



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi del carcinoma urotelial

Identificació de biomarcadors amb valor diagnòstic i pronòstic

Ruth Montalbo Calafell

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDI DEL CARCINOMA UROTELIAL.

IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS AMB VALOR DIAGNÒSTIC I PRONÒSTIC

Manuscrit dipositat per:

Ruth Montalbo Calafell

Pel títol de:

Doctora en Medicina i Recerca Translacional per la Universitat de Barcelona

Tesi dirigida per:

Dra. Lourdes Mengual Brichs

Dra. Laura Izquierdo Reyes

Directora:

**Dra. Laura Izquierdo
Reyes**

Directora i Tutora:

**Dra. Lourdes Mengual
Brichs**

Candidata:

Ruth Montalbo Calafell



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

2018

“Todos somos muy ignorantes, lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.”

– Albert Einstein

A mis padres,

A Joel,

AGRAÏMENTS

Llega a su fin una etapa muy importante de mi vida. Estos cuatro años han estado cargados de trabajo, de emociones, de cambios y de un objetivo. Quizás el reto más grande hasta ahora, una tesis doctoral...Y esto no sería posible sin muchos de vosotros.

Para empezar, quería agradecer al doctor **Antonio Alcaraz** por darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Urología del Hospital Clínico de Barcelona. Gracias Antonio por hacernos sentir siempre una parte importante del servicio y por tu entusiasmo con la investigación.

A la doctora **Lourdes Mengual**, per confiar en mi durant tota aquesta tesi. Gràcies Lou, per ser una gran directora de tesi, sempre m'has recolzat, he après moltíssim de tu i t'has convertit en una persona molt important per mi. Em permeto el luxe de considerar-te una amiga. Sempre ens quedarà Nijmegen, el tant especial Camino, Paris, el Surf, Atenes...i el que vindrà!!

Gracias a la doctora **Laura Izquierdo**, Laurita, también directora de esta tesis, quién me ha enseñado que el UTUC es un filón y me ha contagiado su pasión por su estudio. Gracias Laura por el entusiasmo que pones en todo lo que haces, por tus historias que me alegran los días, por tu positivismo y por ser tan cercana y ayudarme siempre.

Siguiendo en el LABURO, no tengo palabras de agradecimiento suficientes para mi compi **Cheles**. Por horas y horas de terapia, por nuestras confesiones, porque eres todo sabiduría y buenos consejos. Gracias por aguantar mis días buenos, pero también los malos, por convertirte en una gran amiga y por creer tanto en mí. Además, gracias también a todos los que habéis formado parte del LABURO durante este tiempo, en especial a **Marco** y a **Raquel**...presentes en esta no tan corta y sí muy intensa etapa final.

Si seguimos en el CELLEX, quiero dar las gracias a los vecinos, **Maria** y **Jordi**, por hacerme reír tanto, por nuestras pilladas hablando de BGUS... y sobre todo María, gracias por nuestros desahogos, por entenderme tanto y por tus buenos consejos. I gràcies Jordi per confiar en mi i pel que ve!!!

Saltando al hospital, gracias a los uros en general y al doctor **Agustín Franco** en particular, por su entusiasmo cuando propusimos la idea del proyecto Lunares y por toda su ayuda para realizarlo. A la doctora **Maria José Ribal** por sus buenas ideas y su visión crítica que siempre nos permite mejorar. A toda la UDU, a las enfermeras de planta, de quirófano...a todo el servicio de Urología. A **Maite Dalet** por ayudarnos siempre en todo y de una forma más que eficiente, gracias.

Muy importante, quiero dar gracias a todos los **pacientes**...sin ellos nada de esto sería posible ni tendría sentido.

Gracias al doctor **Aleix Prat** y a su equipo. Especialmente a **Patricia Galván** y **Débora Martínez**. Gracias por vuestro trabajo y ayuda con el NanoString y por solucionarme todo siempre que me dejaba algo en el Clínic en mis infinitos viajes clínic-valle.

Saltando al ONCOLAB, quiero dar las gracias a la doctora **Begoña Mellado**. Gracias Begoña por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación en cáncer de próstata en esta etapa tan complicada que es el escribir la tesis. A **Merche**, porque he seguido tus pasos, porque has confiado en mí para trabajar juntas, por nuestras charlas, porque eres una gran persona y tienes mucha paciencia conmigo y porque te has convertido en una gran amiga. Gracias por todo. Gracias también a **Fara**, a **Leire**, a **Nat** y a **Elba** por apoyarme y animarme en esta recta final.

Fuera ya del Clínic, quiero agradecer a **Elvira** y **Yaiza**, las primeras “pre-docs” que conocí y que me dejaron ser su Pikachu, como decía siempre Yaiza, y en parte son culpables de que decidiera empezar una tesis.

A toda la gente que conocí en Nijmegen, esa ciudad que no tenía ni situada en el mapa y que ahora tiene un lugar muy especial en mi corazón. Thank you, **Egbert** and **Gerald**, to let me be part of your laboratory during my stage in the RUMC. A **Toine**, gracias por tanto. Thanks Toine, because you made my stage possible. Thanks for taking care of me during the whole period and thanks for visiting us continuously in Barcelona because when you are here, we are happier. A las chicas del lab, **Vicky** y **Alejandra**, por nuestras charlas en castellano que me hacían descansar un ratito del inglés, por vuestro ánimo y ayuda. Thanks **Ola**, because you taught me everything you could. Thanks to let me be part of your thesis project. Thanks **Jasmijn** for your eternal smile, always with us. A **Caroline**, because my experience in Nijmegen was awesome but having you here was even better. Thanks for coming!! Y gracias a todos los que hicieron esa estancia maravillosa e inolvidable... A mis panchitos, **Daniel** y **Laura**, sois increíbles. A **Eleni**, **Roxane**, **Alex**, **SJ**, **Kaveh**, **Silvia**, **Koen**, **Jerika**...y en especial a **Judit**, porque lo que unió Nijmegen perdura en Barcelona, ¡¡y porque ojalá hubiera ido antes!! 😊

A mis **Pompeufarros**, por compartir el proceso de búsquedas de doctorados que al final todos conseguimos. Por esos desahogos tan necesarios de lo duro que es el camino del doctorante y porque siempre tendremos Sevilla, ahora nos vamos a Grecia y en breves empezamos las maratones de bodas. Gracias por estar.

A mis **Waffles**, ¡¡¡por dónde empezar con vosotros!!! Ha sido tanto, tan bueno y tan intenso. Nunca pensé al elegir la carrera de biología que tendría tanta suerte de que se cruzaran nuestros caminos. Y lo que nos queda...Gracias chicos en general y gracias en particular... a **Sandra**, mi zipi, porque me alegras la vida con tu fuerza y tu entusiasmo. Eres imprescindible. Gracias por quererme tanto y tan bien. A **Miriam**, xurri, gracias por tu constante ánimo y preocupación de cómo va esta tesis...aquí está, parece mentira...fue bonito nuestro corto pero intenso tiempo en la misma institución, pero tenemos una vida juntas por delante. Gracias **Sergio** por ser tan crack y por esta maravillosa portada que me encanta. A **Laia**, caracolilla, gracias por mantener esa ilusión, por confiar ciegamente en mí y por apoyarme hasta el final. Cuando acabe esto seguiremos con las clases de surf jijiji. A **Elena**, mi compañera de viajes y un pilar indispensable ya en este viaje que es la vida. Gracias por soportarme siempre, porque eres incondicional, porque hemos compartido tanto que ya no sabría seguir sin ti, por este vínculo tan bonito que hemos creado.

A mis **Pitus**, ¡GRACIAS! Porque siempre habéis estado, siempre estáis y siempre estaréis. Por la machaca que os he dado con eso llamado tesis que al principio muy bien no entendíais, pero siempre me habéis apoyado y animado a acabar. A **Miriam**, porque siempre tendremos el arroz a la cubana jajajaja ¡qué tiempos! Me has demostrado que siempre puedo contar contigo, gracias. A **Noe**, mi xumy... ni siquiera recuerdo no tenerte conmigo, no tengo palabras para describir esta amistad, millones de gracias por todo lo que has hecho por mí. Os quiero mucho.

A **Jona**, por estar siempre a mi lado, gracias. Aunque a veces hayas sido una mala influencia y no me dejaras escribir...

A mi **Triángulo**, porque sois una fuente de sabiduría, porque tenemos el mismo grado de locura, por nuestros bucles de risa sin fin, por esos cafés que acaban en cenas, por esos planes que sabes cuando empiezan, pero nunca ni siquiera qué día acabarán. Gracias, gracias y gracias **Jess** y **Tri**. Y gracias **Javi**, por prestarme tu tiempo y ayuda aun estando muy liado.

Por último, pero más importante, a mi **Familia**... quienes aguantan los días en que todo sale bien en la lab y los que no...Gracias por aprender conmigo, por vuestra paciencia infinita, por creer en mí desde siempre, por apoyarme en todas y cada una de mis decisiones. Porque sin vosotros esto no sería posible. Porque no he podido tener más suerte con los padres y hermano que me han tocado. Vosotros dais sentido a la palabra amor. Os adoro. GRACIAS.

ABREVIATURES I ANGLICISMES

AUC	Àrea sota la corba (<i>Area Under de Curve</i>)
BC	Càncer de bufeta (<i>Bladder Cancer</i>)
BCG	<i>Bacillus</i> de Calmette-Guérin
BMN	Biòpsia Múltiple Normalitzada
BTA	Antigen del tumor de bufeta (<i>bladder tumour antigen</i>)
CEP	Sonda d'enumeració cromosòmica (<i>chromosome enumeration probe</i>)
cDNA	DNA còpia
Checkpoint	Punt de control
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CU	Carcinoma urotelial
DNA	Àcid Desoxiribonucleic (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMT	Transició Epiteli Mesènquima
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GE	Expressió gènica (<i>Gene expression</i>)
GU	Genèticament inestable (<i>Genetically unstable</i>)
H/E	Hematoxilina-eosina
HR	Hazard Ratio
IHQ	Immunohistoquímica
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
LOH	Pèrdua d'heterosigositat (<i>loss of heterozygosity</i>)
LSI	Sonda locus-específica (<i>locus-specific indicator</i>)
MSI	Inestabilitat dels microsatèl·lits
MIBC	Càncer de Bufeta Múscul Invasiu
mRNA	RNA missatger
NMP22	<i>Nuclear matrix protein-22</i>
NGS	Seqüenciació de nova generació (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NMIBC	Càncer de Bufeta No Múscul Invasiu
OMS	Organització Mundial de la Salut
PCR	Reacció en cadena de la Polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PUNLMP	Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
PFS	Supervivència Lliure de Progressió

qPCR	PCR quantitativa
RT	Transcripció reversa
RTU	Resecció Transuretral
RefSeq	Seqüència referència
RNA	Àcid Ribonucleic (<i>Ribonucleic acid</i>)
SCCL	Carcinoma de cèl·lules escamoses
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Seed	Llavor
TUS	Tracte Urinari Superior
TUI	Tracte Urinari Inferior
TM-TUS	Tumor de Tracte Urinari Superior
TM	Tumor
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
TC	Tomografia Computaritzada
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	i
ABREVIATURES I ANGLICISMES	v
INTRODUCCIÓ	1
1.1 EL SISTEMA URINARI	1
1.2 EL CARCINOMA UROTELIAL	2
1.2.1 Epidemiologia	2
1.2.2 Factors de risc	3
1.2.3 Tipus i classificació	5
1.2.4 Diagnòstic i estadiatge	9
1.2.5 Tractament	13
1.2.6 Associació del carcinoma urotelial en el tracte urinari superior amb el carcinoma urotelial de bufeta	17
1.2.7 Pronòstic	17
1.2.8 Genètica i biologia molecular del carcinoma urotelial	20
HIPÒTESI I OBJECTIUS	39
2.1 Carcinoma urotelial de tracte urinari superior	44
2.2 Carcinoma urotelial de bufeta	44
TREBALLS	47
TREBALL 1	49
TREBALL 2	61
TREBALL 3	75
TREBALL 4	93
DISCUSSIÓ	109
4.1 Recerca de biomarcadors pronòstics al tumor de tracte urinari superior	111
4.1.1 Biomarcadors pronòstics en teixit pel tumor de tracte urinari superior	112
4.1.2 Biomarcadors pronòstics en sèrum al tumor de tracte urinari superior	113
4.2 Diagnòstic no invasiu del carcinoma urotelial de bufeta	115

4.2.1 Biomarcadors diagnòstics basats en expressió gènica en orina pel seguiment del carcinoma urotelial de bufeta.....	115
4.2.2 Significat clínic de la citologia urinària sospitosa	118
CONCLUSIONS.....	123
5.1 Carcinoma urotelial de tracte urinari superior.....	125
5.2 Carcinoma urotelial de bufeta	125
BIBLIOGRAFIA	129
ANNEX.....	151
7.1 Aproximacions metodològiques utilitzades en aquesta tesi	153
7.1 Annex Treball 1.....	158
7.2 Annex Treball 2.....	159
7.3 Annex Treball 3.....	160
7.4 Annex Treball 4.....	179

PRESENTACIÓ

Aquesta tesi és una contribució a l'estudi del carcinoma urotelial (CU) de vies urinàries superiors i de bufeta. Es centra en la recerca de biomarcadors diagnòstics i pronòstics amb potencial utilitat a la pràctica clínica diària en aquests tipus de tumors.

En la tesi per una banda s'identifiquen i validen biomarcadors pronòstics tissulars i sèrics en el carcinoma urotelial de vies urinàries superiors, i per l'altra, es presenta una nova firma d'expressió gènica amb una alta precisió pel diagnòstic i seguiment del CU de bufeta. Finalment, també s'investiga si és pertinent realitzar anàlisis addicionals en pacients amb citologia urinària sospitosa per CU. Aquests estudis han donat lloc a 4 treballs, dos dels quals estan ja publicats en revistes científiques internacionals (els dos a *Oncotarget*, Q1, IF: 5,17) i els altres dos en vies de publicació.

La memòria s'organitza en cinc blocs principals. Una *introducció general*, on es presenten els conceptes clínics i biològics bàsics del carcinoma urotelial. La *hipòtesi i els objectius*, on es descriu el plantejament global de l'estudi així com els objectius específics del mateix. A continuació, a l'apartat de *treballs*, s'inclouen els 4 articles als que ha donat lloc aquesta tesi. Els resultats dels treballs es discuteixen a l'apartat de *discussió* de manera general i individual. Finalment, s'enumeren les *conclusions* obtingudes en aquest estudi.

La tesi que es presenta a continuació ha estat escrita en català, els treballs publicats i en vies de publicació es presenten en anglès amb un resum en català precedint cadascun d'ells. Les figures i taules suplementàries descrites als diferents treballs es presenten a l'annex de la tesi. S'ha optat per no traduir els anglicismes més utilitzats a la pràctica clínica i científica, els quals s'expressen al llarg de la memòria amb la terminologia emprada als serveis d'urologia i als laboratoris d'investigació.

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la supervisió de professionals del Servei i Laboratori d'Urologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

ABSTRACT

This thesis is a contribution to the study of urothelial carcinoma (UC) in the upper urinary tract and in the bladder. It focuses on the search for diagnostic and prognostic biomarkers in these tumors with potential utility in daily clinical practice.

On the one hand, prognostic biomarkers for UTUC are identified and validated in tissue and in serum and on the other hand, a new gene expression signature with high accuracy for the diagnosis and surveillance of bladder cancer is also described. Finally, the utility of an additional analysis in the follow up of patients with cytology suspicious for UC is investigated. These studies have given rise to four works, two of which are already published in international scientific journals (Oncotarget, Q1, IF: 5.17) and the other two are in the process of publication.

The memory is organized into five main blocks. A general introduction, where the basic clinical and biological concepts of UC are presented. The hypothesis and the objectives section, which describes the overall approach of the thesis as well as the specific objectives of the study. Next, the works section includes the 4 papers that have originated from this thesis. The results of the works are discussed in the discussion section globally and individually. Finally, the conclusions obtained in this study are listed.

The thesis presented below has been written in Catalan, the published manuscripts and those under review are presented in English with a summary in Catalan preceding each one of them. Supplementary figures and tables are shown in annex section. It was chosen not to translate the anglicisms used in clinic and scientific practice and they are expressed throughout the memory with the terminology used in urology departments and research laboratories.

This thesis has been carried out under the supervision of professionals from the Laboratory and Department of Urology of the Hospital Clínic de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

1.1 EL SISTEMA URINARI

El sistema urinari humà és l'encarregat de produir i excretar l'orina. Està format per dues parts: els òrgans secretors (ronyons) responsables de la producció de l'orina i, el tracte urinari o les vies excretores (pelvis renals, urèters, bufeta urinària i uretra) que condueixen i emmagatzemen l'orina fins que és excretada a l'exterior. Dels components del tracte urinari, les pelvis renals i els urèters constitueixen el tracte urinari superior (TUS), i l'urèter distal, la bufeta i la uretra formen el tracte urinari inferior (TUI) (Figura 1).

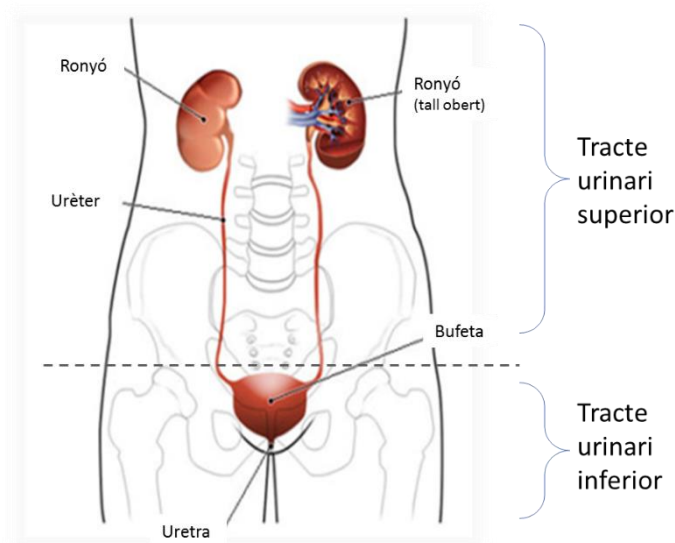


Figura 1. Esquema del tracte urinari humà (Font: <http://dolordered.com/dolor-de-rinones>).

Tot el tracte urinari està constituït per tres capes:

- L'uroteli o epiteli de cèl·lules transicionals:** habitualment format per sis capes que s'agrupen en tres tipus cel·lulars: les cèl·lules basals (localitzades a la base de l'uroteli), les cèl·lules polièdriques (situades a sobre de les basals) que s'organitzen en un número de capes variable depenent de la zona del tracte urinari on estiguin, i finalment, les cèl·lules de superfície o "en paraigües" (les més superficials) que són cèl·lules aplanades i grans. A més d'aquests tres tipus cel·lulars, al llarg de l'uroteli també trobem nius de Brunn i focus dispersos de metaplàsia escamosa glandular. A excepció d'una part de la uretra, tot el tracte urinari està revestit per aquest epiteli especialitzat i preparat pel contacte amb l'orina i les nombroses substàncies tòxiques que aquesta conté.
- Làmina pròpia:** és la capa sobre la que descansa l'uroteli. Està formada per teixit connectiu fibroelàstic i és relativament gruixuda, permetent una distensió

considerable. Aquesta capa és travessada per nombrosos vasos sanguinis i conté fibres de musculatura llisa.

- **Capa muscular:** està formada per feixos de musculatura llisa que es ramifiquen i entrellacen de manera laxa configurant tres capes: la longitudinal externa, la circular mitja i la longitudinal interna. Aquesta malla muscular és la responsable del peristaltisme del tracte urinari i permet el buidament de la bufeta. L'estructura i composició d'aquesta musculatura varia lleugerament al llarg del teixit urinari així com en funció del sexe.

Externa a la capa muscular, trobem una capa de greix al voltant de la bufeta.

La irrigació sanguínia de la bufeta es realitza per les branques arterials de la íliaca interna. A nivell limfàtic, la major part del drenatge passa als ganglis limfàtics íliacs externs, encara que també existeix drenatge als ganglis obturadors, íliacs interns i comuns.

Per acabar, l'enerveció de la bufeta correspon tant al sistema nerviós simpàtic com al parasimpàtic.

1.2 EL CARCINOMA UROTELIAL

El carcinoma urotelial (CU), també anomenat carcinoma de cèl·lules transicionals, és una malaltia neoplàsica que s'origina a l'uroteli. La interiorització de carcinògens al cos, ja sigui mitjançant la ingesta, la inhalació o l'absorció per la pell, fa concentrar l'orina de residus tòxics que poden jugar un paper citotòxic a les cèl·lules de la seva paret. Aquesta toxicitat, a vegades, pot donar lloc a una desregulació del cicle cel·lular i una proliferació massiva de cèl·lules urotelials, constituint així una massa tumoral.

La localització més freqüent del CU és la bufeta (90%), seguida pel TUS (5-10%) i finalment per la uretra (1%). Els tumors al TUS (TM-TUS) es troben localitzats en un rati 2:1 a la pelvis renal respecte als urèters i un 17% presenten tumor de bufeta concomitant [1].

1.2.1 Epidemiologia

El CU és el novè tumor més freqüent a nivell global [2] (Figura 2). A la població mundial masculina, és el setè càncer més diagnosticat i quan es consideren ambdós sexes, a la Unió Europea, es posiciona com a cinquè en incidència [3]. La taxa d'incidència a la Unió Europea és la més alta i es reparteix en 19.1 homes per cada 4 dones [4]. El 6.4% dels càncers diagnosticats en adults al 2012 a Espanya van ser de bufeta, per tant, una incidència de 13,789 casos en un any.

Les divergències a la freqüència entre gèneres s'ha atribuït a les diferents exposicions als factors de risc. De fet, tot i ser més freqüent al sexe masculí, s'observa un augment clar de la incidència al sexe femení sobretot a partir de la dècada dels 50, coincidint amb l'inici entre les dones de l'hàbit del tabaquisme.

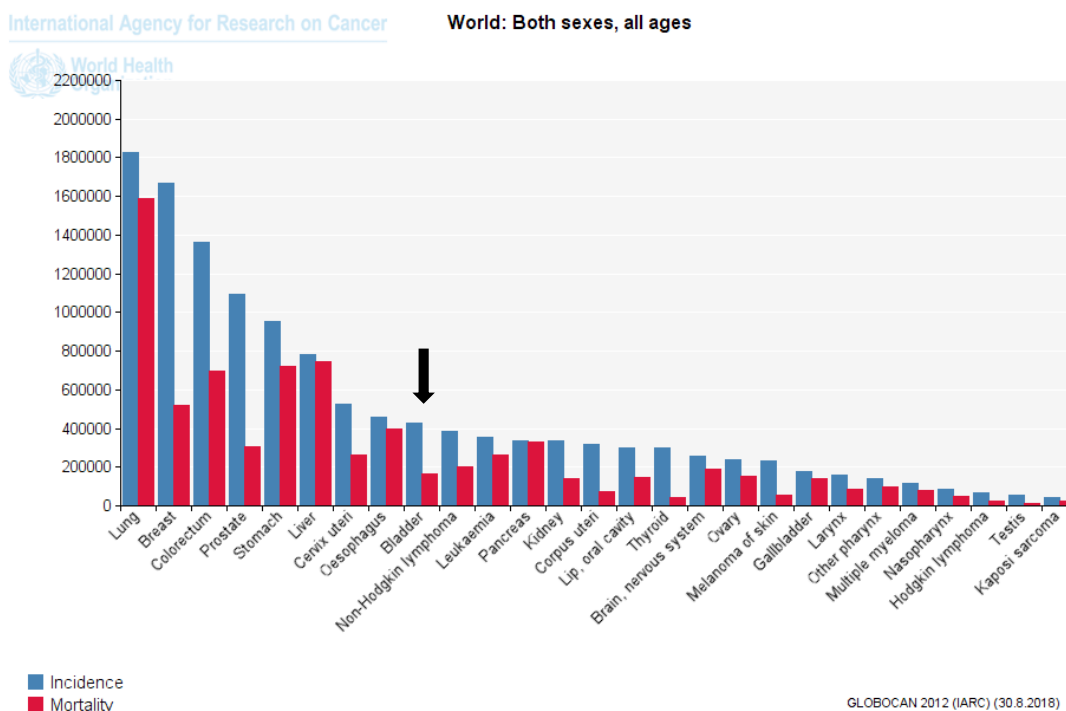


Figura 2. Incidència dels càncers més comuns: estimacions del 2012 [3].

Pel que fa al TM-TUS, la incidència a Europa és de dos casos cada 100.000 habitants. Al diagnòstic, el 60% dels tumors són múscul invasius, comparat amb el 15-20% de CU de bufeta, i el 7% són metastàsics [5]. El pic d'incidència del TM-TUS és a una edat avançada i és tres vegades més comú en homes que en dones [6].

1.2.2 Factors de risc

Tot i ser nombroses les causes que poden donar lloc a la malaltia, a continuació es resumeixen alguns factors que impliquen una major predisposició:

- **Tabac:** és el factor de risc més relacionat amb aquesta patologia, sent el causant en un 50% dels casos del CU de bufeta [7,8] i incrementant el risc del 2.5 al 7 al TM-TUS [9,10] amb un període de latència d'uns 20 anys. Aquest risc augmenta amb el nombre de cigarretes i la durada de l'hàbit. La toxicitat del tabac ve donada per la inhalació d'amines aromàtiques, les quals són excretades per l'orina i són tòxiques per les cèl·lules urotelials.

- **Exposició ocupacional a productes químics:** aquest és el segon factor de risc, causant d'un 10% dels casos i es deu fonamentalment a la inhalació d'anilines en indústries químiques relacionades amb el cautxú i amb diferents tipus de colorants com tints, pintures o vernissos. Un altre agent químic rellevant són els hidrocarburs policíclics aromàtics, relacionats amb el tractament de l'alumini, carbó, ferro i acer [11]. Avui en dia, aquest risc va reduint gràcies a les millores en els plans de salut laboral.
- **Factor genètics:** tot i que la història familiar sembla tenir poc impacte al desenvolupament del CU [12], la predisposició genètica té una influència en la incidència d'aquesta malaltia afectant a la susceptibilitat cap a altres factors de risc que si hi estan associats [13,14]. El TM-TUS i el CU de bufeta comparteixen alguns factors de risc, però fins ara s'han reportat dos polimorfismes específics pel TM-TUS [15].
- **Factors ambientals:** el consum d'aigua potable amb nivells alts en clor i arsènic, l'exposició de manera crònica a baixes dosis de radiació ionitzant i l'ús terapèutic d'alguns isòtops radioactius (com el I-131 en el tractament del hipertiroïdisme) incrementen el risc d'aparició del CU [16].
- **Dieta:** s'ha comprovat que dietes amb baix contingut en fruites i/o alt contingut en greixos contribueixen a l'increment del risc de patir càncer de bufeta 1.4 vegades [13].
- **Factors irritants, infecció i càlculs:** els càlculs, per la seva acció irritant sobre la mucosa urotelial, associats o no a la infecció crònica, s'han relacionat amb la metaplàsia escamosa i la leucoplàsia, podent ser la base del carcinoma escamós o del adenocarcinoma de via urinària (molt poc freqüent). La esquistosomiasis d'urèter, típica de països en vies de desenvolupament, s'ha relacionat amb el desenvolupament de carcinoma escamós [13].
- **Herbes xineses:** la ingestió de determinades herbes xineses per la pèrdua de pes que estan contaminades amb *Aristolochia fangchi* i *Stephania tetrandia* indueixen una nefropatia intersticial [9]. Entre els casos d'insuficiència renal irreversible que van ser sotmesos a nefroureterectomia profilàctica bilateral, la meitat va presentar tumor de vies urinàries superiors i d'aquests, el 18% eren múscul-invasius.
- **Associació amb la nefropatia dels Balcans:** s'ha descrit una freqüència major del que és habitual en determinades àrees dels Balcans on existeix una nefropatia endèmica. La incidència del TM-TUS entre els afectats per la nefropatia és 100 vegades major, mantenint-se inalterada la incidència de tumors de bufeta. La majoria dels tumors eren no múscul invasius, múltiples i bilaterals. No s'han detectat factors ambientals [17].

1.2.3 Tipus i classificació

1.2.3.1 Segons el patró de creixement

El CU pot ser de diversos tipus segons el patró de creixement que presenti:

- **Papil·lar:** aquest patró es presenta en un 75-80% dels CUs. Els tumors papil·lars es caracteritzen per presentar, tal com el seu nom indica, papil·les, que consisteixen en prolongacions entapissades per cèl·lules urotelials que contenen un estroma fibrovascular al seu interior. Tendeixen a ser lesions multifocals i a recidivar. Aquest patró de creixement també és característic del **papil·loma**, que representa el 2.5% de tots els tumors papil·lars de la bufeta. En aquest cas, les papil·les estan formades per un eix fibroconjuntiu vascular revestit d'un epitel·li de cèl·lules transicionals normal.
- **Sòlid:** aquest patró es dóna aproximadament en el 10% dels CUs. Suposa una lesió formada per illots cel·lulars que contenen grans nuclis hiper Cromàtics. La presència d'aquest patró implica un mal pronòstic de la malaltia.
- **Mixte:** es dóna en el 20% dels CUs. Els tumors amb aquest patró de creixement presenten característiques papil·lars i sòlides al mateix temps.
- **Pla:** al CU amb aquest patró de creixement se li confereix una entitat pròpia de forma que passa a anomenar-se carcinoma *in situ* (Cis o Tis). Queda limitat a l'uroteli i té una elevada capacitat invasiva. Pot presentar-se associat a lesions papil·lars i sòlides.

1.2.3.2 Segons histologia

A nivell histològic, el CU es classifica tenint en compte bàsicament dos aspectes: l'estadi d'invasió del tumor a les capes cel·lulars del tracte urinari i el grau de desdiferenciació cel·lular. A continuació s'explica més detalladament cadascun dels aspectes.

2.1.1.1 Estadi

L'estadi indica el nivell d'extensió del tumor entre les capes del tracte urinari i fins i tot si infiltra altres òrgans. El sistema per classificar-lo es denomina TNM (de l'anglès, *Tumour, Node, Metastasis*) i fa referència als següents paràmetres:

T: indica el grau d'infiltració del tumor a les capes del tracte urinari.

N: indica la presència o absència de cèl·lules tumorals als ganglis limfàtics regionals.

M: informa de la presència o absència de metàstasis a distància.

Aquests paràmetres poden avaluar-se a partir del teixit extret a la biòpsia del tumor (estadiatge clínic) i/o després de la cirurgia radical (estadiatge patològic). Quan es parla d'estadiatge patològic a les categories T, N i M passen a dir-se pT, pN i pM, respectivament.

Segons l'estadi, el CU pot rebre diferents denominacions. Quan el tumor no arriba a envair la capa muscular (Tis, Ta i T1) se l'anomena carcinoma **no múscul-invasiu (NMI)** o **tumor no invasiu de la capa muscular**. En canvi, quan el tumor infiltra el múscul ($\geq T2$) se l'anomena carcinoma **múscul-invasiu (MI)**. La classificació TNM del CU de bufeta i de TUS es mostra a les taules 1 i 2. A les figures 3 i 4 es mostra en detall el grau d'infiltració dels tumors al TUS i a la bufeta.

Taula 1. Esquema de la classificació TNM al TM-TUS [18].

T - Tumor Primari	
TX	El tumor primari no pot ser diagnosticat
T0	No hi ha evidència de tumor primari
Ta	Carcinoma papil·lar no invasiu
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : 'tumor pla'
T1	El tumor envaeix el teixit connectiu subepitelial
T2	El tumor envaeix el múscul
T3	Pelvis renal El tumor envaeix per sota el múscul el greix peripèlvic o el parènquima renal Urèter El tumor envaeix per sota el múscul el greix del voltant de l'urèter
T4	El tumor envaeix els òrgans adjacents o a través del ronyó el greix perinefrític
N – Nòduls Limfàtics Regionals	
NX	Els nòduls limfàtics regionals no poden ser diagnosticats
N0	No hi ha metàstasi als nòduls limfàtics regionals
N1	Metàstasi en un nòdul limfàtic únic de 2cm o menys a la dimensió màxima
N2	Metàstasi en un nòdul limfàtic únic de més de 2cm, o a múltiples nòduls limfàtics
M - Metàstasi a Distància	
M0	No hi ha metàstasi a distància
M1	Hi ha metàstasi a distància

Al TM-TUS trobem un 60% de tumors múscul-invasius al moment del diagnòstic [5] i un 7% presenten malaltia disseminada [19]. La supervivència als 5 anys no arriba al 50% per aquells tumors que al diagnòstic són pT2/pT3 i inferior al 10% quan es tracta de pT4 [20,21].

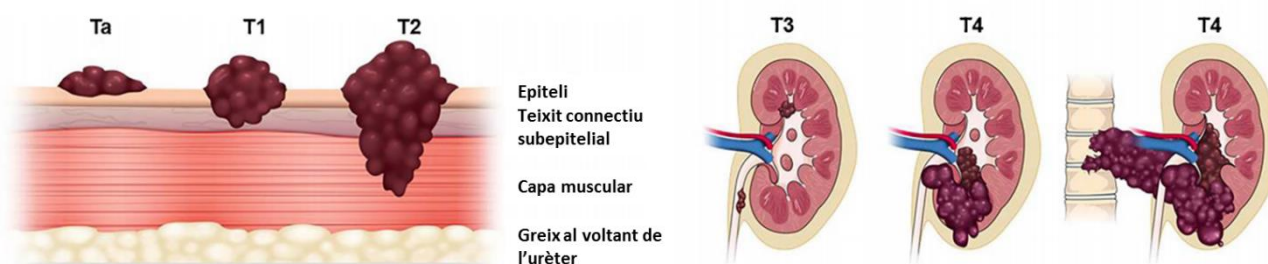


Figura 3. Esquema de la classificació en detall dels estadis del TM-TUS [22].

Aproximadament el 75% dels CU de bufeta es diagnostiquen inicialment com no múscul-invasius (NMIBC). Desafortunadament aquests tumors estan caracteritzats per uns índexs de recidiva que oscil·len entre el 60 i el 85% (un cop que el tumor primari ha estat tractat). A més, entre el 15 i el 30% dels NMIBC progressaran a múscul-invasius (MIBC), podent arribar a produir la mort del pacient [23]. Actualment, s'ha generat una subclassificació per l'estadi T1 ja que s'ha demostrat que la profunditat i la extensió de la invasió de la làmina pròpia per part d'aquests tumors tenen valor pronòstic [24,25].

Taula 2. Esquema de la classificació TNM al CU de bufeta [26].

T - Tumor Primari	
Tx	El tumor primari no pot ser diagnosticat
T0	No hi ha evidència de tumor primari
Ta	Carcinoma papil·lar no invasiu
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : 'tumor pla'
T1	El tumor envaeix el teixit connectiu subepitelial
T2	El tumor envaeix el múscul
T2a	Tumor envaeix el múscul superficial
T2b	Tumor envaeix el múscul profund
T3	El tumor envaeix el teixit perivesical
T3a	Microscòpicament
T3b	Macroscòpicament (massa extravescical)
T4	El tumor envaeix algun del següents: estroma prostàtic, vesícules seminals, úter, vagina, la paret pèlvica, la paret abdominal
T4a	El tumor envaeix l'estroma prostàtic, les vesícules seminals, l'úter o la vagina
T4b	El tumor envaeix la paret pèlvica o abdominal
N – Nòduls Limfàtics Regionals	
Nx	Els nòduls limfàtics regionals no poden ser diagnosticats
N0	No hi ha metàstasi als nòduls limfàtics regionals
N1	Metàstasi en un nòdul limfàtic únic a la pelvis
N2	Metàstasi a múltiples nòduls limfàtics regionals a la pelvis
N3	Metàstasi en nòduls limfàtics ilíacs comuns
M - Metàstasi a Distància	
M0	No hi ha metàstasi a distància
M1	Hi ha metàstasi a distància
M1a	No hi ha nòduls limfàtics regionals afectats
M1b	Altres metàstasis a distància

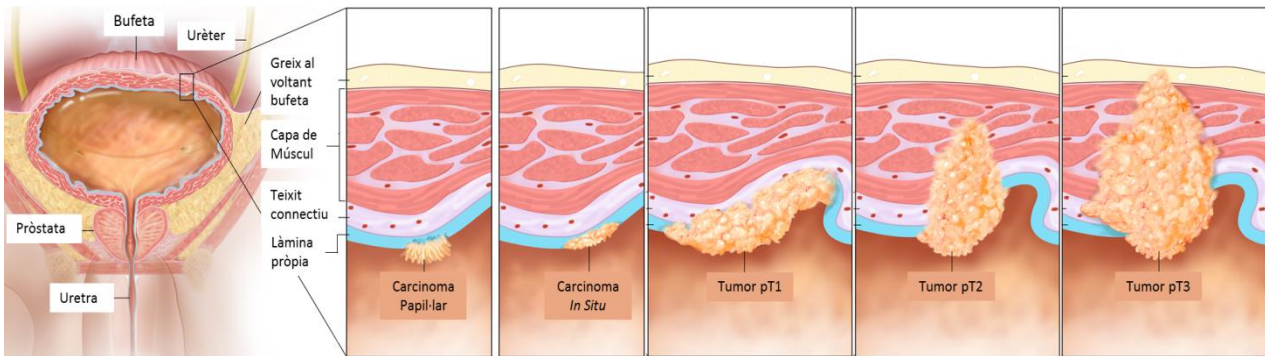


Figura 4. Esquema de la classificació en detall dels estadis del CU de bufeta.

2.1.1.2 Grau

Els sistemes de gradació dels tumors urotelials més difosos i àmpliament acceptats han estat els proposats per l'Organització Mundial de la Salut (OMS). Al 1973 es va establir una gradació que s'ha estat utilitzant durant dècades, la qual classificava els tumors en 4 categories: papil·loma, grau 1, grau 2 i grau 3. En aquesta classificació, els papil·lomes van ser definits com a lesions exofítiques no malignes, formades per un eix fibroconjuntiu recobert per un epiteli transicional normal. Per altra banda, les categories 1, 2 i 3 corresponien als diferents graus d'anaplàsia cel·lular, sent els tumors amb un grau 3 els que presentaven un grau d'anaplàsia més sever, suposant així un pitjor pronòstic de la malaltia. L'anaplàsia en aquesta classificació es va definir per la presència de cèl·lules grans, amb irregularitat morfològica, polaritat atípica, presència de figures mitòtiques anormals i amb variacions als patrons de cromatina nuclears, entre d'altres. Una crítica recurrent d'aquest sistema de gradació va ser la definició poc exacta dels punts de tall entre els tres graus de malignitat [27]. Al 1998 aquest sistema va ser modificat de manera que la classificació va passar únicament a considerar tres grups de lesions: papil·loma, lesions de baix grau i lesions d'alt grau. Finalment, al 2004 la OMS va afegir al sistema del 1998 una nova categoria que inclou les neoplàsies urotelials papil·lars amb baix potencial de malignitat o PUNLMP (de l'anglès, *papillary urothelial neoplasm of low malignant potencial*) [28] (Figura 5).

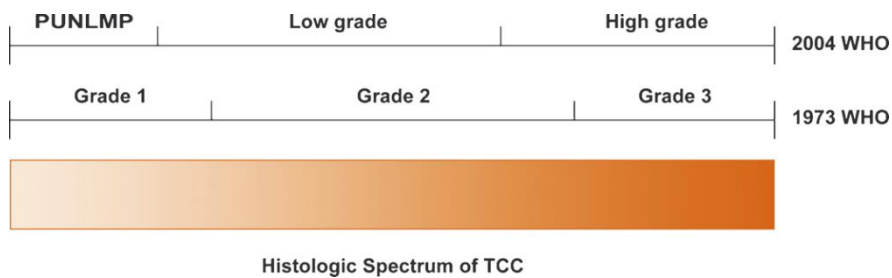


Figura 5. Estratificació dels tumors tenint en compte les classificacions del 1973 i del 2004 [29].

1.2.3.3 Segons els grups de risc

Al 2016, les guies europees d'urologia [26] van descriure les recomanacions de tractament segons uns grups de risc definits dins del CU de bufeta. En aquest sentit, els tumors **no múscul-invasius** es divideixen en tres subcategories:

- Tumors de baix risc: comprenen tumors primaris, individuals, d'estadi pTa, G1/PUNLMP, baix grau, menors de tres centímetres i sense Cis associat.
- Tumors de risc intermedi: tots els tumors compresos entre les categories de baix i alt risc.
- Tumors d'alt risc: qualsevol tumor que compleixi alguna de les condicions de pT1, alt grau, Cis i/o pTa de baix grau múltiples, recurrents i grans (majors de tres centímetres).

1.2.4 Diagnòstic i estadiatge

La clínica més habitual del CU és l'hematúria (és el signe més comú) seguida del síndrome miccional irritatiu i del dolor lumbar. Durant la sospita de CU, les tècniques que s'utilitzen pel diagnòstic i l'estadiatge són les següents:

1.2.4.1 Tècniques de radiodiagnòstic

Dins d'aquestes tècniques, la prova no invasiva, de baix cost econòmic i accessible més utilitzada és l'**ecografia**, que permet visualitzar mitjançant ones acústiques d'alta freqüència (1-20 MHz), òrgans i teixits de diferent impedància acústica.

Aquesta tècnica pot presentar una sensibilitat de fins al 98% en la detecció del CU. Per altra banda, realitzada de manera trans-abdominal permet detectar tumors papil·lars d'entre 2 i 3 mm com a mínim, sent la seva sensibilitat menor en tumors plans i localitzats a la cara anterior de la bufeta. L'ecografia dona informació de la via urinària superior: presència de uretrohidronefrosi (indicador d'obstrucció de la via urinària) i també es pot utilitzar en el seguiment de la malaltia.

Quan existeix sospita de TM-TUS, la tècnica diagnòstica gold estàndard és la **tomografia computaritzada (TC)**. La TC permet la obtenció d'imatges d'òrgans i teixits amb una alta resolució, gràcies a la reconstrucció computaritzada de talls tomogràfics que són escanejats. És la tècnica diagnòstica que presenta millor rendiment amb una sensibilitat del 67 al 100% i una especificitat del 93 al 99% [30]. També s'utilitza a l'estadiatge de la malaltia neoplàsica tant al TUS com a la bufeta.

