

De rol van circulerende tumorcellen bij het urotheelcarcinoom van de blaas

N. Beije · S. Sleijfer · J.L. Boormans

Published online: 25 November 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Samenvatting Ondanks curatieve lokale behandeling ontwikkelt 50% van de patiënten met een spierinvasief urotheelcarcinoom van de blaas metastasen op afstand. Betrouwbare markers die de kans op metastasering na curatieve behandeling voorspellen en die gebruikt kunnen worden voor indicatiestelling voor perioperatieve systemische therapie ontbreken. Circulerende tumorcellen (CTC's) zijn kankercellen die aanwezig zijn in het bloed van patiënten met solide tumoren en zijn afkomstig van tumorlaesies in het lichaam. CTC's zijn in verschillende tumoren prognostisch van belang gebleken bij het voorspellen van de kans op metastasen bij individuele patiënten. Deze review gaat in op de meest relevante literatuur omtrent de klinische waarde van CTC's bij blaaskanker. Bovendien wordt de CirGuidance-studie gepresenteerd. Dit is de eerste interventiestudie waarin, aan de hand van CTC's, de beslissing wordt getest omtrent het wel of niet geven van neoadjuvante chemotherapie aan patiënten met een spierinvasief blaascarcinoom.

Trefwoorden circulerende tumorcellen · CTC's · urotheelcarcinoom · blaaskanker · spierinvasief · CirGuidance

dr. J.L. Boormans (✉)
afdeling Urologie, Erasmus MC Kanker Instituut, Universitair Medisch Centrum Rotterdam,
Rotterdam, Nederland
e-mail: j.boormans@erasmusmc.nl

drs. N. Beije · prof. dr. S. Sleijfer
afdeling Interne Oncologie, Erasmus MC Kanker Instituut,
Universitair Medisch Centrum Rotterdam,
Rotterdam, Nederland

The role of circulating tumor cells in urothelial cell carcinoma of the bladder

Summary Patients with muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder have a 50% chance to develop distant metastases despite curative local treatment. Reliable markers that predict the risk of developing metastases or that could be used to determine whether or not perioperative systemic treatment should be given are lacking. Circulating tumor cells (CTCs) are cancer cells that are present in the blood stream of patients with solid tumors and originate from tumor lesions that are present in the body. The enumeration of CTCs is an attractive option to assess the chance to develop distant metastases in individual patients. Here, we set out to review the most relevant literature to date regarding the clinical value of CTCs in bladder cancer. Moreover, the CirGuidance study is presented, which is the first interventional trial, which uses CTCs to guide treatment choices regarding the administration of neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle-invasive urothelial cell carcinoma.

Keywords circulating tumor cells · CTCs · bladder cancer · urothelial cell carcinoma · muscle-invasive · CirGuidance

Introductie

Blaaskanker is een veel voorkomende maligniteit bij zowel mannen als vrouwen in de westerse wereld [1]. In Nederland is de incidentie tussen 2001 en 2011 met 30% toegenomen en jaarlijks wordt de diagnose nu bij meer dan 6000 patiënten gesteld [2]. Blaaskanker betreft in 90% van de gevallen een urotheelcarcinoom, maar ook plavei-



