo, poniendo especial énfasis en la población con alto grado.

Materiales y métodos (pacientes): se realizaron micromatrices de tejidos (TMA) con especímenes TUR-B representativos de 84 pacientes con CCT vesical no músculo invasivo (40 pT1GII y 44 pT1GIII) a los que se trataba en nuestra institución. El mismo patólogo que había llevado a cabo la prueba ciega de análisis inmunohistoquímico con Hercep realizó el proceso de asignación de profundidades de invasión y grados de manera uniforme: se consideró el valor 3+ como signo altamente positivo de sobreexpresión de la HER2. También se evaluaron otras variables clínico-patológicas.

Resultados: se detectó sobreexpresión de proteína HER2 en 30/ 44 (68,2%) lesiones pT1GIII, prediciendo recaídas en este subgrupo de CCT vesical ($p < 0,01$). Se detectó expresión negativa de la HER2 en 26/ 40 (65%) casos con CCT pT1GII, dándose esta situación con mayor frecuencia en tumores unifocales y sin angiogénesis, con baja tasa de recaída y sin evolución. La supervivencia libre de recidiva puede también preverse mediante la expresión de la HER 2 en los tumores pT1GII ($p < 0,01$).

Conclusión: la expresión de la HER2 mediante test Hercep puede ser de utilidad en la predicción de recaídas en CCT vesical no músculo invasivo. El potencial de aplicación de este estudio, sobre todo en lo que se refiere a la predicción de la respuesta a BCG, debe confirmarse de forma prospectiva en ensayos multicéntricos.

© 2010 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: a.janane@yahoo.fr (A. Janane).

KEYWORDS

HER2 protein;
Prognosis marker;
Bladder TCC;
Tumour behaviour

Evaluation of HER2 protein overexpression in non-muscle invasive bladder cancer with emphasis on tumour grade and recurrence

Abstract

Objective: to evaluate the prognostic value of HER2 expression in non-muscle invasive bladder transitional cell carcinoma (TCC) with special emphasis in the high grade population.

Materials and methods (patients): Tissue microarrays (TMA) were performed with representative TUR-B specimens from 84 patients with non-muscle invasive bladder TCC (40 pT1GII and 44 pT1GIII) treated in our institution. Depth of invasion and grade were uniformly assigned by the same pathologist who performed blind immunohistochemical analysis with Hercep test: 3+ was considered strong positive HER2 overexpression. Other clinico-pathological variables were also assessed.

Results: HER2 protein overexpression was detected in 30/44 (68.2%) pT1GIII lesions and predicted recurrence in this subgroup of bladder TCC ($p < 0.01$). Negative HER2 expression was detected in 26/40 (65%) cases with pT1GII TCC, and this condition was more frequent in unifocal tumours, without angiogenesis, with low recurrence rate and without progression. Recurrence-free survival can also be anticipated by HER 2 expression within pT1GII tumours ($p < 0.01$).

Conclusion: HER2 expression using Hercep test may be useful to predict recurrence in non-muscle invasive bladder TCC. The potential application of this study, especially regarding prediction of response to BCG, should be prospectively confirmed in multi-institutional trials.

© 2010 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La sobreexpresión de la proteína HER2 se asocia con un mal pronóstico en carcinomas vesicales de células de transición (CCT)^{1,2}. Debido a la aplicación de diversas técnicas de laboratorio, sigue sin conocerse la incidencia precisa que pueden tener las anomalías de HER2 en este tipo de neoplasia³. Por consiguiente, son necesarias técnicas de laboratorio normalizadas para establecer el estado de la HER2 y evaluar la reproducibilidad de la prueba para que sea posible evaluar de forma correcta el valor potencial que los tratamientos anti HER2 pudieran tener en el control del CCT.