La **ressonància magnètica** per la seva banda, s'utilitza en casos excepcionals en aquells pacients als que no se'ls hi pot administrar contrast radiològic.

1.2.4.2 Tècniques endoscòpiques

La **cistoscòpia urinària** consisteix en la visualització directa de la bufeta mitjançant un cistoscopi que està format per una font de llum, un sistema òptic i un aparell d'irrigació (Figura 6). La combinació d'aquests mètodes de referència també és clau per avaluar en controls periòdics als pacients amb història prèvia de CU. La periodicitat d'aquests controls dependrà del risc de recidiva del tumor.

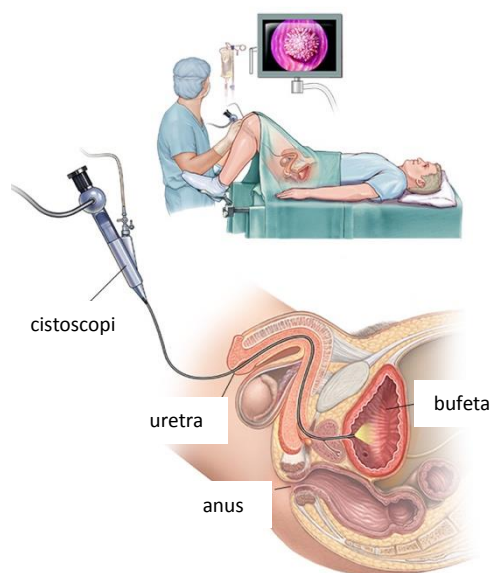


Figura 6. Esquema d'una cistoscòpia (Font: <https://www.mayoclinic.org>).

És important destacar que la sensibilitat de la cistoscòpia és del 70-95%, depenent de la proporció de tumors únics, superficials o *in situ* estudiats [31,32]. De fet, el límit de resolució de l'ull humà és limitat i pot no permetre detectar tumors de grandària inferior a 0,5mm.

Amb la finalitat d'incrementar el percentatge de detecció de carcinoma *in situ* s'ha desenvolupat una tècnica de **cistoscòpia fluorescent**, que consisteix en la instil·lació endovesical d'àcid-5-aminolevulínic (5-ALA) o el seu èster derivat (H-ALA) o la utilització de Hypericin abans de realitzar la cistoscòpia [33]. Aquests fàrmacs són agents fotosensibles. L'administració del fàrmac de manera intravesical donarà lloc a l'acumulació local de molècules amb caràcter fotoreactiu, en les cèl·lules de les capes internes de la bufeta, especialment en les cèl·lules neoplàsiques i preneoplàsiques, degut a la seva major activitat metabòlica. Donat que aquests agents són capaços d'emetre una llum vermella característica

en resposta a l'excitació amb llum blava (de longitud d'ona entre 380 i 450 nm), les lesions premalignes i malignes han de brillar en color vermell al ser il·luminades amb llum blava durant la cistoscòpia. Aquesta tècnica pot incrementar la detecció de tumors o carcinoma *in situ* fins al 30% per sobre de la tècnica habitual de cistoscòpia [34].

En el cas del TM-TUS, la cistoscòpia urinària es realitza sempre per descartar la presència de tumor de bufeta concomitant. Quan el diagnòstic mitjançant tècniques de radiodiagnòstic no és conclouent es realitza la **ureteroscòpia**. Es tracta d'un procediment invasiu que es realitza sota anestèsia que permet la visualització directa de tot el tracte urinari des de la inserció de l'urèter a la bufeta fins als calces renals. Es poden utilitzar endoscòpis rígids o flexibles.

1.2.4.3 Citologia urinària

La citologia urinària és un mètode diagnòstic no invasiu descrit per Papanicolau i Marshall al 1945 [35]. Actualment, en combinació amb la cistoscòpia, és el "*gold estandard*" de diagnòstic del CU de bufeta, juntament amb la TC del TM-TUS.

L'exfoliació cel·lular de l'uroteli a l'orina succeeix en condicions normals, existint, des d'un punt de vista citològic, tres tipus cel·lulars que es reconeixen a l'orina i que presenten els tipus de cèl·lules que formen l'uroteli: cèl·lules basals, cèl·lules intermitges i cèl·lules superficials o "en paraigües". La citologia urinària es basa en l'anàlisi morfològic d'aquesta cel·lularitat de l'orina. Consisteix en una tinció hematoxilina-eosina (H/E) del sediment urinari (també anomenada tinció Papanicolau). Es considera un mètode econòmic, d'alta especificitat en la detecció del CU (al voltant del 95%) i amb una sensibilitat mitja que es troba entre el 35 i el 40%. La sensibilitat arriba al 84% a la detecció de tumors d'alt grau a la bufeta i al TM-TUS, però disminueix al 16% detectant tumors de baix grau [36]. Els criteris que s'utilitzen per determinar la presència de malignitat consideren, entre altres paràmetres, l'augment de la relació nucli-citoplasma i la presència de nuclèols.

Normalment, la mostra utilitzada per aquest examen és l'orina per micció espontània però també es poden utilitzar mostres procedents de barbotatge o cateterisme ureteral. Aquestes últimes poden ser especialment útils en casos de lesions sospitoses a l'urèter o la pelvis renal. L'avantatge principal d'utilitzar l'orina per micció espontània és la inexistència d'invasivitat a l'hora de recollir la mostra i la possibilitat de ser seriada (molt útil al TM-TUS).

El Cis i els tumors d'alt grau representen la diana principal de la citologia urinària, combinada amb la cistoscòpia. Pel que fa al Cis, donada la seva falta de cohesió, aquest tipus de tumor és

més donat a exfoliar que els tumors papil·lars. Un altre tipus de lesions planes que poden suggerir la presència de carcinoma són la atípia reactiva o la neoplàsia intraurotelial de baix grau. En aquests casos i davant la presència de troballes inconcloents normalment s'adopta una terminologia conservadora a l'informe citològic (per exemple, citologia sospitosa) per evitar el sobre-tractament.

Donat que la majoria de TM-TUS són d'alt grau, la citologia és especialment útil en aquests tipus de tumors. La citologia urinària al TUS presenta una sensibilitat del 65-78% [37], acostuma a fer-se seriada (recollida de 3 dies). També pot fer-se *in situ* a les cavitats renals o urèters, sent més sensible ja que es recull la mostra a la localització del tumor. La falta de sensibilitat en aquests casos és justificable per la dificultat en la interpretació de la mostra degut a que les cèl·lules benignes del TUS acostumen a tenir una morfologia atípica [38].

Finalment, s'ha de destacar que el fet de que pugui existir sincronia entre el CU de bufeta i el TM-TUS implica que el resultat positiu de la citologia no permeti identificar l'origen del tumor (bufeta o TUS). Una citologia positiva pot indicar un tumor a qualsevol lloc del tracte urinari, en canvi una citologia negativa no exclou la presència de tumor.

1.2.4.4 Biòpsia múltiple normalitzada

La **biòpsia múltiple normalitzada** (BMN) és una tècnica de diagnòstic que té per objectiu identificar àrees de displàsia o de carcinoma *in situ* a la mucosa vesical mitjançant la pressa, amb pinça freda, de fragments mucosos en localitzacions ja definides. El número de biòpsies que s'acostumen a realitzar al mapeig vesical per descartar un Cis varia segons el centre, però en cap cas ha de ser menor de quatre. Un esquema sobre les localitzacions més freqüents d'on s'obté una biòpsia a la BMN s'il·lustra a la figura 7.

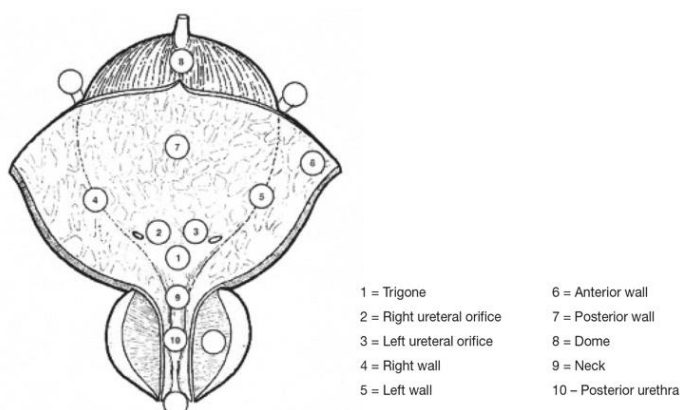


Figura 7. Esquema biòpsia vesical múltiple, amb les localitzacions comunes de recollida de mostra [26].

1.2.4.5 Tècniques histopatològiques

La **tinció H/E** és la tècnica estàndard per l'anàlisi histopatològic de les mostres de teixit. Es basa en l'avaluació al microscopi òptic de la morfologia cel·lular present en una biòpsia (de teixit urotelial o limfàtic, principalment). El patòleg examina les preparacions histològiques i no només diagnostica la presència de cèl·lules tumorals a la mostra sinó que també avalua el nivell d'invasió del tumor a la paret del tracte urinari i el grau de diferenciació cel·lular.

La **immunohistoquímica (IHQ)** és una tècnica complementària a la tinció H/E en aquells casos en que la morfologia cel·lular posa en dubte el diagnòstic del CU i/o de la seva disseminació. Es tracta d'una tècnica basada en la detecció de marcadors moleculars (proteïnes).

1.2.5 Tractament

Després del diagnòstic inicial del CU de bufeta o del TM-US, es realitzarà una resecció del tumor per establir l'estadi i el grau i així dictaminar el tractament més adient depenent del nivell d'infiltració del tumor o de si es troba disseminat. A continuació es detallen les opcions terapèutiques més utilitzades en cada cas:

1.2.5.1 Tractament de la malaltia no múscul invasiu

1.2.5.1.1 *Tractament quirúrgic*

La **resecció transureteral (RTU)** és una intervenció quirúrgica on s'extirpen les lesions visibles del tumor de bufeta en petits fragments a través de la uretra, mitjançant un aparell anomenat resectoscopi (Figura 8). Té doble finalitat: diagnòstica, ja que permet la gradació i estadiatge del tumor, i terapèutica. És el tractament d'elecció en els pacients amb tumor de bufeta inicial i en la majoria dels casos amb recidiva tumoral. Encara que com a tractament aïllat, la RTU s'utilitza només en els pacients amb tumors de baix risc de recidiva i/o progressió (tumors Ta de baix grau sense Cis associat). A la resta de pacients amb tumors no múscul invasius (de risc intermedi i elevat grau de recidiva i/o progressió) s'aconsella la utilització de la quimioteràpia o immunoteràpia intravesicals adjuvants, ja que han demostrat ser efectives per a reduir el risc de recidiva i de progressió [26].

Com a regla fonamental, per certificar que la RTU s'ha realitzat correctament, entre els fragments reseccionats ha d'estar representada la capa muscular. Si no existeix representació d'aquesta capa, el tumor haurà de catalogar-se com a Tx i es valorarà la realització d'una nova RTU per aconseguir la correcta estratificació.

El percentatge de complicacions d'aquesta cirurgia oscil·la entre el 4.7% i el 16%, trobant-se relacionat amb la grandària del tumor, amb el número de focus i amb la expertesa del cirurgià [39]. La mortalitat intra o post-operatòria és molt baixa i sembla estar relacionada amb la comorbiditat del pacient.

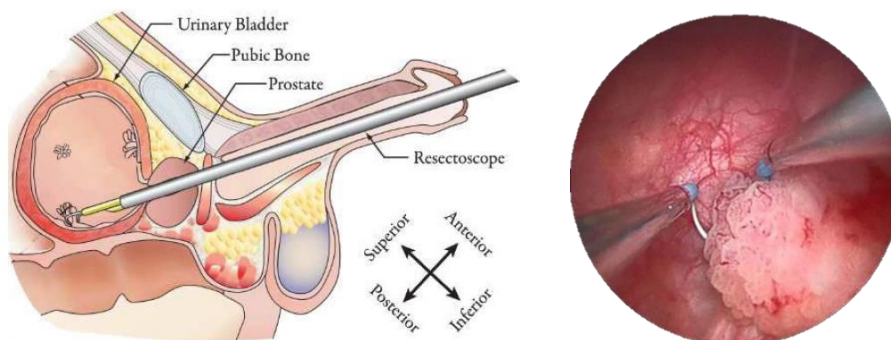


Figura 8. Esquema i imatge real d'una resecció transureteral (Fonts: <https://bellurology.com> i <http://www.drtnathan-urology.com.au>).

En el cas dels tumors localitzats al TUS, es pot realitzar un tractament conservador consistent en l'ablació per làser del tumor a través de l'**ureterorenoscòpia**. Prèviament a aquest procediment, es realitza una citologia i una biòpsia per caracteritzar el tumor. El tractament està indicat principalment en aquells casos en que el tumor és de baix grau sense infiltrar el múscul (estadiatge per imatge, citologia i biòpsia), en lesions PUNLMP, en tumors menors de 2-3 cm i en pacients monorens. També s'utilitza quan la cirurgia radical està contraindicada ja sigui per la presència de malaltia bilateral, insuficiència renal o comorbiditat del pacient [40,41].

1.2.5.1.2 Tractament adjuvant endovesical

Quimioteràpia endovesical

Tot i que la RTU per si mateixa pot eradicar un tumor d'estadi Ta o T1 completament, aquests tumors recidiven amb alta freqüència i poden progressar cap a CU múscul-invasius. És per això que el tractament adjuvant està indicat en molts d'aquests pacients. En aquests casos és la **mitomicina C** el tractament més habitual.

Una **instil·lació única** després de la cirurgia ha demostrat ser efectiva destruint cèl·lules tumorals circulants, a més de tenir un efecte abrasiu (resecció química) a les cèl·lules tumorals residuals al lloc de la resecció i a tumors infravalorats [42]. A més, diferents estudis demostren que després de la RTU, una instil·lació única redueix significativament les taxes de recidiva. En canvi, si els pacients han presentat una taxa de recidiva de més d'una a l'any, es recomana la realització d'un tractament de quimioteràpia adjuvant complert.

No hi ha estudis aleatoritzats que demostrin la eficiència d'aquest tractament en TM-TUS pel que no s'utilitza en aquests pacients.

Immunoteràpia intravesical

La immunoteràpia amb el *Bacillus de Calmette-Guérin (BCG)* després de la RTU ha demostrat ser més efectiva que la RTU per si sola o que la RTU seguida de quimioteràpia per a prevenir la recidiva en els tumors no-múscul invasius al CU de bufeta [43,44]. S'ha observat que l'efecte de la BCG es manté en el temps [45] i s'ha vist una reducció també en el risc de progressió. Tot i aquests beneficis, la BCG presenta més efectes secundaris que la quimioteràpia intravesical [46]. La immunoteràpia amb BCG dóna lloc a una reacció immunològica activa (és a dir, que el sistema immune de l'hoste és l'efector) i inespecífica (ja que implica una resposta inflamatòria independent de la antigenicitat tumoral) el funcionament de la qual és la potenciació de les cèl·lules efectores del sistema immune del pacient. Consisteix en la instil·lació intravesical, de manera periòdica, de preparacions del bacil *Calmette-Guérin* obtingudes a partir de soques modificades provinents d'una soca original de *Mycobacterium bovis*. Aquestes instil·lacions desencadenen una reacció immunològica per part del pacient contra l'agent bacterià introduït.

Pel que fa al TM-TUS, la BCG es recomana en cas de Cis. Les instil·lacions retrògrades cap als urèters es poden realitzar mitjançant catèters "pig tail" o doble-J per fer refluxos, amb uns resultats molt discrets. Tot i això, un estudi recent demostra que els pacients amb TM-TUS no múscul invasiu no es beneficien de la teràpia amb BCG [47].

1.2.5.2 Tractament de la malaltia múscul-invasiva

1.2.5.2.1 Cirurgia radical

La cirurgia radical realitzada dependrà de la localització del tumor i del seu grau d'invasivitat. Quan el tumor urotelial es troba localitzat a la bufeta, i a més es tracta d'un tumor múscul-invasiu amb malaltia òrgan-confinada, la **cistectomia radical** amb **limfadenectomia** és el tractament d'elecció. En algunes ocasions aquest tractament també s'aplica en el cas de tumors no múscul-invasius que han presentat freqüents recurrències en un curt interval de temps o han estat refractaris a la teràpia de BCG realitzada després de la RTU. Aquest tractament quirúrgic consisteix en l'extirpació de la bufeta urinària i dels ganglis limfàtics adjacents. En els homes la cirurgia també inclou l'extracció de la pròstata i en les dones de l'urèter. D'aquesta manera es pretén l'eliminació de la bufeta afectada així com de la possible malaltia microdisseminada.

La linfoadenectomia pot donar lloc a complicacions com l'existència de limfocels encara que no influeix en la mortalitat. Presenta un benefici terapèutic en els pacients amb CU de bufeta en quant a supervivència. Un cop extirpada la bufeta és necessària una derivació urinària. Els mètodes més utilitzats per realitzar aquest procediment es divideixen en continents (neobufeta i uretrosigmoidostomia) i incontinents (bricker i ureterostomia cutània).

Quan el CU es troba localitzat al TUS, el tractament estàndard en pacients amb un tumor múscul-invasiu és la **nefroureterectomia radical**. Aquest tractament consisteix en l'extirpació del ronyó, la pelvis renal i l'urèter afectat, junt amb una resecció d'entre 1 i 2 cm de la mucosa vesical que envolta l'orifici ureteral. El fet de que en la majoria dels casos es valori el tractament radical és degut a la alta taxa de recidiva i d'agressivitat d'aquests tumors, la seva elevada multicentricitat i la baixa incidència tumoral bilateral. Per això, es contempla un tractament conservador només en aquells casos de tumors de baix grau, menors de 2cm, o tumors d'alt grau i majors de 2cm en pacients monorens, en cas de TM-TUS bilateral o en pacients amb insuficiència renal i comorbiditat associada. Els tumors distals de baix estadi i grau poden ser tractats mitjançant **ureterectomia parcial**, és a dir, únicament extraient la part de l'urèter afectada pel tumor.

1.2.5.2.2 Radioteràpia i Quimioteràpia

El CU és un tipus de tumor poc sensible a la radioteràpia. Tot i que el tractament estàndard del CU de bufeta múscul-invasiu és la cistectomia radical, la radioteràpia forma part de l'opció conservadora en el tractament d'aquesta malaltia en cas de preservació de la bufeta en combinació amb la RTU i la quimioteràpia sistèmica.

La supervivència als 5 anys després de la cistectomia radical no supera el 50% [48]. Per aquest motiu, la quimioteràpia neoadjuvant s'utilitza des del 1980 ja que augmenta la supervivència [49].

Per la seva banda, la quimioteràpia per si sola no comporta remissions tumorals duradores. Per alguns pacients ben seleccionats, després d'una estratègia conservadora i quimioteràpia basada en platí es pot allargar la supervivència amb el manteniment de la bufeta intacta i fins i tot considerar-se un tractament curatiu [50]. Després de la cistectomia radical, la quimioteràpia adjuvant es valora als pacients amb tumors d'estadi avançat (pT3-pT4).

Pel que fa al TM-TUS, la radioteràpia no té un paper rellevant i hi ha pocs estudis que demostrin l'eficiència de la quimioteràpia. A més, degut a l'edat avançada dels pacients i a la comorbiditat, no tots els pacients són candidats a aquest tipus de tractament. Un estudi amb

pacients sotmesos a quimioteràpia mostra un benefici en la supervivència després del tractament combinat amb nefroureterectomia radical [51].

1.2.6 Associació del carcinoma urotelial en el tracte urinari superior amb el carcinoma urotelial de bufeta

Els tumors localitzats al TUS estan fortament associats als de la bufeta. Aproximadament el 20-50% de pacients amb TM-TUS desenvoluparan un CU de bufeta al llarg de la seva vida, encara que només entre un 0.7-4% dels pacients amb CU de bufeta desenvoluparan TM-TUS. Respecte a les recidives a la bufeta, s'ha observat que en la bufeta i la uretra prostàtica d'alguns dels pacients amb TM-TUS existeixen canvis pre-neoplàsics microscòpics, especialment quan són d'alt grau. La majoria d'aquestes recidives acostumen a donar-se dins dels 2 primers anys després del tractament quirúrgic del TM-TUS, estant la mitja entre els 5 i els 15 mesos posteriors [52,53]. La multifocalitat associada al CU en aquesta localització, l'estadi patològic i la història de tumor de bufeta del pacient s'han descrit com els factors de risc més importants per la recidiva tumoral a la bufeta [53]. L'alt índex de recidiva a la bufeta derivada d'un tumor al TUS implica la necessitat d'un rigorós seguiment dels pacients mitjançant cistoscòpia, especialment d'aquells amb antecedents de tumor de bufeta. A la situació contrària, la recidiva al TUS després d'un tumor de bufeta, existeix la hipòtesi de que la presència de reflux juga un paper actiu a la disseminació de cèl·lules canceroses des de la bufeta fins la pelvis renal. Els factors més importants de predicció de recidiva del tumor al TUS són la multiplicitat del tumor de bufeta i l'estadi Tis. Finalment, cal destacar que els tumors localitzats al TUS acostumen a presentar un major estadi i grau que els tumors de bufeta, fet que confereix més agressivitat i pitjor pronòstic [54]. Tot i compartir moltes característiques i ser un debat amb molta controvèrsia, el CU de bufeta i el TM-TUS representen dues malalties amb comportaments diferents encara que comparteixin el mateix origen histològic [55].

1.2.7 Pronòstic

Ja que l'agressivitat de la malaltia del CU de bufeta i de TUS és diferent, dividirem la secció en dos apartats:

1.2.7.1 Pronòstic del carcinoma urotelial de tracte urinari superior

Els TM-TUS que envaeixen la capa muscular (60%) acostumen a presentar un mal pronòstic. La supervivència als 5 anys és inferior al 50% pels estadis T2 i T3 i menor del 10% pels T4 [20]. L'edat és un factor important per predir la supervivència al TM-TUS [56], tot i ser insuficient per si sola per a predir l'evolució de la malaltia.

Els factors pronòstics més àmpliament reconeguts són l'estadi patològic i el grau histològic [57,58] però també s'utilitzen el tamany (≥ 2 -3cm) i la multiplicitat del tumor (Figura 9). Aquests factors són insuficients per predir l'evolució dels pacients i la recerca a través d'aproximacions de biologia molecular és de gran interès en aquesta malaltia.

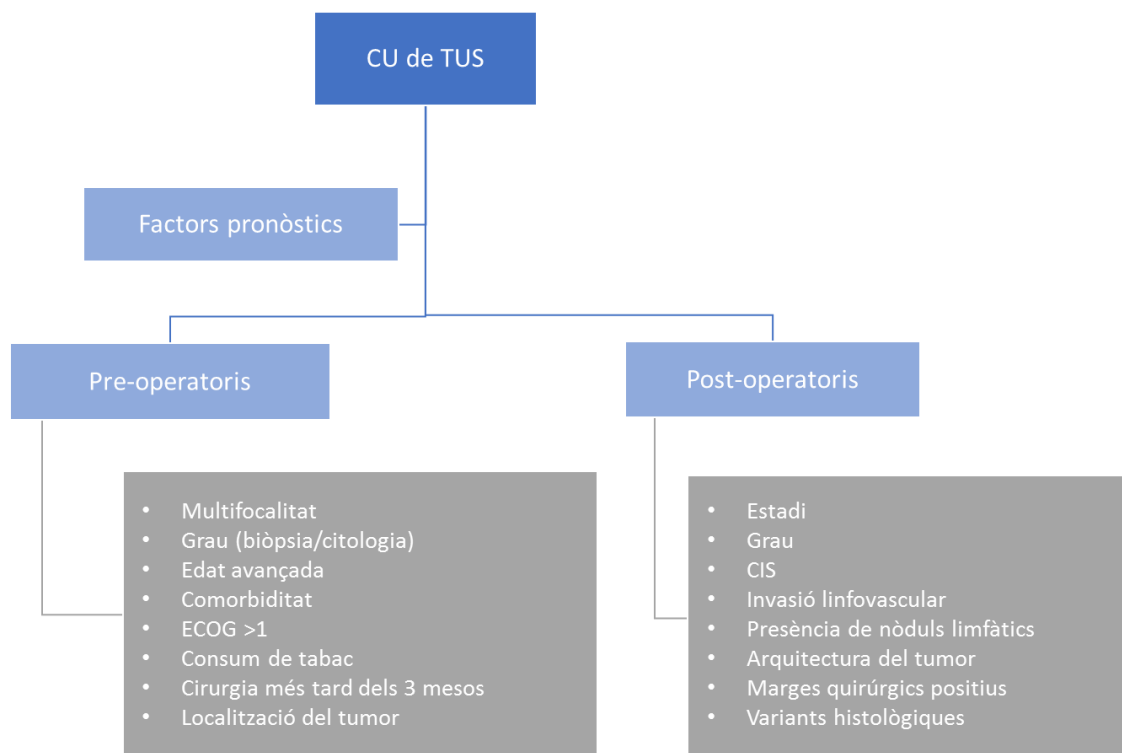


Figura 9. Factors pronòstics al carcinoma urotelial de tracte urinari superior [18].

1.2.7.2 Pronòstic del carcinoma urotelial de bufeta

El tractament de la malaltia ha d'estar basat en la predicció del pronòstic del pacient. Per això, s'ha desenvolupat una classificació basada en el risc de recidiva i progressió per cada pacient [59]. El sistema de classificació es basa en els sis factors clínics i patològics que es mostren a la taula 3 i assigna a cada factor un pes que afectarà a la puntuació final del test pronòstic pel CU de bufeta. D'acord amb aquesta puntuació final, se li assigna a cada pacient una probabilitat de recidiva i progressió (Taula 4).

Taula 3. Pes assignat a cada factor per calcular la puntuació de risc de recidiva i de progressió del CU de bufeta [26].

Factor	Recidiva	Progressió
Nombre de tumors		
Únic	0	0
2 a 7	3	3
≥ 8	6	3
Diàmetre del tumor		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Taxa de recidiva prèvia		
tumor primari	0	0
≤ 1 recidiva/any	2	2
> 1 recidiva/any	4	2
Categoria		
Ta	0	0
T1	1	4
Cis concomitant		
Si	0	0
No	1	6
Grau		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Puntuació total	0 - 17	0 - 23

Taula 4. Probabilitat de recidiva i progressió de la malaltia d'acord amb la puntuació de risc [26].

Puntuació per la recidiva	Probabilitat de recidiva a l'any		Probabilitat de recidiva als 5 anys	
	%	(95% CI)	%	(95% CI)
0	15	(10-19)	31	(24-37)
1 - 4	24	(21-26)	46	(42-49)
5 - 9	38	(35-41)	62	(58-65)
10 - 17	61	(55-67)	78	(73-84)

Puntuació per la progressió	Probabilitat de progressió a l'any		Probabilitat de progressió als 5 anys	
	%	(95% CI)	%	(95% CI)
0	0.2	(0-0.7)	0.8	(0-1.7)
2 - 6	1	(0.4-1.6)	6	(5-8)
7 - 13	5	(4-7)	17	(14-20)
14 - 23	17	(10-24)	45	(35-55)

1.2.8 Genètica i biologia molecular del carcinoma urotelial

1.2.8.1 Citogenètica del carcinoma urotelial

Com en altres tumors sòlids, al CU de bufeta es donen freqüentment aberracions estructurals i numèriques dels cromosomes (aneuploïdies, reordenacions, delecions, amplificacions, etc.), que indiquen una inestabilitat genètica. Aquestes alteracions poden donar lloc a nous gens de fusió o a canvis en la regió reguladora d'alguns gens i poden tenir un impacte directe en el control de les funcions cel·lulars. Es creu que les cèl·lules de l'epiteli urotelial pre-cancerós ja presenten aquest tipus d'alteracions [60]. Els tumors múscul invasius presenten moltes alteracions i generalment es tracta d'aneuploïdies. Per contra, els CU no múscul-invasius acostumen a presentar un cariotip proper al diploide i pocs reordenaments genòmics.

Els canvis cromosòmics que donen lloc al CU de bufeta han estat àmpliament estudiats. Alguns treballs han revelat que en aquest tipus de tumor existeixen freqüents alteracions en un gran nombre de cromosomes (1, 9, 7, 11, 17, entre d'altres), sent la pèrdua del cromosoma 9 l'alteració més comú [61]. La trisomia del cromosoma 7 s'ha relacionat amb la recidiva tumoral [62], mentre que la polisomia del cromosoma 17 i els guanys del cromosoma 8 s'han relacionat amb un major grau i estadi, és a dir, amb la progressió tumoral [63]. Al NMIBC de baix grau s'ha comprovat que són infreqüents les alteracions genètiques del cromosoma 3. No obstant, aquest cromosoma es troba freqüentment alterat en tumors d'alt grau i múscul-invasius [64]. En els NMIBC també es troben freqüents delecions als cromosomes 2, 4p, 8p, 11p, 13q, 17p i 18q [65]. Específicament a la regió 17p, que conté el gen *TP53*. Delecions de 4p també han estat associades a fenotips tumorals més agressius [61].

Pel que fa al TM-TUS, encara que s'han realitzat escassos estudis citogenètics en aquest tipus de tumor, el seu perfil citogenètic sembla similar al descrit al CU de bufeta, el que suggereix que aquests tumors presenten unes anomalies genètiques similars [52,61]. Concretament, algunes de les alteracions més freqüents trobades en aquest tipus de tumors són el guany de 1q, delecions de 1p, 5q, 8p, 14q, i trisomies dels cromosomes 7 i 20. També és freqüent la pèrdua parcial o total del cromosoma 9 [61,66]. Les diferències genètiques que semblen variar segons la localització tumoral en el tracte urinari són les que comporten la inestabilitat de microsatèl·lits, descrites especialment al TM-TUS [67].

1.2.8.2 Biologia molecular del carcinoma urotelial

La biologia molecular del CU és complexa. Es tracta de tumors que acumulen inicialment un nombre important d'alteracions moleculars. Aquestes alteracions no només són més abundants a les lesions múscul-invasives que en les no múscul invasives, sinó que a més a més, semblen ser diferents. En general, les lesions moleculars que donen lloc a la formació d'una neoplàsia ocorren als següents tipus de gens reguladors:

- **Protooncogens:** la funció normal del seu producte gènic és promoure la proliferació cel·lular.
- **Gens supressors de tumors:** regulen el creixement cel·lular descontrolat.
- **Gens reparadors:** codifiquen per proteïnes que serveixen per mantenir la integritat del genoma.

Protooncogens

La principal funció de les proteïnes codificades pels protooncogens és la transmissió de senyals des de la superfície cel·lular al citoplasma o al nucli, així com la generació d'una resposta a aquestes senyals, a través de la fosforilació de molècules diana i d'induir la transcripció del DNA. Les mutacions en aquests gens són de guany o canvi de funció, i promouen la proliferació i la diferenciació cel·lular. Les mutacions als protooncogens afecten només a un al·lel i gairebé sempre són canvis somàtics. Els protooncogens mutats s'anomenen oncogens.

Els primers oncogens estudiats relacionats amb el CU van pertànyer a la família **RAS (H-RAS, K-RAS, N-RAS)**. Aquestes proteïnes juguen un paper clau en la transducció de senyals intracel·lulars [68].

Altres oncogens que s'han trobat freqüentment sobre-expressats al CU són **EGFR** i **ERBB2**, localitzats en 7p i 17q, respectivament. Aquests gens codifiquen per proteïnes que intervenen en la transmissió de senyals de l'exterior a l'interior cel·lular. Específicament, la sobre-expressió d'aquests oncogens s'ha relacionat amb el fenotip múscul-invasiu dels tumors de bufeta [69–71].

El 80% dels tumors de bufeta d'estadi pTa presenten mutacions puntuals a **FGFR3**, el que s'associa amb un pronòstic favorable [72,73]. A l'estadi pT1 i en tumors múscul invasius, la mutació a **FGFR3** és menys comú (10-20% en tumors d'estadi pT2 o superior) [74,75]. Tot i això, **FGFR3** està implicat en el risc de desenvolupament de CU, així com en l'augment del risc

de recidiva. A més, molts CUs, incloent aquells sense mutacions a *FGFR3* presenten una sobre-expressió d'aquest gen [74]. Els microRNAs (dels que parlarem més endavant) miR-99a i miR-100, que regulen negativament l'expressió d'*FGFR3*, es troben comunament infra-expressats al càncer de bufeta, particularment al NMIBC [76]. Tot i això, en CU no es troba una alta freqüència de mutacions a protooncogens a estudis de seqüenciació de l'exoma, el que pot indicar canvis més aviat epigenètics que no genètics. Existeix la hipòtesis de que *FGFR3* actua activant vies de senyalització en les que participa *RAS*, sent les mutacions en aquests dos gens mútuament excloents [77]. També s'ha vist que són excloents mutacions en *FGFR3* i el gen *TP53* (gen supressor de tumors que codifica per la proteïna P53) el que indica que intervenen en vies alternatives de desenvolupament del carcinoma [78,79].

C-MYC, localitzat a 8q, és un oncogen que codifica una fosfoproteïna nuclear. Entre les funcions d'aquesta proteïna s'inclouen la de promoure la replicació del DNA i la de regular la transició G0/G1 al cycle cel·lular. Encara que la sobre-expressió d'aquest gen no estigui relacionada amb la progressió i/o la supervivència, sembla presentar-se amb més freqüència en tumors de bufeta d'alt estadi i grau [80].

Un altre protooncogen a destacar és **BCL-2**, localitzat en 18q i que juga un paper fonamental a la inhibició de l'apoptosi. La seva sobre-expressió està associada a fenotips poc agressius del tumor [81].

Un dels principals protooncogens relacionats amb l'apoptosi i amb el CU és **BIRC5**, localitzat en 17q i que codifica per una proteïna anomenada **survivina**. Aquesta proteïna és multifuncional ja que juga un paper clau a la inhibició de l'apoptosi, intervé a la regulació del cycle cel·lular i promou l'angiogènesi. S'ha vist sobre-expressada en diversos tipus tumorals, incloent el CU, i donada la diferència tan marcada d'expressió entre el teixit tumoral i el normal, ha estat estudiada com a diana terapèutica [82] i com a marcador tumoral al CU [83].

Finalment, un altre protooncogen important relacionat amb la senyalització en l'apoptosi és **FAS**. Mutacions en aquest gen poden limitar la mort cel·lular programada afavorint el desenvolupament del CU [84].

Gens supressors de tumors

Els gens supressors de tumors codifiquen per proteïnes que bàsicament controlen i regulen el cycle cel·lular. En aquests gens, per donar lloc a la transformació cel·lular, ambdues còpies han d'estar mutades, el que porta a la pèrdua de funció del gen.

Moltes de les afectacions a gens supressors de tumors estan relacionades amb el *checkpoint* de la fase G1 del cicle cel·lular. A gairebé tots els MIBC es troben defectes en gens que codifiquen per a proteïnes que controlen aquest punt. Entre ells, la inactivació de **TP53**, **RB1** i **CDKN2A**, presenten un pronòstic advers important [85]. En concret, la funció de *TP53* es troba inactivada en el 76% dels MIBC [86]. Aquestes mutacions, en canvi, no són freqüents en estats inicials de la malaltia. D'altra banda, la inactivació de la ciclina **CCND1** està relacionada amb el desenvolupament del NMIBC i pot representar un mecanisme d'inactivació del *checkpoint* de G1 en aquests tumors.

S'ha observat una pèrdua d'heterozigositat al locus de *RB1* en un 29-33% dels càncers de bufeta, també amb una major freqüència en tumors múscul-invasius, i mutacions puntuals del mateix gen en aproximadament el 27% de pacients [87]. A més, la pèrdua d'expressió de p16, freqüent alteració al CU, està inversament correlacionada amb l'expressió de *RB1* i resulta en un feedback d'alts nivells d'expressió en tumors amb pèrdua de *RB1* [88]. Els dos canvis són utilitzats com a biomarcadors adversos de progressió i es troben a més del 50% de MIBC [89]. L'ús d'assajos que detecten la combinació de TP53 i pRB millora la predicció del pronòstic del CU de bufeta, en comparació amb la detecció de les mateixes proteïnes però per separat. De fet, existeixen estudis que demostren una activitat cooperativa de TP53 i PRb a la progressió del CU [90]. Un altre dels gens supressors de tumors clau pel seu paper en la regulació del cicle cel·lular és **CDKN1A**, localitzat en 6p i que codifica per la proteïna P21. És un gen supressor de tumors per la seva capacitat d'unió e inhibició de l'activitat fosforilasa de les quinases dependents de ciclins que regulen el cicle cel·lular. La seva expressió està regulada de manera directa per TP53, sent amb aquesta, mediador de la parada del cicle cel·lular quan es produeix un dany al DNA. Estudis d'immunohistoquímica han demostrat que en el *Cis*, l'existència d'un fenotip amb ambdues proteïnes mutades, TP53 i P21, està relacionat amb un major risc de recidiva, progressió i mortalitat [91,92].

Per últim, cal destacar els gens **CDKN2A** i **CDKN2B**, que codifiquen per les proteïnes P16 i P15, respectivament, i localitzades en la regió 9p21, la qual es troba freqüentment delecionada en estadis inicials del CU. Aquestes proteïnes són quinases dependents de les ciclins que regulen el cicle cel·lular. Concretament la pèrdua d'expressió de P16, un inhibidor de la fosforilació de PRb i per tant inhibidor del cicle cel·lular, sembla presentar un efecte advers sobre la evolució clínica i la recidiva del tumor [93].

Com hem dit, la deleció del cromosoma 9 és el fenomen més comú tant en NMIBC com en MIBC i es presenta en més d'un 50% d'aquests [94]. Això afecta a diferents gens supressors de tumors com *CDKN2A* i *CDKN2B* [95], *PTCH1* [96], *DBC1* [97] i ***TSC1*** [98]. Aquest últim és un dels gens més estudiats. Té la funció de regular negativament l'expressió de la branca d'mTOR a la via de la PI3K. La pèrdua d'heterozigositat del cromosoma 9, la deleció homozigòtica de *CDKN2A* i la pèrdua de l'expressió de p16 al NMIBC està relacionada amb una reducció del temps lliure de recidiva en pacients amb CU [99,100].

Gens reparadors

Aquests gens codifiquen per proteïnes que detecten i reparen errors en la síntesi del DNA. Quan no es corregeixen els errors a la síntesi del DNA s'incrementa molt el nombre de mutacions a novell de tot el genoma. Aquests errors succeeixen normalment a seqüències repetitives, les quals poden trobar-se en regions codificants i no codificants.

Trobem diversos gens reparadors del DNA mutats al CB. Pel que fa al MIBC, els gens ***ERCC2*** i ***ATM*** estan descrits a l'estudi del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) com a promotors de progressió del CU [101]. La freqüència de mutacions germinals en gens reparadors del DNA a pacients amb CB és d'aproximadament el 10%, essent més freqüents a pacients amb MIBC que als que presenten NMIBC i associant-se a un pronòstic desfavorable [102]. Pel que fa al TM-TUS, trobem una associació entre mutacions germinals a gens reparadors del DNA causants del Síndrome de Lynch i la predisposició al TM-TUS [103].

1.2.8.3 Vies moleculars de progressió del carcinoma urotelial

El CU té un comportament bastant impredecible, donat que no tots els tumors amb el mateix fenotip es comporten de la mateixa manera. Aquesta discrepància porta a pensar en l'existència de diverses vies de progressió de la malaltia amb diversos patrons d'alteracions genètiques. La informació sobre la genètica i la biologia molecular del CU ha ajudat a hipotetitzar diferents models sobre el desenvolupament d'aquests tumors. La gran majoria de models coincideixen en que la deleció del cromosoma 9, o com a mínim, del seu braç p, acostuma a ocórrer d'hora en el desenvolupament del CU [104,105]. Tot i així, existeixen diferents teories al voltant de la divergència genètica entre els tumors múscul-invasius i els no múscul-invasius.

Höglund i col·laboradors al 2001 van proposar un model en el que es mostraven dues vies de desenvolupament del CU [106]. Una d'aquestes vies s'iniciaria amb la pèrdua del cromosoma 9

i continuaria amb les pèrdues del 11p i amb guanys en l'1q. Aquesta seria la via que seguirien aquells tumors que comencen sent Ta però que després progressen a múscul-invasius. D'altra banda, una segona via començaria amb guanys al cromosoma 7 i continuaria amb pèrdues i guanys del cromosoma 8q. Aquesta via presentaria una correlació amb els estadis T1-T3. En passos posteriors d'ambdues vies es donarien alteracions genètiques comuns, de forma que aquestes dues vies serien inicialment independents però convergrien en estadis avançats, quan el nombre d'alteracions genètiques és molt elevat.

Més endavant, al 2005, Wu i col·laboradors plantegen també dues vies d'evolució del CU [107]. Una d'elles es caracteritza per la presència de mutacions a *FGFR3* (70%) i *H-RAS* (30-40%) a l'inici de la carcinogènesi. Posteriorment i associades a progressió, es produirien delecions en 8p, 11p, 13q i 14q. Una segona via, que caracteritzaria als tumors múscul-invasius d'alt grau, s'originaria a partir d'un Cis, d'una displàsia severa, o bé *de novo*. La majoria dels tumors que anirien per aquesta via tindrien mutacions a *TP53* o a *RB1*. A més, el 50% dels tumors que seguirien aquesta via generarien metàstasi al intervenir en el procés alteracions en molècules d'adhesió, en factors que intervenen en l'angiogènesi, entre d'altres.

Actualment i gràcies als avanços en les tècniques de biologia molecular, s'estan confirmant les teories de les dues vies: els tumors no múscul invasius, amb altes taxes de recidiva però genèticament estables, i els tumors múscul invasius, genèticament inestables i que acumulen moltes alteracions (Figura 10).