selcelcarcinomen (5–8%), adenocarcinomen (2%), neuro-endocriene carcinomen (<1%) en sarcomen (<1%) komen voor. Het urotheelcarcinoom van de blaas dat zich beperkt tot de mucosa of de lamina propria (niet-spierinvasieve blaaskanker) wordt behandeld middels een transurethrale resectie van de tumor en intravesicale behandelingen met chemo- of immunotherapie. Als het urotheelcarcinoom is doorgesloegen tot in de spierlaag (spierinvasieve blaaskanker) is de behandeling van keuze een radicale cystectomie met uitgebreide lymfeklierdissectie. Synchronie (chemo) radiotherapie is een alternatief voor radicale chirurgie bij patiënten die geen chirurgie kunnen of willen ondergaan. Zowel chirurgie als (chemo)radiotherapie kan voorafgegaan worden door neoadjuvante cisplatinumhoudende chemotherapie, hetgeen een klein maar significant overlevingsvoordeel op de lange termijn geeft (6% overlevingswinst na 10 jaar) [3]. De prognose van patiënten met spierinvasieve blaaskanker is matig met een vijfjaarsoverleving van rond de 50% na behandeling met curatieve intentie [4]. Dit betekent dat veel patiënten blootgesteld worden aan significante toxiciteit, terwijl maar een kleine groep patiënten baat heeft bij neoadjuvante chemotherapie (NAC). In de gemetastaseerde setting is de prognose ronduit slecht, met een mediane overleving van slechts 15 maanden [5]. Aangezien patiënten over het algemeen overlijden aan de gevolgen van de gemetastaseerde ziekte en niet aan de gevolgen van de primaire tumor, is het van het grootste belang om goede prognostische markers te hebben, die beter inzicht geven in de kans op het optreden van metastasen bij patiënten met een primair blaascarcinoom. Daarnaast zou zo'n prognostische marker kunnen helpen bij het nemen van klinische beslissingen rond het wel of niet geven van (neo)adjuvante chemotherapie. Het vaststellen of er sprake is van circulerende tumorcellen (CTC's) bij patiënten met spierinvasieve blaaskanker is in deze opzichten mogelijk een zeer aantrekkelijke optie.

CTC's zijn losse tumorcellen die van de primaire tumor of van een metastase zijn losgeraakt en in het bloed van een patiënt met een solide tumor kunnen circuleren. Alhoewel niet bij alle patiënten met gemetastaseerde ziekte CTC's kunnen worden aangetoond (dit is bijvoorbeeld het geval bij circa 60% van de patiënten met gemetastaseerd mammacarcinoom), en de hoeveelheid CTC's in het bloed extreem laag is (bij gemetastaseerd mammacarcinoom is het mediane aantal CTC's bijvoorbeeld 5 CTC's/7,5 ml bloed), correleert de aanwezigheid van deze CTC's in het bloed met de agressiviteit van de tumor [6]. In die hoedanigheid kunnen CTC's dan ook potentieel ingezet worden als een prognostische marker, als een mogelijke predictieve marker of als middel om respons op therapie te monitoren.

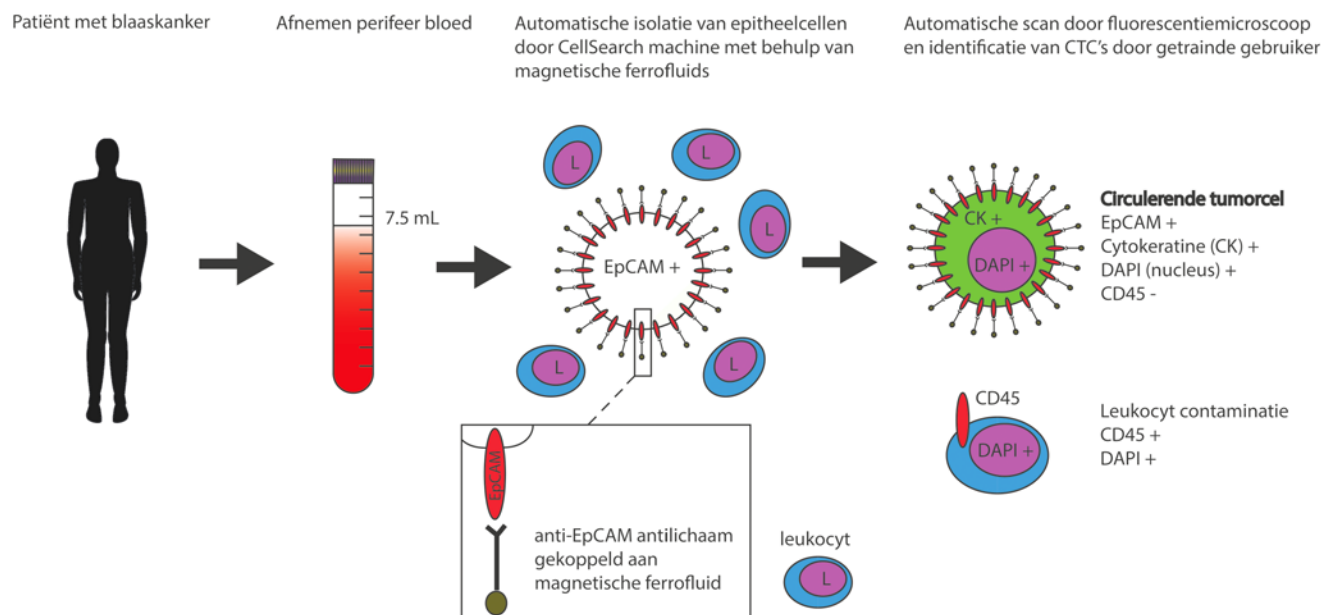
In deze review zal: (1) de huidige methodiek om CTC's te kwantificeren en te karakteriseren nader worden toegelicht, (2) de huidige literatuur omtrent het bewijs voor het