En cuanto al cáncer vesical urotelial, la mayoría de los pacientes suelen presentar tumores no invasivos (pTa) o mínimamente invasivos (pT1). Es más probable que los primeros presenten recidivas (70%), mientras que los segundos tienen mayores probabilidades de evolucionar clínicamente (30-50%)^{4,5}. Aparte del estadio y grado del tumor, se carece de otras variables que permitan predecir un mayor riesgo de evolución y recaídas. Por consiguiente, será de gran utilidad la identificación de marcadores histológicos para que sea posible prever el comportamiento tumoral y clasificar y tomar decisiones respecto a la forma de tratar este grupo de pacientes.

Según la clasificación USIP⁶, las neoplasias vesicales no músculo invasivos de alto grado (los casos pT1G3 anteriores y algunos casos pT1G2) presentan un mayor riesgo de evolución y muerte tumoral. Nuestro objetivo principal consistió en la realización de un análisis sistémico de la expresión de la HER2 y de su trascendencia clínica en este tipo de lesiones.

Materiales y métodos

Población de pacientes y tejidos

Se ha realizado un estudio prospectivo que ha ocupado un periodo de 7 años (de enero de 2000 a febrero de 2007). En el análisis sólo se incluyeron pacientes con diagnóstico inicial de cáncer vesical, y el material patológico disponible para el análisis histopatológico ciego procedía de resecciones vesicales transuretrales realizadas mediante endoscopia (TUR-b). El mismo patólogo examinó portas tratados con hematoxilina-eosina (HE) con el fin de evaluar de nuevo el grado y estadio de los tumores. En cuanto al estadio se aplicó la clasificación TNM, empleándose el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la calificación de los tumores por grados.

El seguimiento de los pacientes se realizó en intervalos de tres meses y mediante cistoscopia y citología urinaria. Concluido el primer año se realizó el control de los pacientes sin recaídas en periodos de 6 meses a lo largo de esos 5 años. Las distintas modalidades de tratamiento consistieron en resecciones transuretrales reiteradas, con instilación intravesical del bacilo de Calmette y Guérin (BCG) cuando fue necesario, de acuerdo con criterios regulares^{7,8}. Se definieron las recidivas como el diagnóstico de un nuevo episodio de carcinoma no invasivo (pTa) o no músculo invasivo (pT1). La evolución se definió en términos de desarrollo de lesiones invasivas de músculo (pT2 o superior).

Micromatrices tisulares e inmunohistoquímica

Se utilizaron muestras de tejido en parafina de 84 pacientes. Las micromatrices tisulares se elaboraron en la forma

descrita por Dowsett et al⁵. Al poco de haber elegido detenidamente una región morfológicamente representativa de la sección HE y seleccionado los bloques incluidos en parafina de los pacientes (bloques donantes), se punzó una biopsia tisular de 0,6 mm, transfiriéndose al bloque donante incluido en parafina (bloque receptor). Se realizó tinción HE de una sección para valorar la presencia de tumor bajo microscopio óptico. Se procesaron por inmunohistoquímica (IHC) secciones de 4 micras de grosor.

La expresión de la HER2 se calculó con el test Hercep (Dako, Hamburgo, Alemania). Al poco se desparafinaron secciones de TMA con xileno, rehidratándose con alcohol en concentración decreciente y sometiendo a recuperación de epítomos mediante calor (epítipo Dako, 40 minutos a 98 °C). A continuación se incubaron los portas con reactivo de bloqueo de la peroxidasa, seguido del anticuerpo policlonal HER2 (30 minutos a temperatura ambiente). La fijación del anticuerpo principal se localizó incubando los portas con reactivo de visualización Dako. Como control positivo se incluyó un porta con sedimento de tres líneas celulares de cáncer de mama en microesferas pellet e intensidades de coloración de 0, 1+ y 3+ (se suministraba con el kit de prueba Hercep). El control negativo se elaboró sustituyendo el anticuerpo principal con disolvente de anticuerpo Chemmate de Dako. Se consideró como positiva una clara coloración de la membrana (expresión de la HER2).