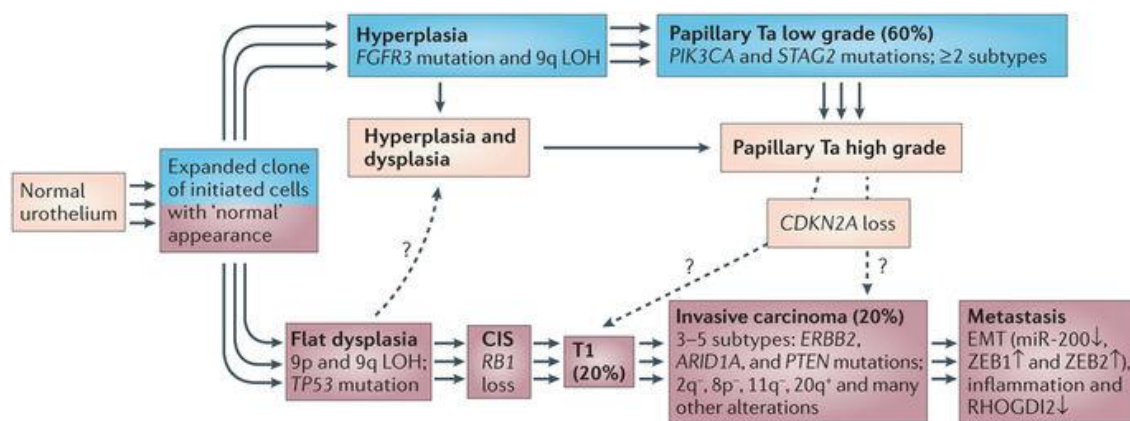


Figura 10. Potencials vies per la formació del CU basades en observacions histopatològiques i moleculars. Els marcatges blau i el vermellós indiquen les dues vies majoritàriament reconegudes a les dues últimes dècades. Actualment, la identificació dels diferents subtipus moleculars suggereix vies alternatives entre les dues principals [94].

Cal destacar que s’han trobat tumors invasius que presenten mutacions a *FGFR3* i pèrdua de *CDKN2A*, el que podria suggerir una via per la qual tumors papil·lars no invasius de baix grau poden progressar i envair el múscul i fins i tot arribar a metastatitzar. La recent identificació de múltiples subtipus moleculars de NMIBC i de MIBC suggereix diverses sub-vies dins de les dues vies principals que explicarien l’heterogeneïtat i la variabilitat del comportament tumoral que s’observa a la pràctica clínica (Figura 11).

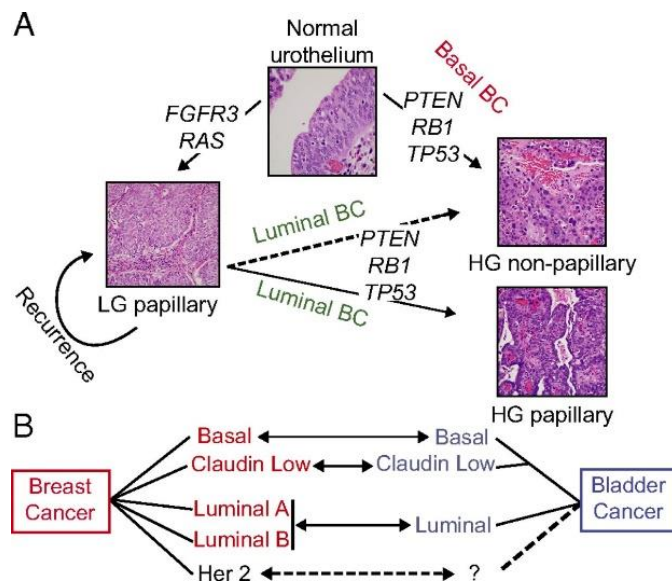


Figura 11. Proposta de model per la formació del CU i la seva relació amb els subtipus intrínsecs del càncer de mama. **A)** Associació de les alteracions genètiques als CU de baix i alt grau. **B)** Diagrama que mostra la possible relació entre els subtipus intrínsecs de càncer de mama i bufeta [94].

1.2.8.4 Subtipus moleculars del carcinoma urotelial

L’heterogeneïtat en l’evolució clínica dels pacients amb CU suggereix l’existència de diferències biològiques rellevants a nivell molecular entre els tumors NMIBC i els MIBC. A la literatura trobem diferents estudis que tenen com a objectiu caracteritzar els diferents subtipus moleculars que es troben al CU. En aquests treballs s’analitza els tumors de bufeta des de diferents aproximacions moleculars: estudis de mutacions del DNA, estudis d’expressió gènica, de metilació, etc. (Figura 12). Fins al moment, els perfils transcripcionals en combinació amb l’estudi de mutacions presenten la millor definició dels diferents subtipus tumorals. Un extens estudi d’expressió en diversos tumors de bufeta de tots els estadis i graus dut a terme per Sjödaahl i col·laboradors (conegut com “estudi de Lund”) va identificar cinc subtipus tumorals: **urobasal (UroA)**, **UroB**, **genèticament inestable (GU)**, **carcinoma de cèl·lules escamoses (SCCL)** i **invasiu** [108].

El grup SCCL comparteix moltes característiques amb el subtipus basal en càncer de mama pel que s'ha decidit anomenar-lo basal també [109]. Els tumors UroA són de bon pronòstic; els GU i els invasius presenten un pronòstic intermig i els basals i els UroB tenen el pitjor pronòstic. Tot i que els tumors UroB tenen mutacions a *TP53* i molts són múscul invasius, mostren característiques epitelials, incloent mutacions a *FGFR3*, el que pot indicar una evolució des del grup d'UroAs. Els tumors UroB també presenten deleció homozigòtica de *CDKN2A*, el que podria ser un mecanisme pel que els tumors no múscul invasius amb mutació a *FGFR3* progressessin [110]. Aquests subtipus moleculars no correlacionen exactament amb l'estadi patològic i el grau histològic dels tumors inclosos a l'estudi, el que pot tenir implicacions rellevants al tractament i pronòstic d'aquests pacients.

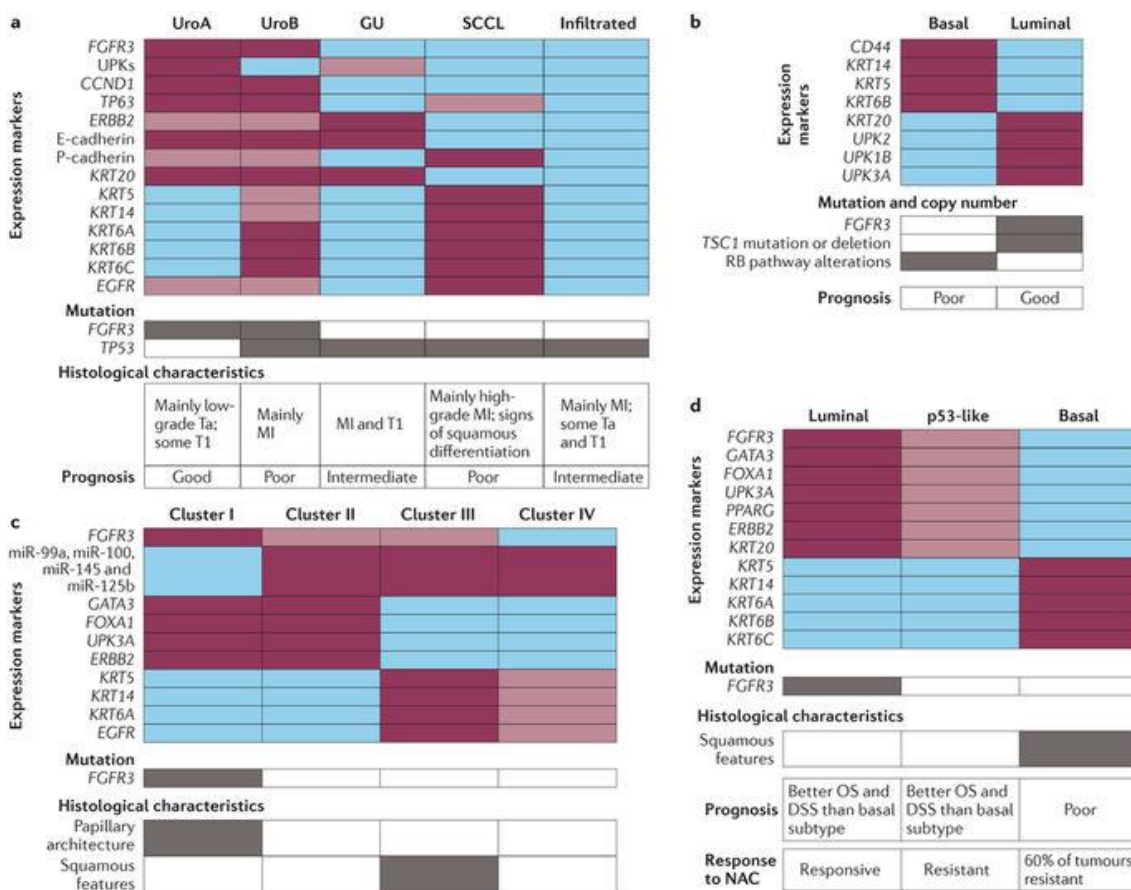


Figura 12. Subtipus moleculars del càncer de bufeta. Classificació dels subtipus en referència als quatre perfils d'expressió gènica proposats. **A)** Sjødal i col·laboradors defineixen cinc subtipus anomenats urobasal A (uroA), UroB, genèticament inestable (GU), carcinoma de cèl·lules escamoses (SCCL) i invasius [108]. **B)** Damrauer i col·laboradors classifiquen en base a subtipus basals i luminals [111]. **C)** L'estudi del TCGA defineix quatre grups d'expressió diferenciats [86]. **D)** Choi i col·laboradors defineixen el subtipus luminal "p53-like" [112].

Subseqüents estudis en MIBC realitzats per Damrauer i col·laboradors, han definit els subtipus transcripcionals [101,113,114] amb força coincidència [115] ja que els dos subtipus majoritaris (basal i luminal) mostren grans semblances amb els mateixos subgrups en càncer de mama. Els tumors del subgrup luminal de MIBCs estan enriquits en uroplaquines, KRT20, ERBB2 i marcadors de diferenciació com FOXA1, GATA3, TRIM24 i PPAR γ , i a més presenten una morfologia papil·lar i sobre-expressió o mutació de *FGFR3*.

A l'estudi del TCGA s'han definit quatre grups basats en l'expressió gènica (I-IV). El grup I es caracteritza per expressar marcadors luminals [86]. El grup II comparteix característiques de luminal i d'un subtipus anomenat "p53-like". Aquest subtipus "p53-like" va ser descrit per Choi i col·laboradors, definint-lo també com a luminal i caracteritzar per presentar activacions a la via de *TP53*, baix nivells de marcadors de cycle cel·lular i de proliferació i enriquiment de marcadors de matriu extracel·lular [112]. El subgrup invasiu descrit per Sjödaahl i col·laboradors gairebé solapa amb aquest subtipus. En els tres estudis que acabem de descriure trobem tumors expressant marcadors basals (*KRT5*, *KRT6*, *KRT14*, *CD44* i *CDH3*). Dos d'ells identifiquen tumors "low-claudin basal" que expressen marcadors característics d'EMT i amb baixos nivells de citoqueratines, els quals són anàlegs a alguns càncers de mama [111]. Globalment, en tots els estudis, el grup SCCL (o basal) de MIBC presenta el pitjor pronòstic, i aquells tumors amb arquitectura papil·lar i sobre-expressió d'*FGFR3*, E-caderina, *GATA3*, *FOXA1* i uroplaquines tenen el millor pronòstic.

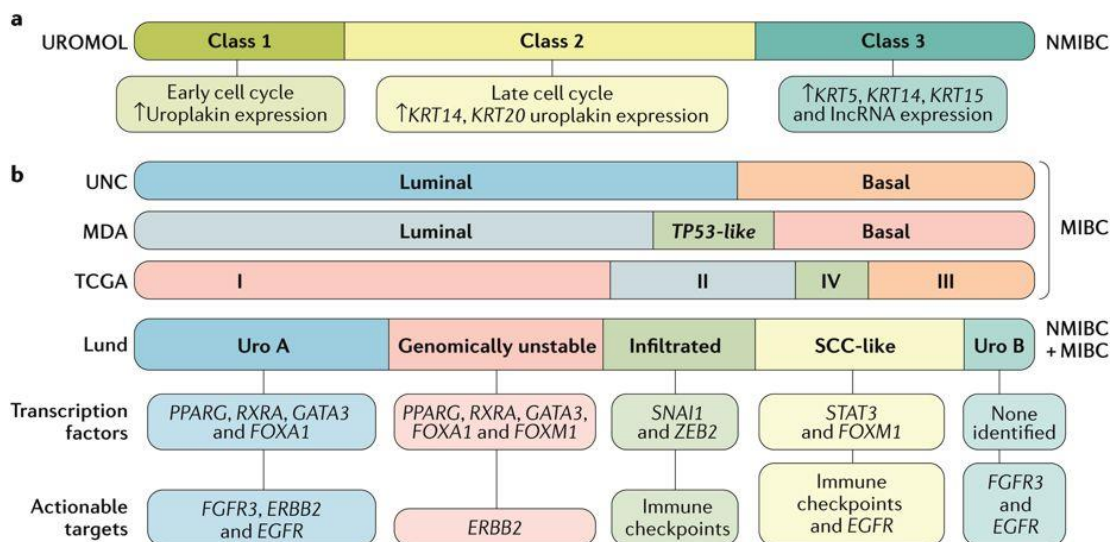


Figura 13. Subtipus moleculars del càncer de bufeta. a) Subtipus moleculars del NMIBC provinents de l'estudi UROMOL. b) Nomenclatura i correlació entre els subtipus moleculars descrits pels diferents estudis transcripcionals pel MIBC. *Imatge extreta de [116].*

Pel que fa a la classificació molecular del NMIBC, a l'estudi de Lund es van incloure bastants tumors no múscul invasius de baix grau, els quals es van classificar predominantment com a UroAs. D'altra banda, l'estudi UROMOL [117], que s'ha centrat en la classificació dels subtipus moleculars del NMIBC, ha descrit tres subtipus moleculars. Els tumors agrupats a la classe 1 són majoritàriament Ta i mostren el millor pronòstic. Les alteracions d'aquesta classe 1 són molt similars a les del grup d'UroAs de la classificació de Lund. A la classe 2 s'agrupen tumors T1 i tumors d'alt grau i la majoria dels tumors que van progressar cap a MIBC. La classe 3 inclou tumors amb característiques compartides entre el grup d'UroAs i la classificació basal dels MIBC.

Un resum dels diferents subtipus moleculars del CU descrits fins al moment es mostra a la Figura 13. Avui en dia s'està treballant per definir una classificació única de subtipus moleculars per poder-la utilitzar a la pràctica clínica i millorar el tractament d'aquests tumors.

1.2.8.5 microRNAs

Els microRNAs (miRNAs) són RNAs no codificants de cadena simple formats per entre 18-25 nucleòtids de llargària i que constitueixen una nova classe de gens reguladors [118]. En general, regulen negativament l'expressió de les seves dianes (un mRNA, *de l'anglès Messenger RNA*, és una diana d'un miRNA si aquest miRNA regula el mRNA) d'una o dues maneres depenent del grau de complementarietat entre el miRNA i la seva diana (Figura 14).

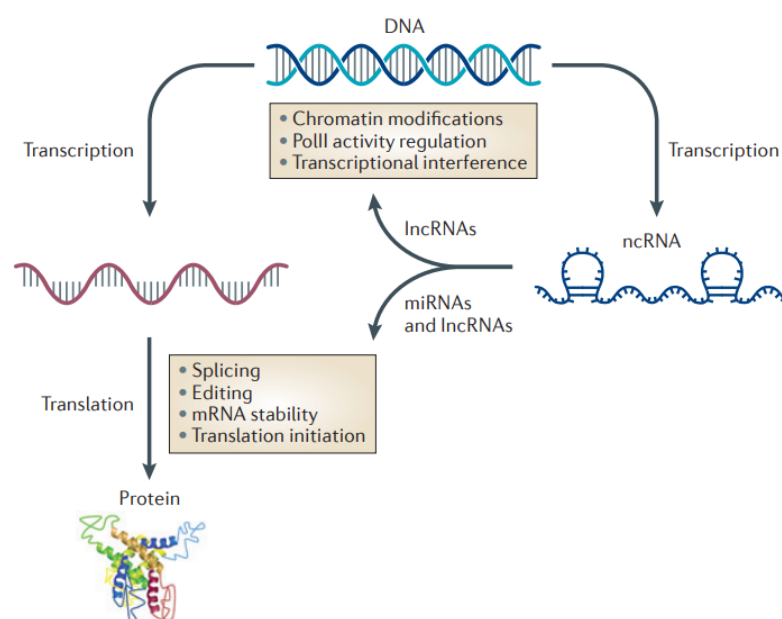


Figura 14. Resum dels elements bàsics que regulen el DNA, l'expressió en forma de mRNA i de les proteïnes [119].

En aquesta tesi s'han identificat miRNAs amb valor pronòstic en TM-TUS, i per tant, a continuació es descriu la biogènesi, nomenclatura i relació dels miRNAs amb el càncer:

Biogènesi dels microRNAs

La transcripció dels gens dels miRNAs per la polimerasa II dona lloc a la generació d'un transcrit primari del miRNA (pri-miRNA). Un complex format per les proteïnes Drosha i DGCR8 constitueix el microprocessador que talla el pri-miRNA per a formar la forquilla del miRNA precursor o pre-miRNA [120]. El pre-miRNA és exportat al citoplasma per una exportina i allà és tallat per Dicer, una RNasa (l'activitat de la qual pot estar regulada per proteïnes accessòries) i es forma un dúplex que anomenarem miRNA intermediari. Aquest dúplex conté dos fragments madurs de miRNA, els que s'anomenaran 5p i 3p. El fragment que es transcriu en la direcció original de traducció serà el 5p, mentre que el 3p serà el complementari. Normalment, un d'ells és immediatament degradat (normalment el fragment 3p). La base de dades on es recullen els miRNAs humans descoberts és l'anomenada miRBase data base [121]. En versions anteriors d'aquesta base de dades, el fragment de miRNA degradat s'anomenava amb un asterisc (*miR-X**) i l'altre sense cap més identificació que el número. En canvi, algunes vegades els dos fragments romanen estables i funcionals a la cèl·lula [122]. Per això, en versions més recents de miRBase, el miRNA madur està referit com a '-5p' i '-3p'.

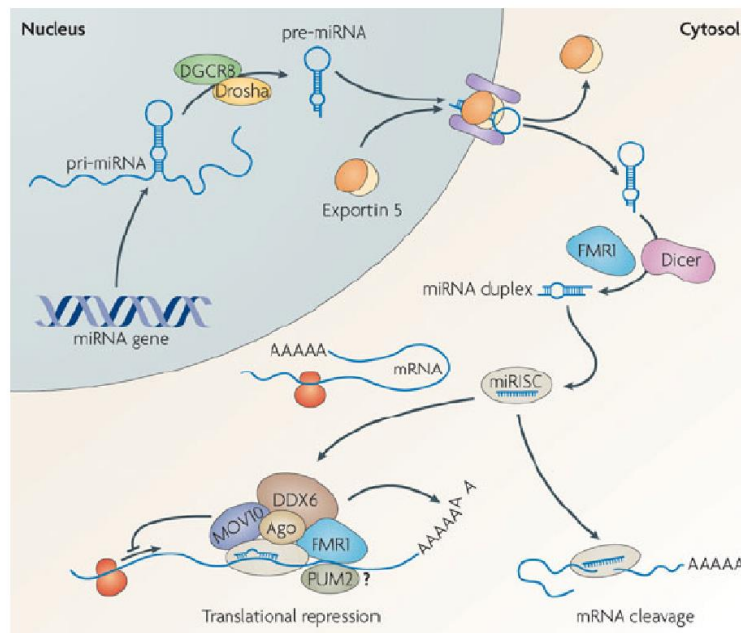


Figura 15. Biogènesi de l'RNA i el seu sistema d'acció [123].

Aquest miRNA madur s'integra a un complex multiproteic anomenat complex miRISC (de l'anglès, *miRNA-induced silencing complex*). Aquest complex és guiat fins al mRNA diana i quan ambdós hibriden, preferiblement a localitzacions properes al 3'UTR del mRNA, pel que es requereix una complementaritat completa al que anomenem *seed* del miRNA però no a altres parts de la unió, dues opcions són possibles: la repressió translacional o la degradació del mRNA diana, on aquesta degradació ocorre al voltant del 84% de les vegades [124]. En ambdós casos, la proteïna mai es forma. El mecanisme detallat de miRISC és encara controvertit però requereix de la funció d'altres proteïnes (helicases com MOV10 i DDX6 o proteïnes d'unió a l'RNA com FMR1 o PUM2) (Figura 15).

Es creu que més del 60% dels mRNA presents a una cèl·lula estan possiblement regulats per miRNAs [125]. Tot i que no hi ha un límit biològic descrit, mentre que un miRNA pot tenir molts mRNA diana, no s'espera que un mateix mRNA tingui molts miRNAs que tinguin com a diana el seu extrem 3' ja que cada miRNA necessita la seva pròpia seqüència de RNA per reconèixer-la i hibridar (la seqüència referenciada abans com a *seed*).

Els miRNAs s'agrupen en famílies o clústers. Una família de miRNAs està formada per diferents miRNAs que comparteixen la mateixa regió *seed*. Aquesta regió *seed* consisteix en els primers vuit nucleòtids a l'extrem 5' i és important pel reconeixement miRNA-mRNA [126]. Per tant, normalment els miRNAs de la mateixa família comparteixen moltes de les seves dianes. Per contra, els clústers són grups de miRNAs que es transcriuen junts per la seva proximitat al genoma però no són necessàriament membres de la mateixa família i la seva seqüència pot ser molt diferent així com les seves dianes.

Els gens dels miRNAs poden estar a diferents llocs del genoma. Un mateix miRNA pot estar codificat per més d'un clúster, cadascun localitzat a un cromosoma diferent. Els dos gens produiran el mateix miRNA, el qual no es podrà diferenciar.

microRNAs en càncer

Els miRNAs, com a reguladors de l'expressió gènica, participen en tots els processos associats a la carcinogènesi, controlant un ampli ventall de funcions biològiques com la proliferació cel·lular, la diferenciació o l'apoptosi. A més, algunes vies moleculars estan interconnectades, evidenciant que el rang de funcions que poden estar regulades per un miRNA pot ser molt ampli. Els miRNAs poden actuar tant com oncogens com gens supressors de tumors depenent de la funció que tingui el mRNA diana que regulin. Encara més, factors

necessaris per a la biogènesi dels miRNAs han estat associats amb varis tipus de càncers i poden ells mateixos actuar com a oncogens o gens supressors de tumors [127].

L'estudi dels perfils d'expressió dels miRNAs ha demostrat la seva utilitat com a mètode per a la classificació de diferents subtipus de càncer. Aquestes molècules poden convertir-se en una eina molt potent pel diagnòstic, pronòstic o tractament d'aquesta malaltia. Pel que fa a la utilitat dels miRNAs com a biomarcadors diagnòstics, Hanke i col·laboradors han observat la seva estabilitat a la orina i identifiquen miR-126 i miR-152 com a marcadors prometedors pel diagnòstic pel CU [128]. Recentment, al nostre grup de recerca s'ha dut a terme l'estudi dels miRNAs en orina de pacients amb càncer de bufeta, generant una firma de miRNAs amb alta precisió diagnòstica i pronòstica per aquesta malaltia [129,130].

Els miRNAs tenen també un paper fonamental en les vies moleculars de progressió del CU. Com hem vist, les vies moleculars del tumors de baix grau i d'alt grau són diferents. En particular, els tumors de baix grau, presenten infra-expressió de miRs-99a/100 que indueixen la sobre-expressió d'*FGFR3*. Els tumors d'alt grau, per contra, desenvolupen nombrosos esdeveniments genètics i epigenètics, incloent la transició epiteli-mesènquima mitjançada per la família miR-200, la supressió de la via de *TP53* (per miR-21), l'apoptosis (pels miRs-143/145) i la proliferació mitjançada per la sobre-expressió del factor de transcripció E2F3 seguit de la infra-expressió de miR-125b .

1.2.8.6 Biomarcadors

La identificació de biomarcadors en CU és de gran importància per millorar diferents aspectes en el seu diagnòstic , pronòstic o per predir la resposta a tractaments. Tant al TM-TUS com al CU de bufeta, cap dels biomarcadors descrits als últims temps ha estat implementat a la pràctica clínica diària. A continuació es resumeix l'estat dels biomarcadors proposats pel pronòstic o diagnòstic d'ambdues patologies.

1.2.8.6.1 Biomarcadors pel tumor de tracte urinari superior

Marcadors en teixit

A la literatura s'ha descrit el paper pronòstic de diferents proteïnes involucrades al cicle cel·lular com a potencials biomarcadors de la malaltia [131]. S'ha relacionat TP53 amb l'agressivitat dels tumors i la supervivència dels pacients [132,133]. A més, s'ha relacionat Ki-67 amb la proliferació cel·lular i s'ha associat amb un estadi i grau tumoral avançat en TM-TUS [134]. En tercer lloc, la Uroplaquina III i la proteïna Snail també s'han correlacionat amb la supervivència càncer específica i amb la recidiva del TM-TUS [135,136]. Pel que fa als

marcadors d'apoptosis, la survivina s'ha descrit com a predictora de la supervivència al TM-TUS [137]. En quant a l'angiogènesi, HIF-1 α també s'ha associat a la supervivència càncer específica de TM-TUS [138]. Finalment, estudis de molècules d'adhesió com l'E-caderina han demostrat que aquesta molècula podria ser un predictor independent de la recidiva o la supervivència càncer específica [139,140]. El nostre grup va determinar el perfil d'expressió gènica del TM-TUS [141] i va descriure miR-31-5p i miR-149-5p com a biomarcadors pronòstics de progressió de la malaltia [142]. Cap d'aquests marcadors descrits s'ha implementat a la pràctica clínica molt probablement per la manca d'estudis de validació multicèntrics que confirmin aquests resultats i determinin la utilitat clínica final d'aquestes molècules.

L'anomenada inestabilitat dels microsatèl·lits (MSI) ha estat estudiada en diferents càncers i la seva presència s'ha descrit en pacients amb TM-TUS. Només un estudi ha demostrat que la MSI pot ser un predictor independent de la supervivència a la malaltia en pacients amb TM-TUS avançat (estadi T2 o més), per tant la validació dels resultats és necessària per determinar la seva utilitat com a marcador [67].

La hipermetil·lació de promotors també ha estat estudiada i relacionada amb la supervivència lliure de progressió al TM-TUS [143]. Finalment, mutacions a *FGFR3* també han demostrat estar associades amb estadis no múscul-invasius a TM-TUS i amb un millor pronòstic de la malaltia [144].

Marcadors en sang

Els estudis de biomarcadors a la sang de pacients amb TM-TUS són escassos i els pocs que trobem descrits estan en fases encara molt preliminars. A més a més, cap d'ells s'ha relacionat amb la predicció de recidiva o supervivència de la malaltia, ni ha estat validat en treballs multicèntrics [145,146].

Marcadors en orina

La orina, al estar en contacte amb l'epitel·li urotelial és un medi molt adient per la recerca de biomarcadors, així com propici pel desenvolupament d'un test diagnòstic o pronòstic no invasiu. Una citologia positiva és altament suggestiva de TM-TUS quan la cistoscòpia és normal i en el cas de que s'hagi descartat un Cis a la bufeta o a la uretra prostàtica [18]. Diferents estudis han avaluat el paper de la citologia per a determinar l'estadi i el grau del tumor i la seva utilitat predictiva preoperatòria [147,148]. A nivell molecular, l'estudi de FISH en pacients amb TM-TUS ha demostrat que aquesta tècnica presenta una alta sensibilitat per la detecció de la malaltia però no s'utilitza de manera rutinària [149,150].

1.2.8.6.2 Biomarcadors en orina pel seguiment del carcinoma urotelial de bufeta

La identificació de biomarcadors en orina és de gran importància en el càncer de bufeta per reduir la freqüència de cistoscòpies en el diagnòstic i seguiment d'aquest tumor, per detectar possibles progressions de la malaltia de manera precoç, així com per predir la resposta a tractaments [151]. En aquesta tesi ens hem centrat en la identificació de biomarcadors per a la millora de la detecció del NMIBC en pacients en seguiment per CB, ja que el 70% de les recidives són tumors no múscul-invasius, i un marcador amb una altra precisió diagnòstica en aquests pacients seria de gran utilitat a la pràctica clínica actual.

A la literatura s'han descrit diferents biomarcadors en orina pel diagnòstic i seguiment del CU, i fins i tot sis d'ells han estat aprovats per la *Food and Drug Administration* (FDA); cinc d'ells han estat aprovats pel diagnòstic i el seguiment del CU de bufeta (NMP22 test kit, NMP22 BladderCheck Test, BTA TRAK, BTA stat i l'UroVysion) i el darrer (uCyt+) ha estat aprovat només pel seguiment de pacients amb NMIBC. Tot i així, cap d'aquests tests ha estat implementat a la pràctica clínica diària.

També trobem biomarcadors comercialitzats que es troben en fases de desenvolupament (fase I-II-III) que encara no estan aprovats per la FDA. A la taula 5 es mostren en resum els diferents biomarcadors descrits fins al moment per la detecció i seguiment del NMIBC a les diferents fases de desenvolupament:

- Fase 0: desenvolupament del test
- Fase I: estudi retrospectiu
- Fase II: validació en una sèrie més àmplia
- Fase III: validació externa multicèntrica amb assajos clínics prospectius
- Fase IV: informe post-aprovació

Taula 5. Resum dels diferents biomarcadors descrits pel diagnòstic i/o seguiment del CU de bufeta no múscul invasiu [171].

	Test	Metodologia	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)	Font
MARCADORS EN FASE III-IV (aprovats per la FDA)	NMP22BC	ELISA	50-85	46-93	[152]
	NMP22 Bladder Check	POC test			[153]
	BTA TRAK	ELISA	54-61	74-86	[154]
	BTA Stat	POC test			[155]
	ImmunoCyt⁺/uCyt⁺	Immunofluorescència	62-85	74-93	[156]
	Urovysion	FISH	13-94	63-100	[157]
MARCADORS EN FASE II-III	CxBladder Monitor	RT-qPCR	93	-	[158]
	UBC Test	ELISA/POC test	12-80	77-92	[159]
MARCADORS EN FASE I-II	Xpert BC Monitor	RT-qPCR	84	91	[160]
	FAS soluble	ELISA	-	-	[161]
	Àcid Hialurònic	ELISA i RT-qPCR	91	70	[162]
	Survivina	ELISA	64	93	[163]
	FGFR3	Anàlisi de mutacions	58	-	[164]
	Metil·lació del DNA	Seqüenciació	58-89	66-97	[165,166]
	Combinació FGFR3+Metil·lació del DNA	Anàlisi de mutacions + seqüenciació	79-95	75-77	[167,168]
	VEGF	ELISA	-	-	[169]
	Microsatèl·lits	RT-qPCR	58	73	[170]

Finalment, comentar que hi ha una llarga llista de biomarcadors relacionats amb les vies moleculars de progressió del CU que estan sent actualment investigats. A continuació es resumeixen a la taula 6 els biomarcadors moleculars estudiats pel CU agrupats per les diferents vies de senyalització cel·lulars a les que intervenen i la seva relació amb la malaltia.

Taula 6. Principals biomarcadors moleculars descrits al carcinoma urotelial [171].

Biomarcador	Expressió al carcinoma urotelial	Funció normal	Impacte pronòstic
Cicle cel·lular			
p53	Alterada	Inhibeix la progressió G1-S	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
p21	Infraexpressada o perduda	Inhibidor de ciclines depenents de quinases	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
Mdm2	Sobreexpressada	Promou la degradació al proteasoma de p53	Incrementa amb l'estadi i el grau tumorals
p14	Infraexpressada o perduda	Inhibeix <i>MDM2</i>	Disminució de la supervivència
p16	Infraexpressada o perduda	Inhibidor de ciclines depenents de quinases	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
pRb	Perduda o hiperfosforilada	Inhibeix la progressió del cicle cel·lular	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
CDK4	Sobreexpressada	Forma part de la transició G1-S	Incrementa amb l'estadi i el grau tumorals
p27	Infraexpressada o perduda	Inhibidor de ciclines depenents de quinases	Augment de la recidiva tumoral
Apoptosi			
Fas	Infraexpressada o perduda	Promou l'apoptosi	Disminució de la supervivència
Bcl-2	Sobreexpressada	Inhibeix l'activació de caspases	Disminució de la supervivència
Bax	Infraexpressada o perduda	Promou l'apoptosi	Mal pronòstic, disminució de la supervivència
Caspasa 3	Infraexpressada o perduda	Promou l'apoptosi	Augment de la recidiva tumoral
Proliferació			
FGFR3	Sobreexpressada	Transmissió de senyals de creixement	Augment de la recidiva tumoral
EGFR	Sobreexpressada	Transmissió de senyals de creixement	Promou la progressió, disminueix la supervivència
ErbB-2	Sobreexpressada	Transmissió de senyals de creixement	Disminució de la supervivència
VEGFR2	Sobreexpressada	Transmissió de senyals d'angiògenesi	Incrementa amb l'estadi i el grau tumorals, la invasió i la metastasi
Ki67	Sobreexpressada	Promou la proliferació cel·lular	Augment de la recidiva tumoral
Transducció de senyals			
HRAS	Sobreexpressada	Activa Raf i PI3K	Incrementa a Ta
PKC	Sobreexpressada	Activa Raf, c-Fos, NF-kB, i inhibeix Bad	Augment de la recidiva tumoral
PTEN	Infraexpressada o perduda	Antagònica a la senyalització de PI3K	Disminueix amb l'estadi i el grau tumorals
Regulació gènica			
STAT3	Sobreexpressada	Regula l'expressió gènica	Augment de la recidiva tumoral
NF-kB	Inserció o deleció a la regió promotora	Regula l'expressió gènica	Augment de la recidiva tumoral
c-Fos	Sobreexpressada	Regula l'expressió gènica	Incrementa amb el grau tumoral
c-Jun	Sobreexpressada	Regula l'expressió gènica	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
Angiògenesi			
HIF	Sobreexpressada	Transcriu gens responsables de l'angiògenesi	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
VEGF	Sobreexpressada	Promou l'angiògenesi	Augment de la recidiva tumoral i de la progressió, disminució de la supervivència
TP	Sobreexpressada	Promou la secreció de VEGF i de IL-8, induïx MMP	Augment de la recidiva tumoral
uPA	Sobreexpressada	Degrada la matriu extracel·lular	Increment la progressió, disminució de la supervivència
aFGF	Sobreexpressada	Promou l'angiògenesi	Incrementa amb l'augment del grau tumoral
bFGF	Sobreexpressada	Promou l'angiògenesi	Incrementa el risc de recidiva tumoral
SF	Sobreexpressada	Promou l'angiògenesi	Augmentat respecte controls
TSP-1	Infraexpressada o perduda	Inhibeix l'angiògenesi	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
Invasió			
E-cadherina	Infraexpressada o perduda	Implicada a l'adhesió intracel·lular	Augment de la recidiva i la progressió tumoral, disminució de la supervivència
Integrina $\alpha 6 \beta 4$	Sobreexpressada	Transducció de senyals reguladores	Disminució de la supervivència
MMP-2	Sobreexpressada	Degrada la matriu extracel·lular	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència
MMP-9	Sobreexpressada	Degrada la matriu extracel·lular	Incrementa amb l'estadi i el grau tumorals
TIMP-2	Dubtosa	Antagonitza amb la funció de les MMP	Augment de la recidiva tumoral, disminució de la supervivència

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

En aquesta tesi s'han estudiat dos tipus de carcinomes urotelials (CU); el tumor de tracte urinari superior (TM-TUS) i el càncer de bufeta (CB). En cadascun d'ells hem identificat diferents aspectes clínics susceptibles de ser millorats a partir dels quals hem generat les següents hipòtesis de treball.

El carcinoma urotelial de tracte urinari superior és un tumor de mal pronòstic. Actualment, l'estadi patològic i el grau histològic són els factors pronòstics més habitualment utilitzats a la pràctica clínica, tot i que resulten insuficients per a predir l'evolució de la malaltia de manera individualitzada, donat que pacients amb els mateix fenotip tumoral presenten evolucions clíniques diferents. La nostra hipòtesi de treball es basa en que tot i presentar les mateixes característiques histopatològiques, a nivell molecular els tumors dels pacients que progressen són diferents dels tumors dels pacients que no progressen. La identificació de biomarcadors que complementin als factors pronòstics actuals i ens permetin identificar de manera precoç aquells pacients amb majors probabilitats de progressar comportaria una millora en la presa de decisions clíniques al tractament del TM-TUS. A més a més, si aquests marcadors pronòstics es poguessin detectar als pacients d'una manera no invasiva, la seva translació a la rutina assistencial es podria donar d'una manera senzilla, pel que tindrien una alta acceptació dintre de la comunitat urològica.

El *gold estàndard* de diagnòstic i seguiment del CB és la cistoscòpia combinada en alguns casos amb la citologia urinària. La cistoscòpia és un mètode invasiu, incòmode i dolorós pels pacients. D'altra banda, el mètode no invasiu, la citologia urinària, presenta una baixa sensibilitat, sobretot en els tumors de baix grau. Tot i els nombrosos esforços descrits a la literatura per identificar biomarcadors no invasius pel diagnòstic i seguiment del CU de bufeta, els biomarcadors estudiats fins al moment no superen la precisió diagnòstica d'aquesta combinació (aproximadament SN=80%, SP=90%) i per tant, no han estat implementats a la pràctica clínica. Prèviament a aquest treball, el nostre grup havia desenvolupat i validat 4 firmes d'expressió gènica en orina pel diagnòstic no invasiu del CU de bufeta. Als estudis de validació d'aquestes firmes, la especificitat del test va quedar confirmada, però la sensibilitat disminuïa, essent lleugerament inferior al 80%. Aquesta disminució de la sensibilitat era deguda fonamentalment a la pèrdua diagnòstica dels tumors de bufeta no múscul invasius (NMIBC) de risc baix/intermedi, el que provoca una reducció de la sensibilitat global del test. La nostra hipòtesi de treball es basa en que la identificació de biomarcadors específics de

NMIBC de risc baix/intermedi i posterior combinació amb els prèviament identificats, permetrà generar un test global amb alta precisió pel diagnòstic i seguiment del CB. El desenvolupament d'un test amb aquestes característiques permetria la substitució, al menys parcial, de la cistoscòpia en el diagnòstic i seguiment del CU i per tant, milloraria el maneig dels pacients.

En aquesta mateixa línia de treball de diagnòstic i seguiment del CU, ens trobem amb freqüència amb el dilema clínic de com interpretar una citologia sospitosa per CU en els pacients amb una cistoscòpia negativa. Actualment, aquests pacients són inclosos al mateix protocol de seguiment que aquells pacients amb citologia i cistoscòpia negatives. En aquesta tesi s'ha hipotetitzat que un diagnòstic de citologia sospitosa per CU té un significat clínic diferent al de la citologia negativa, donat que el patòleg observa canvis morfològics en les cèl·lules que no pot classificar com a normals. La identificació de biomarcadors per determinar el significat clínic de les citologies reportades com a sospitoses per CU podria permetre aclarir el diagnòstic en aquests pacients, i fins i tot podria permetre predir la presència de tumor d'una manera precoç. Això milloraria l'esquema de seguiment d'aquests pacients.

HYPOTHESIS

In this thesis two types of urothelial carcinomas (UC) have been studied; upper urinary tract tumors (UTUC) and bladder cancer (BC). In each of them we have identified different clinical issues with potential for improvement, from which we have generated the following work hypotheses.

UTUC is a tumor of poor prognosis. Pathological stage and Histological grade are the most commonly used prognostic factors in clinical practice. However, they are insufficient to predict the evolution of the disease individually since patients with the same histopathological tumor type have different clinical outcomes. Our working hypothesis is based on the fact that even these tumors share histopathological characteristics, on the molecular level, tumors from patients that progress are different from those that do not progress. The identification of biomarkers that complement the current prognostic factors and allow us to identify earlier those patients with higher probability of tumor progression would let to an improvement in clinical decision making in the treatment of TM-TUS. In addition, if these prognostic markers could be detected in patients in a non-invasive way, their translation to clinical practice would be simpler, which would have a high acceptance within the urological community.

The BC gold standard for diagnosis and follow-up is cystoscopy, combined in some cases with urinary cytology. Cystoscopy is an invasive, uncomfortable and painful method for patients. On the other hand, the non-invasive method, urinary cytology, has a low sensitivity (SN), especially in low-grade (LG) tumors. Despite the numerous efforts described in the literature to identify non-invasive biomarkers for the diagnosis and monitoring of BC, the biomarkers studied so far do not exceed the diagnostic accuracy of this combination (approximately SN = 80%, specificity (SP) = 90%) and therefore, they have not been implemented in clinical practice. Prior to this work, our group had developed and validated four gene expression signatures in urine for the non-invasive diagnosis of BC. In the validation studies of these signatures, the SP of the test was confirmed, but the SN was slightly below 80%. The decrease in SN is mainly due to the loss of diagnostic of low/intermediate risk non-muscle invasive BC (NMIBC), which causes a decrease in the overall SN of the test. Our hypothesis here is that the identification of low/intermediate risk NMIBC biomarkers and their subsequent combination with the previously identified ones would allow us to generate a global test with higher accuracy for the diagnosis of BC. This classifier would allow the replacement, at least partially, of cystoscopy in the diagnosis and monitoring of UC. The development of a classifier with these characteristics would improve diagnosis and surveillance in BC patients which would have a great impact on care.

Eventually, patients with a suspicious for UC cytology and negative cystoscopy are included in the same follow-up protocols as patients with both negative cytology and cystoscopy. In this thesis it is hypothesized that a diagnosis of suspicious cytology has a clinical significance and it may be different from negative cytology, since the pathologist observes morphological changes in cells that cannot be classified as normal. The identification of biomarkers to determine the clinical significance of the cytologies reported as suspicious for UC could lead to the clarification of the diagnosis in these patients and could even allow for the earlier prediction of tumor presence, consequently improving the follow-up schedule for these patients.