gebruik van CTC's bij patiënten met primair blaaskanker worden samengevat en (3) de toepasbaarheid van CTC's bij het nemen van klinische beslissingen nader worden beschouwd. Geëxcludeerd zijn studies waarin technieken zoals *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) [7] of immunomagnetische verrijkingen anders dan CellSearch zoals IsoFlux [8] werden gebruikt om CTC's te kwantificeren, mede omdat de sensitiviteit en specificiteit van deze technieken nog steeds ter discussie staat [9]. Aangezien de meeste studies de CellSearch-techniek hebben gebruikt om CTC's te kwantificeren, en dit de enige methode is die is goedgekeurd door de *Food and Drug Administration* (FDA) voor klinische toepassingen, worden alleen publicaties waarin de CellSearch-techniek is gebruikt belicht in dit artikel.

CellSearch-systeem voor de kwantificatie en karakterisering van CTC's

Verscheidene methoden zijn beschreven om CTC's uit het bloed te isoleren en te tellen en/of te karakteriseren, maar slechts één methode, het CellSearch-systeem, is op dit moment door de FDA goedgekeurd voor diagnostisch gebruik bij gemetastaseerd mammacarcinoom, gemetastaseerd prostaatcarcinoom en gemetastaseerd colorectaal carcinoom. Het CellSearch-systeem, waarvan de werking staat toegelicht in fig. 1, maakt gebruik van een immunomagnetische verrijking van epitheliale tumorcellen in het bloed. Door tumorcellen die de epitheliale marker EpCAM tot expressie brengen te labelen met een anti-EpCAM-antilichaam, dat is gekoppeld aan een magnetische *ferrofluid* (een minuscuul ijzeren bolletje), worden met behulp van een magneet alle EpCAM-positieve cellen uit 7,5 ml bloed geïsoleerd. Vervolgens worden de verrijkte cellen gekleurd met additionele antistoffen om aan te kunnen tonen dat de EpCAM-positieve cel daadwerkelijk een tumorcel is. Om een cel te kunnen karakteriseren als een CTC dient deze: 1) een celkern te hebben (positieve aankleuring met de kernkleuring DAPI), 2) cytokeratine (CK) 8, 18 of 19 tot expressie te brengen en 3) geen expressie van leukocytmarker CD45 te hebben. Na een scan van potentiële CTC's door middel van een geautomatiseerde microscoop, neemt een getrainde gebruiker de uiteindelijke beslissing of een cel wel of niet wordt gedefinieerd als een CTC op basis van de hier gebruikte definitie (EpCAM-positief, CK-positief, DAPI-positief, CD45-negatief) zoals vastgelegd in internationale criteria [10]. De CellSearch-methode heeft een zeer hoge specificiteit en produceert robuuste resultaten, zelfs bij CTC-tellingen die zo laag zijn als 1 CTC per 7,5 ml bloed, in het geval fouten door interbeoordelaarsvariabiliteit tot een minimum beperkt worden [11, 12]. Indien bloed wordt verzameld in een CellSave-buis die een mild fixatief bevat, kunnen CTC's tot 96 uur na afname nog betrouwbaar





Figuur 1 Telling van CTC's met behulp van het CellSearch-systeem (Bron: Beije et al., met toestemming vertaald [17]).

bepaald worden, hetgeen de methode ook geschikt maakt voor multicenteronderzoek.