La inmunorreactividad se evaluó teniendo en cuenta la media de valores positivos en especímenes TUR-B. En consonancia con lo definido en la guía del Kit Hercep y en cuanto a sobreexpresión de la HER2 se consideraron negativos los valores 0 o 1+ (HER-), los 2+ se valoraron como positivos bajos, y los 3+ como positivos altos (HER+++). Para que se asignase la puntuación 2+ debía observarse una coloración total de la membrana de moderada intensidad en más del 10% de las células tumorales.

Análisis estadístico

Se compararon subgrupos de CCT pT1 según la clasificación del tumor (II o III) con el fin de analizar la posible presencia de diferencias en estado de la HER2 mediante la prueba exacta de Fisher. Asimismo, se investigó su relación con recaídas tumorales. Los intervalos de supervivencia sin recaídas ni evolución clínica se calcularon con el método Kaplan-Meier, teniendo también en cuenta otras variables con posible valor pronóstico, como edad en el momento de la aparición, sexo, clasificación del tumor, existencia de varios focos, angiogénesis y presencia de carcinoma *in situ* (CIS).

Resultados

La [tabla 1](#) ofrece la información clínica e histológica de forma resumida. El promedio de seguimiento fue de $38 \pm 16,2$ meses. En 12 casos se practicó cistoprostatectomía radical tras producirse evolución clínica, casos en que el paciente falleció por enfermedad metastática.

Se consignaron y analizaron tanto las características de los tumores (existencia de varios focos, angiogénesis, CIS concomitante) como la información relativa al comportamiento y resultado clínico (recaídas, evolución y muerte) con el fin de valorar las posibles diferencias entre

Figura 1 Sobreexpresión intensa de la HER (HER+++), revelada por tinción IHC de membrana en más del 10% de las células.

poblaciones de grados intermedios y altos con CCT sin invasión muscular.

Subgrupo pT1GII

Se detectó una intensa sobreexpresión de la HER2 (HER+++), en 14/ 40 pacientes (el 35%) en este grupo poblacional de nuestra serie ([fig. 1](#)). De ellos, 8 pacientes pT1GII (HER+++), (el 57,1%) desarrollaron recaídas tumorales. Este tipo de suceso siempre se observó en los dos primeros años de seguimiento. En cuanto al patrón de recaídas 4 (el 28,6%) desarrollaron recaídas en varios focos. Estos 4 casos con PT1 GII (HER +++) en varios focos han evolucionado hacia tumores pT2 GIII al cabo de dos años. Se valoró invasión muscular en unos 28, el 4% del subgrupo PT1GII (HER+++): 4 casos de un total de 14.

Las restantes 26 lesiones pT1GII (el 65%) dieron un resultado negativo al test Hercep (HER-) ([fig. 2](#)). Es de destacar que el índice de recaída en esta población fue sumamente reducido, con sólo 4 casos de 26 (15,4%) que aparecían como recaídas en los controles regulares, y siempre antes del cuarto año de seguimiento. Asimismo, estos casos siem-

Figura 2 Expresión negativa de la HER (HER-), revelada por ausencia de tinción IHC de membrana.

Tabla 1 Datos clínicos e histopatológicos de la serie

	pT1GII	pT1GIII	Total
Número de casos	40	44	84
Edad media (años)	53,2	56,1	54,8
Proporción de sexos	9:1	6,3:1	7,4:1
Diversidad de focos	24/40 (60%)	20/44 (45,4%)	44/84 (52,4%)
CIS	8/40 (20%)	8/44 (18,2%)	16/84 (19%)
Presencia de angiogénesis	14/40 (35%)	24/44 (54,5%)	38/84 (45,2%)
Sobreexpresión intensa de la HER	14/40 (35%)	30/44 (68,2%)	44/84 (52,4%)

pre recaían en forma de lesiones pTa gastrointestinales. Por tanto, se observó una estrecha asociación entre los tumores pT1GII (HER-) y una menor tasa de recaída, así como un intervalo libre de recaídas más prolongado en cuanto a tumores pT1GII (HER +++) (fig. 3).