OBJECTIU GENERAL

Identificar biomarcadors per a la millora diagnòstica i pronòstica del carcinoma urotelial

To identify biomarkers for the diagnosis and prognosis of urothelial carcinoma

OBJECTIUS ESPECÍFICS

2.1 Carcinoma urotelial de tracte urinari superior

- a. Validar els microRNAs miR-31-5p i miR-149-5p, prèviament identificats pel grup com a biomarcadors pronòstics del TM-TUS, en una sèrie independent i multicèntrica de pacients amb TM-TUS

To validate miR-31-5p and miR-149-5p miRNAs, previously identified as UTUC prognostic biomarkers, in an independent and multicentric cohort of UTUC patients

- b. Identificar un perfil d'expressió de microRNAs pronòstic en sèrum de pacients amb TM-TUS i validar aquest perfil de microRNAs en una cohort independent

To identify and validate a serum microRNA prognostic profile for UTUC patients in an independent cohort

2.2 Carcinoma urotelial de bufeta

- c. Identificar en orina els gens diferencialment expressats específicament en NMIBC de risc baix/intermedi

To identify differentially expressed genes specifically in urine from low/intermediate risk NMIBC patients

- d. Desenvolupar una firma d'expressió gènica amb una alta precisió per la detecció del CU en orina amb utilitat en el seguiment clínic dels pacients amb càncer de bufeta

To develop a global gene expression classifier with high accuracy for UC diagnosis in urine and useful for BC surveillance

- e. Aclarir el significat clínic de les citologies urinàries sospitoses per carcinoma urotelial mitjançant la utilització de biomarcadors

To elucidate the clinical significance of suspicious for UC urinary cytology and to improve patient's clinical management by using urinary biomarkers

TREBALLS

TREBALL 1

MicroRNAs PRONÒSTICS EN EL TUMOR DE TRACTE URINARI SUPERIOR: ESTUDI DE VALIDACIÓ INTERNACIONAL I MULTICÈNTRIC

Oncotarget. 2017 May 16;8(31):51522-51529.

PMID: 28881664

MicroRNAs PRONÒSTICS EN EL TUMOR DE TRACTE URINARI SUPERIOR: ESTUDI DE VALIDACIÓ INTERNACIONAL I MULTICÈNTRIC

Objectiu: L'objectiu d'aquest treball és validar els microRNAs prèviament identificats pel nostre grup (miR-31-5p i miR-149-5p) com a factors pronòstics pel TM-TUS en una cohort de pacients independent i multicèntrica.

Material i Mètodes: Estudi restrospectiu, internacional i multicèntric en el que s'han inclòs 103 pacients amb TM-TUS (45 casos que presenten progressió de la malaltia i 58 sense progressió). Tots els pacients van estar sotmesos a nefroureterectomia. A partir de les mostres tumorals parafinades, es va aïllar i retrotranscriure el RNA total. L'expressió dels dos microRNAs diana (miR-31-5p i miR-149-5p), així com la del control endògen (miR-218-5p), va ser avaluada a totes les mostres mitjançant RT-qPCR. Es va utilitzar la regressió de Cox per avaluar la relació entre l'expressió dels microRNAs i les variables clíniques relacionades amb la progressió de la malaltia. Finalment, es va generar corbes de Kaplan-Meier per analitzar la supervivència lliure de progressió i la supervivència càncer específica dels pacients en relació a l'expressió dels microRNAs diana.

Resultats: La mitjana d'edat (rang) de la cohort va ser de 67 (33-94) anys. Un total de 45 pacients (43,7%) van progressar i 32 (31,2%) van morir. D'aquests 32 pacients, 20 (62,5%) van morir degut al TM-TUS, després d'una mitjana de seguiment de 36 mesos. La mitjana de progressió tumoral i de supervivència càncer específica va ser de 15 i 20 mesos, respectivament. La supervivència lliure de progressió pels estadis \leq pT2 va ser del 58%, pels pT3 del 36% i pels pT4 del 0%. Pel que fa a la supervivència càncer específica, pels tumors \leq pT2 va ser del 67,8%, pels pT3 del 50,6% i pels pT4 del 0%. A l'anàlisi multivariant, es va identificar l'expressió de miR-31-5p com a factor pronòstic independent de progressió tumoral (HR 1.1; 95% CI 1.039-1.273; $p=0.02$). Les corbes de Kaplan-Meier evidencien que l'expressió de miR-31-5p és capaç de discriminar entre dos grups de pacients amb TM-TUS que presenten diferent probabilitat de progressió tumoral ($p=0.007$).

Conclusions: Al present estudi, s'han validat els resultats previs en una cohort independent, multicèntrica i internacional de pacients amb TM-TUS, suggerint que miR-31-5p podria ser d'utilitat com a biomarcador pronòstic de progressió pel TM-TUS. La determinació dels valors d'expressió d'aquest microRNA a la pràctica clínica podria refinar els factors pronòstics actuals i predir l'evolució dels pacients d'una manera més personalitzada.

Prognostic microRNAs in upper tract urothelial carcinoma: multicenter and international validation study

Laura Izquierdo^{1,*}, Ruth Montalbo^{1,*}, Mercedes Ingelmo-Torres¹, Carme Mallofré¹, Miguel Ramírez-Backhaus², Jose Rubio², Antoine Van der Heijden³, Ewout Schaafsma³, Antonio Lopez-Beltran⁴, A. Blanca⁴, Nathan Lawrentschuk⁵ Antonio Alcaraz¹ and Lourdes Mengual¹

¹Department and Laboratory of Urology and Pathology of Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²Department of Urology of Fundación IVO, Valencia, Spain

³Department of Urology and Pathology of Radboud University Centre, Nijmegen, Netherlands

⁴Department of Urology and Pathology of Reina Sofía Hospital and Maimonides Biochemical Research Institute, Córdoba, Spain

⁵University of Melbourne, Department of Surgery/Olivia Newton-John Cancer Research Institute, Department of Surgical Oncology, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Laura Izquierdo, **email:** lizquier@clinic.cat

Keywords: microRNAs, prognosis, upper tract urothelial carcinoma

Received: November 25, 2016

Accepted: April 26, 2017

Published:

Abbreviations: UTUC; upper urinary tract tumor, RNU; radical nephroureterectomy

Copyright: Izquierdo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Objective: To validate previously discovered miRNAs (miR-31-5p and miR-149-5p) as prognostic factors for UTUC in an independent cohort of UTUC patients.

Patients and Methods: Multicenter, international and retrospective study of formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples from 103 UTUC patients (45 progressing and 58 non-progressing) who underwent radical nephroureterectomy. Total RNA was isolated and reverse transcribed. The expression of target miRNAs (miR-31-5p and miR-149-5p) and the endogenous control miR-218-5p was evaluated in all samples by reverse transcription quantitative PCR. Normalized miRNA expression values were evaluated by multivariate forward stepwise Cox regression analysis. Kaplan Meier curves were used to discriminate between two groups of patients with a different probability of tumour progression.

Results: The mean age (range) of the series was 67 (33-94) years. Overall, 45 patients (43.7%) developed tumour progression and 32 patients (31.2%) died, 20 of these (62.5%) due to their UTUC, after a median follow-up of 36 months. The mean time for tumour progression and cancer-specific survival were 15 and 20 months, respectively. Five year tumour progression free survival and cancer-specific survival were 58% for \leq pT2, 36% for pT3 and 0% for pT4 and 67.8% for \leq pT2, 50.6% for pT3 and 0% for pT4, respectively. In the multivariate analysis, expression of miR-31-5p was found to be an independent prognostic factor of tumour progression (HR 1.1; 95% CI 1.039-1.273; $p=0.02$). Kaplan Meier curve shows that miR-31-5p expression values are able to discriminate between two groups of UTUC patients with a different probability of tumour progression ($p=0.007$).

Conclusions: We have been able to validate our previous results in an independent multicentre international cohort of UTUC patients, suggesting that miRNA-31-

5p could be a useful prognostic marker of UTUC progression. The application of miRNA expression values to clinical practice could refine the currently used clinicopathological-based approach for predicting UTUC patients' outcome.

INTRODUCTION

Upper tract urothelial carcinomas (UTUCs) are uncommon and account for only a small number (5-10%) of urothelial carcinomas. The majority of UTUCs are invasive at diagnosis compared to bladder tumours having only up to a quarter invasive at presentation [1, 2]. Due to the aggressive nature of UTUC, radical nephroureterectomy (RNU) remains the "gold standard" treatment for localized tumours [3].

Established prognostic factors associated with tumour progression and survival are pathological stage and tumour grade are. However, they are insufficient to predict the individual outcome for UTUC patients [4, 5]. A greater understanding of the biological behaviour of tumours would allow individualized medicine, in an attempt to decrease morbidity and importantly improve survival. microRNAs (miRNAs) are a family of short (average of 22nt long), naturally occurring, small antisense non-coding RNAs, that have emerged as important post-transcriptional regulators of gene expression [6]. They have wide distribution as endogenous controllers of gene expression by binding to the 3'-untranslated region of specific miRNAs [7, 8]. As miRNAs may regulate a significant portion of the transcriptome and proteome, considerable attention has focused on miRNAs as mediators or biomarkers of disease [9, 10]. miRNAs are critical to cancer pathogenesis, as they can act as oncogenes or tumor suppressor genes. They may also have potential value as prognostic or diagnostic biomarkers in the clinical setting [11]. Many cancers have had dysregulation of miRNAs documented [12-14], including urothelial tumours such as bladder cancer [15] and UTUC [16, 17].

We have previously examined the miRNA expression pattern of UTUC tissue samples from progressing and non-progressing patients in order to identify putative miRNAs that may be used as prognostic markers in UTUC. miRNA-31-5p and miRNA-149-5p have been identified as prognostic factors of tumour progression and cancer specific survival [17]. In the present study, we aim to retrospectively validate miRNA-31-5p and miRNA-149-5p as prognostic markers of UTUC in a multicenter cohort of UTUC patients.

RESULTS

Patient characteristics

The final cohort consisted of 103 patients. Median age (range) of the cohort was 67 (33-94) years. Gender balance favored men 83:20. The median (range) follow-

up in this series was 36 (6-384) months. The patients' histopathological characteristics are outlined in Table 1.

Overall 45 patients (43.7%) recorded progression of their tumours at a median follow-up of 36 months. Tumour progression occurred at a median of 15 (2-168) months. By pathological stage, one and five year tumour progression free survival were 80% for \leq pT2, 76% for pT3 and 45% for pT4 and 58% for \leq pT2, 36% for pT3 and 0% for pT4, respectively ($p < 0.05$) (Figure 1).

During follow-up, 32 patients (31.2%) died, 20 of them (62.5%) due to their UTUC. One was pTa (5%), two were pT1 (10%), three pT2 (15%), eight pT3 (40%) and six pT4 (30%). Disease other than UTUC accounted for mortality in twelve patients. The median (range) time to cancer-specific death was 20 (9-85) months. Based on pathological stage, the one and five year cancer-specific survival were 96.5% for \leq pT2, 65.7% for pT3 and 40% for pT4 and 67.8% for \leq pT2, 50.6% for pT3 and 0% for pT4, respectively ($p < 0.05$).

Correlations between clinical features and miRNA expression

We found that histological grade correlated with pathological stage ($R=0.53$, $p=0.001$). In addition, miRNA-31-5p correlated with histological grade ($R=0.21$, $p=0.03$) and pathological stage ($R=0.29$, $p=0.002$). Non-significant correlations were found between miRNA-149-5p with histological grade ($p=0.589$) and pathological stage ($p=0.495$).

Association of miRNA expression with progression and survival

The expression pattern of miR-31-5p and miR-149-5p are provided in Supplementary Figure 1 of supplementary material. To verify whether these two selected miRNAs (miR-31-5p and miR-149-5p) were independent prognostic factors of patients' progression and survival, the miRNAs expression were analyzed using a Cox regression model. Univariate analysis including miRNA-31-5p and miRNA-149-5p showed that the expression of miRNA-31-5p was an independent prognostic factor of tumour progression (HR=1.107; 95% CI 1.008-1.217, $p=0.033$ and HR=0.998; 95% CI 0.831-1.199, $p=0.985$, respectively). Multivariate regression analysis demonstrated that expression of miRNA-31-5p was an independent prognostic factor of tumour progression (HR=1.1; 95% CI 1.039-1.279, $p=0.02$). Contrarily, the two miRNAs were not associated with cancer-specific survival.

Table 1: Histopathological features of patients with UTUC

		Radboud University Nijmegen Medical Centre	Instituto Valenciano de Oncología	Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba	Hospital Clínic de Barcelona	Total (%)
Patients		36	22	5	40	103 (100)
Gender (male/female)		31/5	18/4	4/1	30/10	—
Median age		64	67	74	73	—
Histological Grade	I	1	8	2	2	13 (12.6)
	II	9	10	0	18	37 (35.9)
	III	26	4	3	20	53 (51.5)
Pathological Stage	pTa	8	4	1	8	21 (20.4)
	pT1	4	2	1	8	15 (14.6)
	pT2	5	8	1	7	21 (20.4)
	pT3	11	8	2	12	33 (32)
	pT4	6	0	0	5	11 (10.7)
	pTis	2	0	0	0	2 (1.9)
	N+	5	7	0	8	20 (19.4)
	M+	2	3	0	1	6 (5.8)

miRNA-31-5p expression values are able to discriminate between two groups of UTUC patients with a different probability of tumour progression ($p=0.007$) using Kaplan Meier curves. UTUC samples with miRNA-31-5p expression values (ΔCt) greater than the cutoff value (-2.27) have a greater risk of tumour progression (high-risk group) and samples with miRNA-31-5p expression values lower/equal than the cutoff value have low risk tumour progression (low risk group) (Figure 1).

Target Prediction and functional enrichment of miR-31-5p

The DIANA-miRPath miRNA analysis, with miRNA-31-5p, shows several statistically significant predicted Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) terms related with the adherens junction, TNF signalling pathway, cGMP-PKG signalling pathway among others (Supplementary Table 1 of supplementary material).

DISCUSSION

The prognosis of UTUC remains unpredictable in many instances. Approximately one third of UTUC

patients die from their tumour after five years of follow-up and the commonly utilised prognostic factors are unable to accurately predict individual tumour behaviour [18]. Therefore predicting disease progression in a specific patient remains a challenge. Several molecular prognostic biomarkers have been previously investigated in UTUC patients [19-27], but have not transitioned to becoming clinically valuable tools as yet.

Identification of new prognostic tools is of great interest in UTUC to adapt treatments according to the molecular risk of a particular tumour. If we could identify a patient with a high risk of progression (clinical, molecular or both), it would be possible to increase surveillance intervals and/or consider additional treatments such as chemotherapy. Experimental work has shown that miRNAs are dysregulated in most cancer types and have demonstrated significant diagnostic and prognostic value in different malignancies [28-31]. In the case of UTUC, there are only a few studies evaluating miRNAs as diagnostic biomarkers. Kriebel *et al.* reported that miRNA expression is altered in UTUC and showed that circulating miRNA-141 may be useful as diagnostic biomarker [32]. Tao *et al.* identified a ten-serum miRNA-based expression profile that was useful in discriminating between UTUC cases and controls [16].

However, as far as we could ascertain, our group was the first to explore the potential prognostic value of miRNA expression profiles in UTUC patients [17]. Using a global miRNA profiling of UTUC samples, we identified 26 miRNAs differentially expressed within tissue samples from patients with progressive and non-progressive UTUC. After validation of such miRNAs using an independent multicenter cohort, we were able to identify miRNA-31-5p and miRNA-149-5p as independent predictors of tumour progression. Here, we report the validation of these two previously discovered prognostic miRNAs in an independent international multicenter series of UTUC patients. As demonstrated, miRNA-31-5p expression predicts tumour progression in this independent cohort. Hence miRNA-31-5p discriminated between two groups with a highly significant differential probability of tumour progression. Thus, miRNA-31-5p provides a biomarker to identify a sub-group of patients with a poorer prognosis and may help redefine the current clinicopathological approach making it a valuable clinical tool.

In addition, we found a statistical correlation between miR-31-5p with the most established prognostic

factors in UTUC, histological grade and pathological stage.

miRNA-31-5p has been previously reported to be upregulated in colon, lung and cervical cancer [33-35]. On the other hand, miRNA-31-5p was found down-regulated in bladder, prostate, gastric, breast and serous ovarian cancer [36, 37]. These data suggested that miRNA-31-5p can behave either as tumour suppressor or as an oncogenic miRNA, which may be dependent on the cancer type. In concordance with our previous results, we found a down-regulation of miRNA-31-5p in progressive UTUC patients [17]. Interestingly, Wang et al. revealed that miRNA-31-5p was down-regulated in bladder cancer patients with an unfavourable outcome [38]. The miRNA-31-5p gene is located on 9p21.3. DNA lost at 9p21 has been frequently observed in bladder and UTUC patients [39, 40]. Across differing cancer types, genetic variants of the 9p21 region have been associated with the development of multiple cancers which suggests this region's importance [41]. Therefore, downregulation of miRNA-31-5p is in accordance with the loss of this chromosomal region in urothelial cancers. Moreover, in support of our study, it has been reported that suppression of miRNA-31-5p enhances

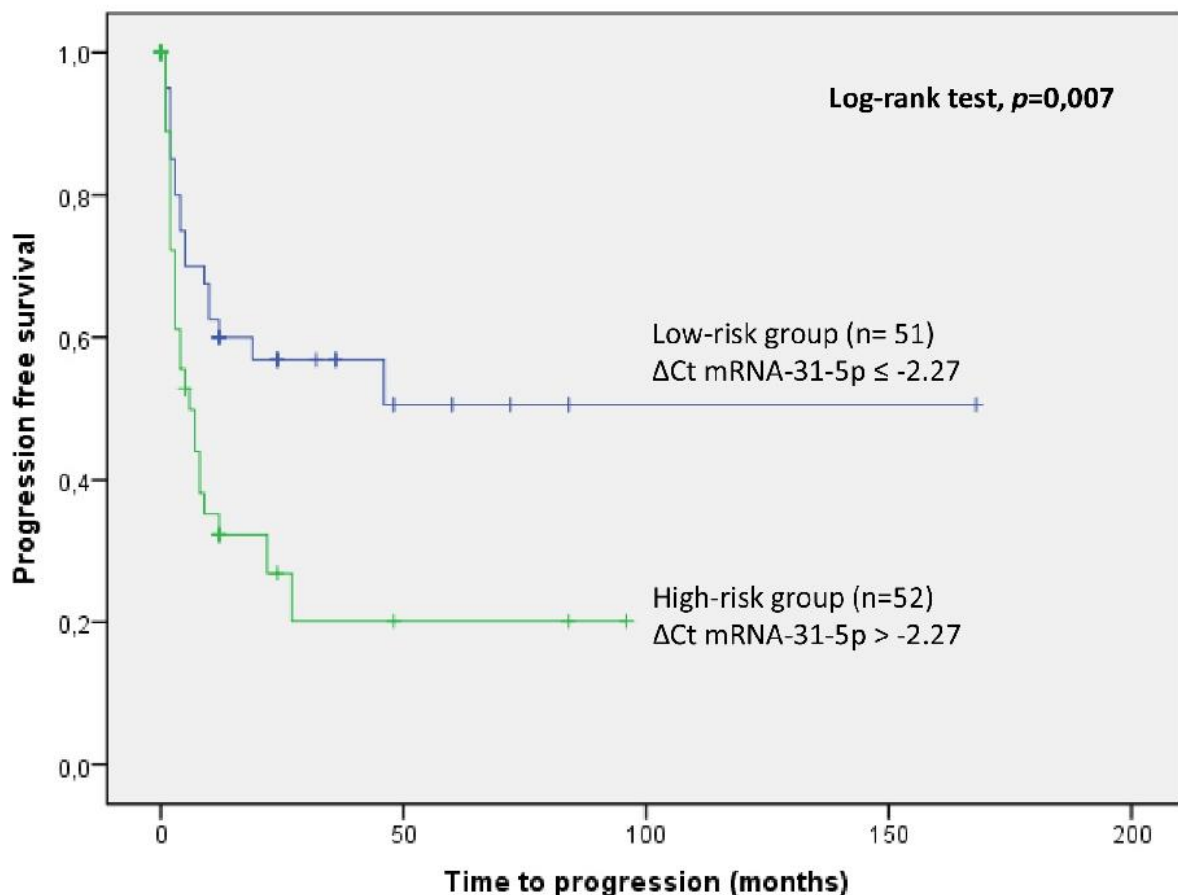


Figure 1: Kaplan Meier curve of tumor progression according to miRNA-31-5p expression values.

chemotherapy effectiveness (5-fluoracil) at earlier stages, and additionally interferes with cell migration and invasion of colon cancer cells [37].

Furthermore, analysis of KEGG pathways corroborates that miRNA-31-5p is biologically meaningful. Several possible signalling pathways, such as the adherens junction, TNF signalling pathway, cGMP-PKG signalling pathway were predicted to be modified by miRNA-31-5p. Among others, the adherens junction contributes to cells physical linking and regulating of cell–cell contacts- both critical for tissue and organ morphogenesis and remodeling.. TNF is a pro-inflammatory cytokine that plays a crucial role across a range of cellular activities from proliferative through to apoptotic events., TNF has also been identified in cell dysregulation that leads to disease. making it a target of interest for molecular study. It appears that many signal pathways are involved which lead to the observed TNF-mediated biological responses. [42]. cGMP-PKG is implicated in the regulation of cell division and synthesis.

One of the potential strengths of this study is The methodology whereby we were able to use archival FFPE samples to obtain miRNA expression patterns. This has implications for clinical practice due to the ability to quickly translate results from “bench-to-bedside”. Moreover, this study represents a multicenter international cohort with long-term follow-up, making the data more generalizable than in a single institutional cohort. There are some limitations. Firstly, although multi-center, the final number of patients studied may still be considered insufficient. Secondly, in the pursuit of in robust data, a cutoff of RNA quality was used, and a high percentage of samples were excluded from the analysis. Although the methodology reported could be refined in future studies, we maintain that we have a reliable prognostic biomarker for UTUC patients. Thirdly, although we found miRNA-31-5p down-regulated in progressing patients, the literature supports the clinical value of down-regulated biomarkers in cancer [43]. As such, we strongly believe that our results are clinically applicable.

In conclusion, the current results support the validation of our previous finding in an independent cohort, confirming that miRNA-31-5p is a discriminator between two groups of UTUC patients having differing probabilities of tumour progression. Ultimately being able to identify new miRNAs associated with tumour progression in UTUC patients will allow individualized medicine with tailored treatment and surveillance strategies.

PATIENTS AND METHODS

Patient population

A retrospective study in which a total of 103 patients with UTUC who underwent nephroureterectomy

in 4 different centres (Radboud University Nijmegen Medical Centre-Netherlands, Instituto Valenciano de Oncología-Spain, Hospital Universitario Reina Sofia of Córdoba-Spain, Hospital Clinic of Barcelona-Spain) between 1990 and 2012 were included. The only exclusion criterion was lack of tissue from the archive blocks. Histopathological characteristics of the UTUC patients are shown in Table 1. None of the patients received neoadjuvant chemotherapy. A total of 13 patients (12.6%) received adjuvant chemotherapy. Tumours were graded and classified according to the WHO's [44] and the TNM's classification of the International Union Against Cancer [45].

Tissuesamples were obtained under institutional review board-approved protocol.

All patients were followed up postoperatively at 3-month intervals for the first year, at 6-month intervals for the next 2 years, and annually thereafter. Physical examination, abdominal and pelvic CT scan, cytology and cystoscopy were used to follow these patients up.

Tumour was considered to be progressing when distant metastasis or pathological nodes developed during the follow-up.

Tissue specimens and RNA isolation

Upon obtainment, the tissue was fixed in 10% formalin within 24h and subsequently embedded in paraffin. A slide of each specimen was stained with haematoxylin-eosin to determine the presence of tumour cells. The pathologist revised haematoxylin-eosin slides and only those paraffin blocks with a minimum of 75% of tumour cells were selected. Total RNA was isolated from specimens (80-Δm) using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion INC) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was quantified by spectrophotometric analysis at 260 nm (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

miRNA validation by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR reactions were performed according to the manufacturers' instructions (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Briefly, cDNA was synthesized using a poly(T) primer and was amplified with locked nucleic acid (LNA) primers and SYBR Green master mix. Specific LNA PCR primer sets used were miRNA-31-5p and miRNA-149-5p. miRNA-218-5p was used as an endogenous control [17] and its expression was assessed in all samples. Those samples with a Ct value ≥ 30 for endogenous control were considered of low RNA quality and were excluded from the analysis (n=68). In the remaining samples, expression of miRNA-149-5p and miRNA-31-5p was analyzed. PCR reactions were carried out using specific miRNA protocol conditions provided by the manufacturers in an

ABI7900HT instrument. At the end of the PCR cycles, melting curve analyses were performed.

Data analysis

RT-qPCR data was analyzed using SDS 2.4 software (Applied Biosystems). An automatic baseline and a manual threshold of 2.0 were used for all miRNAs to record Cq values. Each experiment included a negative non-template control and an inter-experiment control. miRNA-218-5p was selected by using GeNorm as reference miRNA [46,47]. Relative expression levels of target miRNAs within a sample were expressed as ΔCt ($Ct_{miR218} - Ct_{target\ miRNA}$).

Statistical analysis

The probabilities of progression-free survival and cancer-specific survival were calculated using Kaplan-Meier curves. Statistical differences were identified by the log-rank test. Hazard ratios and their confidence interval were calculated. Spearman Test was used for correlations. In the multivariate analysis forward stepwise Cox regression was performed. Statistical significance was established at a p-value of 0.05, and accordingly 95% confidence intervals (CI) around hazard ratios (HR) are presented. SPSS 23.0 software was used for statistical analysis. Thereafter, Kaplan-Meier curves were generated. For this analysis, miRNA expression was dichotomized using the median value (-2.27) of miRNA-31-5p as a cut-off value.

Pathway enrichment analysis

The DIANA-miRPath tool [48], using TargetScan as the target prediction algorithm, was used to identify the targets of miR-31-5p, and subsequent target enrichment analysis was performed in order to discover possible canonical altered pathways.

Author Contributions

L. Izquierdo - R. Montalbo: Study concept, Study design, samples and Data acquisition, Data analysis and interpretation, Statistical analysis, Manuscript preparation and editing

L. Mengual: Study design, Quality control of data and algorithms, Data analysis and interpretation, Manuscript preparation and editing

C. Ingelmo: Sample processing

C. Mallofre: Pathology review

M. Ramirez, J. Rubio, AG Van der Heijden, HE. Schaafsma, A. López-Beltrán, A. Blanca: samples and Data acquisition

N. Lawrentschuk: Manuscript review

A. Alcaraz: Manuscript review

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Helena Kruyer for the English correction of the manuscript. We are indebted to the IDIBAPS Biobank, integrated in the Spanish National Biobanks Network (PT13/0010/0011), for the sample and data procurement, and to the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC) financed by the Pla Director d'Oncologia de Catalunya.

CONFLICT OF INTEREST

None declared

FUNDING

The present work was supported by a grant from the Spanish Urological Association (FIU 2010 to LI).

REFERENCES

- Munoz JJ, Ellison LM. Upper tract urothelial neoplasms: incidence and survival during the last 2 decades. *J Urol* 2000;164:1523-1525.
- Shariat SF, Favaretto RL, Gupta A, et al. Gender differences in radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *World J Urol* 2011;29:481-486.
- Colin P, Ouzzane A, Pignot G, et al. Comparison of oncological outcomes after segmental ureterectomy or radical nephroureterectomy in urothelial carcinomas of the upper urinary tract: results from a large French multicentre study. *BJU Int* 2012;110:1134-1141.
- Huben RP, Mounzer AM, Murphy GP. Tumor grade and stage as prognostic variables in upper tract urothelial tumors. *Cancer* 1988;62:2016-2020.
- Mbeutcha A, Roupret M, Kamat AM, et al. Prognostic factors and predictive tools for upper tract urothelial carcinoma: a systematic review. *World J Urol* 2016.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136:642-655.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835-840.
- Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, Weiss RH. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark Med* 2013;7:623-631.
- Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:286-294.
- Hung CH, Chiu YC, Chen CH, Hu TH. MicroRNAs in hepatocellular carcinoma: carcinogenesis, progression, and therapeutic target. *Biomed Res Int* 2014;2014:486407.

12. Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, et al. MicroRNA in Prostate, Bladder, and Kidney Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol* 2011;59:671-681.
13. Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ, Crown J, O'Driscoll L. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clin Chem* 2011;57:18-32.
14. Song B, Ju J. Impact of miRNAs in gastrointestinal cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e33.
15. Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Gazquez C, Ribal MJ, Alcaraz A. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *Int J Cancer* 2013;133:2631-2641.
16. Tao J, Yang X, Li P, et al. Identification of circulating microRNA signatures for upper tract urothelial carcinoma detection. *Mol Med Rep* 2015;12:6752-6760.
17. Izquierdo L, Ingelmo-Torres M, Mallofre C, et al. Prognostic value of microRNA expression pattern in upper tract urothelial carcinoma. *BJU Int* 2014;113:813-821.
18. Izquierdo L, Truan D, Alvarez-Vijande R, Alcaraz A. [Large series of 114 cases with long-term follow-up of upper urinary tract urothelial tumors]. *Actas Urol Esp* 2010;34:232-237.
19. Izquierdo L, Truan D, Petit A, Gutierrez R, Mallofre C, Alcaraz A. Adhesion molecules alpha, beta and gamma-catenin as prognostic factors of tumour progression in upper urinary tract urothelial tumours: the role of AKT-P/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *BJU Int* 2009;104:100-106.
20. Nakanishi K, Kawai T, Torikata C, Aures T, Ikeda T. E-cadherin expression in upper-urinary-tract carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:446-449.
21. Nakanishi K, Hiroi S, Tominaga S, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha protein predicts survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Clin Cancer Res* 2005;11:2583-2590.
22. Kashibuchi K, Tomita K, Schalken JA, et al. The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenin in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Eur Urol* 2006;49:839-845.
23. Izquierdo L, Truan D, Mengual L, Mallofre C, Alcaraz A. HER-2/AKT expression in upper urinary tract urothelial carcinoma: prognostic implications. *Anticancer Res* 2010;30:2439-2445.
24. Kamai T, Takagi K, Asami H, Ito Y, Arai K, Yoshida KI. Prognostic significance of p27Kip1 and Ki-67 expression in carcinoma of the renal pelvis and ureter. *BJU Int* 2000;86:14-19.
25. Eltz S, Comperat E, Cussenot O, Roupret M. Molecular and histological markers in urothelial carcinomas of the upper urinary tract. *BJU Int* 2008;102:532-535.
26. Nakanishi K, Hiroi S, Kawai T, et al. Expression of telomerase catalytic subunit (hTERT) mRNA does not predict survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Mod Pathol* 2001;14:1073-1078.
27. Izquierdo L, Mengual L, Gazquez C, Ingelmo-Torres M, Alcaraz A. Molecular characterization of upper urinary tract tumours. *BJU Int* 2009.
28. Lin T, Dong W, Huang J, et al. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J Urol* 2009;181:1372-1380.
29. Vogt M, Munding J, Gruner M, et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch* 2011;458:313-322.
30. Yamada Y, Enokida H, Kojima S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 2011;102:522-529.
31. Catto JW, Miah S, Owen HC, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res* 2009;69:8472-8481.
32. Kriebel S, Schmidt D, Holdenrieder S, et al. Analysis of tissue and serum microRNA expression in patients with upper urinary tract urothelial cancer. *PLoS One* 2015;10:e0117284.
33. Xu RS, Wu XD, Zhang SQ, et al. The tumor suppressor gene RhoBTB1 is a novel target of miR-31 in human colon cancer. *Int J Oncol* 2013;42:676-682.
34. Liu X, Sempere LF, Ouyang H, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest* 2010;120:1298-1309.
35. Zheng W, Liu Z, Zhang W, Hu X. miR-31 functions as an oncogene in cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292:1083-109.
36. Wang S, Li Q, Wang K, et al. Decreased expression of microRNA-31 associates with aggressive tumor progression and poor prognosis in patients with bladder cancer. *Clin Transl Oncol* 2013;15:849-854.
37. Wang CJ, Stratmann J, Zhou ZG, Sun XF. Suppression of microRNA-31 increases sensitivity to 5-FU at an early stage, and affects cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *BMC Cancer* 2010;10:616.
38. Wang S, Li Q, Wang K, et al. Decreased expression of microRNA-31 associates with aggressive tumor progression and poor prognosis in patients with bladder cancer. *Clin Transl Oncol* 2013;15:849-854.
39. Bonberg N, Pesch B, Behrens T, et al. Chromosomal alterations in exfoliated urothelial cells from bladder cancer cases and healthy men: a prospective screening study. *BMC Cancer* 2014;14:854.
40. Luo B, Li W, Deng CH, et al. Utility of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;189:93-97.
41. Li WQ, Pfeiffer RM, Hyland PL, et al. Genetic polymorphisms in the 9p21 region associated with risk of multiple cancers. *Carcinogenesis* 2014;35:2698-705.

42. Xue Y, Ouyang K, Huang J, et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* 2013;152:82-96.
43. Kou CH, Zhou T, Han XL, Zhuang HJ, Qian HX. Downregulation of mir-23b in plasma is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett* 2016;12:4838-4844.
44. Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, Hartmann A, Schmitz-Dräger BJ, Hergueta J, Ayala AG, Tamboni P, Knowles MA, Sidransky D, Cordon-Cardo C, Jones PA, Cairns P, Simon R, Amin MB, Tyczynsky JE. World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2004.
45. L.H.Sobin, Ch.Wittekind. TNM Classification of Malignant Tumours, ed. 6th. New York: Wiley; 2002.
46. Ratert N, Meyer HA, Jung M, et al. Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PLoS One* 2012;7:e39309.
47. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009;10:R64.
48. Papadopoulos GL, Alexiou P, Maragkakis M, Reczko M, Hatzigeorgiou AG. DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics* 2009;25:1991-1993.

TREBALL 2

VALOR PRONÒSTIC DELS MicroRNAs LLIURES CIRCULANTS AL TUMOR DE TRACTE URINARI SUPERIOR

Oncotarget. 2018 Mar 30;9(24):16691-16700.

PMID: 29682178

VALOR PRONÒSTIC DELS MicroRNAs LLIURES CIRCULANTS AL TUMOR DE TRACTE URINARI SUPERIOR

Introducció: Es necessari identificar biomarcadors pronòstics pel tumor de tracte urinari superior per a predir la progressió de la malaltia d'una manera més personalitzada. L'objectiu d'aquest estudi és la identificació de microRNAs lliures circulants al sèrum de pacients amb TM-TUS que puguin ser utilitzats com a biomarcadors mínimament invasius de la progressió tumoral i la supervivència càncer específica.

Material i Mètodes: Un total de 33 pacients amb TM-TUS sotmesos a nefroureterectomia radical a l'Hospital Clínic de Barcelona van ser inclosos prospectivament en aquest estudi. Es va avaluar l'expressió de 800 microRNAs a mostres de sèrum obtingudes d'aquests pacients mitjançant el nCounter miRNA Expression Assay (NanoString Technologies). L'estudi es va dividir en dues fases: una fase inicial exploratòria (n=12) i una fase de validació (n=21). La valoració de la progressió tumoral i la supervivència càncer específica es va dur a terme mitjançant regressió de Cox i corbes Kaplan-Meier.

Resultats: La mitjana de seguiment (rang) de la cohort va ser de 42 (9-100) mesos. A la primera fase de l'estudi es van identificar 38 microRNAs diferencialment expressats en el sèrum de pacients amb TM-TUS que progressen en comparació amb els pacients que no progressen ($p < 0.05$). A la segona fase de l'estudi, la validació d'aquests 38 microRNAs en una sèrie independent de pacients va confirmar l'expressió diferencial en 18 d'ells ($p < 0.05$). L'anàlisi multivariant mostra miR-151b i l'estadi patològic com a factors pronòstics independents de progressió tumoral (HR=0.33, $p < 0.001$ i HR=2.62, $p = 0.006$, respectivament) i de supervivència càncer específica (HR=0.25, $p < 0.001$ i HR=3.98, $p = 0.003$, respectivament). L'anàlisi de supervivència mostra que l'expressió de miR-151b discrimina entre els dos grups de pacients amb diferent probabilitat de progressió tumoral ($p = 0.006$) i de supervivència càncer específica ($p = 0.034$).

Conclusions: En aquest estudi pilot, demostrem que hi ha una expressió diferencial de microRNAs en sèrum de pacients amb TM-TUS que progressen i els que no. Més concretament, hem identificat que l'expressió diferencial de miR-151b en sèrum de pacients amb TM-TUS podria emprar-se com a eina pronòstica mínimament invasiva en aquesta malaltia. La validació d'aquests resultats en una cohort independent i més àmplia confirmaria el valor pronòstic real d'aquest microRNA al TM-TUS.

Prognostic value of circulating microRNAs in upper tract urinary carcinoma

Ruth Montalbo^{1,*}, Laura Izquierdo^{1,*}, Mercedes Ingelmo-Torres¹, Juan José Lozano², David Capitán¹, Antonio Alcaraz¹ and Lourdes Mengual¹

¹Department and Laboratory of Urology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²CIBERehd, Plataforma de Bioinformàtica, Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Lourdes Mengual, email: lmengual@clinic.cat

Keywords: biomarkers; microRNA; serum; tumour progression; upper urinary tract urothelial carcinoma

Received: November 22, 2017

Accepted: February 26, 2018

Published: March 30, 2018

Copyright: Montalbo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The identification of upper tract urinary carcinoma (UTUC) prognostic biomarkers is urgently needed to predict tumour progression. This study aimed to identify serum microRNAs (miRNAs) that may be useful as minimally invasive predictive biomarkers of tumour progression and survival in UTUC patients. To this end, 33 UTUC patients who underwent radical nephroureterectomy at the Hospital Clínic of Barcelona were prospectively included. Expression of 800 miRNAs was evaluated in serum samples from these patients using nCounter® miRNA Expression Assays. The study was divided into an initial discovery phase (n=12) and a validation phase (n=21). Cox regression analysis was used for survival analysis. The median follow-up (range) of the series was 42 months (9-100 months). In the discovery phase, 38 differentially expressed miRNAs were identified between progressing and non-progressing UTUC patients (p<0.05). Validation of these 38 miRNAs in an independent set of UTUC patients confirmed the differential expression in 18 of them (p<0.05). Cox Regression analysis showed miR-151b and pathological stage as significant prognostic factors for tumour progression (HR=0.33, p<0.001 and HR=2.62, p=0.006, respectively) and cancer specific survival (HR=0.25, p<0.001 and HR=3.98, p=0.003, respectively). Survival curves revealed that miR-151b is able to discriminate between two groups of UTUC patients with a highly significant different probability of tumour progression (p=0.006) and cancer specific survival (p=0.034). Although the data needs to be externally validated, miRNA analysis in serum appears to be a valuable prognostic tool in UTUC patients. Particularly, differential expression of miR-151b in serum may serve as a minimally invasive prognostic tool in UTUC.

INTRODUCTION

Radical nephroureterectomy (RNU) is the accepted treatment for localized upper tract urinary carcinoma (UTUC) [1]. Pathological stage and tumour grade are the most established prognostic factors associated with tumour progression and

patient survival, but they are insufficient to predict the individual outcome of UTUC patients [2]. More accurate knowledge regarding the biological behaviour of tumours would allow for tailored treatment schedules to be offered to patients (such as neoadjuvant chemotherapy or early radical surgery), in an attempt to increase survival and decrease morbidity.

The rapid advance in the understanding of the molecular biology of UTUC has led to the appearance of promising new biomarkers such as microRNAs (miRNAs) [3–6]. miRNAs are an abundant class of newly identified endogenous non-protein-coding small RNAs with a 20–25 nucleotide length [7], which can negative-regulate protein expression of target genes. Recent studies show that several miRNAs are differentially expressed in different human cancers, which indicate that miRNAs may have a role in the carcinogenic processes of numerous tumours [8–11]. Interestingly, these miRNA differences have also been observed in human biofluids [12, 13]. It has been recently demonstrated that circulating miRNAs in the blood stream are present in a stable and reproducible state [14]. Moreover, blood samples are easily acquired in a relatively non-invasive manner and miRNAs from blood can be readily detected [15]. Notably, the serum miRNA expression profile has been used as a fingerprint for various malignancies, including carcinomas of the urinary tract [13, 16]. In particular, diagnostic miRNAs in serum have been described for UTUC [17]. However, to the best of our knowledge, the prognostic global circulating miRNA patterns from UTUC patients have not been studied as yet.

In the present work, we aim to determine the differential miRNA expression patterns in serum of progressing and non-progressing UTUC patients in order to identify putative miRNAs that may be used as prognostic markers.

RESULTS

Clinical features

Median age (range) of the series was 70 (53–90) years. The median (range) follow-up of the cohort was 42 (9–100) months. Tumour progression was documented in 13 patients (39%). The median (range) time of tumour progression was 10 (2–46) months. Eleven patients (33%) died due to their UTUC. The median (range) time of cancer specific death was 24 (6–48) months. Two patients with tumour progression died from diseases other than UTUC.

Discovery phase

Overall, 38 miRNAs were identified as differentially expressed between progressing (n=5) and non-progressing (n=7) UTUC patients. Of these, nine miRNAs were up-regulated and 29 down-regulated in progressing patients. A heat map based on the differentially expressed miRNAs between the two groups of UTUC patients is shown in Figure 1.

Validation phase

All 38 miRNAs previously identified as differentially expressed were analyzed in an independent set of 21 UTUC serum samples (8 progressing and 13 non-

progressing). Eighteen microRNAs remained differentially expressed between these two groups of UTUC patients; all of them were down-regulated in progressing patients (Table 1).

Survival analysis

Multivariate Cox regression analysis including clinical covariates and serum expression levels of the 18 differentially expressed miRNAs showed that miR-151b and pathological stage were significant prognostic factors for tumour progression (HR=0.33; p<0.001 and HR=2.62; p=0.006, respectively) and cancer specific survival (HR=0.25; p<0.001 and HR=3.98; p=0.003, respectively).

Thereafter, the median expression value of miR-151b was used as a cut-off point to classify patients into a high-risk group (61%) and a low-risk group (39%) for tumour progression. Figure 2 depicts Kaplan-Meier curves generated using the selected cut-off point. As shown, the miR-151b expression value was able to discriminate between two groups of UTUC patients with a highly significant different probability of tumour progression (p=0.006) and cancer specific survival (p=0.034).

Pathway analysis

Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®) software predicted 104 target genes for miR-151b (Supplementary Table 1) while miRWalk analysis identified 1063 seed sequences (corresponding to 368 genes). There were 53 predicted gene targets for miR-151b with a statistically significant relation identified in common for both softwares (Supplementary Figure 1). Afterwards, Network Analyst showed several of these predicted targets to be related to Cancer pathways (Figure 3).