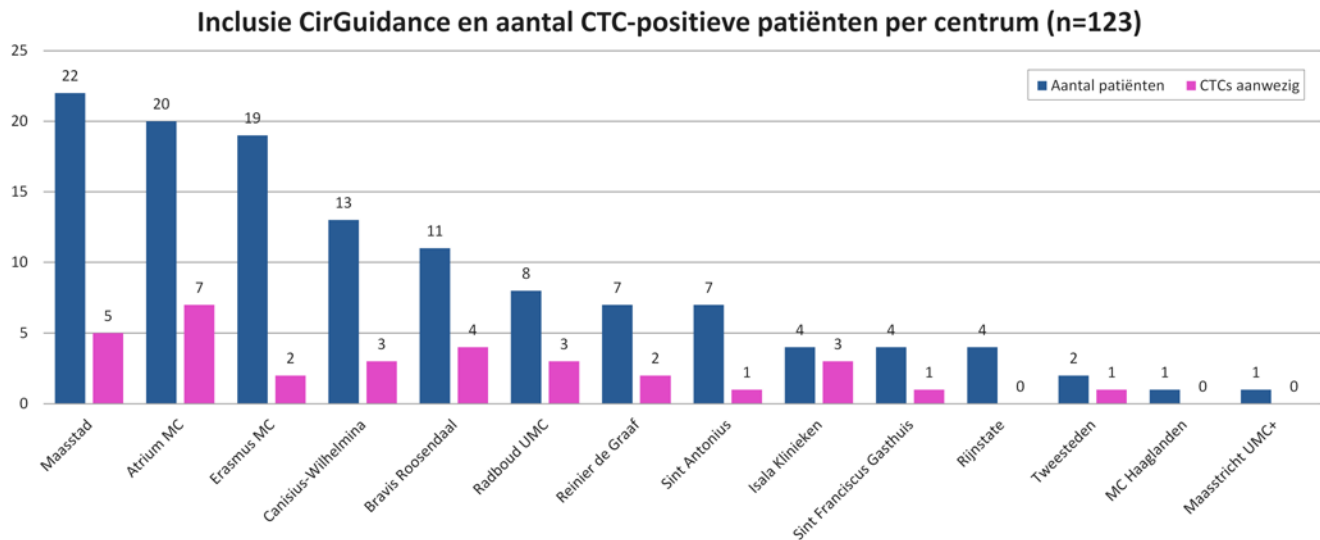
Behalve deze duidelijke voordelen van de CellSearch-techniek, zijn ook nadelen van de methode beschreven. Omdat de methode afhankelijk is van een verrijking met EpCAM, zullen tumorcellen die geen EpCAM tot expressie brengen, niet worden gedetecteerd [13]. Daarnaast wordt gehypothetiseerd dat EpCAM-positieve CTC's een epitheliale-naar-mesenchymale transitie (EMT) kunnen ondergaan in de circulatie, waarop de expressie van EpCAM verloren gaat en deze CTC's niet gedetecteerd zouden kunnen worden met het CellSearch-systeem [14]. Desondanks is de prognostische waarde van het tellen van CTC's met het CellSearch-systeem in verschillende tumortypes uitgebreid aangetoond [6, 15, 16]. Bij patiënten met gemetastaseerd mammacarcinoom kunnen CTC's zelfs in een subgroep van patiënten ingezet worden voor het nemen van klinische beslissingen [17]. Zodoende zijn voor meerdere epitheliale maligniteiten studies geïnitieerd die de klinische waarde van CTC's verder onderzoeken, met name om tot betere patiëntgerichte behandelingen te komen [18].

CTC's bij het urothelcarcinoom van de blaas

Behoudens de lokale behandeling van het primair spierinvasief urothelcarcinoom van de blaas, wordt de behandeling van de individuele blaaskankerpatiënt mede bepaald door het risico op het ontwikkelen van metastasen na lokale behandeling. Perioperatieve systemische chemotherapie in zowel de neoadjuvante als in de adjuvante setting is veelvuldig onderwerp geweest van onderzoek. De gedachte achter deze strategie is dat micrometastasen van het blaascarci-

noom geëlimineerd worden door de chemotherapie, waardoor de kans op het ontwikkelen van recidieven op afstand wordt verkleind. CTC's zouden mogelijk van waarde kunnen zijn om reeds in de primaire setting ten aanzien van blaaskankerpatiënten een risicoschatting te maken, of om de respons op (neo)adjuvante chemotherapie te monitoren.