Subgrupo pT1GIII

Se observó una sobreexpresión acusada de la HER2 (HER+++) en 30/ 44 muestras (68,2%) en esta población dentro de nuestra serie. De ellas se presentaron recaídas en 16/ 30 (53,3%) en tumores pT1GIII (HER+++) en el transcurso del seguimiento realizado para el estudio. El análisis histopatológico de las recaídas manifestó la existencia de pTaGII en 10 casos y de pTaGI en los 6 pacientes restantes.

En cuanto a la evolución 12/ 30 (40%) pacientes pT1GIII (HER +++) incluídos en el estudio evolucionaron hacia tumores de alto grado con invasión muscular. Se les practicó una cistectomía seguida de quimioterapia adyuvante con cisplatino y gemcitabina. El análisis histológico mostró afectación extracapsular de ganglios linfáticos e invasión de vasos linfáticos en todos los casos. Además, en 4 casos de 12 (33,3%) se constató invasión ureteral con sincronización a nivel pelviano. Todos los pacientes en los que se dio evolución clínica murieron por la enfermedad durante el seguimiento.

Por otra parte, el desenlace clínico fue positivo en los pacientes con lesiones pT1GIII y HER2 negativa (HER-), ya que respondieron adecuadamente a las instilaciones de BCG. Sólo en dos casos de un total de 14 (14,3%) se detectaron recaídas en los tres primeros años de seguimiento en forma

de pTaGI, no evolucionando ninguno de ellos hacia enfermedad con invasión muscular. Por consiguiente, los tumores pT1GIII (HER-) se asociaron de forma significativa a una menor tasa de recaídas y a un mayor periodo libre de las mismas en comparación con los tumores pT1GIII (HER +++) (fig. 4).

Exposición

En torno al 20-35% de los CCT sin invasión muscular (pT1) evolucionan hacia la invasión muscular o más allá^{1,2}. En torno al 50% de estas lesiones suele desarrollar una diversidad de alteraciones genéticas que pueden ser responsables del desarrollo del fenotipo recurrente y maligno^{3,4}. Se ha descrito que se da con frecuencia polisomía del cromosoma 17 en tumores de alto grado, con independencia de la poliploidía tumoral⁵.

Simon et al han descrito la presencia de polisomía 17 en el 0% de los tumores grado 1, en el 30-40% de los de grado 2 y en el 70-85% de los de grado 3⁹. El protooncogen HER2, que se encuentra en el cromosoma 17q21, codifica un receptor transmembranoso del factor de crecimiento de la tirosina-quinasa para esta proteína (HER2)¹⁰. La proteína acelera la multiplicación, proliferación y evolución del CCT vesical, y su selectividad y especificidad puede cambiar dependiendo del anticuerpo empleado. Asimismo, la fijación y procesamiento de tejidos y la recuperación de antígenos puede influir en el nivel de antígenos HER2 y en la intensidad de la inmunotinción^{11,12}.

Figura 3 Supervivencia en ausencia de recaídas de acuerdo con expresión de la HER en tumores pT1GII.

Figura 4 Supervivencia en ausencia de recaídas de acuerdo con expresión de la HER en tumores pT1GIII.

La descripción de la expresión de la HER en carcinoma urotelial ha variado entre el 2% y el 79%^{13,14}. Las diferencias en la incidencia de la expresión podrían muy bien explicarse en términos de la diversidad de métodos empleados para valorar el estado HER (detección de amplificación frente a detección de sobreexpresión), la técnica utilizada (PCR, hibridación por fluorescencia *in situ* e inmunohistoquímica), y también por la definición específica que se dé a positividad HER^{13,14}. En esta área la comparación del material bibliográfico disponible se torna enormemente difícil, y apenas es posible extraer conclusiones significativas de los datos generales. De hecho, no se ha puesto a prueba la reproducibilidad de los diversos métodos de laboratorio¹⁴.