DISCUSSION

UTUC is considered to have an unpredictable prognosis. In the present series, more than one third of the patients developed tumour progression and died from their cancer within four years of follow-up. Pathological stage and histological grade are the most commonly used prognostic factors for UTUC, but they are insufficient to accurately predict tumour progression. The identification of minimally invasive prognostic UTUC biomarkers would help to accurately estimate the progression risk at the time of diagnosis, and consequently to identify the most appropriate therapy for each individual patient. Furthermore, it may be useful for monitoring tumour progression after RNU.

Our group has prior experience in miRNA analysis from different types of urothelial cell carcinoma samples. On the one hand, we provided evidence that miRNAs can be used as prognostic biomarkers in UTUC in tissue samples [3, 4]. On the other, we showed that miRNAs can be useful diagnostic and prognostic biomarkers for

bladder cancer in urine samples [12, 18]. Here, we evaluate circulating miRNA in the bloodstream from UTUC patients as minimally invasive predictive biomarkers of tumour progression and patient survival.

It has been previously described that circulating miRNAs in the bloodstream may be used as disease markers due to their methodological advantages over gene expression assays. First, it is easier to obtain short mature serum miRNAs than long-chain serum mRNA, since they are more stable against nuclease degradation [19]. In addition, the average copy number of an individual miRNA has been estimated to be ~ 500 per cell, which may be higher than the average mRNA species [20]. Consequently, less total RNA is required for a miRNA than for an mRNA assay. Regarding the technology used to

quantify miRNA expression, here we have used nCounter (NanoString Technologies). This system is a simple and cost-effective methodology that allows gene expression quantification in a multiplex format. In addition, it does not need any nucleic acid amplification and it provides more accurate miRNA quantification than PCR or microarray-based methods, especially in samples with low abundant and degraded RNA [21–23]. Actually, this system is already used in clinical settings for diagnostic as well as prognostic purposes [24, 25].

Therefore, circulating miRNAs may be a potentially useful blood-based tool for monitoring human cancers or predicting tumour outcome. In the case of urothelial carcinoma, some diagnostic miRNAs have been identified in serum samples from bladder cancer patients [26, 27].

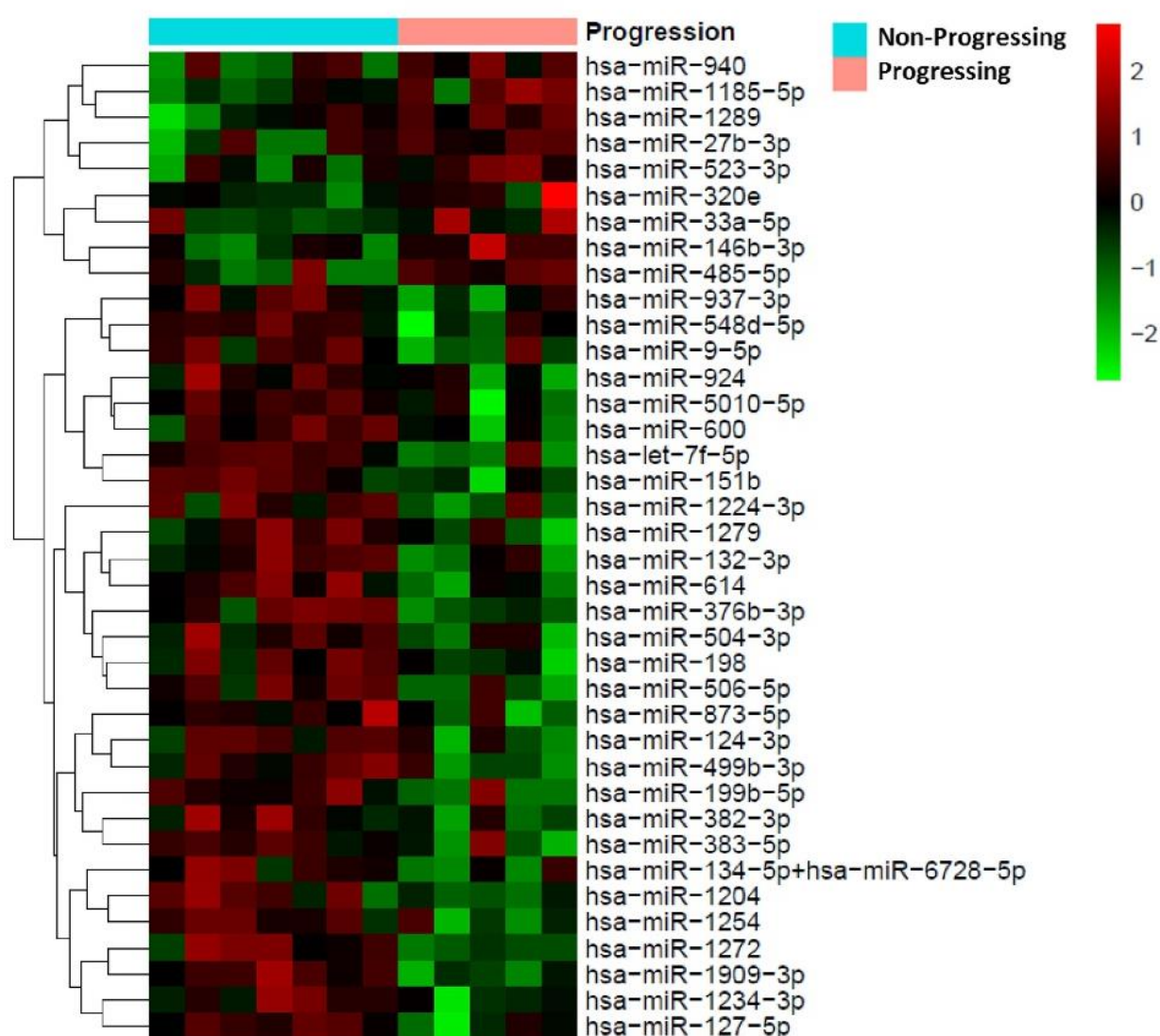


Figure 1: Heat map showing the 38 miRNAs differentially expressed between patients with progressing and non-progressing UTUC (N=12). Red pixels correspond to a greater abundance of miRNA in the serum samples, whereas green pixels indicate lower miRNA levels. Rows represent individual miRNAs and columns represent experimental samples.

Table 1: List of the 18 differentially expressed miRNAs and their FC values in the validation phase

miRNA	p-value	FC	FDR (%)
hsa-miR-600	0.001	-2.32	2.07
hsa-miR-504-3p	0.002	-2.30	2.431
hsa-miR-1279	0.003	-2.29	2.712
hsa-miR-198	0.001	-2.28	2.141
hsa-miR-151b	0.003	-2.13	2.747
hsa-miR-499b-3p	0.010	-1.99	3.329
hsa-miR-937-3p	0.008	-1.94	3.199
hsa-miR-1909-3p	0.018	-1.87	3.995
hsa-miR-383-5p	0.031	-1.86	5.357
hsa-miR-376b-3p	0.024	-1.86	4.755
hsa-miR-924	0.039	-1.82	6.143
hsa-miR-1254	0.016	-1.82	3.846
hsa-miR-1204	0.041	-1.80	6.332
hsa-miR-1272	0.020	-1.77	4.185
hsa-miR-132-3p	0.032	-1.76	5.416
hsa-miR-614	0.044	-1.74	6.489
hsa-miR-1234-3p	0.042	-1.73	6.385
hsa-miR-199b-5p	0.037	-1.72	5.89

P-value = Student's *t* test. Statistically significant FDR≤10%
 Abbreviations: FC=Fold Change; FDR=False Discovery Rate.

Jiang X et al [28] evaluated miRNA expression in serum samples from muscle-invasive bladder tumour, and they found two miRNAs (miR-486-3p and miR-103a-3p) with

prognostic value in these patients. In the case of UTUC, there are only few studies evaluating UTUC circulating miRNAs, and all of them have been focused on identifying

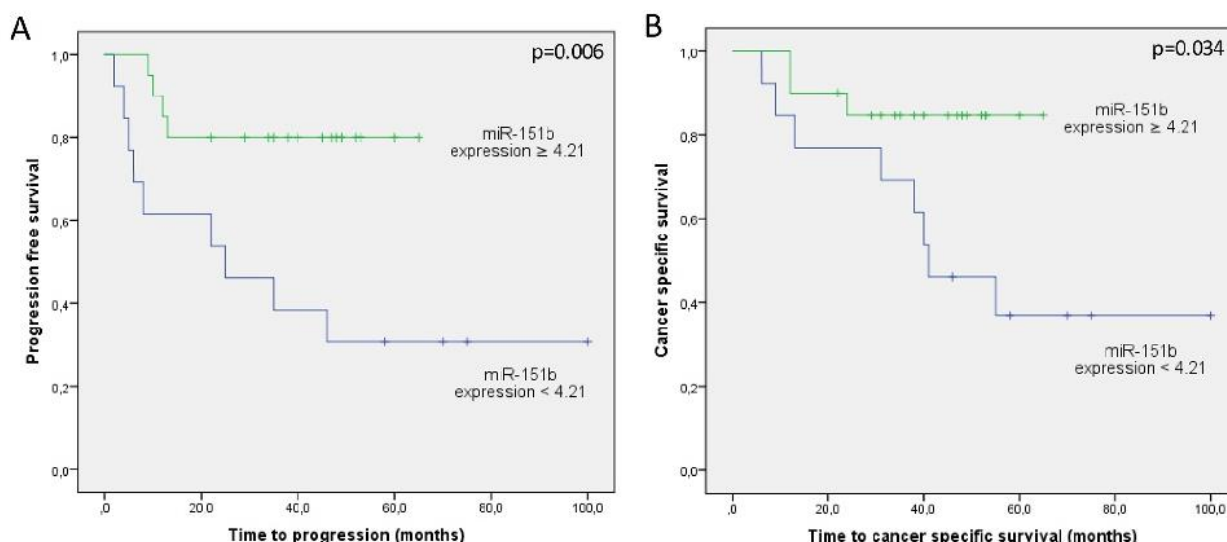


Figure 2: Kaplan Meier curves for (A) tumour progression and (B) cancer-specific survival according to miR-151b expression values (N=33). Green line represents patients at low risk (expression cutoff≥4.21) and blue line represents patients at high risk (expression cutoff<4.21).

diagnostic biomarkers. Kriebel *et al.*, reported alterations in miRNA expression, both in serum (n=44) and tissue (n=47) samples from UTUC patients. They showed that circulating miR-141 may be useful as diagnostic biomarker [29]. Tao *et al.* using 46 serum samples from UTUC patients and 30 controls identified a tensesum miRNA-based expression profile that was useful in discriminating between UTUC cases and controls [17]. However, as far as we could ascertain, this is the first study that shows differences in the miRNA expression profile between serum samples from progressing and non-progressing UTUC patients and

identifies a prognostic circulating miRNA (miR-151b) that independently predicts tumour progression and cancer specific survival. Unfortunately, neither the diagnostic nor prognostic serum miRNAs identified in bladder cancer samples are shared with miRNAs found in serum UTUC samples, supporting the previous genetic differences found in both tumour types [30, 31].

In accordance with our results, down-regulation of circulating miR-151b is described in primary CNS lymphoma patients [32]. Furthermore, *in silico* analysis shows that one of the target genes of miR-151b, *CCNE1*,

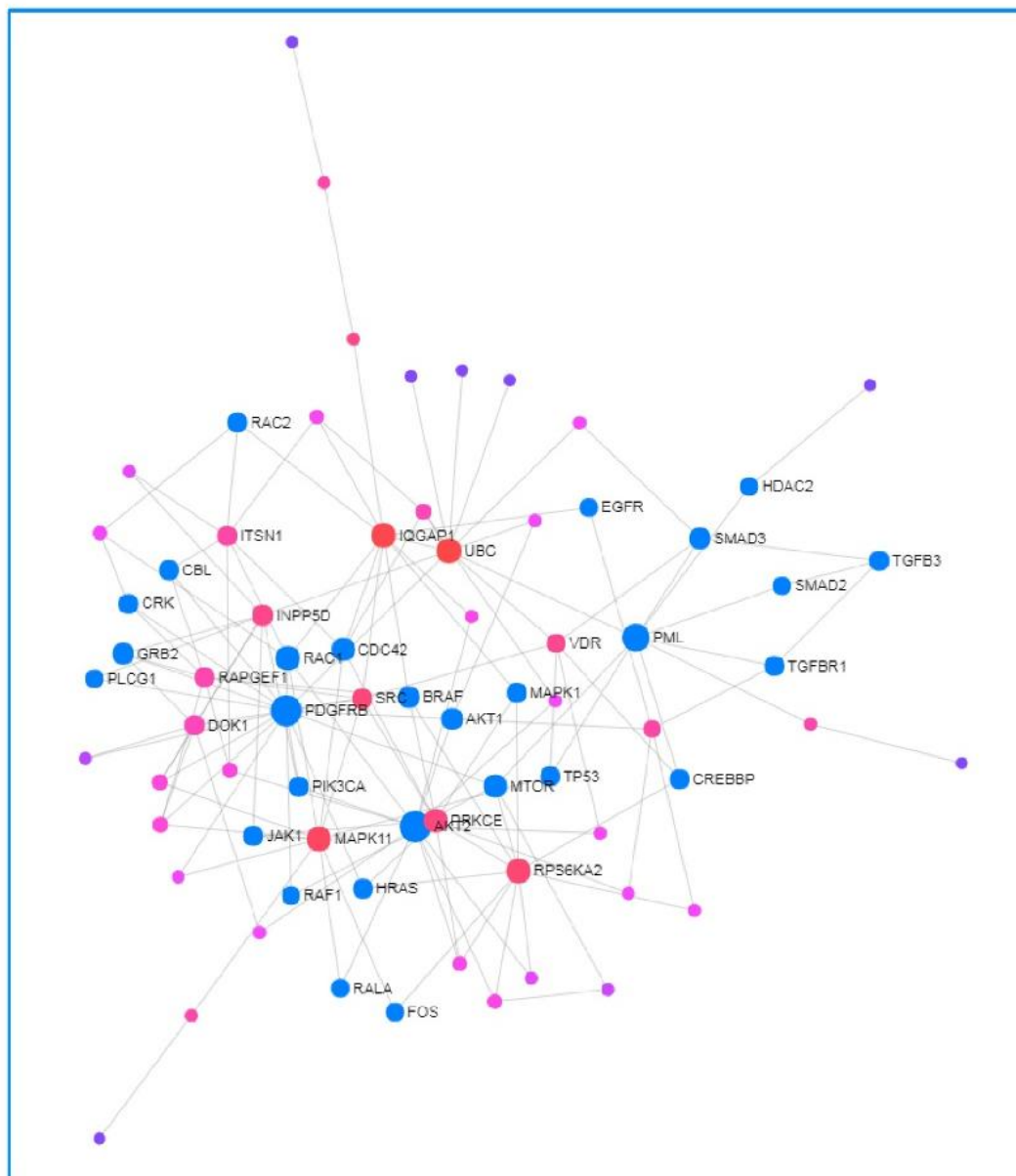


Figure 3: Network Analyst-derived protein-protein interactions network results. Network constructed with the 53 genes shared across most of data sets as seed proteins. Red nodes are most important interactions, followed by pink nodes and finally purple nodes. Nodes in blue represent those proteins interacting in Cancer pathways.

Table 2: Pathological features of UTUC patients

	Progressing UTUC N (%)	Non-Progressing UTUC N (%)	Total N (%)
N° Patients	13	20	33
Gender			
Male	8 (62)	15 (75)	23 (70)
Female	5 (38)	5 (25)	10 (30)
Tumor location			
Pelvis	5	14	19 (58)
Ureter	7	5	12 (36)
Both	1	1	2 (6)
Pathological Stage			
pTa	1 (8)	6 (30)	7 (21)
pT1	1 (8)	4 (20)	5 (15)
pT2	3 (23)	4 (20)	7 (21)
pT3	6 (46)	6 (30)	12 (37)
pT4	2 (15)	0 (0)	2 (6)
Histological Grade			
Low	2 (15)	4 (20)	6 (18)
High	11 (85)	16 (80)	27 (82)
Metastasis			
Local	3 (24)	-	3 (24)
Distant	5 (37)	-	5 (37)
Local + Distant	2 (15)	-	2 (15)
Nodes	3 (24)	-	3 (24)
Chemotherapy			
Adjuvant	9 (69)	-	9 (69)

is involved in T-cell signaling, cell-cycle, DNA-damage induced signaling and breast, pancreas, lung and prostate cancer pathways. Interestingly, *CCNE1* has been previously suggested as a prognostic biomarker for UTUC [33]. Wu S *et al.* [34] demonstrated that over-expression of *CCNE1* is associated with lower overall survival in UTUC patients, which is in concordance with our results showing down-regulation of miR-151b in progressing patients.

We are aware, however, that the study has some limitations. First, the total number of patients analyzed can be considered as low. It should be taken into account that UTUC is a rare disease, accounting only for 5-10% of all urothelial carcinomas, which makes it difficult to obtain large prospective series. Furthermore, we followed a very restrictive inclusion criterion, excluding all those patients having UTUC and other active neoplasms. Second, miRNA isolation from serum samples is challenging

since the amount of circulating miRNA is low. Even so, we were able to analyze miRNA expression in all samples except two (informative specimen rate of 94%). Finally, the data reported warrants further prospective evaluation in carefully and specifically designed studies.

In conclusion, our results demonstrate that serum samples from progressive and non-progressive UTUC patients show a differential miRNA expression pattern. We also show that expression of miRNA-151b in serum samples significantly predicts progression and cancer-specific survival in UTUC patients, indicating that it may be a novel potential minimally invasive biomarker for prognosis of UTUC patients. Although independent validation of the data is necessary, the identification of new circulating miRNAs associated with poor outcome in patients with UTUC may help tailor treatment and surveillance strategies in these patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and clinical samples

Prospective study including 35 UTUC patients who underwent radical RNU at the Hospital Clinic of Barcelona from January 2008 to August 2014. Finally, 33 UTUC patients (12 progressing and 21 non-progressing) were analyzed. Consecutive patients with a minimum of 36 months of follow-up were enrolled. Exclusion criteria were presence of another active neoplasm or absence of UTUC confirmation. Patients' histopathological characteristics are summarized in Table 2. Histological Grade and Pathological Stage of the tumors were determined according to WHO criteria and TNM classification, respectively [35, 36]. Institutional Review Board approval and patients' informed consents were obtained from all patients.

All patients were diagnosed by computed tomography (CT) scan and followed-up postoperatively with CT scan and cystoscopy at 3-month intervals for the first year, at 6-month intervals for the next 2 years, and annually thereafter. Tumours were considered as progressing when distant metastasis or pathological nodes were developed during follow-up.

This study was split into a two-stage approach with an initial discovery phase (training set) and a validation phase (testing set). Initial discovery phase included 12 UTUC patients, 5 progressing [1 pT2, 3 pT3 and 1 pT4, all high grade (HG)] and 7 non-progressing (2 pTa, 1 pT2 and 4 pT3, all HG). Validation phase comprised 21 UTUC patients, 8 progressing [1 pTa low grade (LG), 1 pT1 LG, 2 pT2 HG, 3 pT3 HG and 1 pT4 HG] and 13 non-progressing (4 pTa LG, 4 pT1 HG, 3 pT2 HG and 2 pT3 HG).

Serum sample processing and RNA isolation

Whole blood samples were collected in the operating room before RNU in a BD Vacutainer 10mL sterile tube coated with silicone and micronized silica particles and stored at 4°C. Blood was left to clot for a minimum of one hour and, within four hours, tubes were centrifuged for 15 minutes at 3500rpm, 4°C. Serum was immediately transferred to a cryotube and stored in aliquots at -80°C until use.

Total RNA was isolated from 500µL of serum aliquots using mirVana PARIS Kit (Thermofisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Before RNA isolation, 5µL at 200pM of five Spike-In controls (ath-miR-159a, cel-miR-248, cel-miR-254, osa-miR-414 and osa-miR-442) were added to each sample. Total RNA was quantified with a NanoDrop1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Expression analysis

Expression profiling of 800 human miRNAs from miRBase v3 was analyzed with the nCounter Human v3

miRNA Expression Assay Kit (NanoString Technologies) following manufacturer's instructions. Briefly, the assay uses molecular barcodes called nCounter Reporter Probes to detect microRNAs. The reaction involves a multiplexed hybridization of the specific probes to their target miRNA and an enzymatic purification to remove the unligated probes on the nCounter Prep Station. Data is finally collected by direct digital counting of the target molecules in each sample using the nCounter Digital analyzer. The assay contains positive and negative controls, reference genes and spike-in controls.

Five spike-in controls were used to compensate variations in RNA recovery between samples. Six established housekeeping miRNAs for serum already included in the assay (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-93-5p and hsa-miR-24-3p) were used to normalize microRNA expression levels [37–39]. After normalization, fold change expression between progressing and non-progressing patients was calculated using the moderate p-value (FDR) of the limma-R package [40].

Statistical analysis

Univariate Cox regression analysis was performed on the established clinical prognosticators of UTUC (stage and grade) and the 18 differentially expressed miRNAs to examine its influence on tumor progression and cancer specific survival; afterwards, multivariate forward stepwise Cox regression analysis was performed on significant covariates. Statistical significance was established at a p-value of 0.05 and according to 95% confidence intervals (CI). miRNA expression was dichotomized using the median expression value of miR-151b (cutoff = 4.21). Thereafter, Kaplan-Meier curves were generated. SPSS 23.0 software was used for statistical analysis.

Pathway enrichment analysis

The biological targets of the miRNAs identified were investigated using IPA®. Interactions and networks between significant miRNAs and genes were mapped to pathways, regulators, diseases, and functions based on direct/indirect and experimentally validated targets.

The miRWalk software [41] was used to predict putative miRNA binding sites in target genes, in order to discover possible canonical altered pathways. Finally, Network Analyst [42] was used to determine protein-protein interactions of the resulting genes from the previous analysis.

Abbreviations

RNU, Radical Nephroureterectomy; UTUC, Upper Tract Urothelial Carcinoma; CI, confidence interval; CT scan, computed tomography scan; LG, low grade; HG,

high grade; HR, hazard ratio; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; miRNA, microRNA.

Author contributions

Study concepts and design: LI, RM, LM, AA
 Data acquisition: RM, LI, MI, DC
 Data analysis and interpretation: RM, LI, LM, JJJ
 Statistical analysis: RM, LI, JJJ
 Manuscript preparation: RM, LI, LM
 Manuscript review: ALL AUTHORS.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients who participated in this study and all the staff and nurses from the Urology Department of the Hospital Clinic for collaborating in collecting blood samples. Funding from CERCA Programme/Generalitat de Catalunya is gratefully acknowledged. This work was developed at the building Centre de Recerca Biomèdica Cellex, Barcelona. We thank Helena Kruyer for the English correction of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Spanish Urological Association (FIU 2010 to LI).

REFERENCES

- Roupret M, Zigeuner R, Palou J, Boehle A, Kaasinen E, Sylvester R, Babjuk M, Oosterlinck W. European guidelines for the diagnosis and management of upper urinary tract urothelial cell carcinomas: 2011 update. *Eur Urol*. 2011; 59:584–594.
- Huben RP, Mounzer AM, Murphy GP. Tumor grade and stage as prognostic variables in upper tract urothelial tumors. *Cancer*. 1988; 62:2016–2020.
- Izquierdo L, Ingelmo-Torres M, Mallofre C, Lozano JJ, Verhasselt-Crinquette M, Leroy X, Colin P, Comperat E, Roupret M, Alcaraz A, Mengual L. Prognostic value of microRNA expression pattern in upper tract urothelial carcinoma. *BJU Int*. 2014; 113:813–821.
- Izquierdo L, Montalbo R, Ingelmo-Torres M, Mallofre C, Ramirez-Backhaus M, Rubio J, Van der Heijden AG, Schaafsma E, Lopez-Beltran A, Blanca A, Lawrentschuk N, Alcaraz A, Mengual L. Prognostic microRNAs in upper tract urothelial carcinoma: multicenter and international validation study. *Oncotarget*. 2017; 8:51522–51529. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17884>.
- Popovska-Jankovic K, Noveski P, Jankovic-Velickovic L, Stojnev S, Cukuranovic R, Stefanovic V, Toncheva D, Staneva R, Polenakovic M, Plaseska-Karanfilska D. MicroRNA profiling in patients with upper tract urothelial carcinoma associated with balkan endemic nephropathy. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:7450461.
- Ke HL, Li WM, Lin HH, Hsu WC, Hsu YL, Chang LL, Huang CN, Li CC, Chang HP, Yeh HC, Li CF, Wu WJ. Hypoxia-regulated microRNA-210 overexpression is associated with tumor development and progression in upper tract urothelial carcinoma. *Int J Med Sci*. 2017; 14:578–584.
- Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA. Identification and characterization of new plant microrNAS using EST analysis. *Cell Res*. 2005; 15:336–360.
- Lin T, Dong W, Huang J, Pan Q, Fan X, Zhang C, Huang L. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J Urol*. 2009; 181:1372–1380.
- Vogt M, Munding J, Gruner M, Liffers ST, Verdoodt B, Hauk J, Steinstraesser L, Tannapfel A, Hermeking H. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch*. 2011; 458:313–322.
- Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci*. 2011; 102:522–529.
- Catto JW, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudzic E, Larre S, Milo M, Rehman I, Rosario DJ, Di Martino E, Knowles MA, Meuth M, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res*. 2009; 69:8472–8481.
- Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Gazquez C, Ribal MJ, Alcaraz A. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *Int J Cancer*. 2013; 133:2631–2641.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008; 18:997–1006.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:10513–10518.
- Zuo Z, Maiti S, Hu S, Loghavi S, Calin GA, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Cooper LJ, Bueso-Ramos

- CE. Plasma circulating-microRNA profiles are useful for assessing prognosis in patients with cytogenetically normal myelodysplastic syndromes. *Mod Pathol*. 2015; 28:373–382.
16. Huang X, Liang M, Dittmar R, Wang L. Extracellular micromas in urologic malignancies: chances and challenges. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:14785–14799.
 17. Tao J, Yang X, Li P, Wei J, Deng X, Cheng Y, Qin C, Ju X, Meng X, Li J, Gu M, Lu Q, Yin C. Identification of circulating microRNA signatures for upper tract urothelial carcinoma detection. *Mol Med Rep*. 2015; 12:6752–6760.
 18. Ingelmo-Torres M, Lozano JJ, Izquierdo L, Carrion A, Costa M, Gomez L, Ribal MJ, Alcaraz A, Mengual L. Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget*. 2017; 8:18238–18247. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15315>.
 19. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8:467–477.
 20. Ragan C, Zuker M, Ragan MA. Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations. *PLoS Comput Biol*. 2011; 7:e1001090.
 21. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, Fell HP, Ferree S, George RD, Grogan T, James JJ, Maysuria M, Mitton JD, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008; 26:317–325.
 22. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordóñez B, Gullane P, Irish J, Jurisica I, Kamel-Reid S. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. *BMC Biotechnol*. 2011; 11:46.
 23. Wang H, Horbinski C, Wu H, Liu Y, Sheng S, Liu J, Weiss H, Stromberg AJ, Wang C. Nanostringdiff: a novel statistical method for differential expression analysis based on nanostring ncounter data. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44:e151.
 24. Prat A, Galvan P, Jimenez B, Buckingham W, Jeiranian HA, Schaper C, Vidal M, Alvarez M, Diaz S, Ellis C, Nuciforo P, Ferree S, Ribelles N, et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy using core needle biopsy samples with the prosigna assay. *Clin Cancer Res*. 2016; 22:560–566.
 25. Martin M, Gonzalez-Rivera M, Morales S, Haba-Rodriguez J, Gonzalez-Cortijo L, Manso L, Albanell J, Gonzalez-Martin A, Gonzalez S, Arcusa A, Cruz-Merino L, Rojo F, Vidal M, et al. Prospective study of the impact of the prosigna assay on adjuvant clinical decision-making in unselected patients with estrogen receptor positive, human epidermal growth factor receptor negative, node negative early-stage breast cancer. *Curr Med Res Opin*. 2015; 31:1129–1137.
 26. Jiang X, Du L, Wang L, Li J, Liu Y, Zheng G, Qu A, Zhang X, Pan H, Yang Y, Wang C. Serum microma expression signatures identified from genome-wide microma profiling serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence of bladder cancer. *Int J Cancer*. 2015; 136:854–862.
 27. Motawi TK, Rizk SM, Ibrahim TM, Ibrahim IA. Circulating microRNAs, miR-92a, miR-100 and miR-143, as non-invasive biomarkers for bladder cancer diagnosis. *Cell Biochem Funct*. 2016; 34:142–148.
 28. Jiang X, Du L, Duan W, Wang R, Yan K, Wang L, Li J, Zheng G, Zhang X, Yang Y, Wang C. Serum microma expression signatures as novel noninvasive biomarkers for prediction and prognosis of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:36733–36742. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9166>.
 29. Kriebel S, Schmidt D, Holdenrieder S, Goltz D, Kristiansen G, Moritz R, Fisang C, Muller SC, Ellinger J. Analysis of tissue and serum microRNA expression in patients with upper urinary tract urothelial cancer. *PLoS One*. 2015; 10:e0117284.
 30. Moss TJ, Qi Y, Xi L, Peng B, Kim TB, Ezzedine NE, Mosqueda ME, Guo CC, Czerniak BA, Ittmann M, Wheeler DA, Lerner SP, Matin SF. Comprehensive genomic characterization of upper tract urothelial carcinoma. *Eur Urol*. 2017; 72:641–649.
 31. Izquierdo L, Mengual L, Gazquez C, Ingelmo-Torres M, Alcaraz A. Molecular characterization of upper urinary tract tumours. *BJU Int*. 2009; 106:868–872.
 32. Roth P, Keller A, Hoheisel JD, Codo P, Bauer AS, Backes C, Leidinger P, Meese E, Thiel E, Korfel A, Weller M. Differentially regulated mirnas as prognostic biomarkers in the blood of primary cns lymphoma patients. *Eur J Cancer*. 2015; 51:382–390.
 33. Wu S, Chen J, Dong P, Zhang S, He Y, Sun L, Zhu J, Cheng Y, Li X, Tang A, Huang Y, Gui Y, Liu C, et al. Global gene expression profiling identifies ALDH2, CCNE1 and SMAD3 as potential prognostic markers in upper tract urothelial carcinoma. *BMC Cancer*. 2014; 14:836.
 34. Guo B, Luo C, Xun C, Xie J, Wu X, Pu J. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in urine samples as diagnostic tools for bladder cancer by real-time PCR. *Exp Oncol*. 2009; 31:43–47.
 35. Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, Hartmann A, Schmitz-Dräger BJ, Helpap B, Ayala AG, Tamboni P, Knowles MA, Sidransky D, Cordon-Cardo C, Jones PA, Cairns P, et al, eds. World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press, 2004.
 36. Sobin LH, Wittekind Ch, editors. TNM Classification of Malignant Tumours, 6th ed. New York: Wiley, 2002.
 37. Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegner J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microma expression

- data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 2016; 17:204–212.
38. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, Han S, Zhang Z. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci.* 2012; 57:897–904.
 39. Hu Z, Dong J, Wang LE, Ma H, Liu J, Zhao Y, Tang J, Chen X, Dai J, Wei Q, Zhang C, Shen H. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis.* 2012; 33:828–834.
 40. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:e47.
 41. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. Mirwalk--database: prediction of possible mirna binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011; 44:839–847.
 42. Xia J, Gill EE, Hancock RE. Networkanalyst for statistical, visual and network-based meta-analysis of gene expression data. *Nat Protoc.* 2015; 10:823–844.

TREBALL 3

CLASSIFICADOR D'EXPRESSION GÈNICA EN ORINA PEL SEGUIMENT DEL CARCINOMA UROTELIAL DE BUFETA

Int J Cancer. 2018

(Under review)

CLASSIFICADOR D'EXPRESSION GÈNICA EN ORINA PEL SEGUIMENT DEL CARCINOMA UROTELIAL DE BUFETA

Objectiu: Desenvolupar un test no invasiu basat en l'expressió gènica en orina amb una alta precisió diagnòstica pel CU en el seguiment dels pacients amb aquesta malaltia.

Metodologia: Un total de 597 pacients amb càncer de bufeta, pacients en seguiment per la malaltia (sense tumor) i controls van ser inclosos a l'estudi. Es van recollir mostres d'orina per micció espontània de tots els pacients i controls i es va extreure RNA de les cèl·lules descamades a la orina. L'estudi es va dividir en 3 fases, en cadascuna de les quals s'augmentava progressivament el nombre de mostres incloses i es reduïa el nombre de gens a analitzar. A la primera fase es va dur a terme el descobriment de biomarcadors específics del grup de risc de càncer de bufeta baix/intermedi mitjançant seqüenciació del RNA a 84 orines incloses retrospectivament de pacients amb CU de bufeta i controls. A la segona fase es va desenvolupar el test analitzant l'expressió de 132 gens seleccionats a la fase anterior. La quantificació de l'expressió gènica es va realitzar mitjançant el nCounter (NanoString) en 214 orines de pacients en seguiment per CU de bufeta recollides prospectivament (98 d'ells amb tumor). El test es va desenvolupar utilitzant regressió logística. Finalment, a la fase de validació del test, es van incloure 248 orines (134 amb tumor i 114 pacients sense tumor però en seguiment per CU de bufeta) provinents de diferents centres internacionals per avaluar la precisió diagnòstica del test.

Resultats: S'han identificat 521 gens diferencialment expressats entre les mostres de pacients amb càncer de bufeta de risc baix/intermedi i la resta de grups ($p < 0.05$). S'ha desenvolupat un test basat en l'expressió de 8 gens en orina amb una AUC de 0.893 i s'ha validat el test en una cohort independent multicèntrica i internacional presentant una sensibilitat (SN) i un valor predictiu negatiu (NPV) del 96% i el 97%, respectivament (AUC=0.823). Aquesta precisió diagnòstica es manté a les mostres de CU de bufeta de risc baix/intermedi (SN=94%; NPV=98%).

Conclusions: El classificador d'expressió gènica de 8 gens desenvolupat en aquest treball té una alta SN i NPV en un escenari clínic real (pacients en seguiment per CU de bufeta). L'ús del test durant el seguiment dels pacients amb CU de bufeta podria reduir el nombre de cistoscòpies a les que estan sotmesos els pacients. La validació del test en un estudi prospectiu aleatoritzat determinaria el paper final del test a la pràctica clínica diària.

Urine gene expression classifier for bladder cancer surveillance

Ruth Montalbo^a, Juan J. Lozano^b, Laura Izquierdo^a, Mercedes Ingelmo-Torres^a, Carmen Baños^a, Joan Palou^c, Antoine G. Van der Heijden^d, Rafael Medina^e, Joerg Schmidbauer^f, Aleix Prat^g, Maria J. Ribal^a, Antonio Alcaraz^a and Lourdes Mengual^a

^aDepartment and Laboratory of Urology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

^bBioinformatics Platform, CIBEREHD, Barcelona, Spain.

^cDepartment of Urology, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain.

^dDepartment of Urology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands.

^eHospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

^fDepartment of Urology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

^gOncology Department, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

This study aimed to develop a high accuracy non-invasive bladder cancer (BC) surveillance test focusing on the detection of non high-risk non-muscle invasive BC (NMIBC) tumors. A total of 597 urines from BC patients, controls and patients in follow up for BC (PFBC) were included. The study was divided into three phases. In the urinary biomarker discovery phase, 84 urines from BC and control patients were retrospectively included and analyzed by RNA sequencing. In the classifier development phase, a total of 132 selected genes from previous phase were evaluated by nCounter® in 214 prospectively collected urines from PFBC (98 with tumor). Then, a diagnostic classifier was generated by logistic regression. Finally, in the classifier validation phase, a multicentric and international cohort of 248 urine samples (134 BC and 114 non-recurrent PFBC) was used to validate classifier performance. A total of 521 genes were found differentially expressed between non high-risk NMIBC samples and all other groups ($p < 0.05$). An 8-gene diagnostic classifier with an AUC of 0.893 was developed. Validation of the 8-gene classifier in an independent cohort of PFBC achieved an overall sensitivity (SN) and a negative predictive value (NPV) of 96% and 97%, respectively (AUC=0.823). Of note this accuracy was maintained in non high-risk NMIBC group (SN=94%; NPV=98%). In conclusion, this 8-gene expression classifier has high SN and NPV in a real clinical scenario (PFBC). The use of this classifier can reduce the number of follow up cystoscopies in PFBC, although assessing its final place in clinical setting is necessary.

Key words: bladder cancer; biomarkers; diagnostic test; gene expression profiling; urine

Abbreviation BC: bladder cancer; NMIBC: non-muscle invasive bladder cancer; SN: sensitivity; SP: specificity; LG: low grade; NR-PFBC: non-recurrent patients in follow up for bladder cancer; C: control; MIBC: muscle invasive bladder cancer; PCA: principal component analysis; FDR: false discovery rate; FC: fold change; AUC: area under curve; NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value; HG: high grade; RT-qPCR: reverse transcription quantitative PCR; GO: Gene ontology

Introduction

Seventy to 80 percent of bladder cancer (BC) cases are non-muscle invasive BC (NMIBC) at diagnosis. As the recurrence rate of NMIBC is approximately 70% at 5 years, these patients require long term monitoring by cystoscopy and cytology [1]. Cystoscopy is an invasive technique with patient discomfort and possible complications. Moreover, it has been estimated that it can overlook 10-20% of the papillary lesions and 50% of flat bladder lesions, and could also be inconclusive some cases [2;3]. For this reason, cystoscopy is always associated with cytology in BC diagnostic and follow up schedules as its specificity (SP) reaches 98% [4]. Cytology is a non-invasive methodology but it has low sensitivity (SN), inter-observer variability, subjective evaluation and low-accuracy in low-grade (LG) tumors [5].

Over the last decades, many studies have attempted to identify urinary biomarkers that could replace cystoscopy. In fact, several urinary biomarkers have been reported in the literature and some of them are even FDA-approved, but none of these tests have been incorporated into routine clinical practice due to their insufficient diagnostic performance [6].

We have previously reported and validated several gene expression classifiers in exfoliated urinary cells with a diagnostic accuracy equal or superior to the current gold standard (cystoscopy combined with cytology) [7-9]. However, these classifiers lack sensitivity in low-grade recurrences and were only evaluated in case-control cohorts. Here

we investigate the gene expression profile specifically associated with non high-risk NMIBC tumors in order to identify a specific set of urine biomarkers in this subgroup of patients. The combination of the newly identified biomarkers with the previously reported by our group could lead to the development of a more accurate classifier for detecting low-grade tumors. This would allow us to replace cystoscopy during follow up or lower cystoscopy frequency in a routine fashion.

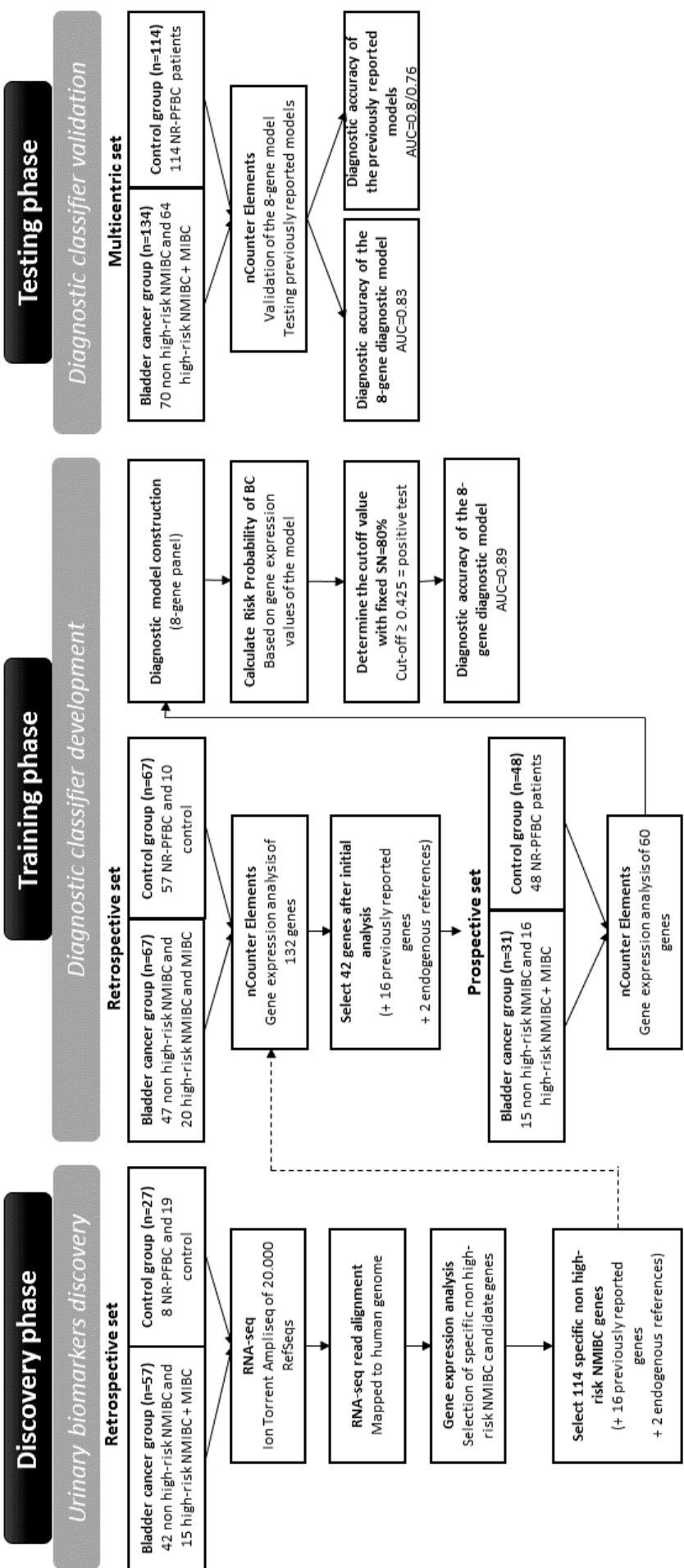
Materials and methods

Patients and samples

Multicentre and international study performed according to STARD guidelines [10] and reported according to REMARK guidelines [11]. The protocol was approved by an institutional review committee at Hospital Clinic, Barcelona (Spain), and by local committees of the four external participating institutions; Fundació Puigvert (Spain), Radboud University Nijmegen (The Netherlands), Hospital Virgen del Rocío (Spain), University of Vienna (Austria).