De klinische waarde van CTC's is onderzocht voor zowel het niet-spierinvasieve als het spierinvasieve blaascarcinoom. Gazzaniga en collega's beschreven 44 patiënten met niet-spierinvasief blaascarcinoom bij wie CTC's werden bepaald op de dag waarop het urothelcarcinoom werd gediagnosticeerd [19]. Bij acht patiënten (18%) werden één of meer CTC's gevonden in 7,5 ml bloed (range: 1–3 CTC's/7,5 ml bloed). CTC's werden exclusief gevonden bij patiënten met T1-tumoren, en niet bij patiënten met Ta-tumoren. Bij de patiënten met ≥ 1 CTC per 7,5 ml bloed werd een kortere tijd tot de detectie van een recidief in de blaas gevonden (6,5 maanden vs. 21,7 maanden, $p < 0,001$) dan bij patiënten met één CTC per 7,5 ml bloed. Deze studie liet voor het eerst zien dat CTC's te detecteren zijn in het bloed van patiënten met een blaascarcinoom en dat CTC's prognostische waarde hebben bij blaascarcinoom. Echter, er werden ook recidieven geobserveerd bij 36% van de patiënten zonder CTC's, hetgeen de sensitiviteit van de CTC-bepaling laag maakt. Daarnaast was de follow-up (maximaal 24 maanden) te kort om te onderzoeken of het voorkomen van CTC's geassocieerd was met progressie naar een spierinvasief blaascarcinoom. Gezien de toenemende beschikbaarheid van andere methoden om recidieven te detecteren in het niet-spierinvasieve blaascarcinoom met een betere sensitiviteit dan CTC's, bijvoorbeeld in de urine, lijkt het onwaarschijnlijk dat CTC's een grote rol



Figuur 2 Inclusie van de CirGuidance-studie per deelnemend centrum en het voorkomen van CTC's bij de eerste 123 geïncludeerde patiënten.

zullen gaan spelen in de setting van het niet-spieerinvasieve blaascarcinoom [20]. Daarnaast lijkt gereede twijfel op zijn plaats of het bloed de aangewezen plek is om een *lokaal* recidief in de blaas op het spoor te komen.

Bij patiënten met spierinvasief urotheelcarcinoom lijken er betere beweegredenen te zijn om te kijken naar markers in het bloed, aangezien deze patiënten ondanks een succesvolle lokale behandeling toch 50% kans hebben om op termijn metastasen op afstand te ontwikkelen [4]. Aangezien deze metastasen waarschijnlijk al als micrometastasen aanwezig zijn op het moment van de diagnose, biedt de detectie van CTC's mogelijk een kans om inzicht te krijgen in het risico op vorming van metastasen op afstand. Guzzo et al. bepaalden bij 43 patiënten met een spierinvasief blaascarcinoom de aanwezigheid van CTC's voorafgaand aan de radicale cystectomie [21]. Bij 21% van de patiënten werd ≥ 1 CTC's/7,5 ml bloed gedetecteerd (range 0–9 CTC's/7,5 ml bloed). Een correlatie tussen CTC's en klinische of pathologische factoren, zoals NAC, pathologisch T-stadium, lymfekliermetastasen en extravescicale uitbreiding van de tumor, werd niet gevonden. Guzzo et al. rapporteerden geen gegevens over de follow-up van de patiënten, waardoor geen uitspraak kon worden gedaan over de associatie tussen CTC's en het ontwikkelen van metastasen en/of algehele overleving.

Rink et al. deden wel onderzoek naar de prognostische waarde van CTC's bij patiënten met een spierinvasief blaascarcinoom die een radicale cystectomie zonder NAC ondergingen [22]. Analog aan de studie van Guzzo et al. werd preoperatief bloed afgenomen om CTC's te kwantificeren ($n=100$). CTC's werden gedetecteerd bij 23% van de patiënten met het CellSearch-systeem, met een mediaan van 1 CTC per 7,5 ml bloed (range 0–100) [22]. CTC's bleken ook in deze studie niet geassocieerd met klinische of patho-