Nuestra intención era medir la expresión de la proteína HER en especímenes TUR-B procedentes de cáncer vesical no músculo invasivo. La intensidad de la sobreexpresión no se limitó al grado alto definido por la OMS (grado III), sino que se mostró también en algunos carcinomas diferenciados moderados (grado II), una población con un potencial de recaída muy heterogéneo^{14,15}. Según nuestra experiencia, la valoración de la sobreexpresión de la HER en este grupo podría contribuir a predecir su comportamiento. Otros autores han indicado ya que podría permitir decidir qué pacientes podrían beneficiarse más de la terapia BCG^{2,16}.

En los modelos contemporáneos de evolución del CCT vesical se comparan los tumores pTaGIII con los pT1GIII en cuanto a número de copias de HER y en una sobreexpresión de la proteína que apunta hacia la equivalencia¹⁷. Las lesiones que evolucionan a enfermedad invasiva del músculo adquieren anomalías HER2/new antes de la invasión muscular. Se cree que la activación de oncogenes se produce de manera tardía, y que la mayoría de los cambios genéticos se producen antes de que la enfermedad evolucione¹⁷.

Hemos centrado nuestro análisis en el carcinoma urotelial no invasivo del músculo y de alto riesgo. La evolución de estos pacientes hacia las variedades invasivas del músculo se sitúa entre el 27 y el 49%⁸. En la mayoría de los estudios, la variabilidad inter e intraobservador para clasificar y estadificar las lesiones y, más concretamente, en que la TUR-B sea completa, son variables que inducen a confusión. El error de clasificación del estadiaje a la baja, que se

da entre el 23 y el 41%, y que puede encontrarse en series grandes de cistectomías, se debe en su mayor parte a la ausencia de una segunda TUR-B antes de la cistectomía^{5,16}. Esta última identificaría invasión muscular en el 18-34% de los casos diagnosticados inicialmente como tumores no invasivos del músculo. A pesar del tratamiento con BCG, en torno al 20% de los pacientes acaba por evolucionar en el plazo de 5 años^{16,17}. No existen recomendaciones claras con las que se disfrute de un nivel de evidencia claro en el caso de los pacientes que desarrollan recaídas tumorales, a pesar de la terapia con BCG^{17,18}. Se ha apuntado que la expresión de la HER, asistida por otros marcadores de proliferación como la ploidía, sería de utilidad en la selección temprana de pacientes refractarios a la quimio o inmunoterapia intravesicales¹⁴. Asimismo, la amplificación y sobreexpresión de la HER han suscitado una enorme atención debido a que, una nueva terapia focalizada adyuvante (trastuzumab) podría probar su eficacia en este tipo de situaciones de actividad proliferativa grave, a menudo relacionada con la resistencia a la BCG en enfermedad no invasiva del músculo^{3,14,19}.

La sobreexpresión de la proteína en nuestro estudio tuvo como consecuencia un mayor potencial de recaídas, que probablemente contribuyese a un fenotipo maligno de lesiones no claramente diferenciadas¹⁹. Se plantea la necesidad de abundar en la investigación para valorar los posibles mecanismos que pudieran ser responsables de la sobreexpresión de la HER2 en algunas lesiones no invasivas del músculo y trabajar en sus consecuencias terapéuticas en este grupo de CCT. Pruebas recabadas del cáncer de mama apuntarían a que sólo los tumores con sobreexpresión de la HER2 responderían a la terapia anti HER2. El papel que este fármaco puede tener en tumores recurrentes o resistentes a BCG no ha sido puesto a prueba en la actualidad^{18,19}. Lebret et al informaron de una respuesta objetiva del 83% en CCT vesical localmente avanzado, sobre todo en pacientes con una intensa sobreexpresión de la HER. Estos resultados se explicaban por una interacción muy amplia y positiva entre los fármacos (cetuximab o Trastuzumab) y HER (ligandos y receptores del HER)²⁰.