The study was divided into three phases: identification of non high-risk NMIBC specific urinary biomarkers (discovery phase), development of a diagnostic classifier (training set phase) and validation of the diagnostic classifier (testing set phase) (Figure 1). A total of 597 urine samples from BC patients, non-recurrent patients in follow up for BC (NR-PFBC) and controls without neoplastic urological disease (C) were enrolled between

Figure 1. Study design. Urine samples from 57 BC patients and 27 control subjects were collected for RNA-seq analysis. High-risk NMIBC and MIBC patients were included in the analysis as controls to avoid selection of genes related to these groups. A subset of genes differentially expressed specifically in non high-risk NMIBC was selected to be tested in a total of 215 urine samples from BC patients and controls. Then, an 8-gene classifier for predicting the probability of BC was constructed using multivariate logistic regression. Diagnostic performance of the classifier was validated in an independent multicentric cohort of 249 urine samples from 134 BC patients and 114 NR-PFBC.



Abbreviations: NMIBC, Non-Muscle Invasive Bladder Cancer; MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer; NR-PFBC, non-recurrent control patients in follow up for BC; BC, Bladder Cancer; SN, sensitivity; AUC, Area Under the Curve.

April 2008 and June 2016 in the different centres. External centres were asked to collect and prepare the urine samples for final processing at the Hospital Clinic. After excluding non-evaluable samples (see nCounter Elements gene expression analysis section), 546 samples were included in the study (Table 1). The grade and stage of the tumours were determined according to WHO criteria [12] and TNM classification [13], respectively. Tumours were classified into three categories according to their risk: non high-risk NMIBC, high-risk NMIBC and muscle invasive BC. BCG treatments were applied following EAU guidelines [1].

Urine cytology

Urine cytologies were performed according to Papanicolaou staining and were evaluated by expert pathologists in each participating centre blinded to the patient's clinical history. The results were either considered as positive, negative, or suspicious. Suspicious cytology was defined as those samples that contained cells with morphologies that could not be clearly classified as tumour cells or normal cells.

RNA isolation

Around 50-100 ml of voided urine was collected from all patients of the series. Urine samples were processed as previously described [14], except that collected urines were stored at 4°C and processed within the next 24 hours instead of ice cooled. After processing, TRIzol reagent (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) was added and samples were frozen at -80°C until RNA isolation. RNAs from the urinary cell pellets were extracted following manufacturer's instructions and quantified with a NanoDrop1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). In the discovery phase, RNA integrity was assessed with Agilent Bionalyzer by using Eukaryote Total RNA Nano kit (mean RIN value was 2.5; range: 0-8.9).

Library preparation and sequencing method

RNA sequencing of 20,000 RefSeqs was performed in the discovery phase. Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit (Thermo Fisher Scientific, P/N A26325) was used for library preparation. Briefly, cDNA was synthesised from total RNA by using the SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) from 10 ng of RNA. Then, cDNA was amplified using Ion AmpliSeq™ technology. Finally, after a partial digestion of the primer sequence with FUPA reagent, ligation of the barcoded adapters, and purification by Agencourt® AMPure® XP Reagent of the amplified cDNA, the library was quantified with Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific).

An input concentration of eight pooled libraries copy/Ion Sphere Particles (ISPs) was added to the emulsion PCR master mix and the emulsion was generated using the Ion Chef™ Instrument (Thermo Fisher Scientific) using the

Table 1. Clinicopathological and demographic characteristics of the study population classified by **A)** the study phase and **B)** the participating centre (testing set).

A)	DISCOVERY PHASE	TRAINING SET	TESTING SET
Bladder Cancer Patients	N (%)	N (%)	N (%)
Gender			
Male	45 (79)	73 (74)	100 (75)
Female	12 (21)	25 (26)	34 (25)
Age			
Mean	69	72	73
Range	53-95	46-90	30-94
Pathological Stage			
pTa	42 (74)	64 (65)	73 (54)
pT1	6 (11)	14 (14)	44 (33)
pT2	7 (12)	15 (15)	7 (5)
pTis	2 (3)	5 (6)	10 (7)
Histological Grade			
Low	44 (77)	61 (62)	49 (37)
High	13 (23)	37 (38)	85 (63)
Subtotals	57	98	134
Non-Recurrent Patients in Follow Up for BC			
Gender			
Male	5 (63)	75 (71)	97 (85)
Female	3 (37)	31 (29)	17 (15)
Age			
Mean	67	71	73
Range	53-84	48-90	40-89
Pathological Stage before TURB			
pTa	6 (75)	68 (64)	76 (67)
pT1	2 (25)	21 (20)	31 (27)
pT2	-	12 (11)	5 (4)
pTis	-	5 (5)	2 (2)
Histological Grade before TURB			
Low	6 (75)	67 (63)	78 (68)
High	2 (25)	39 (37)	36 (32)
Subtotals	8	106	114
Control Patients without Neoplastic Diseases			
Gender			
Male	9 (47)	6 (60)	-
Female	10 (53)	4 (40)	-
Age			
Mean	69	63	-
Range	35-84	39-83	-
Urinary Condition			
Urolithiasis	12 (63)	7 (70)	-
BPH	7 (37)	3 (30)	-
Subtotals	19	10	-
TOTAL	84	214	248

Abbreviations: NMIBC, Non-Muscle Invasive Bladder Cancer; MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer; TURB, Trans-urethral resection of the bladder; BPH, Benign Prostate History.

B)

	TESTING SET				
	Hospital Clínic	Fundació Puigvert	Radboud University Nijmegen	Virgen del Rocio	University of Vienna
Bladder Cancer Patients	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Gender					
Male	33 (77)	37 (77)	16 (84)	9 (56)	6 (75)
Female	10 (23)	11 (23)	3 (16)	7 (44)	2 (25)
Age					
Mean	74	71	74	69	76
Range	55-91	39-89	30-86	45-82	67-94
Pathological Stage					
pTa	18 (42)	31 (65)	15 (79)	10 (63)	4 (50)
pT1	14 (33)	14 (29)	4 (21)	5 (31)	2 (25)
pT2	1 (2)	3 (6)	-	1 (6)	2 (25)
pTis	10 (23)	-	-	-	-
Histological Grade					
Low	31 (72)	31 (65)	17 (89)	11 (69)	4 (50)
High	12 (28)	17 (35)	2 (11)	5 (31)	4 (50)
Subtotals	43	48	19	16	8
Non-Recurrent Patients in Follow Up for BC					
Gender					
Male	75 (87)	5 (83)	14 (82)	-	3 (60)
Female	11 (13)	1 (17)	3 (18)	-	2 (40)
Age					
Mean	74	70	74	-	77
Range	40-89	60-78	47-89	-	69-80
Pathological Stage before TURB					
pTa	65 (76)	-	6 (35)	-	-
pT1	15 (17)	-	7 (41)	-	-
pT2	4 (4)	-	2 (12)	-	-
pTis	2 (3)	-	2 (12)	-	-
Histological Grade before TURB					
Low	67 (78)	-	6 (35)	-	-
High	19 (22)	-	11 (65)	-	-
Subtotals	86	6	17	-	5
TOTAL	129	54	36	16	13

Abbreviations: NMIBC, Non-Muscle Invasive Bladder Cancer; MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer; TURB, Transurethral resection of the bladder.

Ion PI™ Hi-Q™ Chef Kit (Thermo Fisher Scientific). Template-positive ISPs were enriched, and sequencing was undertaken using an Ion PI v3 (Thermo Fisher Scientific) on the Ion Proton sequencer (Thermo Fisher Scientific) using the Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit (Thermo Fisher Scientific).

Read alignment and differential gene expression analysis

Partek Flow 6.0 (<http://www.partek.com/>) was used to analyse AmpliSeq transcriptome data. Briefly, primary read alignment for AmpliSeq sequencing data of all samples was performed using the Torrent Mapping Alignment Program (TMAP). After quantification, features with a minimum ≤ 1.0 were excluded. Between-sample normalization at gene level was performed using the trimmed mean method (TMM)

followed by quantile normalisation. Gene-specific analysis (GSA) was used to identify a statistical model that is the best for a specific transcript, and then the best model was used to test for differential expression.

nCounter Elements gene expression analysis

Gene expression levels in training and testing sets were quantified via the nCounter Elements approach, according to manufacturer's instructions (NanoString Technologies, Seattle, WA). Briefly, probes were designed to target sequences of interest and the corresponding Elements TagSet (consisting of a fluorescently labelled specific Reporter Tag and a biotinylated universal Capture Tag). The probes were hybridized with the Elements TagSet and 250ng of RNA for a minimum of 16 hours at 67°C in a thermocycler. Samples were stored at 4°C for a maximum of 24h until purified in the nCounter Prep Station to remove unligated probes. Expression data was collected by direct digital counting of the target molecules in each sample using the nCounter Digital analyser. Those samples with less than 10 counts were excluded from the analysis. Relative expression values for the genes analysed were used to calculate the risk of presenting BC. If the predicted probability of the model was higher than the established cut-off point value, the samples were classified for the gene expression signature as tumour sample. All the researchers from the Hospital Clinic involved in this analysis

were blinded to the patients' clinical data, ensuring the reliability of the results.

Data analysis

NanoString raw data was processed in the R statistical environment (v3.3.2) and normalization was performed using the NanoStringNorm package [15]. The normalization setting was performed using the geometric mean of the two housekeeping genes (*BGUS*, *PPIA*). Logistic regression was used to generate diagnostic models. Performance was evaluated by ROC curves. Comparisons with a p-value < 0.05 were considered statistically significant.

ToppGene (<https://toppgene.cchmc.org/>) [16] was used to detect functional enrichment of the 8 genes from the classifier. Gene-gene interaction networks for the genes of the model were built by the GeneMANIA Cytoscape 3.0.0 plugin [17]. Physical, co-expression and pathway gene-gene interactions were evaluated.

Results

Urinary biomarkers discovery

Initial exploratory assessment of the RNA-seq dataset was performed using principal component analysis (PCA). As shown, there is a noticeable overlap of urine samples from non high-risk NMIBC and all other groups. Nevertheless, 521 genes were found to be specifically differentially expressed (p<0.05) between non high-risk NMIBC and all the other groups (Figure 2 and Table S1).

Classifier development

A total of 114 key differentially expressed genes selected from previous phase (FDR \leq 0.12 and absolute FC \geq 1.5) plus 16 selected genes from our previous classifiers [7-9] (Table S2) were analysed in 136 urine samples. Thereafter, 60 genes were selected (FDR \leq 0.12 and absolute FC \geq 1.5) to be tested in 79 independent additional samples (Table S3). Logistic regression analysis was used to generate an 8-gene expression classifier (*ANXA10*, *IGF2*, *KIFC3*, *KRT20*, *LCN2*, *MAGEA3*, *RPS21* and *SLC1A6*) that achieves an AUC=0.893 for detecting BC. At a fixed SN of 80%, the classifier reaches 89% SP.

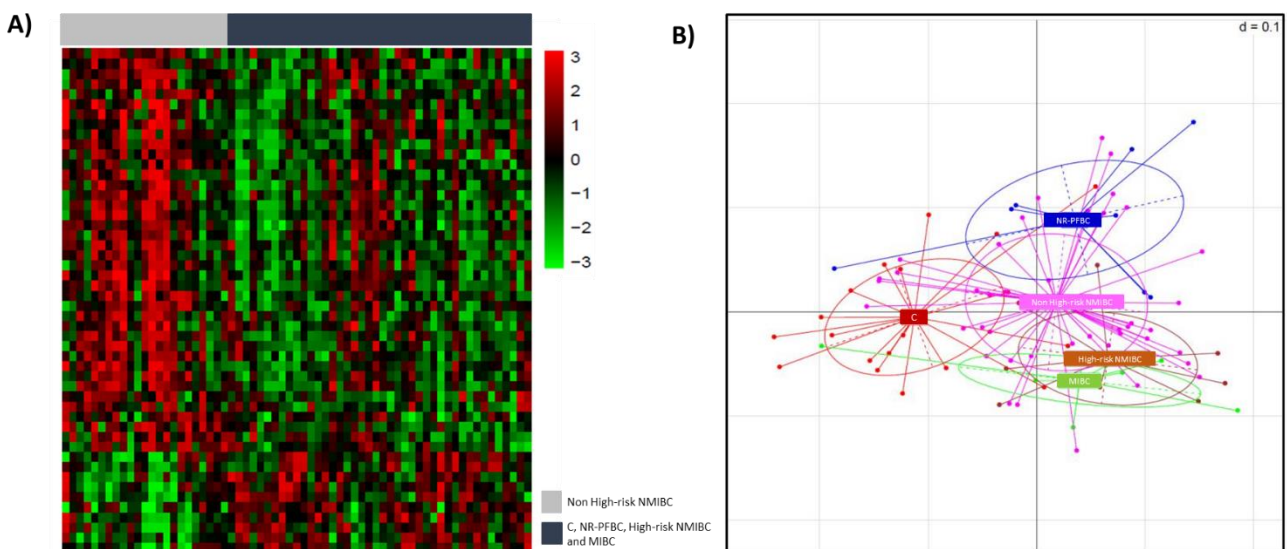
Gene ontology (GO) analyses of the 8 genes included in the classifier revealed highly significant enrichment of diseases associated with bladder malignances (Figure 3A). The generated network by GeneMANIA shows that there are no direct interactions between the eight genes of the model although four of them show co-expression (Figure 3B).

Classifier validation

The 8-gene classifier was validated in an independent multicentric and international cohort of 249 voided urine samples from patients in follow up for BC (PFBC). The 8-gene classifier performed well in this real clinical scenario (AUC=0.823), achieving an overall SN of 96%. More importantly, the SN of the classifier in non high-risk NMIBC group was 94%. Notably, the SN of the classifier in the subset of recurrent tumors (SN=92%; n=72) was comparable to that of primary tumors (SN=100%; n=62).

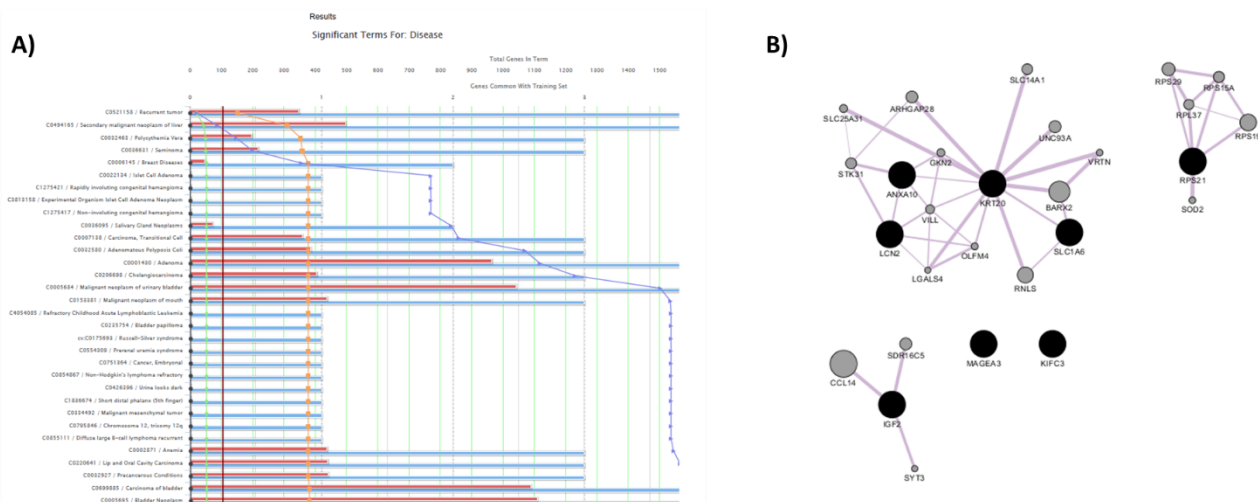
On the other hand, the SP of the classifier decreased to 18% in this validation set, as evidenced in ROC curves and AUC values (Table 2 and Figure 4). Interestingly, we found that the performance of the 8-gene classifier was not affected by number of tumors ($p=0.43$) nor by tumor size ($p=0.34$). Figure 4 depicts the risk probabilities derived from the 8-gene classifier in NR-PFBC, non high-risk NMIBC and high-risk NMIBC+MIBC, both in

Figure 2. A) Heat map representation of the top 50 differentially expressed genes between low grade NMIBC and the other groups from the discovery set. Red pixels correspond to an increased abundance of mRNA in the urine samples, whereas green pixels indicate decreased mRNA levels. B) PCA representation of differences between all samples.



Abbreviations: NMIBC, Non-Muscle Invasive Bladder Cancer; MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer; NR-PFBC, non-recurrent control patients in follow up for BC; C, controls without neoplastic urological disease.

Figure 3. Functional gene enrichment analysis (A) and gene-gene interaction network (B) for the 8 genes of the classifier.



training and testing sets.

In this phase, we oversampled patients with BC. We therefore cannot directly calculate predictive values from the test results. In daily practice, it is known that recurrence is detected in approximately 10% of all follow up cystoscopies performed (90% of patients previously diagnosed with NMIBC are without recurrence at time of follow up cystoscopy). In order to calculate predictive values that reflect values in real clinical practice, we assumed the distribution of recurrent vs. non-recurrent to be 10 vs. 90%. For this, we multiplied the NR-PFBC samples by 10. Thus, the positive and negative predictive value (PPV and NPV, respectively) in the validation phase become 66% and 97%, respectively. If NMIBC patients with a negative classifier do not undergo cystoscopy, this means that ~17% of all cystoscopies can be prevented at the cost of 2% of recurrences remaining undiagnosed.

Performance comparison of 8-gene classifier and urine cytology

Overall cytology results were available for 198 patients in training and 209 in testing set. Performance of cytology in detecting BC is shown in Table 2. In both training and testing set, SN of the 8-gene classifier (80% and 96%, respectively) was higher than that of urine cytology (35% and 43%, respectively) in our cohort of samples. NPV is also higher in both training and testing sets for the 8-gene classifier than for urine cytology (Table 2). This means, in the case of the testing set, that 53% of the tumors (51 out of 96) that were missed by urine cytology were detected by the 8-gene classifier. Notably, the classifier only misses four tumors (all were non high-risk NMIBC) which also were not detected by cytology. On the contrary, PPV and SP are higher for urine cytology than for the 8-gene classifier (Table 2).

The combination of the 8-gene model and urinary cytology results does not significantly improve the diagnostic performance of the 8-gene classifier alone, neither in the training set (AUC 0.903) nor in the testing set (AUC 0.825) (Figure S1).

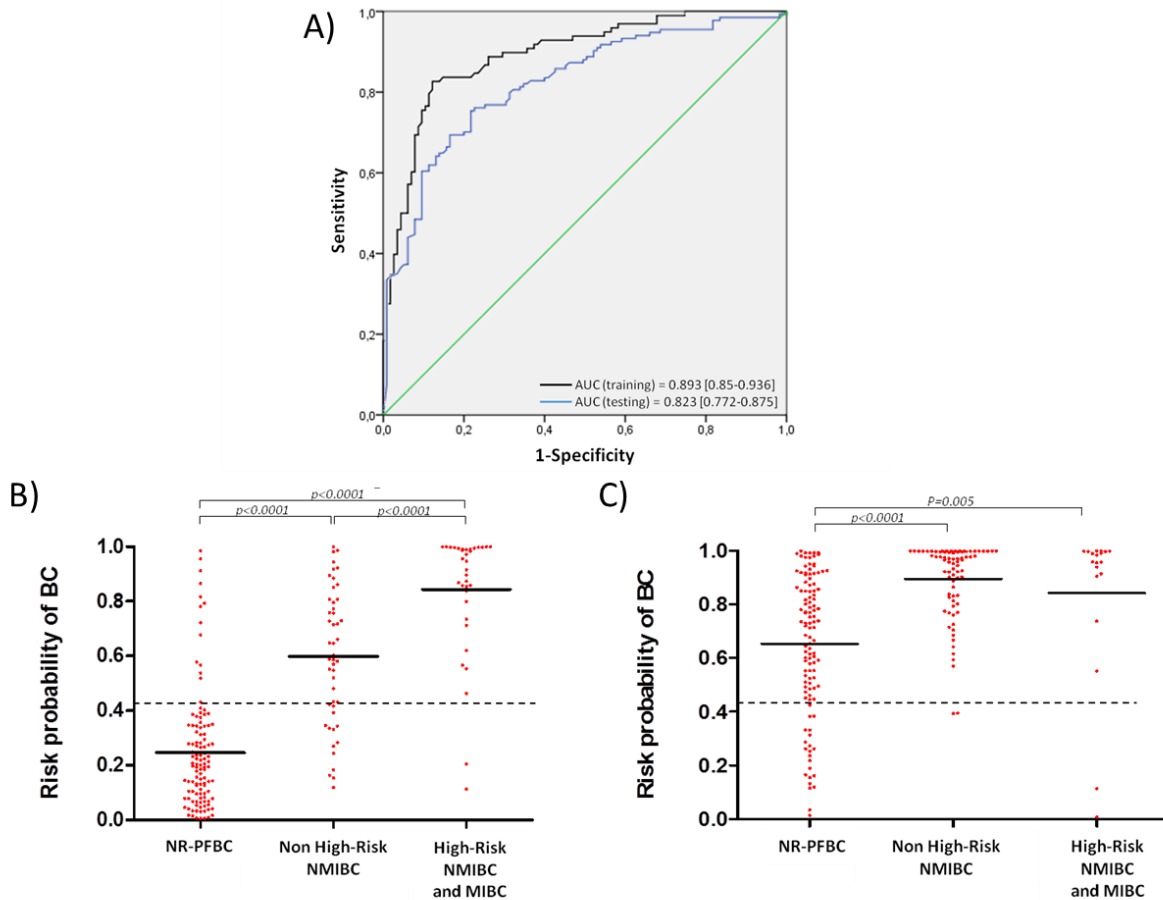
Table 2. Diagnostic performance of the 8-gene test, cytology and combination of both in testing set (at fixed sensitivity of 80% in the training set).

		TRAINING SET		TESTING SET		
		8-gene classifier	Cytology*	8-gene classifier	Cytology*	Combination
N samples		213	198	249	209	209
AUC		0.893	-	0.823	-	0.825
Sensitivity	Overall	80%	35%	96%	43%	96%
	Non High-risk NMIBC	86%	15%	94%	40%	97%
	High-risk NMIBC	96%	56%	97%	54%	85%
	MIBC	87%	75%	100%	60%	100%
	LG	87%	14%	96%	33%	95%
	HG	92%	68%	95%	51%	96%
NPV	Overall	85%	68%	97%	67%	98%
	Non High-risk NMIBC	92%	73%	98%	70%	99%
	High-risk NMIBC	99%	91%	99%	94%	99%
	MIBC	98%	97%	100%	98%	100%
	LG	91%	72%	99%	80%	99%
	HG	97%	91%	98%	80%	99%
Specificity	NR-PFBC	89%	92%	18%	96%	22%
	C	80%	100%	-	-	-

*Cytology was only available for a subset of samples

Abbreviations: NMIBC, Non-Muscle Invasive Bladder Cancer; MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer; LG, Low Grade; HG, High Grade; NR-PFBC, Non-recurrent Patients in Follow up for Bladder Cancer; C, Non-neoplastic Controls.

Figure 4. Performance of the 8-gene classifier. A) ROC curve of 8-gene model in both training (black line) and testing set (blue line). **B)** Risk of tumor probability representation according to the 8-gene expression classifier in training and **C)** testing sets (cut-off = 0.425).



Abbreviations: AUC, Area Under the Curve; BC, Bladder Cancer; NR-PFBC, non-recurrent control patients in follow up for BC; NMIBC, Non-Muscle Invasive Bladder Cancer; MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer.

Discussion

Patients with NMIBC are submitted to frequent invasive cystoscopies during their surveillance. Cytology is useful, particularly as adjunct to cystoscopy, if high-grade disease is present, but it presents low sensitivity in low-grade tumors. Thus, the identification of a reliable non-invasive tool for overall detection of BC would be of great usefulness in the clinical setting, especially for the non high-risk NMIBC group. Considering this lack of accurate tests for non high-risk NMIBC, in this study, we applied an RNA-seq methodology to identify non high-risk NMIBC specific urinary RNA biomarkers. Moreover, the combination of these new identified biomarkers with our previously described BC urine biomarkers has allowed us to develop and validate an improved 8-gene expression classifier useful for BC monitoring.

To the best of our knowledge, this is the first time that a list of genes differentially expressed specifically in non high-risk NMIBC tumors is reported. To identify these genes, 5 subgroups of urine samples were evaluated and only those genes differentially expressed specifically in the non high-risk NMIBC group of patients were selected for further analysis. As we aimed at developing a test for the global diagnosis of BC, the 16 genes reported in our previous classifiers with a high diagnostic performance in high-grade tumors [7-9] were also included in the subsequent analysis. After two validation rounds of all these selected key genes, we have been able to develop a global 8-gene expression

classifier that performs equally in all BC risk groups. Overall SN of the classifier is 96%, with no significant difference in low (96%) and high-grade (HG) (95%) tumors. Of note, the classifier was validated in an international and multicentric cohort of samples. Furthermore, with the aim of translating our classifier to routine clinical setting, we have developed the classifier using a non-observer dependent and non-labour-intensive methodology. The eight genes included in the classifier can be easily analysed in a multiplex format using the nCounter technology [18].

Recently, several urinary tests for BC follow up have been described. Sin et al [19] used RNA-seq to develop a three-biomarker test to predict BC with an overall SN of 83% and SP of 89%. However, they designed a case-control study and, although it has been tested in 6 PFBC, validation of the results in an independent cohort is necessary to determine the usefulness of the classifier in a real clinical scenario. On the other hand, there are currently two commercially available tests based on gene expression quantification by RT-qPCR of five markers in urine samples; Cxbladder (Pacific Diagnostics) achieved an AUC of 0.87 in a cohort of firstly diagnosed BC patients while AUC values drop to 0.66 in a surveillance cohort. This performance in surveillance was improved with the development of CxBladder Monitor test which presents an AUC value of 0.73 [20]. Xpert Bladder Cancer (Cepheid) achieves an AUC of 0.87 in a validation cohort of PFBC. Of note, SN in primary and recurrent tumors was

73% and 77%, respectively. However, SN drops to 65% in low-grade disease. Interestingly, two out of the five genes included in their final classifier were selected from our previously reported classifiers [7-9]. A test with high SN and NPV is crucial in the BC surveillance scenario to safely lower the number of follow up cystoscopies. Our 8-gene expression classifier outperforms the current gold standard and previously developed gene expression tests in terms of SN and NPV [7-9]. Using the test, ~17% of PFBC from our validation cohort could safely skip cystoscopy. The remaining PFBC should undergo cystoscopy. This is not a major problem, since in normal daily practice PFBC would have undergone a cystoscopy anyway. Using our 8-gene classifier, six recurrent PFBC were wrongly diagnosed as not having a recurrence; four of them had TaLG, one had a Tis and one had a T1HG tumor. Of note, cytology also missed these six tumors. Furthermore, it is known that cystoscopy, our gold standard, misses up to 15% of the papillary and up to 30% of the flat lesions [21].

It should be considered that a high proportion of patients who presented non high-risk tumors are being long term monitored. In our series, 60% of the BC samples analysed are non high-risk NMIBC and a SN of 94% and NPV of 98% was found in this subgroup of patients. This population may be hugely benefited from the avoidance of continuing surveillance procedures which are invasive. Of importance, the 8-gene classifier maintains a high SN and NPV in high-risk NMIBC

disease (97% and 99%, respectively) guarantying the detection of potential life-threatening tumors. Lastly, the accuracy of our 8-gene classifier was not affected by number of tumors neither did it correlate with tumor size, further supporting its usefulness in the follow up of BC patients.

We found that the 8 genes composing the classifier regulate the carcinogenesis process via different mechanisms. This is shown by the fact that the genes of the model have no direct interactions and derive from different pathways. This 8-gene classifier incorporates three genes not previously included in our reported classifiers: *LCN2*, *RPS21* and *KIFC3*. *LCN2* facilitates tumorigenesis by promoting survival, growth and metastasis [22] and it has been reported several cancers [23]. Preliminary evidence also suggests that *LCN2* may be used as a prognostic urinary biomarker of breast cancer [24]. According to our results, Arthurs *et al* [25] found that *RPS21* presented significantly raised levels of expression in malignant prostate cancer tissue. Finally, *KIFC3* plays a role in the formation, maintenance and remodeling of the bipolar mitotic spindle. It has been not related previously with carcinogenetic processes. Go analysis confirmed that the genes included in the classifier are highly related to bladder malignancies, corroborating the suitability of these genes to be useful for the detection of BC.

The strengths of this study lie in the fact that we have chosen a three-stage approach using PFBC, the patients in whom the test should

be applied. We have also used a blind approach to identify genes particularly related with non high-risk BC patients. Furthermore, the use of voided urine samples to analyze gene expression allows for the development of a non-invasive BC diagnostic tool with an easy translation into clinical practice. Lastly, the test is based on a multiplexing format directly quantifying by an hybridization gene expression. However, some limitations should be mentioned. To avoid inefficiency, patients with recurrence were oversampled by also recruiting patients who were scheduled for a bladder transurethral resection of a proven bladder tumor. Consequently, some of the patients had primary tumors. Moreover, the number of NR-PFBC was misrepresented in the validation series and we had to make an estimation to calculate the number of cystoscopies that could be skipped. Secondly, 8.5% of samples had to be excluded due to technical failures. Eventually, the low SP of the test should be improved to prevent unnecessary cystoscopies.

In conclusion, our 8-gene expression classifier has high SN and NPV in a real clinical scenario and this performance is maintained in non high risk NMIBC group. If only patients with a positive classifier result would be

cystoscoped, 17% of all cystoscopies can be prevented. For a definitive conclusion, these results must be validated through prospective large-scale randomized clinical trials for assessing its final place in clinical setting.

Acknowledgements

We thank all the patients who participated in this study and all the staff and nurses from the Urology Department of the Hospital Clínic for collaborating in collecting urine samples. We thank GenTracer for Ion AmpliSeq™ Transcriptome analysis and Patricia Galván and Débora Martínez for her technical help with the nCounter. We thank Helena Kruyer for the English correction of the manuscript. This work was sponsored by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de innovación 2013-2016, project reference number PI17/01343. This work was co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF). Funding from CERCA Programme/Generalitat de Catalunya is gratefully acknowledged. This work was developed at the building *Centre de Recerca Biomèdica Cellex*, Barcelona.

References

- [1] Babjuk M, Bohle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Comperat EM, Hernandez V, Kaasinen E, Palou J, Roupret M, van Rhijn BW, Shariat SF, Soukup V, Sylvester RJ, Zigeuner R. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol* 2017; 71: 447-461.
- [2] Goh AC, Lerner SP. Application of new technology in bladder cancer diagnosis and treatment. *World J Urol* 2009; 27: 301-307.
- [3] Smith ZL, Guzzo TJ. Urinary markers for bladder cancer. *F1000Prime Rep* 2013; 5: 21.
- [4] Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TR, N'Dow J, Nabi G, Cook J, Vale L. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess* 2010; 14: 1-iv.
- [5] Gakis G, Kruck S, Stenzl A. Can the burden of follow-up in low-grade noninvasive bladder cancer be reduced by photodynamic diagnosis, perioperative instillations, imaging, and urine markers? *Curr Opin Urol* 2010; 20: 388-392.
- [6] Soria F, Droller MJ, Lotan Y, Gontero P, D'Andrea D, Gust KM, Roupret M, Babjuk M, Palou J, Shariat SF. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol* 2018.
- [7] Mengual L, Burset M, Ribal MJ, Ars E, Marin-Aguilera M, Fernandez M, Ingelmo-Torres M, Villavicencio H, Alcaraz A. Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2624-2633.
- [8] Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Burset M, Fernandez PL, Alcaraz A. Validation Study of a Noninvasive Urine Test for Diagnosis and Prognosis Assessment of Bladder Cancer: Evidence for Improved Models. *J Urol* 2014; 191: 261-269.
- [9] Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Palou J, Rodriguez-Faba O, Witjes JA, Van der Heijden AG, Medina R, Conde JM, Marberger M, Schmidbauer J, Fernandez PL, Alcaraz A. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer* 2016; 54: 131-138.
- [10] Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Moher D, Rennie D, de Vet HC, Lijmer JG. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. The Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Group. *Croat Med J* 2003; 44: 639-650.
- [11] McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Eur J Cancer* 2005; 41: 1690-1696.
- [12] Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T et al. Tumours of the Urinary System. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (eds.), *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2004: 89-157.
- [13] Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind CH. *TNM Classification of Malignant Tumours*. UICC International Union Against

Cancer, 7 ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009: 243-248.

[14] Mengual L, Burset M, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, Alcaraz A. Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays. *BMC Res Notes* 2008; 1: 21.

[15] Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1546-1548.

[16] Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: W305-W311.

[17] Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Bader GD, Morris Q. GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. *F1000Res* 2014; 3: 153.

[18] Bonnetterre J, Prat A, Galvan P, Morel P, Giard S. Value of a gene signature assay in patients with early breast cancer and intermediate risk: a single institution retrospective study. *Curr Med Res Opin* 2016; 32: 835-839.

[19] Sin MLY, Mach KE, Sinha R, Wu F, Trivedi DR, Altobelli E, Jensen KC, Sahoo D, Lu Y, Liao JC. Deep Sequencing of Urinary RNAs for Bladder Cancer Molecular Diagnostics. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 3700-3710.

[20] Kavalieris L, O'Sullivan P, Frampton C, Guilford P, Darling D, Jacobson E, Suttie J, Raman JD, Shariat SF, Lotan Y. Performance Characteristics of a Multigene Urine Biomarker Test for Monitoring for Recurrent Urothelial Carcinoma in a

Multicenter Study. *J Urol* 2017; 197: 1419-1426.

[21] Grossman HB, Gomella L, Fradet Y, Morales A, Presti J, Ritenour C, Nseyo U, Droller MJ, PC 302/01 Study Group. A phase III, multicenter comparison of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy and white light cystoscopy for the detection of superficial papillary lesions in patients with bladder cancer. *J Urol* 2007; 178: 62-67.

[22] Rodvold JJ, Mahadevan NR, Zanetti M. Lipocalin 2 in cancer: when good immunity goes bad. *Cancer Lett* 2012; 316: 132-138.

[23] Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, Lavorgna A, Crescenzi E, Vascotto C, Tell G, Salzano AM, Scaloni A, Vuttariello E, Chiappetta G, Formisano S, Leonardi A. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14058-14063.

[24] Yang J, Moses MA. Lipocalin 2: a multifaceted modulator of human cancer. *Cell Cycle* 2009; 8: 2347-2352.

[25] Arthurs C, Murtaza BN, Thomson C, Dickens K, Henrique R, Patel HRH, Beltran M, Millar M, Thrasivoulou C, Ahmed A. Expression of ribosomal proteins in normal and cancerous human prostate tissue. *PLoS ONE* 2017; 12: e018

TREBALL 4

S'HAN DE REALITZAR ANÀLISIS ADDICIONALS ALS PACIENTS AMB CITOLOGIA URINÀRIA SOSPITOSA PER CARCINOMA UROTELIAL?

BJU Int. 2018

(Under review)

S'HAN DE REALITZAR ANÀLISIS ADDICIONALS ALS PACIENTS AMB CITOLOGIA URINÀRIA SOSPITOSA PER CARCINOMA UROTELIAL?

Objectiu: Esbrinar el significat clínic de la citologia urinària sospitosa per carcinoma urotelial (CU) en pacients amb cistoscòpia negativa.

Pacients i mètodes: Estudi prospectiu en què es van analitzar 83 mostres d'orina de pacients amb diagnòstic de citologia urinària sospitosa per CU i cistoscòpia negativa. Es va recitar als pacients en un termini mitjà de dos mesos després del diagnòstic de citologia urinària sospitosa per CU per repetir la cistoscòpia i recollir una mostra d'orina. Les orines es van analitzar mitjançant citologia, hibridació in situ fluorescent (assaig FISH, Urovysion®), mutacions de DNA en els gens *FGFR3* i *TERT* i el classificador d'expressió de 8 gens (GE). Tots els pacients van completar un mínim de 15 mesos de seguiment endoscòpic i clínic. Els resultats d'aquestes tècniques es van comparar amb l'evolució clínic de cada pacient.

Resultats: En aquesta cohort, es va detectar la presència de tumor en 29 (35%) pacients; 25 d'ells en el moment de la segona avaluació i quatre durant el seguiment. Globalment, 21 (84%) dels tumors identificats a la segona avaluació van ser d'alt risc, per contra, els quatre pacients als que se'ls va detectar el tumor durant el seguiment van presentar tumors TaLG. En 63 pacients, es van poder realitzar tres de les tècniques proposades: la citologia urinària, la FISH i el GE. Aquestes tècniques van detectar el 52%, el 100% i el 90% dels tumors al moment de la segona avaluació, respectivament. El 100%, el 83% i el 84% dels tumors detectats per la citologia, la FISH i el GE, eren d'alt risc, respectivament. Tant la FISH com el GE van predir la presència de tumor en el 100% dels casos durant el seguiment dels pacients, mentre que la citologia no en va predir cap. L'anàlisi per cistoscòpia i l'anàlisi de mutacions van identificar la presència de tumor només en el 14% dels casos.

Conclusió: A la nostra sèrie, el 35% dels pacients amb citologia sospitosa per CU i cistoscòpia negativa presenten CU. El 84% dels pacients que presenten CU van ser identificats a la segona avaluació. Sorprenentment, el 84% d'aquests tumors detectats a la segona avaluació eren d'alt risc. Aquestes dades suggereixen que la citologia urinària sospitosa per CU té un alt impacte clínic i que és recomanable utilitzar assaigs addicionals, com una segona citologia, l'anàlisi per FISH o el GE, per aclarir la seva importància.

IS A SECOND EVALUATION MANDATORY FOR UROTHELIAL CARCINOMA SUSPICIOUS URINE CYTOLOGY PATIENTS?

Ruth Montalbo^a, Mercedes Ingelmo-Torres^a, Laura Izquierdo^a, Pilar Galve^a, Manel Solé^b, Agustín Franco^a, Maria José Ribal^a, Antonio Alcaraz^a and Lourdes Mengual^a

^aDepartment and Laboratory of Urology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

^bDepartment of Pathology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

Objective

To elucidate the clinical significance for urothelial carcinoma (UC) suspicious urinary cytology in patients with negative cystoscopy.

Patients and methods

Prospective study in which 83 urine samples from patients with a diagnosis of UC suspicious urine cytology and negative cystoscopy were analyzed. Patients were reprogrammed within a mean of two months after the suspicious cytology diagnosis to perform a second cystoscopy and to collect a second urine sample. Urines were analyzed by cytology, fluorescent in situ hybridization (Urovysion® FISH assay), DNA mutations in FGFR3 and TERT genes and an 8-gene expression (GE) classifier. All patients completed at least 15 months of endoscopic and clinical follow up (FU). Results from these techniques were compared with the clinical outcome of each patient.

Results

In this cohort, tumour presence was found in 29 (35%) patients; 25 patients had tumour presence at second analysis and 4 patients showed tumour presence during the FU. Overall, 21 (84%) of the tumours detected at second analysis were high risk tumours and all four patients who had tumour

presence during the FU had a TaLG tumour. Results from urine cytology, FISH and GE were available for 63 patients. These techniques were able to diagnose 52%, 100% and 90% of tumours at second analysis, respectively. Notably, 100%, 83% and 84% of the tumours detected by cytology, FISH and GE, respectively, were high risk tumours. Both, FISH and GE were also able to predict 100% of the tumours during patients' FU, while cytology did not predict anyone. Both, cystoscopy and mutation analysis identified only 14% tumours.

Conclusion

Presence of tumour at second analysis was observed in 35% of patients with UC suspicious urine cytology and negative cystoscopy, and 84% of these patients showed tumour presence already at second analysis. Strikingly, 84% of tumours were of high risk of progression at second analysis. This data suggests that UC suspicious urine cytology has a strong clinical significance and additional assays, such as second cytology, FISH and/or GE analysis should be used to elucidate its significance.

Keywords

bladder cancer, FISH, surveillance, non-invasive biomarkers, gene expression, suspicious cytology

Introduction

At presentation, 75% of the urinary bladder cancers (BC) are non-muscle invasive bladder cancers (NMIBC), of which 20 to 80%, depending of the risk group, will have one or several recurrences and 15 to 25% of the high-risk NMIBC will progress to muscle invasive tumours. Consequently, NMIBC patients require frequent and long-term surveillance. The follow up (FU) schedule consists of cystoscopy and in case of high risk NMIBC, cystoscopy combined with urine cytology. Depending on the patient's risk profile the European Association of Urology guidelines recommend up to 15 cystoscopies during the first 5 years of FU [1].

Cystoscopy has a high sensitivity (SN) but is an invasive methodology, observer dependent, bothers some patients and misses up to 15% of the papillary and up to 30% of the flat recurrences [2,3]. Urine cytology, on the other hand, exhibits excellent specificity (SP) but presents low SN, especially in low-grade (LG) tumours, ranging between 4–31% [4,5]. Furthermore, cytology results are referred sometimes as suspicious, which are challenging because it raises the possibility of a tumour even with normal cystoscopy. In this scenario, there are no specific recommendations to guide clinicians when deciding whether to perform further analysis or alter surveillance. Consequently, a group of patients remains who are over investigated or, even worse, being diagnosed late. The development of a urinary tool to predict tumour presence in these patients would greatly improve

patient's management and probably lower the number of investigations performed.

Several urine biomarkers for the surveillance of BC patients have been proposed and some of them are even FDA-approved [6–8]. For instance, UroVysion FISH assay (Abbot Laboratories) has shown greater sensitivity than cytology to diagnose BC in urine cells [9] even though it does not achieve its specificity. On the other hand, mutations in the promoter region of the telomerase reverse transcriptase (TERT) and in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) genes have also been suggested as useful biomarkers of BC in urine cells. Mutations in the core promoter region of TERT gene emerged as the most frequent somatic genetic alterations found in both NMIBC and muscle invasive BC (MIBC) [10,11]. Furthermore, about 70% of LG NMIBC have a mutation in FGFR3 [12]. Alternatively, promising urine gene expression tests have also been developed for the non-invasive diagnosis of BC [13–15]. Specifically, we have developed and validated different urine gene expression classifiers [16–18]. More recently, we have demonstrated the utility of an 8-gene expression classifier to detect BC recurrences in patients in FU for BC [19].