logische kenmerken, met name niet met het voorkomen van lymfekliermetastasen. Wel werd een duidelijke prognostische waarde aangetoond, waarbij CTC-positieve patiënten een hoger risico hadden om een recidief te krijgen; de eenjaarsrecidiefkans was 59% voor patiënten bij wie één of meer CTC's aanwezig waren *versus* 14% voor patiënten zonder CTC's. Deze bevinding werd bevestigd in een multivariate analyse waarbij de stagering, de tumorgraad, de resectiemarges en de ontvangen adjuvante behandeling ook werden meegenomen (*hazard ratio* (HR) voor recidief bij CTC-positieve patiënten van 4,6, 95%-betrouwbaarheidsinterval (BI)=2,0–10,8). Daarnaast bleek het voorkomen van CTC's als uitkomst van de multivariate analyse geassocieerd te zijn met een hogere kans op kankerspecifieke mortaliteit (HR=5,2; 95%-BI=1,8–14,7) en algehele mortaliteit (HR=3,5; 95%-BI=1,5–8,0).

Ook onderzocht deze studie het voorkomen van HER2-positiviteit op CTC's. Amplificatie van HER2 wordt beschreven bij 28–85% van de blaascarcinomen, met trastuzumab (een monoklonaal antilichaam tegen de HER2-receptor) dat mogelijk antitumoractiviteit heeft in HER2-positief gemetastaseerd urotheelcarcinoom [23, 24]. Bovendien is bekend dat intratumorheterogeniteit voor HER2 voorkomt bij 35% van de patiënten met een primair blaascarcinoom [25]. Daarom zou het bepalen van de HER2-status op CTC's additionele informatie kunnen bieden over de aanwezigheid van mogelijke HER2-positieve tumorlocalisaties in het lichaam. In de studie van Rink et al. werden bij drie van de 22 CTC-positieve patiënten HER2-positieve CTC's aangetroffen. Bij twee patiënten was er sprake van het voorkomen van ≥ 1 HER2-positieve CTC, terwijl de primaire tumor HER2-negatief was. Bij slechts één van de vier patiënten met een HER2-positieve primaire tumor, werd ook HER2-positiviteit van de CTC's aangetroffen. In hoeverre de discrepanties

tussen de HER2-status van de primaire tumor en de CTC's klinische betekenis hebben, valt nog te bezien. Bij patiënten met gemetastaseerd mammacarcinoom zijn inmiddels de eerste studies geïnitieerd waarin patiënten met HER2-positieve CTC's met trastuzumab worden behandeld [17, 18]. Waarschijnlijk zal binnen enkele jaren duidelijkheid komen omtrent de mogelijk predictieve waarde van HER2-positieve CTC's in relatie tot de respons op trastuzumab.

Indicatie voor neoadjuvante chemotherapie op grond van CTC's: de CirGuidance-studie

De prognostische waarde van CTC's bij spierinvasief blaascarcinoom maakt het mogelijk patiënten beter te stratificeren in groepen met een slechte prognose (CTC-positief) en een goede prognose (CTC-negatief). Zo is al gesuggereerd dat CTC's een rol kunnen spelen bij het bepalen of patiënten wel of geen adjuvante chemotherapie na de radicale cystectomie moeten krijgen [7]. Dezelfde afweging kan worden gemaakt ten aanzien van de klinische beslissing voor het geven van NAC voorafgaand aan radicale cystectomie. NAC is geassocieerd met de beperkte overlevingswinst van 6% na tien jaar (HR=0,84; 95%-BI=0,72–0,99) [3]. Op basis van deze winst wordt NAC dan ook aangeraden in de richtlijn van de *European Association of Urology* (EAU) [26]. In de dagelijkse klinische praktijk wordt NAC echter lang niet altijd gegeven [27, 28], en in de Nederlandse richtlijn staat dat bij spierinvasieve blaaskanker NAC niet standaard is geïndiceerd [29]. Belangrijke redenen om geen NAC te geven, zijn uitstel van de cystectomie, de gevorderde leeftijd van de patiënten, aanwezige comorbiditeit, de toxiciteit van de NAC en twijfels over de winst van NAC [27, 28]. Sommige Nederlandse ziekenhuizen bieden patiënten dan ook standaard NAC aan, terwijl andere ziekenhuizen dat helemaal niet doen, of alleen aan een selecte groep patiënten. Dit onderstreept dat er een grote behoefte bestaat aan een betere identificatie van patiënten die wel of geen baat hebben bij NAC.