No pueden extraerse resultados concluyentes del presente estudio, hecho que se debe en parte al número

limitado de pacientes. No obstante, hemos observado que la expresión de HER está presente en algunos tumores vesicales no músculo invasivos con alto riesgo de recaída a pesar de la terapia. El pronóstico, trascendencia y utilidad terapéutica de estos resultados precisa de un desarrollo posterior de la investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Elisa S, Ali HS, Al tonsi AH, Zaglol A, El ahmady O. HER2/neu expression in bladder cancer: relationship to cell cycle kinetics. *Clin Biochemistry*. 2005;38:142–8.
2. Christopher L, Coogan A, Estrada CR, Kapur S, Kenneth JB. HER2/neu protein overexpression and gene amplification in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2004;63:786–90.
3. Raica M, Zylis D, Cinpeam AM. Cytokeratin 20, 34 beta E12 and overexpression of HER-2/neu in urine cytology as predictors of recurrences in superficial urothelial carcinoma. *J Morphol Embryo*. 2005;46:11–5.
4. Wallerand H, Bernhard JC, Culine S, Ballanger P, Robert G, Reiter RE, et al. Targeted therapies in non muscle invasive bladder cancer according to the signal pathways. *Urologic Oncology*. 2009;13:624–32.
5. Latif Z, Watters D, Dunn I, Grigor M, Underwood M, Bartlett JM. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in GIII PT2 transitional carcinoma of the bladder: a role for anti-HER2 therapy? *Eur J Cancer*. 2004;40:56–63.
6. Babjuk M, Oosterlink W, Sylvester R, Kaasien E, Böhle A, Palo-Redorta J. Guía clínica del carcinoma urotelial no músculo invasivo de la Asociación Europea de Urología. *Actas Urol Esp*. 2009;33:361–71.
7. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology Classification of urothelial (transitional) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol*. 1998;22:1435–48.
8. Gelabert A. *Monografías de Urología Oncológica. Cáncer vesical que no infiltra músculo. Recomendaciones diagnósticas, terapéuticas y de seguimiento*. Barcelona: Marge Medical Books; 2007.
9. Langner C, Gross C, Peter R, Ratschek M, Rucshoff J, Zigeuner R. HER2 protein over expression and amplification in transitional cell carcinoma: systemic analysis applying tissue microarray technique. *Urology*. 2005;65:176–80.
10. Press MF, Hung G, Godolphin, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue: potential source of error in Immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*. 1994;54:2771–7.
11. Pérez EA, Roche PC, Jenkins RB, Reynolds CA, Halling KC, Ingle JN, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescent in situ hybridization. *Mayo Clin Proc*. 2002;77:148–54.
12. Kruger S, Weitsch G, Buttner H, Matthiensen A, Bohmer T, Marquardt T, et al. HER overexpression in muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer*. 2002;102:514–8.
13. Wester K, Sjostrom A, De la Toore M, Carlson J, Malmstrum PU. HER-2 a possible target for therapy of metastatic urinary bladder carcinoma. *Acta Oncol*. 2002;41:282–8.
14. Sauter G, Moch H, Moore D. Heterogeneity of HER2 gene amplification in bladder cancer? *Cancer Res*. 1993;53:2199–203.
15. Underwood M, Bartlett J, Reeves J, Cooke TC. HER-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder cancer? *Cancer Res*. 1995;55:2422–30.
16. Latif Z, Watters AD, Dunn I, Underwood MA, Grigor KM, Bartlett JMS. HER/neu overexpression in the development of muscle invasive TCC of the bladder. *Br J Cancer*. 2003;89:1305–9.
17. Simon R, Atefy R, Wagner U, Forster T, Fijan A, Bruderer J, et al. HER2 and TOP 2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer*. 2003;107:764–72.
18. Eltze E, Wulfig C, Von Struensee D, Hansjürgen P, Horst B, Lothar H. Cox2 and HER2/neu coexpression in invasive bladder cancer. *Int J Oncol*. 2005;26:1525–31.
19. Tetu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Rberge N, Bernard P. Prevalence and clinical significance of the HER-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol*. 1996;155:1784–8.
20. Lebre T, Méjean A. Metastatic Transitional cell carcinomas: the future and perspectives. *Prog Urol*. 2008;7:277–84.