Here, we aimed to determine how to deal with patients with urothelial carcinoma (UC) suspicious cytology and normal cystoscopy by repeating cytology, cystoscopy and testing different urine-based biomarkers. The final clinical goal is to avoid over examination and prevent delayed

diagnosis when tumour, or even progression, is present.

Patients and methods

Patients and samples

Prospective study including 95 patients with urine cytology suspicious for UC and negative cystoscopy enrolled between April 2014 and September 2016. After excluding those non-evaluable samples (insufficient number of urine cells), 83 samples were analyzed (Table 1).

Table 1. Histopathological characteristics of the study population.

Patients	N	%
Mean age (range), years	74 (54-92)	-
Sex		
Male	71	86
Female	12	14
Cohort features		
Patients with suspected BC	15	18
Patients in FU for BC	68	82
Before suspicious cytology in patients in FU for BC		
Pathological Stage		
pTa	39	58
pT1	18	26
pT2	3	4
pTis	8	12
Histological Grade		
Low grade	23	34
High grade	45	66
Prior recurrence		
Primary tumour	33	49
Recurrent tumour	35	51
Tumour Focality		
Multiple	46	68
Solitary	22	32
Tumour diameter		
<3cm	55	81
≥3cm	13	19
Subtotal	68	100
TOTAL	83	100

Abbreviations: BC, bladder cancer; FU, follow up

Hospital ethics committee approved the study and all patients provided their informed consent before being enrolled.

Suspicious cytology patients with negative cystoscopy were reprogrammed (mean time: 2 months; range: 0.5-5 months) to repeat cystoscopy and collect urine samples by barbotage. Urine samples were divided into four aliquots, each one for cytology, UroVysion FISH assay, FGFR3 and TERT mutations and 8-GE classifier. Samples were stored at 4°C until processing within the next 4 hours. The urine aliquot used for GE analysis was mixed with 1/25 volumes of 0.5 M EDTA pH 8.0 to prevent RNA degradation before being stored at 4°C.

Results from these techniques were compared with the clinical outcome of each patient. Tumour presence was defined as a histological proven tumour after bladder biopsies or trans-ureteral resection of the bladder (TURB). None of the patients presenting tumour had adjuvant treatments, including BCG, at least two years before sample collection.

Cytology analysis

Urine cytologies were performed according to Papanicolaou's staining and were evaluated by an uro-pathologist blinded to the patient's clinical history (MS). Cytologies were classified as positive, negative or suspicious. Suspicious cytology was defined as a sample containing cells with morphologies not clearly classifiable as tumour cells.

FISH test (UroVysion® Bladder Cancer Kit)

FISH analysis was performed following manufacturers' instructions. Briefly, urine samples were centrifuged at 1800 rpm for 10 min at room temperature. Subsequently, cell pellets were washed once with PBS 1X and then fixed with Carnoy's solution (3:1 methanol/glacial acetic acid). Then, cells were extended in methanol pre-treated slides and FISH was performed. The criteria for positivity of a single cell was the identification of morphologically abnormal nuclei showing either a gain of multiple chromosomes for more than 1 of the probes CEP 3 red, CEP 7 green, or CEP 17 aqua, or a homozygous loss of 9p21 (no signals for LSI 9p21 yellow). Analysis continues until either ≥ 4 cells with gains of multiple chromosomes or ≥ 12 cells with homozygous loss of 9p21 are detected, or until the entire sample is analyzed.

Mutation detection analysis

Urines were centrifuged at 2400rpm, 10', 4°C. DNA from cell pellets was isolated using the QIAmp DNA mini kit following manufacturer's instructions (QIAGEN). In some cases (n=36), the volume of urine samples collected was insufficient to perform all the analysis. In these cases, DNA was extracted from cells extended in the FISH slides once the FISH analysis was finalized. Briefly, cells were scraped off the glass slides in a laminar flow hood with a sterile scalper blade and the resulting powdered material was transferred to a 1.5mL Eppendorf tube containing 1mL of cell lysis buffer (0.01M Tris-HCl pH=7.5, 0.4M NaCl, 2mM

EDTA pH=8), 30uL of Proteinase K and 100uL of SDS 10%. Tubes were incubated at 55°C for at least 2 hours. Then, phenol-chloroform DNA isolation was performed.

Isolated DNA was quantified with a NanoDrop ND-1000 and PCR amplified using 20ng of the isolated material, 20pmols of the specific primers (Table S1A) and 10uL of KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems) in a total volume of 20uL following the same protocol as described in previous studies [10,20,21]. The PCR products were treated with EXO-SAP (Affimetrix-Applied Biosystems). This step was followed by a single-nucleotide probe extension assay using the SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems) in which probes were designed to anneal to either the forward or reverse strand adjacent to the mutation site under investigation. These probes were fitted with T-tails of different lengths at their 5' ends to allow separation of the extension product by size (Table S1B). After single-nucleotide primer extension, products were treated with one unit of SAP at 37°C for 60 minutes followed by 15 minutes at 75°C. Final products were run on an ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Results were analyzed by Peak Scanner 2 software (Applied Biosystems).

Gene expression analysis

The 8-gene expression classifier previously developed by our group was tested [19]. Urines were centrifuged at 2400rpm, 10', 4°C and RNA

from cell pellets was isolated using TRIZOL reagent following manufacturer's instructions. A total of 250ng of RNA were analyzed using nCounter Elements methodology. The mixture of RNA and the target probes (Table S2) hybridized for at least 16 hours at 67°C. After hybridization, washing and purification were carried out in the nCounter Prep Station and finally, digital counting was performed in the nCounter Digital Analyzer. Resulting counts were normalized using two housekeeping genes in the NanostringNorm R Package. Differential expression assessment was obtained using limma-voom pipeline.

Results

Characteristics of the series

In this cohort of patients with urine cytology suspicious for urothelial carcinoma (UC), tumour presence was observed in 29 (35%) patients (Table 2); 25 patients had tumour presence at second evaluation (mean time to second evaluation 2 months, range 1-4) and 4 patients showed tumour presence during later FU (mean time to tumour detection 7 months, range 3-8).

Overall, 84% of the tumours detected at patients' second evaluation (n=21) were high risk tumours. All four patients who had tumour presence during the FU had a TaLG tumour. The mean FU time (range) of the series was 28 (15-44) months.

Urine cytology

Second urine cytology was performed in the 83 patients with previous urothelial carcinoma (UC) suspicious cytology and negative cystoscopy.

Table 2. Histopathological characteristics of the tumours.

Patients	N	%
Mean age (range), years	76 (60-91)	-
Sex (males)	25	86
Pathological Stage		
pTa	8	28
pT1	5	17
pT1 + CIS	1	3
pTis	13	45
pTx	2	7
Histological Grade		
Low grade	9	31
High grade	20	69
Risk Group		
Low-risk	2	7
Intermediate-risk	6	21
High-risk	21	72
TOTAL	29	100

A total of 13 (15.6%) positive, 57 (68.8%) negative and 13 (15.6%) suspicious cytologies were found in this second cytology (Table 3). Eleven of the 13 (85%) patients with positive cytology had tumour presence, all of them at the time the of patients' second evaluation and all were high-risk tumours. Overall, eleven of the 57 (19%) patients with negative cytology had tumour presence; eight (73%) patients showed tumour presence at second evaluation (4 high and 4 low risk tumours) and 3 showed tumour presence during later FU; all TaLG tumours (mean time to tumour presence 6 months, range 3-8). Overall, 7 of the 13 (54%) patients who remained with suspicious cytology at second cytology had a tumour presence; 6 (86%) patients at second evaluation, all of them high-risk tumours, and one patient (TaLG) during later FU (time to tumour presence 8 months).

Cystoscopy

A second cystoscopy was performed in all patients, 4 (5%) had positive and 79 (95%) negative cystoscopy. Three of the four patients with positive cystoscopy had tumour presence, two of them at patients' second evaluation (all high-risk tumours). Twenty-six of the 79 patients (33%) with negative cystoscopy had tumour presence; 23 (88%) patients at second evaluation, 19 of these tumours (83%) being of high-risk. Three patients showed tumour (TaLG) during later FU (mean time to tumour progression 6 months, range 3-8).

FISH test (UroVysion)

From the 83 samples analyzed by UroVysion FISH assay, 35 (42%) had a positive FISH result. From this 35, presence of tumour was confirmed in 28 (80%) by TURB or biopsy; 24 (86%) patients had the tumour at second evaluation (20 of them were high risk tumours) and 4 (14%) during later

FU (all TaLG). All negative FISH samples, except one (pTis), did not showed tumour.

Mutation analysis

Mutation analysis was performed in 62 samples. Overall, mutation in FGFR3 and TERT were found in 6 patients. Mutations in FGFR3 gene were found in four patients (2x S249C, 3x Y375C and K652E/Q). Two additional patients had mutations in the promoter region of TERT gene [hTERT 1,295,228 C228T/A) and hTERT hTERT 1,295,242 C242A]. Three of the six patients showed tumour presence at second evaluation (2 of them were high risk tumours). Twenty-two of the 58 patients (38%) without mutation in these genes had tumour presence; 19 (86%) patients at second evaluation, 16 of these tumours (84%) being of high-risk. Three patients showed tumour presence (TaLG) during later FU (mean time to tumour presence 6 months, range 3-8).

Table 3. Results of the different methodological approaches

	CYTOLOGY	CYSTOSCOPY	FISH	MUTATION	GE
N Patients	83	83	83	62	63
POSITIVE	13	4	35	6	42
TRUE POSITIVE	11	3	28	3	23
POSITIVE AT SECOND EVALUATION	11	2	24	3	19
HIGH RISK TUMOUR	11	2	20	2	16
NEGATIVE	57	79	48	58	21
FALSE NEGATIVE	11	26	1	22	2
POSITIVE AT SECOND EVALUATION	8	23	1	19	2
HIGH RISK TUMOUR	4	19	1	16	2
SUSPICIOUS	13	-	-	-	-
TRUE POSITIVE	7	-	-	-	-
POSITIVE AT SECOND EVALUATION	6	-	-	-	-
HIGH RISK TUMOUR	6	-	-	-	-

Abbreviations: GE, gene expression

Gene expression analysis

RNA samples were available for 63 patients. The 8-gene expression classifier determined 42 samples to be positive, 23 (55%) of them were confirmed as positive by biopsy or TURB; 19 (83%) of them at patients' second evaluation (16 of them were high risk tumours) and 4 (17%) during later FU (all of them TaLG). On the other hand, from the 21 samples considered as negative for the classifier, 19 (90%) did not show tumour presence. The remaining two patients had a CIS at patients' second evaluation.

Performance comparison of the different methodological approaches

Patients' second cystoscopy and mutation analysis were excluded from further comparisons due to their limited diagnostic performance in this subgroup of patients (Table 3). Cytology, FISH and GE were analyzed in 63 patients. Of these 63 patients, 25 showed tumour presence; of which 21 were detected at patients' second evaluation. Cytology, FISH and GE were able to identify tumour presence in 11, 21 and 19, respectively. Furthermore, FISH and GE were also able to predict the four tumours at later FU while cytology failed in all cases.

Figure 1 shows the results of the FISH and GE in this cohort stratified according to cytology results. Eleven of the 12 positive cytologies confirmed by biopsy/TURB are high risk tumours. FISH was able to detect all the tumours and GE analysis missed one case of CIS. From the 40 negative cytologies, 8 showed tumour presence; 5 at patients' second

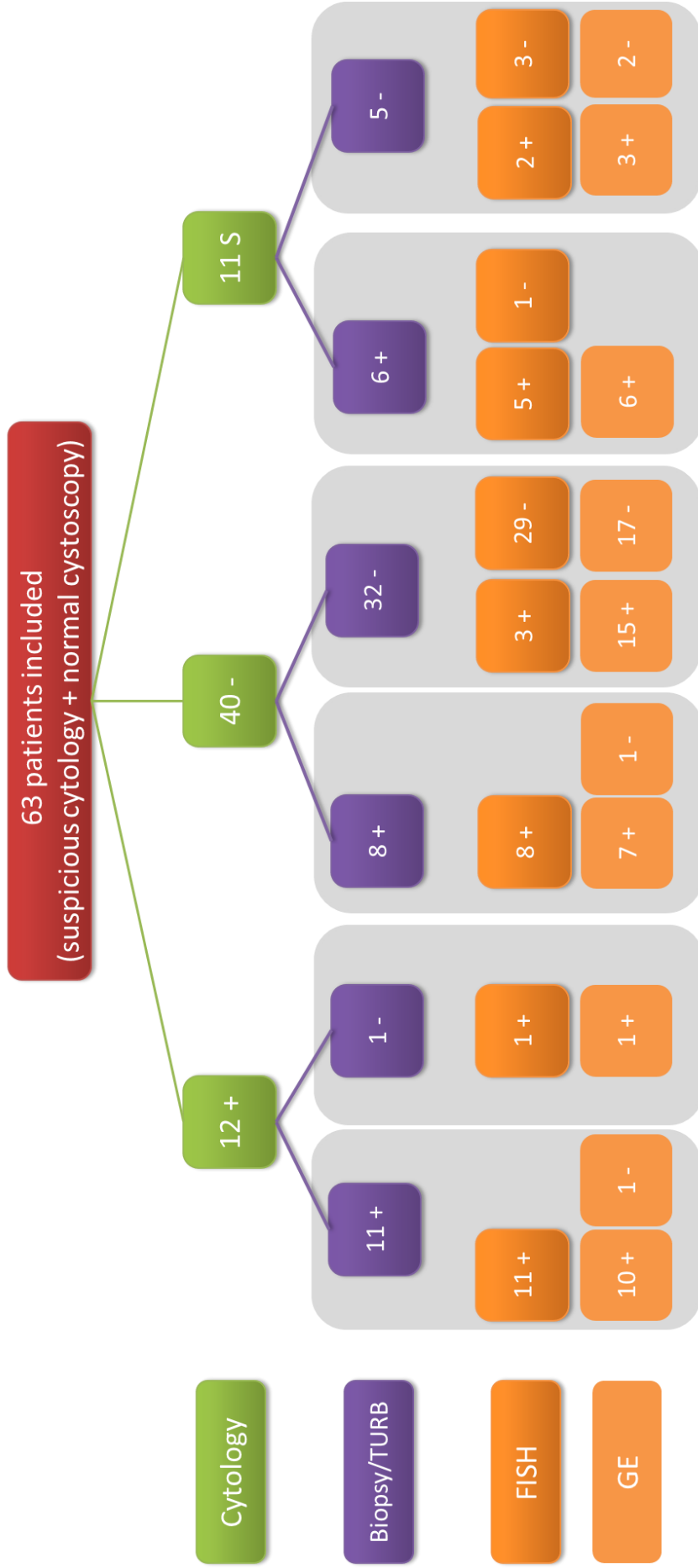
evaluation (2 high and 3 low risk tumours) and 3 during later FU (all TaLG). FISH was able to detect all the tumours and GE analysis missed one case of CIS. Finally, from the 11 UC suspicious cytologies, 6 patients showed tumour presence; 5 at patients' second evaluation (all high risk tumours) and 1 during later FU (TaLG). GE was able to detect all the tumours and FISH missed a case of CIS.

Discussion

Suspicious urine cytology represents a diagnostic and therapeutic challenge. In the case of a suspicious cytology and negative cystoscopy, if no additional testing is performed, there is risk of misdiagnosing UC. The use of an additional, non-invasive technique to detect or predict tumour presence would improve patient's disease management and outcome.

In the present study 35% (29 out of 83) of analyzed patients with suspicious cytology and negative cystoscopy showed tumour presence. Notably, 25 out of the 29 (86%) patients showed tumour at patients' second evaluation and 21 (84%) of them presented high risk tumours. These patients with putative life-threatening tumours would have not been re-evaluated until a minimum of 3-6 months later, depending of the patient's risk profile and FU schedule. However, a second urine cytology analysis in these patients within a mean of 2 months as of the suspicious diagnosis, identified 13 patients that changed the cytology results from suspicious to positive. Biopsy/TURB demonstrated that 11 of these 13 patients (85%) had high risk tumours.

Figure 1. Flow diagram showing results from cytology, FISH and GE analysis correlated with biopsy/TURB results.



Abbreviations: TURB, transurethral resection of the bladder; FISH, fluorescence in situ hybridization; GE, gene expression

Consequently, only one second urine cytology showed a direct benefit in these patients. This is in line with the EAU guidelines suggestion to repeat cytology analysis in case of a suspicious cytology finding [22].

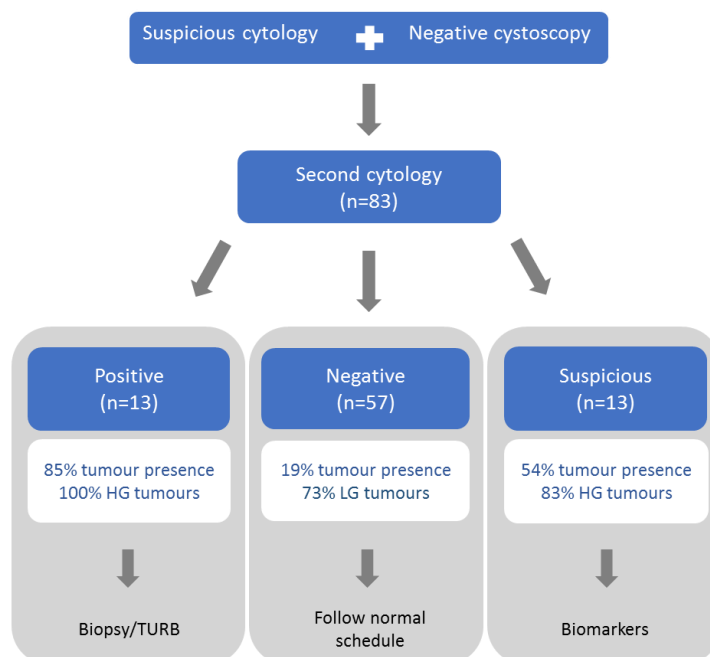
Of note, FISH also identified all 11 tumours while GE analysis missed one. Contrarily, 4 of the 29 patients had a tumour presence during their later FU, all of them presenting TaLG tumours. Cytology was unable to predict these 4 tumours while FISH and GE analysis predicted all.

On the other hand, 14% of patients with negative second cytology presented a tumour at patients' second evaluation and 5% had tumour presence during later FU. Overall, 73% of these tumours were low grade. FISH and GE achieved a sensitivity of 100% and 88%, respectively, detecting tumour presence in this subgroup of patients. Nevertheless, urine biomarkers improve the detection of tumour presence, it has been shown that a delay of 6 months in the diagnosis of a LG tumour does not adversely affect the patient's outcome [23]. Eventually, in our series, 16% of second cytologies remained with a suspicious result and 88% of the patients showed tumour presence at patients' second evaluation. Of note, all these tumours were of high risk. Sensitivity for FISH detecting these tumours was 83%, while the gene expression classifier achieved 100% sensitivity. In this ambiguous scenario of a second suspicious for UC cytology, the use of urine markers and biopsy, upper tract imaging or close cystoscopy evaluation after a positive FISH in these cases has to be considered [24,25]. Our

results highly support the use of complementary evaluation using urine biomarkers to elucidate this uncertain cytology diagnosis. In this sense, both FISH and GE classifier could be useful tools for implementing in the clinical setting (Figure 2).

FISH is very useful to predict tumour presence in the case of atypical cytology with negative cystoscopy. Kim et al., in a cohort of 243 patients with negative cystoscopy and suspicious cytology, found positive FISH in 41% patients, and 23% of them recurred [26]. These results are in accordance with those reported here where 42% patients with suspicious cytology had positive FISH and 35% of them had tumour presence. To the best of our knowledge, this is the first time a GE classifier and mutation analysis to predict tumour presence in patients with suspicious cytology is used. Even though in our cohort of

Figure 2. Patients' evaluation proposal for UC suspicious urine cytology.



Abbreviations: HG, high grade; TURB, transurethral resection of the bladder; FISH, fluorescence in situ hybridization

patients with suspicious cytology mutation analysis does not perform well, it has shown to be useful in other studies [10,12].

In contradiction, the GE classifier was able to predict tumour patients in patients with two consecutive suspicious cytologies (Sensitivity 100%). This assay is based on a direct quantification in urine samples of the expression of 8 genes in a multiplex format allowing its easy translation to clinical routine.

We acknowledge that this work has some limitations. The diagnosis of atypical or suspicious cytology can vary between institutions [27,28]. In November 2015 a consensus classification for reporting urine cytology (The Paris System for Reporting Urinary Cytology) was published [29]. Unfortunately, sample collection started before this date. Furthermore, the total number of patients analyzed is limited, but the number of cytologies reported as suspicious is relatively low, in our institution it represents $\approx 5\%$ of all cytologies, which makes it difficult to obtain a large prospective series. Moreover, we included only those cytologies suspicious for UC with negative cystoscopy. Finally, we needed a certain amount of urine cells to perform all four analyses. In some cases, this was not possible, and thus the whole comparison was only possible in a subset of the patients. Consequently, a multicenter validation study with a larger series of patients would be useful to corroborate these findings and to elucidate which of the methodological approaches proposed, FISH or GE, has better performance to predict tumour presence in the

subgroup of patients with two consecutive for UC suspicious cytologies.

Conclusion

In this study, tumour was present in 35% of patients with UC suspicious cytology and negative cystoscopy and 84% of them showed tumour presence already at patients' second evaluation. Strikingly, 84% of tumours detected at patients' second evaluation were of high risk. Consequently, urinary cytology suspicious for UC has a strong clinical significance. Our data supports the recommendation to perform at least a second cytology. FISH and GE analysis are useful to predict tumour presence in patients with a second suspicious cytology. In the case of negative cytology at patients' second evaluation, the maintenance of the standard FU schedule is suggested.

Acknowledgments

We thank all the patients who participated in this study and all the staff and nurses from the Urology Department of the Hospital Clinic for collaborating in collecting urine samples. Funding from CERCA Programme/Generalitat de Catalunya is gratefully acknowledged. This work was developed at the building Centre de Recerca Biomèdica Cellex, Barcelona. We thank AG Van der Heijden for the critical revision of the manuscript and Helena Kruyer for the English correction of the manuscript.

References

- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, Van Rhijn BWG, Comp erat E, Sylvester RJ, Kaasinen E, B hle A, Palou Redorta J, Rouprêt M. EAU guidelines on non-muscle-invasive Urothelial carcinoma of the bladder: Update 201. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, Van Rhijn BWG, Comp erat E, Sylvester RJ, Kaasinen E, B hle A, Palou Redorta J, Rouprêt M. EAU guidelines on non-muscle-invasive Urothelial carcinoma of the bladder: Update 2013. *Eur Urol.* 2013; 64: 639–53. doi: 10.1016/j.eururo.2013.06.003.
- Smith Z, Guzzo T. Urinary markers for bladder cancer. *F1000Prime Rep.* 2013; . doi: 10.12703/P5-21.
- Goh AC, Lerner SP. Application of new technology in bladder cancer diagnosis and treatment. *World J Urol.* 2009; . doi: 10.1007/s00345-009-0387-z.
- Lotan Y, Bensalah K, Ruddell T, Shariat SF, Sagalowsky AI, Ashfaq R. Prospective Evaluation of the Clinical Usefulness of Reflex Fluorescence In Situ Hybridization Assay in Patients With Atypical Cytology for the Detection of Urothelial Carcinoma of the Bladder. *J Urol [Internet].* 2008; 179: 2164–9. doi: 10.1016/j.juro.2008.01.105.
- Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: Meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2008; 26: 646–51. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.06.002.
- Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TRL, N'Dow J, Nabi G, Cook J, Vale L. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technology Assessment.* 2010. doi: 10.3310/hta14040.
- Bell MD, Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prognostic value of urinary cytology and other biomarkers for recurrence and progression in bladder cancer: a prospective study. *World J Urol.* 2016; . doi: 10.1007/s00345-016-1795-5.
- Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2015; 33: 66e25-66e31. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.06.008.
- Marin-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, Musquera M, Ars E, Villavicencio H, Algaba F, Alcaraz A. Utility of fluorescence in situ hybridization as a non-invasive technique in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Eur Urol.* 2007; 51: 409–15; discussion 415. doi: 10.1016/j.eururo.2006.08.045.
- Allory Y, Beukers W, Sagrera A, Fl andez M, Marques M, Marquez M, Van Der Keur KA, Dyrskjot L, Lurkin I, Vermeij M, Carrato A, Lloreta J, Lorente JA, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: High frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol.* 2014; 65: 360–6. doi: 10.1016/j.eururo.2013.08.052.
- Hurst CD, Platt FM, Knowles MA. Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine. *European Urology.* 2014. p. 367–9. doi: 10.1016/j.eururo.2013.08.057.

12. Zuiverloon TCM, Tjin SS, Busstra M, Bangma CH, Boevé ER, Zwarthoff EC. Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based FGFR3 mutation assay. *J Urol*. 2011; 186: 707–12. doi: 10.1016/j.juro.2011.03.141.
13. Kavalieris L, O’Sullivan P, Frampton C, Guilford P, Darling D, Jacobson E, Suttie J, Raman JD, Shariat SF, Lotan Y. Performance Characteristics of a Multigene Urine Biomarker Test for Monitoring for Recurrent Urothelial Carcinoma in a Multicenter Study. *J Urol*. 2017; . doi: 10.1016/j.juro.2016.12.010.
14. Lotan Y, O’Sullivan P, Raman JD, Shariat SF, Kavalieris L, Frampton C, Guilford P, Luxmanan C, Suttie J, Crist H, Scherr D, Asroff S, Goldfischer E, et al. Clinical comparison of noninvasive urine tests for ruling out recurrent urothelial carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2017; . doi: 10.1016/j.urolonc.2017.03.008.
15. Pichler R, Fritz J, Tulchiner G, Klinglmair G, Soleiman A, Horninger W, Klocker H, Heidegger I. Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int*. 2018; . doi: 10.1111/bju.14019.
16. Mengual L, Burset M, Ribal MJ, Ars E, Marín-Aguilera M, Fernández M, Ingelmo-Torres M, Villavicencio H, Alcaraz A. Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 2624–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3373.
17. Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Burset M, Fernández PL, Alcaraz A. Validation study of a noninvasive urine test for diagnosis and prognosis assessment of bladder cancer: Evidence for improved models. *J Urol*. 2014; 191: 261–9. doi: 10.1016/j.juro.2013.06.083.
18. Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Palou J, Rodríguez-Faba O, Witjes JA, Van Der Heijden AG, Medina R, Conde JM, Marberger M, Schmidbauer J, Fernández PL, et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer*. 2016; 54: 131–8. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.003.
19. Ruth Montalbo, Juan J. Lozano, Laura Izquierdo, Mercedes Ingelmo-Torres, Carmen Baños, Joan Palou, Antoine G. Van der Heijden, Rafael Medina, Joerg Schmidbauer, Aleix Prat, Maria J. Ribal AA and LM. Urine gene expression classifier for bladder cancer surveillance. *Under Rev*. 2019; .
20. Zuiverloon TCM, van der Aa MNM, van der Kwast TH, Steyerberg EW, Lingsma HF, Bangma CH, Zwarthoff EC. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-grade non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 3011–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3013.
21. Kandimalla R, Masius R, Beukers W, Bangma CH, Orntoft TF, Dyrskjot L, Van Leeuwen N, Lingsma H, Van Tilborg AAG, Zwarthoff EC. A 3-plex methylation assay combined with the FGFR3 mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine. *Clin Cancer Res*. 2013; 19: 4760–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3276.
22. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Hernández V, Kaasinen E, Palou J, Rouprêt M, van Rhijn BWG, Shariat SF, Soukup V, et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive

- Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 2017; 71: 447–61. doi: 10.1016/j.eururo.2016.05.041.
23. Soloway MS, Sofer M, Vaidya A. Contemporary Management Of Stage T1 Transitional Cell Carcinoma Of The Bladder. *J Urol.* 2002; . doi: 10.1016/S0022-5347(05)65157-9.
24. Chang SS, Boorjian SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, Pruthi R, Quale DZ, Ritch CR, Seigne JD, Skinner EC, Smith ND, McKiernan JM. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *J Urol.* 2016; . doi: 10.1016/j.juro.2016.06.049.
25. Schlomer BJ, Ho R, Sagalowsky A, Ashfaq R, Lotan Y. Prospective Validation of the Clinical Usefulness of Reflex Fluorescence In Situ Hybridization Assay in Patients With Atypical Cytology for the Detection of Urothelial Carcinoma of the Bladder. *J Urol* [Internet]. 2010; 183: 62–7. doi: 10.1016/j.juro.2009.08.157.
26. Kim PH, Sukhu R, Cordon BH, Sfakianos JP, Sjoberg DD, Hakimi AA, Dalbagni G, Lin O, Herr HW. Reflex fluorescence in situ hybridization assay for suspicious urinary cytology in patients with bladder cancer with negative surveillance cystoscopy. *BJU Int.* 2014; 114: 354–9. doi: 10.1111/bju.12516.
27. Raab SS, Grzybicki DM, Vrbin CM, Geisinger KR. Urine cytology discrepancies: Frequency, causes, and outcomes. *Am J Clin Pathol.* 2007; . doi: 10.1309/XUVXFXMFPL7TELCE.
28. Brimo F, Vollmer RT, Case B, Aprikian A, Kassouf W, Auger M. Accuracy of urine cytology and the significance of an atypical category. *Am J Clin Pathol.* 2009; . doi: 10.1309/AJCPPRZLG9KT9AXL.
29. Barkan GA, Wojcik EM, Nayar R, Savic-Prince S, Quek ML, Kurtycz DFI, Rosenthal DL. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Acta Cytologica.* 2016. doi: 10.1159/000446270.

ACGTA
GTACGT
GTACGTAC
GTACGTAC
GTACGTACG
GTACGTACG
CGTAC TACGT
CGTAC ACGTAC
CGTAC GTAC
CGTAC GTACG
CGTACGTACGTACGTACG
GTACGTACGTACGTACGT
TACGTACGTACGTACGTAC
GTACG
TACGT
ACGTAC

DISCUSSIÓ

El carcinoma urotelial (CU) és el quart tumor més freqüent en homes als països industrialitzats. La identificació de biomarcadors amb alta precisió pel diagnòstic no invasiu i per a la predicció de recidives i/o progressió tumoral és encara un dels reptes actuals de la urologia clínica. La utilització d'aquests biomarcadors a la pràctica clínica permetria un seguiment individualitzat de cada pacient, i per tant milloraria de manera significativa el seu tractament.

En aquesta tesi s'han utilitzat eines moleculars i citogenètiques per a la identificació d'aquests biomarcadors diagnòstics i pronòstics que poden suposar un gran avanç en el tractament d'aquesta malaltia.

4.1 Recerca de biomarcadors pronòstics al tumor de tracte urinari superior

El diagnòstic del TM-TUS es basa en la tomografia computaritzada, una tècnica no invasiva i una amb alta sensibilitat. Tot i disposar d'una tècnica diagnòstica amb alta precisió, el 60% dels tumors són invasius al moment del diagnòstic. Per tant, la identificació de factors pronòstics de la malaltia és de gran importància per tal de millorar el pronòstic i tractament dels pacients. El TM-TUS és un càncer poc freqüent, però un 30% dels tumors recidiven a la bufeta i un 6% a l'urèter contra-lateral. És una malaltia de mal pronòstic, amb una supervivència global als 5 anys inferior al 50% en pacients amb tumors pT2/pT3 i per sota del 10% pels que presenten pT4. Els principals factors pronòstics de progressió de la malaltia utilitzats fins al moment són l'estadi patològic i el grau histològic del tumor. A més d'aquests paràmetres, s'han valorat marcadors moleculars pronòstics d'adhesió cel·lular, de diferenciació, d'angiogènesi, de proliferació i de transició epiteli-mesènquima, entre altres [172,173], però malauradament, cap dels factors anteriors ha complert els criteris necessaris per ser aplicable a la pràctica clínica.

Els miRNAs han esdevingut un dels nous focus d'atenció en la biomedicina. Estan formats per uns 22 nucleòtids i tenen un paper molt important en processos cel·lulars com la proliferació, la diferenciació, la migració o el metabolisme. A més a més, es troben desregulats en moltes neoplàsies humanes [174,175]. En estudis previs, el nostre grup ha caracteritzat l'expressió gènica del TM-TUS [141] i ha estudiat l'expressió de diferents miRNAs relacionats amb el pronòstic de la malaltia [142].

4.1.1 Biomarcadors pronòstics en teixit pel tumor de tracte urinari superior

Amb l'objectiu de validar els miRNAs amb valor pronòstic de progressió del TM-TUS prèviament descrits pel nostre grup (miR-31-5p i miR-149-5p), es van estudiar aquests microRNAs en un sèrie independent, multicèntrica i internacional de mostres de teixit de pacients amb aquesta malaltia.

Actualment a la literatura hi ha diferents treballs que descriuen microRNAs pel diagnòstic del TM-TUS, però pel que coneixem, el nostre grup ha estat el primer en explorar el potencial pronòstic de l'expressió de microRNAs a pacients amb TM-TUS [141]. En aquesta tesi (treball 1), hem pogut validar que l'expressió de miR-31-5p prediu la progressió tumoral a pacients amb TM-TUS. L'expressió d'aquest microRNA podria ser utilitzada per identificar aquells pacients amb un pitjor pronòstic i així personalitzar el seu tractament basant-nos en aquesta informació.

La sobre-expressió de miR-31-5p ha estat prèviament descrita a diferents càncers com són el de colon, el de pulmó o el de cèrvix [176–178]. D'altra banda, també s'ha descrit la seva infra-expressió al CU de bufeta, al càncer de pròstata, al gàstric i al de mama [179,180]. Aquests resultats suggereixen que la seva expressió difereix depenent del tipus de càncer i podria actuar com a oncogen o gen supressor de tumors depenent del tipus tumoral. En concordança amb els nostres resultats previs [142], es manté la infra-expressió de miR-31-5p a pacients amb TM-TUS que progressen. Això lliga amb el fet de que el gen que codifica per miR-31-5p, està localitzat al 9p21, una regió cromosòmica amb pèrdues freqüents en CU [181,182].

Un dels punts forts d'aquest treball recau en el fet de que s'han utilitzat mostres procedents de teixit parafinat per obtenir els patrons d'expressió dels miRNAs. Aquest detall metodològic permet una fàcil translació del procediment utilitzat a la rutina assistencial. Aquest estudi a més a més, representa una validació internacional i multicèntrica de les dades, fet que atorga als resultats obtinguts el caràcter de generalitzables. Tot i així, som conscients de que el nombre final de pacients inclosos a l'estudi pot ser considerat baix. S'ha de tenir en compte que es tracta d'una malaltia poc freqüent i que a més a més es va ser molt restrictiu en la inclusió de les mostres, fet que assegura la robustesa dels resultats i la qualitat del material analitzat.

Tot i tenir en compte les limitacions descrites, podem afirmar que els resultats d'aquest estudi validen en un sèrie independent de pacients els resultats prèviament obtinguts, confirmant que miR-31-5p discrimina entre dos grups de pacients amb TM-TUS amb diferent probabilitat

de progressió tumoral. La quantificació de l'expressió d'aquest miRNA (i altres possibles miRNAs que resten per identificar) en les mateixes mostres de teixit que s'utilitzen pel diagnòstic anatomopatològic permetria l'aplicació d'una medicina personalitzada per a cada pacient i ajudaria en la millora de les estratègies clíniques i terapèutiques.

4.1.2 Biomarcadors pronòstics en sèrum al tumor de tracte urinari superior

Un pas més enllà en la identificació de biomarcadors pel pronòstic del TM-TUS ens porta a la recerca de biomarcadors mínimament invasius. Cada cop més, la denominada biòpsia líquida com a metodologia mínimament invasiva pel diagnòstic, pronòstic o seguiment dels pacients està adquirint un paper rellevant en el camí cap a la medicina personalitzada. L'estudi de biomarcadors en biòpsia líquida podria estimar el risc de progressió i en conseqüència ajudar en la presa de decisions sobre quina és la teràpia més adient per a cada pacient, depenent del seu pronòstic, amb el menor impacte possible en la qualitat de vida del pacient.

S'ha descrit que els miRNAs lliures circulants a la sang poden servir com a biomarcadors i que a més a més presenten diferents avantatges respecte als mRNAs. Per una banda, és més fàcil obtenir miRNAs que no pas mRNA, ja que els miRNAs són molècules curtes i més estables a la degradació per part de les nucleases. D'altra banda, el nombre de còpies de miRNAs per cèl·lula s'estima en ~500, per tant superior al nombre de còpies de mRNA [183], pel que menys RNA és necessari per un estudi amb miRNAs que amb mRNA. Finalment, aquestes molècules lliures en circulació tenen un paper en la comunicació entre cèl·lules modificant el comportament d'aquestes cèl·lules i per tant influint en processos com la progressió o la resistència a teràpies [184].

En el CU trobem treballs en els que estudien miRNAs lliures circulants com a eina diagnòstica [185,186], però pel que fa concretament al TM-TUS hi ha pocs estudis avaluant els miRNAs circulants, i dels que es troben descrits a la literatura, l'avaluació dels miRNAs està enfocada com a biomarcador diagnòstic i no pronòstic [187].

L'objectiu principal del present estudi (treball 2) ha estat l'anàlisi de l'expressió dels miRNAs en sèrum de pacients amb TM-TUS com a biomarcadors pronòstics de la progressió de la malaltia. Per dur a terme la quantificació de l'expressió dels miRNAs hem utilitzat la metodologia del nCounter. Aquesta metodologia està basada en la hibridació directa d'unes sondes dissenyades amb complementarietat amb la seva molècula diana, permetent la quantificació digital directa de l'expressió del miRNA en format multiplex i sense necessitat

d'amplificar prèviament els àcids nucleics. Per tant, es tracta d'un mètode molt sensible, especialment important en mostres que presenten molta degradació o molt poc RNA [188,189]. És interessant comentar que aquest sistema, a més, s'està utilitzant actualment a la pràctica clínica per la classificació molecular en altres patologies [190,191].

El present estudi demostra que hi ha un patró diferencial d'expressió de miRNAs lliures circulants en el sèrum dels pacients amb TM-TUS que progressen en comparació amb els que no progressen. Concretament, hem identificat 38 miRNAs presents a la circulació i amb una expressió significativament diferent en aquests dos grups de pacients. Al validar aquests 38 miRNAs en una cohort independent de pacients amb TM-TUS, 18 d'ells mantenen l'expressió diferencial entre els dos grups de pacients. L'anàlisi multivariant d'aquests 18 miRNAs identifica el miR-151b com a factor pronòstic de progressió tumoral i supervivència càncer específica pel TM-TUS.

La infra-expressió de miR-151b ha estat descrita prèviament a la literatura a mostres de pacients amb limfoma [192]. A més a més, l'anàlisi *in silico* de les possibles dianes de miR-151b, va identificar el gen *CCNE1* com a diana d'aquest miRNA. La recerca bibliogràfica de la funció de *CCNE1* ens porta a que l'expressió d'aquest gen ha estat descrita com a biomarcador pronòstic en TM-TUS. En concret, la sobre-expressió de *CCNE1* s'ha relacionat amb una disminució de la supervivència a pacients amb TM-TUS [193], el que es correlaciona amb els nostres resultats on miR-151b es troba infra-expressat a pacients que progressen amb TM-TUS.

Tot i que el miR-151b sembla un biomarcador pronòstic prometedori, som conscients de que la validació dels resultats obtinguts en aquest treball en un estudi més ampli i multicèntric és necessària per confirmar el valor pronòstic de progressió tumoral d'aquest microRNA en pacients amb TM-TUS. Com hem comentat, el TM-TUS és una malaltia poc freqüent, el que fa que l'obtenció de les mostres sigui complicada. A més a més, en el nostre cas, hem exclòs aquelles mostres provinents de pacients que presentessin altres neoplàsies actives, reduint el nombre de pacients a incloure a l'estudi. Finalment, comentar que l'obtenció del RNA del sèrum és costosa ja que un nombre baix d'aquestes molècules està present a la circulació. No obstant, els miRNAs descrits en aquest estudi ajuden a incrementar el coneixement sobre la malaltia del TM-TUS, on encara resta molt per investigar. Són imprescindibles estudis que confirmin aquests resultats o que evidencin altres eines pronòstiques d'utilitat a la pràctica clínica per aquests pacients.

4.2 Diagnòstic no invasiu del carcinoma urotelial de bufeta

En el moment del diagnòstic aproximadament un 75% dels CU de bufeta són tumors no múscul invasius (NMIBC; estadis Ta o T1), el 20% es presenta envaint les capes musculars (MIBC; estadis T2-T4) i un 5% ja presenten malaltia disseminada. Dels casos no múscul invasius, al voltant d'un 20% es curen mitjançant una única intervenció quirúrgica, la resecció transureteral (RTU), mentre que entre un 50 i un 70% recorren després de la RTU. Això fa que els pacients amb NMIBC requereixin un seguiment llarg i continuat.

Actualment, els sistemes de diagnòstic i seguiment del CU es basen en la cistoscòpia, combinada en alguns casos amb la citologia urinària. La cistoscòpia, la principal tècnica diagnòstica i de seguiment d'aquests tumors, es realitza via transureteral i per tant, es considera una tècnica invasiva pels pacients. La citologia urinària, en canvi, és una tècnica diagnòstica no invasiva i amb una alta sensibilitat i especificitat pels tumors d'alt grau. Però, la sensibilitat de la citologia disminueix en els tumors de baix grau i la interpretació de la mateixa és observador-depenent amb el que poden existir diferències inter-observador. En combinació, la cistoscòpia i la citologia, presenten una sensibilitat i una especificitat aproximades del 80% i el 90% pel diagnòstic del CU, respectivament. A dia d'avui, la recerca de biomarcadors en la majoria de neoplàsies així com en el CU, s'ha centrat en l'estudi del teixit tumoral. Això requereix de la realització de processos invasius per a l'obtenció de biòpsies. En el cas del CU, les mostres d'orina o de barbotatge han estat testades com a alternativa per detectar marcadors tumorals, ja que són fluids que estan en contacte amb l'epiteli de la bufeta, i per tant, amb la massa tumoral. Hi ha diversos estudis centrats en la recerca de marcadors per la detecció del càncer de bufeta a la orina i de fet, alguns dels biomarcadors descrits han estat aprovats per la FDA i fins i tot comercialitzats (NMP22, UroVysion, ImmunoCyt, BTA stat i BTA TRAK) (Veure secció 1.2.8.6 d'aquesta tesi). Tot i que la majoria d'aquests marcadors tenen major sensibilitat que la citologia urinària, aquesta segueix sent la més específica, fet que a portat a que cap d'ells hagi estat incorporat a la pràctica clínica.