De waarde van een op basis van CTC's genomen klinische beslissing om voorafgaand aan een radicale cystectomie NAC te geven, is onderzocht in de CirGuidance-studie (Nederlands Trialregister nummer NTR4120). De CirGuidance-studie is een prospectieve studie, die is geïnitieerd door het Erasmus MC Kanker Instituut en die is ondersteund vanuit de Stichting *Dutch Uro-Oncology Studygroup* (DUOS). In deze studie wordt voorafgaand aan de beslissing om wel of niet NAC te geven, gekeken naar het voorkomen van CTC's bij patiënten met een klinisch N0–I M0 spierinvasief urotheelcarcinoom van de blaas, met behulp van de CellSearch-techniek. Patiënten bij wie geen CTC's worden gedetecteerd, zullen direct een radicale cystectomie ondergaan zonder NAC. Patiënten bij wie wel CTC's worden aangetroffen, worden bij voorkeur wel behandeld met

NAC, maar deze beslissing wordt aan de lokale richtlijnen van het deelnemende ziekenhuis overgelaten.

Over het algemeen kan gezegd worden dat NAC te rechtvaardigen is als de te verwachten algehele overlevingswinst ten minste 5% is. De power van de studie is berekend op het kunnen aantonen van een algehele tweejaarsoverleving van 75% (met een 95%-BI van 70–80%) bij CTC-negatieve patiënten. Indien CTC-negatieve patiënten een dergelijk goede prognose hebben, zal de toegevoegde waarde van NAC in deze groep zeer beperkt zijn; de berekende absolute overlevingswinst bij gebruik van NAC op de lange termijn bij CTC-negatieve patiënten zal dan <5% zijn, waardoor het geven van NAC aan deze patiënten niet te rechtvaardigen zou zijn.

Om de primaire vraagstelling te beantwoorden, zijn 260 patiënten nodig. Secundaire eindpunten zijn de associatie van CTC's met kankerspecifieke overleving, (lokaal) recidievrije overleving en metastasevrije overleving. Daarnaast wordt de prognostische waarde van een 20-genenprofiel [30] op primair tumormateriaal onderzocht. De CirGuidance-studie is naar ons weten op dit moment de eerste en enige studie ter wereld die de waarde van een interventie op basis van CTC's bij blaaskanker onderzoekt.

Ten tijde van publicatie van dit artikel zijn 123 patiënten geïncludeerd (fig. 2); bij 26% van de patiënten zijn CTC's in perifeer bloed aangetroffen (CTC-positieve patiënten) (range=1–32 CTCs/7,5 ml bloed). Deze detectieratio komt overeen met de bevindingen zoals gerapporteerd in de literatuur [21, 22]. Bij 56% van de patiënten werden één of meer CTC's aangetroffen die ook HER2 tot expressie brachten. Het exploreren van de prognostische waarde van het voorkomen van HER2-CTC's is een van de andere secundaire eindpunten van de CirGuidance-studie.

Conclusie

CTC's zijn detecteerbaar in het bloed van een gedeelte van de patiënten met een primair urotheelcarcinoom van de blaas en, analoog aan andere solide tumoren, hebben CTC's ook bij blaaskanker prognostische waarde. De aanwezigheid van CTC's bij patiënten met spierinvasief urotheelcarcinoom die een radicale cystectomie ondergaan, is geassocieerd met een slechte uitkomst. Of CTC's ook daadwerkelijk klinische betekenis hebben in de setting van het spierinvasief urotheelcarcinoom, bijvoorbeeld om NAC te onthouden aan bepaalde subgroepen van patiënten, is onderdeel van de Nederlandse CirGuidance-studie. Mogelijk dat moleculaire karakterisering van CTC's ook bij blaaskanker aanvullende waarde kan hebben. De initiatie van dit soort onderzoeken is essentieel om uiteindelijk te komen tot een betere en meer geïndividualiseerde behandeling van patiënten met het spierinvasieve blaascarcinoom.



Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Literatuur

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374–403.
2. IKNL Kankerzorg in beeld 2014. Utrecht: Integraal Kankercentrum Nederland (IKNL); 2014.
3. International Collaboration of Trialists, Medical Research Council Advanced Bladder Cancer Working P, European Organisation for R, Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer G, Australian Bladder Cancer Study G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G, 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(16):2171–7.
4. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):666–75.
5. Maase H von der, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, 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.
6. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):406–14.
7. Soave A, Riethdorf S, Pantel K, Fisch M, Rink M. Do circulating tumor cells have a role in deciding on adjuvant chemotherapy after radical cystectomy? *Curr Urol Rep*. 2015;16(7):520.
8. Alva A, Friedlander T, Clark M, Huebner T, Daignault S, Hussain M, et al. Circulating Tumor Cells as Potential Biomarkers in Bladder Cancer. *J Urol*. 2015;194(3):790–8.
9. Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(5):463–74.
10. Ignatiadis M, Riethdorf S, Bidard FC, Vaucher I, Khazour M, Rothe F, et al. International study on inter-reader variability for circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):R43.
11. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897–904.
12. Tibbe A, Miller M, Terstappen L. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry A*. 2007;71(3):154–62.
13. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, Spoel P van der, Elstrodt F, Schutte M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(1):61–6.
14. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(3–4):673–87.
15. Bono J de, Scher H, Montgomery R, Parker C, Miller M, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6302–9.
16. Cohen S, Punt C, Iannotti N, Saidman B, Sabbath K, Gabrail N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213–21.
17. Beije N, Jager A, Sleijfer S. Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: the clinician's guide to breast cancer treatment? *Cancer Treat Rev*. 2014;41(2):144–50.
18. Bidard F-CC, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB, Alix-Panabieres C, Janni W, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(1–2):179–88.
19. Gazzaniga P, Gradilone A, Berardinis E de, Busetto GM, Raimondi C, Gandini O, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in nonmuscle invasive bladder cancer: a CellSearch analysis. *Ann Oncol*. 2012;23(9):2352–6.
20. Kompier LC, Lurkin I, Aa MN van der, Rhijn BW van, Kwast TH van der, Zwarthoff EC. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*. 2010;5(11):e13821.
21. Guzzo TJ, McNeil BK, Bivalacqua TJ, Elliott DJ, Sokoll LJ, Schoenberg MP. The presence of circulating tumor cells does not predict extravesical disease in bladder cancer patients prior to radical cystectomy. *Urol Oncol*. 2012;30(1):44–8.
22. Rink M, Chun FK, Dahlem R, Soave A, Minner S, Hansen J, et al. Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: a prospective study. *Eur Urol*. 2012;61(4):810–7.
23. Zhao J, Xu W, Zhang Z, Song R, Zeng S, Sun Y, et al. Prognostic role of HER2 expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol*. 2015;47(1):87–94.
24. Hussain MH, MacVicar GR, Petrylak DP, Dunn RL, Vaishampayan U, Lara PN Jr, et al. Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial. *J Clin Oncol*. 2007;25(16):2218–24.
25. Lae M, Couturier J, Oudard S, Radvanyi F, Beuzebec P, Vieillefond A. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann Oncol*. 2010;21(4):815–9.
26. Witjes JA, Comperat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebre T, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol*. 2014;65(4):778–92.
27. Raj GV, Karavadia S, Schlomer B, Arriaga Y, Lotan Y, Sagalowsky A, et al. Contemporary use of perioperative cisplatin-based chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Cancer*. 2011;117(2):276–82.
28. Burger M, Mulders P, Witjes W. Use of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer is low among major European centres: results of a feasibility questionnaire. *Eur Urol*. 2012;61(5):1070–1.
29. Oncoline. Richtlijn urotheelcelcarcinoom van de blaas. Behandeling/T2+/Neoadjuvante chemotherapie. <http://www.oncoline.nl/urotheelcelcarcinoom-van-de-blaas>.
30. Smith SC, Baras AS, Dancik G, Ru Y, Ding KF, Moskaluk CA, et al. A 20-gene model for prospective nodal staging of bladder cancer: development and prospective assessment. *Lancet Oncol*. 2011;12(2):137–43.

drs. N. Beije arts-onderzoeker.

prof. dr. S. Sleijfer internist-oncoloog.

dr. J.L. Boormans uroloog.