4.2.1 Biomarcadors diagnòstics basats en expressió gènica en orina pel seguiment del carcinoma urotelial de bufeta

Diferents grups han desenvolupat firmes d'expressió gènica en orina amb una alta precisió diagnòstica. Malgrat això, en tots aquests estudis els tumors de baix grau generalment estan poc representats, les firmes no han estat validades o no han arribat a la precisió esperada a la validació, o no s'han testat en pacients en seguiment [194–196]. El nostre grup

ha treballat durant anys en el desenvolupament d'una firma d'expressió gènica amb alta precisió pel diagnòstic no invasiu del càncer de bufeta. En primer lloc, es va demostrar la idoneïtat de les mostres d'orina com representatives del perfil genètic del càncer de bufeta [197]. A continuació, es van identificar els gens diferencialment expressats al càncer de bufeta en mostres de teixit [198] i finalment, es van validar els gens seleccionats utilitzant mostres d'orina. Com a resultat, es van desenvolupar 4 firmes d'expressió gènica pel diagnòstic no invasiu del CU de bufeta (Patents Europees P200700727, nº 13382030.8-1403) [199] amb alta sensibilitat i especificitat, que han estat validades en un estudi multicèntric internacional [200]. A més a més, el test ha estat validat en població xinesa, demostrant la seva aplicabilitat a aquesta població i suggerint que presenta caràcter generalitzable [201]. No obstant, l'anàlisi específic del rendiment del test pels diferents grups de risc del CU ha evidenciat que fonamentalment, totes les signatures desenvolupades, fallen en el diagnòstic del NMIBC de risc baix/intermedi, el que fa disminuir la SN global del test. L'augment de la sensibilitat diagnòstica en aquest grup de pacients ha estat un dels objectius principals d'aquesta tesi. Com hem descrit al treball 3, hem aplicat una metodologia basada en la seqüenciació del RNA per identificar marcadors d'expressió gènica específics de càncer de bufeta de risc baix/intermedi. A continuació, hem combinat aquests marcadors amb els marcadors descrits prèviament pel grup com a biomarcadors diagnòstics de CU de bufeta, el que ens ha permès desenvolupar i validar un test basat en l'expressió de 8 gens que és d'utilitat en el seguiment d'aquest pacients. Aquest test presenta una precisió diagnòstica equivalent en tots els grups de risc del CU de bufeta. La SN global del test és del 96%, mantenint-se tant al baix (96%) com a l'alt (95%) grau. A més, s'ha validat el classificador en una cohort independent, multicèntrica i internacional donant robustesa als resultats obtinguts. Un altre punt fort a destacar és que amb l'objectiu de que aquest test sigui d'utilitat a la pràctica clínica, s'ha desenvolupat utilitzant una metodologia ràpida, senzilla i objectiva que permet que els 8 gens inclosos al test es puguin analitzar alhora (en format múltiple).

Com hem comentat anteriorment, trobem descrits a la literatura diversos tests amb el mateix objectiu. En la línia del nostre estudi, Sin i col·laboradors han desenvolupat un test pel diagnòstic del CU de bufeta mitjançant seqüenciació del RNA amb una SN i una SP globals del 83 i el 89% [202]. Aquest estudi compara mostres procedents de pacients amb CU de bufeta i mostres de controls sans i, tot i que han estudiat mostres d'orina de sis pacients en seguiment per CB, la validació dels resultats en una cohort ampla de pacients en seguiment per CB és necessària per valorar la utilitat final d'aquest test en un escenari clínic real. D'altra banda, trobem dos tests comercialitzats, en aquest cas basats en RT-qPCR, que analitzen l'expressió

de 5 marcadors en mostres d'orina: el primer test, anomenat CxBladder, presenta una AUC de 0.87 quan s'analitzen pacients amb un CU de bufeta primari. Aquesta precisió diagnòstica disminueix al 0.66 quan l'anàlisi és en pacients en seguiment per CU de bufeta. Aquest test ha estat millorat amb l'actualment anomenat CxBladder Monitor que presenta una AUC de 0.73. D'altra banda, el segon test comercialitzat i basat en expressió gènica en orina és Xpert Bladder Cancer. Aquest test presenta una AUC de 0.87 en un estudi de validació amb pacients en seguiment per CU de bufeta. Al discriminar entre els diferents grups de risc trobem que la SN al grup de pacients amb tumors de baix grau és del 65%. Cal remarcar que dos dels cinc gens inclosos en aquest test han estat seleccionats dels nostres tests previs.

Un test que tingui com a objectiu disminuir el nombre de cistoscòpies durant el seguiment dels pacients amb CU de bufeta, ha de presentar una alta SN i un elevat VPN. Aquesta combinació permet per una banda la detecció d'una proporció elevada dels tumors recorrents i per l'altra, confirma amb força seguretat l'absència de tumor en cas d'un resultat negatiu. El test desenvolupat en aquest treball supera en termes de SN i VPN al *gold standard* actual i als tests desenvolupats en treballs previs del nostre i altres grups. Un 60% dels pacients inclosos a la cohort d'estudi del present treball presenten un CU de bufeta de risc baix o intermedi. Aquest subgrup de pacients se'ls ha de seguir durant un període llarg de temps mitjançant una tècnica invasiva. Amb l'ús d'aquest test, un 17% de pacients en seguiment per CU de bufeta evitarien la cistoscòpia de manera segura, és a dir, amb un 98% de probabilitat de no presentar un CU. És important destacar que la SN i el VPN als tumors NMIBC d'alt risc són del 97 i el 99%, respectivament, garantint alhora el diagnòstic dels tumors que potencialment comprometen la vida dels pacients. A l'anàlisi multivariant hem comprovat que ni el número ni la grandària dels tumors correlaciona amb la precisió diagnòstica del test, reiterant la seva idoneïtat per a ser utilitzat a la pràctica clínica en el seguiment dels pacients amb CU de bufeta.

L'estudi de la biologia dels 8 gens que inclou el classificador ens confirma que tots 8 estan implicats en diferents processos relacionats amb la carcinogènesi per diferents mecanismes. Mitjançant anàlisis *in silico* amb els softwares del Cytoscape o l'IPA no hem identificat interaccions directes entre els gens del classificador i a més a més, aquests deriven a diferents vies de senyalització. Addicionalment, l'anàlisi GO confirma la relació entre aquests 8 gens i les malalties de la bufeta. En concret, *IGF2* i *MAGEA3* estan fortament associats al diagnòstic del CU [199]. *IGF2* està relacionat amb la proliferació i la supervivència cel·lular i participa a l'activació de la via de senyalització de *KRAS* [203], gen que està anormalment expressat al

NMIBC [204]. Per contra, una alta expressió de *MAGEA3*, un gen associat amb la via de *TP53* [205], està altament relacionada amb els tumors de bufeta d'alt grau i els estadis avançats d'aquests tumors [206]. L'expressió d'*ANXA10* està relacionada amb el creixement cel·lular i la senyalització i amplament descrita a diferents firmes d'expressió gènica pel diagnòstic i també el pronòstic del CU [160,200,207,208]. L'expressió de *KRT20* s'associa a la detecció de micrometàstasis en pacients amb CU de bufeta [209,210] i també es descriu alterada al TM-TUS [141]. *LCN2* facilita la carcinogènesi promovent la supervivència, el creixement i la disseminació de les cèl·lules del tumor i ha estat descrit en diferents càncers. En concret, *LCN2* s'ha hipotetitzat com un potencial biomarcador pronòstic en càncer de mama [211,212]. En concordança amb els nostres resultats, s'han trobat alts nivells de *RPS21* en teixit de pacients amb càncer de pròstata [213]. Finalment, *KIF3* juga un paper important a la formació, el manteniment i la remodelació de l'espina mitòtica [214,215].

Un dels punts rellevants d'aquest estudi recau en el fet d'utilitzar mostres de pacients en seguiment amb CU de bufeta com a mostres referència per discriminar pacients amb malaltia. Aquests pacients representen la diana diagnòstica on s'ha de discriminar una recidiva tumoral d'un pacient lliure de malaltia. Som conscients de la baixa SP del test. Tot i això, s'ha de tenir en compte que els falsos positius del test que serien sotmesos a cistoscòpia, ho haurien estat igualment sense la utilització d'aquest. Tot i tenir en compte que al seguiment dels pacients amb CU de bufeta prioritzem una elevada SN i un alt VPN, la SP del test ha de millorar-se per a la seva aplicació definitiva a la pràctica clínica. Aquests resultats haurien de ser validats en un estudi prospectiu a gran escala i aleatoritzat per valorar la seva utilitat final dins del seguiment dels pacients amb CU de bufeta i la seva aplicabilitat definitiva a la pràctica urològica.

4.2.2 Significat clínic de la citologia urinària sospitosa

Els resultats sospitosos de la citologia urinària, ja sigui en el diagnòstic inicial o en el seguiment dels pacients amb CU, representen un repte per la medicina clínica actual. Aquests diagnòstics sospitosos generen incertesa al clínic, ja que no hi ha evidència de malignitat i les guies clíniques no indiquen si modificar el seguiment habitual del pacient [26]. Per tant, estudis addicionals en aquests pacients podrien permetre aclarir si el pacient presenta o no un tumor. Actualment, disposem de diferents biomarcadors que podrien ser d'utilitat per a aquest propòsit. Dels biomarcadors aprovats per la FDA, el test UroVysion (FISH), creat per a la detecció no invasiva del CU en mostres d'orina, ha demostrat ser una eina diagnòstica amb alta sensibilitat i alt valor diagnòstic predictiu positiu [216–218]. D'altra banda, s'han descrit 10 mutacions diferents del gen *FGFR3* en càncer de bufeta i 4 d'elles representen el 95% de les

mutacions a *FGFR3* (S249C, Y375C, G372C i R248C). Concretament, un 70% de NMIBC de baix grau presenta aquestes mutacions recurrents al gen *FGFR3*. Diferents estudis han avaluat la sensibilitat i l'especificitat de l'anàlisi en orina d'aquestes mutacions com a eina diagnòstica i fins i tot pronòstica tant en el diagnòstic inicial com en el seguiment del CU de bufeta [219,220]. Les mutacions a la regió promotora del gen TERT són també característiques del CU, concretament dels tumors múscul-invasius [221]. Finalment, el nostre grup ha desenvolupat un test d'expressió gènica (GE) amb alta precisió diagnòstica en el seguiment dels pacients amb CU (descriu al treball 3 d'aquesta tesi). L'ús d'aquests biomarcadors en pacients amb una cistoscòpia negativa i una citologia sospitosa podria millorar enormement el seu diagnòstic i futur tractament.

En el treball 4 presentat a aquesta tesi, orines procedents d'un total de 83 pacients amb cistoscòpia negativa i citologia sospitosa per CU es van analitzar mitjançant diferents metodologies per tal d'esbrinar el significat clínic d'aquests diagnòstics. Es va poder detectar presència de tumor en un 35% dels pacients analitzats. En un 86% dels casos, la identificació del tumor va ser durant aquesta segona avaluació del pacient. A més a més, un 84% dels tumors identificats van ser d'alt risc de progressió. Aquests pacients amb tumors d'alt risc no haguessin estat avaluats fins de 3 a 6 mesos més tard, depenent del moment del seguiment en el que es trobin i del tipus de tumor que presentaven anteriorment. A la nostra sèrie, la sola repetició de la citologia urinària en un període de temps mitjà de 2 mesos des del diagnòstic de citologia sospitosa, va identificar 13 pacients que canviaven el diagnòstic de citologia sospitosa per citologia positiva. D'aquests, la biòpsia o la RTU van confirmar la presència de tumor en un 85% d'ells i tots van ser classificats com a tumors d'alt risc. Per tant, el sol fet de repetir la citologia urinària, en el cas de tenir un diagnòstic de citologia urinària sospitosa previ, té un benefici per aquests pacients. A més a més, la tècnica de la FISH va ser positiva en totes les mostres on s'ha determinat la presència de tumor i el test d'expressió gènica també va detectar tots els tumors excepte un. Al avaluar els 4 pacients en que es va identificar la presència de tumor durant el seu seguiment, trobem que tots els tumors eren Ta de baix grau i que la citologia urinària no en prediu cap, però tant el FISH com el GE són capaços de predir-los tots.

D'altra banda, dels pacients amb una segona citologia negativa, un 14% van presentar tumors al moment de la segona avaluació i un 5% al seguiment posterior. Aquests tumors han estat classificats majoritàriament (73%) com a tumors de baix grau. El FISH i el GE presenten una SN del 100% i del 88%, respectivament, per aquest subgrup de pacients. Encara que aquests tests

milloren el diagnòstic en aquest grup de pacients, s'ha de ser conscient de que una demora de 6 mesos en el diagnòstic d'un tumor de baix grau no afecta adversament la vida dels pacients [222].

Finalment, un 16% dels pacients romanen amb un resultat de citologia sospitosa després de la segona avaluació. Sorprenentment, un 88% d'aquests pacients presenten tumors al moment de la segona avaluació, sent el 100% d'aquests tumors d'alt risc. La SN del FISH en aquest subgrup de pacients és del 83% mentre que el test d'expressió gènica assoleix un 100% de SN. Aquest resultat recolza el fet de que és necessària una avaluació complementària utilitzant biomarcadors per aclarir aquests diagnòstics sospitosos. En aquest escenari, tant el FISH com el classificador d'expressió gènica han mostrat una alta precisió diagnòstica per detectar aquests tumors. Ambdós metodologies han permès aclarir els resultats sospitosos de la citologia i podrien ser dues opcions a tenir en compte en la pràctica clínica.

En la mateixa línia del nostre estudi, Kim i col·laboradors van analitzar una àmplia cohort de pacients amb cistoscòpia negativa i citologia sospitosa. En aquest estudi es descriu que el 41% dels pacients van presentar un resultat de FISH positiu i que un 23% d'ells van recórrer al seguiment [217]. Aquests resultats estan en concordança amb els trobats a la nostra sèrie on un 42% dels pacients presenten un FISH positiu i un 35% d'ells va mostrar presència de tumor.

Tot i que els resultats d'aquest treball poden permetre aclarir el significat clínic d'una citologia sospitosa, hem de reconèixer que l'estudi presenta algunes limitacions. Primer, la recollida de les mostres per l'estudi es va dur a terme mitjançant barbotatge, el que implica un procés invasiu pel pacient. Això va ser així ja que per a aquest estudi requeríem d'un volum d'orina relativament elevat per a poder analitzar la mostra amb les quatre tècniques escollides. Una altra limitació de l'estudi seria el fet de que el diagnòstic de citologia sospitosa pot variar entre institucions i fins i tot entre patòlegs d'una mateixa institució. Al novembre del 2015 es va arribar un consens per la classificació de les citologies [223], però la recollida de mostres per aquest estudi va començar més tard. També comentar que el nombre total de pacients analitzats pot ser considerat baix. Això és degut al fet de que el nombre de citologies reportades com a sospitoses també és baix (aproximadament un 5% de totes les citologies reportades a la nostra institució). A més a més, només hem inclòs pacients amb citologia sospitosa per CU amb cistoscòpia negativa. Finalment, necessitàvem un nombre elevat de cèl·lules per poder realitzar tots els anàlisis. En alguns casos, això no va ser possible, i per tant el nombre final de mostres a la comparació amb totes les tècniques es redueix. En conseqüència, un estudi multicèntric seria necessari per validar aquests resultats i aclarir quina

de les tècniques proposades (FISH o GE) detecta i/o prediu millor la presència de tumor en aquest subgrup de pacients amb dues citologies sospitoses consecutives.

GTACGTACGTACG
ACGTACGTACGTAC
CGTACGTACGTACG
GTAC
GTACG
TACGTACGTACG
ACGTACGTACGTAC
ACGTACGTACGTAC
CGTAC
GTACG
TACGT
ACGTACGTACGTAC
GTACGTACGTACGTAC
GTACGTACGTACGTAC

CONCLUSIONS

5.1 Carcinoma urotelial de tracte urinari superior

- a. L'expressió de miR-31-5p com a factor pronòstic independent de la progressió tumoral del TM-TUS es valida en un estudi multicèntric i internacional

miR-31-5p expression has been validated as an independent prognostic factor of tumor progression in UTUC patients in an international and multicentric study

- b. Els pacients amb TM-TUS que progressen presenten un patró d'expressió diferencial de microRNAs en sèrum

UTUC progressing patients showed a differential microRNA expression pattern in serum samples

- c. L'expressió de miR-151b en sèrum ha estat identificada i validada com a biomarcador pronòstic de la progressió tumoral del TM-TUS

miR-151b expression has been identified and validated as an independent prognostic factor of tumor progression in serum from UTUC patients

5.2 Carcinoma urotelial de bufeta

- d. Les mostres d'orina de pacients amb NMIBC de risc baix/intermedi presenten un patró d'expressió gènica diferencial al de la resta de grups de risc i controls

A differential expression pattern has been identified in urine from low/intermediate risk NMIBC patients compared with all the other risk groups and controls

- e. El classificador basat en la quantificació de l'expressió de 8 gens en orina pot ser útil com a eina diagnòstica no invasiva per a la detecció de recidives en pacients en seguiment del CU de bufeta, ja que presenta globalment una sensibilitat del 96% i un valor predictiu negatiu del 97%

An 8-gene urine classifier has been developed and validated in patients in follow-up for BC presenting a SN of 96% and a NPV of 97%

- f. S'ha identificat la presència de tumor urotelial en el 35% dels pacients amb citologia urinària sospitosa per CU i cistoscòpia negativa; en el 86% d'aquests pacients la presència de tumor es va identificar al moment de la segona avaluació. A més a més, un 84% dels tumors detectats van ser d'alt risc. Per tant, la citologia urinària sospitosa per CU en pacients amb una cistoscòpia negativa té un significat clínic rellevant

Tumour was present in 35% of patients with suspicious for UC urinary cytology and negative cystoscopy and 84% of them showed tumour presence already at patients' second evaluation. Strikingly, 84% of tumours detected at patients' second evaluation were of high risk. Consequently, suspicious for UC urinary cytology has a strong clinical significance

- g. Els pacients amb citologia sospitosa per CU i cistoscòpia negativa requereixen d'avaluacions addicionals per determinar o predir la presència de tumor d'una manera primerenca. La repetició de la citologia urinària i la utilització de biomarcadors en orina basats en FISH i GE són d'utilitat per detectar i predir la presència de tumor en aquests pacients

Additional studies in patients with suspicious for UC urinary cytology and negative cystoscopy are necessary to earlier elucidate or predict tumor presence. A second urinary cytology or the use of urine biomarkers such as FISH or GE have demonstrated their ability to detect and predict tumour presence in these patients

\ACGTACGTA\
ACGTACGTACGTAC
ACGTACGTACGTACG
ACGTACGTACGTAC
CGTACC
GTACGTACGTACGTAC
GTACGTACGTACGTAC
ACGTACGTACGTACGTAC
CGTACC
GTACGTACGTACGTAC
TACGTACGTACGTAC
ACGTACGTACGTAC
GTACGTACGTACGTAC
ACGTACGTACGTAC
TACGTACGTACGTAC

BIBLIOGRAFIA

1. Cosentino M, Palou J, Gaya JM, Breda A, Rodriguez-Faba O, Villavicencio-Mavrich H. Upper urinary tract urothelial cell carcinoma: Location as a predictive factor for concomitant bladder carcinoma. *World J Urol*. 2013; 31: 141–5. doi: 10.1007/s00345-012-0877-2.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017; 67: 7–30. doi: 10.3322/caac.21387.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. doi: 10.1016/j.ucl.2013.01.011.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359–86. doi: 10.1002/ijc.29210.
5. Margulis V, Shariat SF, Matin SF, Kamat AM, Zigeuner R, Kikuchi E, Lotan Y, Weizer A, Raman JD, Wood CG. Outcomes of radical nephroureterectomy: A series from the upper tract urothelial carcinoma collaboration. *Cancer*. 2009; 115: 1224–33. doi: 10.1002/cncr.24135.
6. Shariat SF, Favaretto RL, Gupta A, Fritsche H-M, Matsumoto K, Kassouf W, Walton TJ, Tritschler S, Baba S, Matsushita K, Bastian PJ, Martínez-Salamanca JI, Seitz C, et al. Gender differences in radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *World J Urol* [Internet]. 2011; 29: 481–6. doi: 10.1007/s00345-010-0594-7.
7. Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma. *International Journal of Urology*. 2017. p. 730–4. doi: 10.1111/iju.13376.
8. van Osch FHM, Jochems SHJ, van Schooten F-J, Bryan RT, Zeegers MPA. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2016; 45: dyw044. doi: 10.1093/ije/dyw044.
9. Colin P, Koenig P, Ouzzane A, Berthon N, Villers A, Biserte J, Rouprêt M. Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract. *BJU International*. 2009. p. 1436–40. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08838.x.
10. Crivelli JJ, Xylinas E, Kluth LA, Rieken M, Rink M, Shariat SF. Effect of smoking on outcomes of urothelial carcinoma: A systematic review of the literature. *European Urology*. 2014. doi: 10.1016/j.eururo.2013.06.010.
11. Colt JS, Friesen MC, Stewart PA, Donguk P, Johnson A, Schwenn M, Karagas MR, Armenti K, Waddell R, Verrill C, Ward MH, Freeman LEB, Moore LE, et al. A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med*. 2014; 71: 667–74. doi: 10.1136/oemed-2013-102056.
12. Egbers L, Grotenhuis AJ, Aben KK, Alfred Witjes J, Kiemeny LA, Vermeulen SH. The prognostic value of family history among patients with urinary bladder cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2015; 136: 1117–24. doi: 10.1002/ijc.29062.
13. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013; 63: 234–41. doi:

- 10.1016/j.eururo.2012.07.033.
14. Al-Zalabani AH, Stewart KFJ, Wesselius A, Schols AMWJ, Zeegers MP. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol.* 2016; . doi: 10.1007/s10654-016-0138-6.
 15. Rouprêt M, Drouin SJ, Cancel-Tassin G, Comperat E, Larré S, Cussenot O. Genetic variability in 8q24 confers susceptibility to urothelial carcinoma of the upper urinary tract and is linked with patterns of disease aggressiveness at diagnosis. *J Urol.* 2012; . doi: 10.1016/j.juro.2011.10.038.
 16. Steinmaus C, Ferreccio C, Acevedo J, Yuan Y, Liaw J, Durán V, Cuevas S, García J, Meza R, Valdés R, Valdés G, Benítez H, Van Der Linde V, et al. Increased lung and bladder cancer incidence in adults after in utero and early-life arsenic exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23: 1529–38. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0059.
 17. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, Suzuki N, Fernandes A, Rosenquist T, Medverec Z, Jakovina K, Brdar B, Slade N, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2007; 104: 12129–34. doi: 10.1073/pnas.0701248104.
 18. Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, Zigeuner R, Sylvester RJ, Burger M, Cowan NC, Gontero P, Van Rhijn BWG, Mostafid AH, Palou J, Shariat SF. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *Eur Urol.* 2018; . doi: 10.1016/j.eururo.2017.07.036.
 19. Soria F, Shariat SF, Lerner SP, Fritsche H-M, Rink M, Kassouf W, Spiess PE, Lotan Y, Ye D, Fernández MI, Kikuchi E, Chade DC, Babjuk M, et al. Epidemiology, diagnosis, preoperative evaluation and prognostic assessment of upper-tract urothelial carcinoma (UTUC). *World J Urol.* 2017; . doi: 10.1007/s00345-016-1928-x.
 20. Lughezzani G, Burger M, Margulis V, Matin SF, Novara G, Roupert M, Shariat SF, Wood CG, Zigeuner R. Prognostic factors in upper urinary tract urothelial carcinomas: A comprehensive review of the current literature. *European Urology.* 2012. p. 100–14. doi: 10.1016/j.eururo.2012.02.030.
 21. Jeldres C, Sun M, Isbarn H, Lughezzani G, Budäus L, Alasker A, Shariat SF, Lattouf JB, Widmer H, Pharand D, Arjane P, Graefen M, Montorsi F, et al. A Population-based Assessment of Perioperative Mortality After Nephroureterectomy for Upper-tract Urothelial Carcinoma. *Urology.* 2010; . doi: 10.1016/j.urology.2009.10.004.
 22. Vikram R, Sandler CM, Ng CS. Imaging and staging of transitional cell carcinoma: Part 2, upper urinary tract. *American Journal of Roentgenology.* 2009. doi: 10.2214/AJR.09.2577.
 23. Amira N, Mourah S, Rozet F, Teillac P, Fiet J, Aubin P, Cortesse A, Desgrandchamps F, Le Duc A, Cussenot O, Soliman H. Non-invasive molecular detection of bladder cancer recurrence. *Int J Cancer.* 2002; . doi: 10.1002/ijc.10561.
 24. Van Rhijn BWG, Van Der Kwast TH, Alkhateeb SS, Fleshner NE, Van Leenders GJLH, Bostrom PJ, Van Der Aa MNM, Kakiashvili DM, Bangma CH, Jewett MAS, Zlotta AR. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur Urol.* 2012; . doi: 10.1016/j.eururo.2011.10.026.
 25. Otto W, Breyer J, Herdegen S, Eder F, Bertz S, May M, Mayr R, Lausenmeyer EM,

- Denzinger S, van Rhijn BWG, Burger M, Hartmann A. WHO 1973 grade 3 and infiltrative growth pattern proved, aberrant E-cadherin expression tends to be of predictive value for progression in a series of stage T1 high-grade bladder cancer after organ-sparing approach. *Int Urol Nephrol*. 2017; . doi: 10.1007/s11255-016-1491-9.
26. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Hernández V, Kaasinen E, Palou J, Rouprêt M, van Rhijn BWG, Shariat SF, Soukup V, et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*. 2017; 71: 447–61. doi: 10.1016/j.eururo.2016.05.041.
 27. Mostofi FK. Testicular tumors. Epidemiologic, etiologic, and pathologic features. *Cancer*. 1973; . doi: 10.1002/1097-0142(197311)32:5<1186::AID-CNCR2820320527>3.0.CO;2-8.
 28. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016; . doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028.
 29. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic Grading of Noninvasive Papillary Urothelial Neoplasms. *European Urology*. 2007. doi: 10.1016/j.eururo.2006.10.037.
 30. Cowan NC, Turney BW, Taylor NJ, McCarthy CL, Crew JP. Multidetector computed tomography urography for diagnosing upper urinary tract urothelial tumour. *BJU International*. 2007. doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.06766.x.
 31. GLAS AS, ROOS D, DEUTEKOM M, ZWINDERMAN AH, BOSSUYT PMM, KURTH KH. Tumor Markers in the Diagnosis of Primary Bladder Cancer. A Systematic Review. *J Urol*. 2003; . doi: 10.1097/01.ju.0000067461.30468.6d.
 32. Cheung G, Sahai A, Billia M, Dasgupta P, Khan MS. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMC Medicine*. 2013. doi: 10.1186/1741-7015-11-13.
 33. Kołodziej a., Krajewski W, Matuszewski M, Tupikowski K. Review of current optical diagnostic techniques for non-muscle-invasive bladder cancer. *Cent Eur J Urol*. 2016; . doi: 10.5173/cej.2016.780.
 34. Nakai Y, Inoue K, Tsuzuki T, Shimamoto T, Shuin T, Nagao K, Matsuyama H, Oyama M, Furuse H, Ozono S, Miyake M, Fujimoto K. Oral 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis using fluorescence cystoscopy for non-muscle-invasive bladder cancer: A multicenter phase III study. *Int J Urol*. 2018; 25: 723–9. doi: 10.1111/iju.13718.
 35. Papanicolaou GN, Marshall VF. Urine sediment smears as a diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science*. 1945. doi: 10.1126/science.101.2629.519.
 36. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015; 33: 66e25-66e31. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.06.008.
 37. Messer J, Shariat SF, Brien JC, Herman MP, Ng CK, Scherr DS, Scoll B, Uzzo RG, Wille M, Eggener SE, Steinberg G, Terrell JD, Lucas SM, et al. Urinary cytology has a poor performance for predicting invasive or high-grade upper-tract urothelial carcinoma. *BJU Int*. 2011; 108: 701–5. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09899.x.

38. Barkan GA, Wojcik EM, Nayar R, Savic-Prince S, Quek ML, Kurtycz DFI, Rosenthal DL. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Acta Cytologica*. 2016. p. 185–97. doi: 10.1159/000446270.
39. Babjuk M. et al. Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer. *Eur Urol* [Internet]. 2014; 41: 105–112. doi: 10.1016/j.eururo.2013.06.003.
40. Roupert M, Traxer O, Tligui M, Conort P, Chartier-Kastler E, Richard F, Cussenot O. Upper urinary tract transitional cell carcinoma: recurrence rate after percutaneous endoscopic resection. *Eur Urol* [Internet]. 2007; 51: 709–13; discussion 714. doi: 10.1016/j.eururo.2006.07.019.
41. Seisen T, Peyronnet B, Dominguez-Escrig JL, Bruins HM, Yuan CY, Babjuk M, Böhle A, Burger M, Compérat EM, Cowan NC, Kaasinen E, Palou J, van Rhijn BWG, et al. Oncologic Outcomes of Kidney-sparing Surgery Versus Radical Nephroureterectomy for Upper Tract Urothelial Carcinoma: A Systematic Review by the EAU Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel. *European Urology*. 2016. p. 1052–68. doi: 10.1016/j.eururo.2016.07.014.
42. Koga H, Kuroiwa K, Yamaguchi A, Osada Y, Tsuneyoshi M, Naito S. A randomized controlled trial of short-term versus long-term prophylactic intravesical instillation chemotherapy for recurrence after transurethral resection of Ta/T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2004; 171: 153–7. doi: 10.1097/01.ju.0000100386.07370.0a.
43. Han RF, Pan JG. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology*. 2006; 67: 1216–23. doi: 10.1016/j.urology.2005.12.014.
44. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. Intravesical bacillus Calmette-Guerin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int*. 2004; 93: 485–90. doi: 4655 [pii].
45. Järvinen R, Kaasinen E, Sankila A, Rintala E. Long-term Efficacy of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin versus Maintenance Mitomycin C Instillation Therapy in Frequently Recurrent TaT1 Tumours without Carcinoma In Situ: A Subgroup Analysis of the Prospective, Randomised FinnBladder I Study with a 20. *Eur Urol*. 2009; 56: 260–5. doi: 10.1016/j.eururo.2009.04.009.
46. SYLVESTER RJ, van der MEIJDEN APM, LAMM DL. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Reduces the Risk of Progression in Patients with Superficial Bladder Cancer: A Meta-analysis of the Published Results of Randomized Clinical Trials. *J Urol* [Internet]. 2002; 168: 1964–70. doi: 10.1016/S0022-5347(05)64273-5.
47. Miyake M, Tatsumi Y, Matsumoto H, Nagao K, Matsuyama H, Inamoto T, Azuma H, Yasumoto H, Shiina H, Fujimoto K. Outcomes of subsequent non-muscle-invasive bladder cancer treated with intravesical Bacillus Calmette-Guérin after radical nephroureterectomy for upper urinary tract urothelial carcinoma. *BJU Int*. 2018; . doi: 10.1111/bju.14111.
48. Stein JP, Skinner DG. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: Long-term results of a standard procedure. *World J Urol*. 2006; . doi: 10.1007/s00345-006-0061-7.

49. Porter MP, Kerrigan MC, Donato BMK, Ramsey SD. Patterns of use of systemic chemotherapy for Medicare beneficiaries with urothelial bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2011; . doi: 10.1016/j.urolonc.2009.03.021.
50. Sternberg CN, Pansadoro V, Calabrò F, Schnetzer S, Giannarelli D, Emiliozzi P, De Paula F, Scarpone P, De Carli P, Pizzo M, Platania A, Amini M. Can patient selection for bladder preservation be based on response to chemotherapy? *Cancer.* 2003; 97: 1644–52. doi: 10.1002/cncr.11232.
51. Seisen T, Jindal T, Karabon P, Sood A, Bellmunt J, Rouprêt M, Leow JJ, Vetterlein MW, Sun M, Alanee S, Choueiri TK, Trinh QD, Menon M, et al. Efficacy of Systemic Chemotherapy Plus Radical Nephroureterectomy for Metastatic Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Eur Urol.* 2017; 71: 714–8. doi: 10.1016/j.eururo.2016.11.012.
52. Kirkali Z, Tuzel E. Transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2003. doi: 10.1016/S1040-8428(03)00079-9.
53. Raman JD, Ng CK, Boorjian SA, Vaughan ED, Sosa RE, Scherr DS. Bladder cancer after managing upper urinary tract transitional cell carcinoma: Predictive factors and pathology. *BJU International.* 2005. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05804.x.
54. Stewart GD, Bariol S V., Grigor KM, Tolley DA, McNeill SA. A comparison of the pathology of transitional cell carcinoma of the bladder and upper urinary tract. *BJU International.* 2005. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05402.x.
55. Green DA, Rink M, Xylinas E, Matin SF, Stenzl A, Roupret M, Karakiewicz PI, Scherr DS, Shariat SF. Urothelial carcinoma of the bladder and the upper tract: Disparate twins. *Journal of Urology.* 2013. doi: 10.1016/j.juro.2012.05.079.
56. Kim HS, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Association between demographic factors and prognosis in urothelial carcinoma of the upper urinary tract: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017; . doi: 10.18632/oncotarget.10708.
57. Mbeutcha A, Rouprêt M, Kamat AM, Karakiewicz PI, Lawrentschuk N, Novara G, Raman JD, Seitz C, Xylinas E, Shariat SF. Prognostic factors and predictive tools for upper tract urothelial carcinoma: a systematic review. *World J Urol.* 2016; . doi: 10.1007/s00345-016-1826-2.
58. Petrelli F, Ismail M, Hussein Y, Vavassori I, Barni S. Prognostic Factors of Overall Survival in Upper Urinary Tract Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Urology.* 2016; . doi: 10.1016/j.urology.2016.07.036.
59. Sylvester RJ, Van Der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DWW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: A combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006; 49: 466–75. doi: 10.1016/j.eururo.2005.12.031.
60. Steidl C, Simon R, Brger H, Brinkschmidt C, Hertle L, Bcker W, Terpe HJ. Patterns of chromosomal aberrations in urinary bladder tumours and adjacent urothelium. *J Pathol.* 2002; . doi: 10.1002/path.1175.
61. Fadl-Elmula I. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell and Chromosome.* 2005. doi: 10.1186/1475-9268-4-1.

62. Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Cohen MB, Field FG, Mayall BH. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res.* 1991; .
63. Pycha A, Mian C, Haitel A, Hofbauer J, Wiener H, Marberger M. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer. *J Urol.* 1997; . doi: 10.1016/S0022-5347(01)64690-1.
64. Gallucci M, Guadagni F, Marzano R, Leonardo C, Merola R, Sentinelli S, Ruggeri EM, Cantiani R, Sperduti I, De La Iglesia Lopez F, Cianciulli AM. Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: Correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J Clin Pathol.* 2005; . doi: 10.1136/jcp.2004.021154.
65. Knowles MA. Molecular genetics of bladder cancer: Pathways of development and progression. *Cancer Surv.* 1998; .
66. Rigola MA, Fuster C, Casadevall C, Bernues M, Caballin MR, Gelabert A, Egozcue J, Miro R. Comparative genomic hybridization analysis of transitional cell carcinomas of the renal pelvis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; .
67. Rouprêt M, Fromont G, Azzouzi A-R, Catto JW, Vallancien G, Hamdy FC, Cussenot O. Microsatellite instability as predictor of survival in patients with invasive upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology [Internet].* 2005; 65: 1233–7. doi: 10.1016/j.urology.2005.01.019.
68. Knowles MA, Williamson M. Mutation of H-ras Is Infrequent in Bladder Cancer: Confirmation by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis, Designed Restriction Fragment Length Polymorphisms, and Direct Sequencing. *Cancer Res.* 1993; .
69. Knowles M a. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol.* 2001; .
70. Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet GP, Grossman HB, Schalken JA, Schmitz-Dräger BJ, Murphy WM, Bono A V., Goebell P, Getzenberg RH, Hautmann SH, Messing E, et al. Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology.* 2005. doi: 10.1016/j.urology.2005.08.065.
71. E.M. W, G. L, P.A. J. Mechanisms of disease: Genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2005; . doi: 10.1038/ncpuro0318.
72. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thierry JP, Radvanyi F. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet.* 1999; 23: 18–20. doi: 10.1038/12615.
73. Burger M, van der Aa MNM, van Oers JMM, Brinkmann A, van der Kwast TH, Steyerberg EC, Stoehr R, Kirkels WJ, Denzinger S, Wild PJ, Wieland WF, Hofstaedter F, Hartmann A, et al. Prediction of Progression of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer by WHO 1973 and 2004 Grading and by FGFR3 Mutation Status: A Prospective Study. *Eur Urol.* 2008; 54: 835–44. doi: 10.1016/j.eururo.2007.12.026.
74. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. UKPMC Funders Group Author Manuscript FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. 2008; 213: 91–8. doi: 10.1002/path.2207.FGFR3.

75. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, De Medina SGD, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, Van Der Kwast T, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol.* 2001; 158: 1955–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64665-2.
76. Catto JWF, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudzic E, Larré S, Milo M, Rehman I, Rosario DJ, Di Martino E, Knowles MA, Meuth M, et al. Distinct MicroRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res.* 2009; 69: 8472–81. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0744.
77. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene.* 2005; . doi: 10.1038/sj.onc.1208705.
78. Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye J, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Paireon J-C, Jaurand M-C, Thiery J-P, Chopin DK, de Medina SGD. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 2003; . doi: 10.1158/0008-5472.can-03-2421.
79. Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Jaramillo R, Amorós A, Tardón A, García-Closas R, Serra C, Carrato A, Malats N, Real FX. FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: Independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005; . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0122.
80. Kee K. Oncoprotein changes in the flat lesions with atypia and invasive neoplasms of the urinary bladder. *Oncol Rep.* 2001; .
81. SHIINA H, IGAWA M, URAKAMI S, SHIRAKAWA H, ISHIBE T. Immunohistochemical analysis of nm23 protein in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol.* 1995; 76: 708–13. doi: 10.1111/j.1464-410X.1995.tb00761.x.
82. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer.* 2003. doi: 10.1038/nrc968.
83. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: A promising tumor biomarker. *Cancer Lett.* 2007; 249: 49–60. doi: 10.1016/j.canlet.2006.12.020.
84. Lee SH, Shin MS, Park WS, Kim SY, Dong SM, Pi JH, Lee HK, Kim HS, Jang JJ, Kim CS, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res.* 1999; .
85. Mitra AP, Hansel DE, Cote RJ. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. *Semin Oncol.* 2012; . doi: 10.1053/j.seminoncol.2012.08.008.
86. Cancer T, Atlas G. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature [Internet].* 2014; 507: 315–22. doi: 10.1038/nature12965.
87. Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S, Iwasaki Y, Kubota Y. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer.* 1995; .
88. Le Frère-Belda MA, Gil Diez De Medina S, Daher A, Martin N, Albaud B, Heudes D, Abbou CC, Thiery JP, Zafrani ES, Radvanyi F, Chopin D. Profiles of the 2 INK4a gene products, p16 and p14ARF, in human reference urothelium and bladder carcinomas, according to pRb and p53 protein status. *Hum Pathol.* 2004; 35: 817–24. doi: 10.1016/j.humpath.2004.01.019.

89. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF, Lerner SP. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 1014–24. doi: 10.1200/JCO.2004.03.118.
90. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, Young L, Shi SR, Gee C, Groshen S, Skinner DG, Cote RJ. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2004; . doi: 10.1200/JCO.2004.05.174.
91. Llopis J, Alcaraz A, Ribal MJ, Solé M, Ventura PJ, Barranco MA, Rodriguez A, Corral JM, Carretero P. p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. *Eur Urol*. 2000; . doi: 10.1159/000020232.
92. Shariat SF, Kim J, Raptidis G, Ayala GE, Lerner SP. Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology*. 2003; . doi: 10.1016/S0090-4295(03)00236-X.
93. Cote RJ, Datar RH. Therapeutic approaches to bladder cancer: Identifying targets and mechanisms. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2003. doi: 10.1016/S1040-8428(03)00066-0.
94. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015; 15: 25–41. doi: 10.1038/nrc3817.
95. York N, Carli M, Taylor AE, Lang AE, Cairns P. * TECHNICAL COMMENTS T ... Rates of p 16 (MTS 1) Mutations in Primary Tumors with 9p Loss. 1994; 265: 15–6.
96. Aboukassim TO, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer. *Oncogene*. 2003; 22: 2967–71. doi: 10.1038/sj.onc.1206513.
97. Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles MA. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics*. 1998; 48: 277–88. doi: 10.1006/geno.1997.5165.
98. Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 6008–17. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0898.
99. Ploussard G, Dubosq F, Soliman H, Verine J, Desgrandchamps F, De Thé H, Mongiat-Artus P. Prognostic value of loss of heterozygosity at chromosome 9p in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Urology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010; 76: 513.e13-513.e18. doi: 10.1016/j.urology.2010.03.037.
100. Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Roberta Girardi L, Baroni G, Dal Canto M. Loss of P16 Expression and Chromosome 9p21 LOH in Predicting Outcome of Patients Affected by Superficial Bladder Cancer. *J Surg Res*. 2007; 143: 422–7. doi: 10.1016/j.jss.2007.01.012.
101. TCGA. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* [Internet]. 2014; 507: 315–22. doi: 10.1038/nature12965.
102. Na R, Wu Y, Jiang G, Yu H, Lin X, Wang M, Conran CA, Fantus RJ, Zhang N, Liu S, Helfand BT, Zheng SL, Isaacs WB, et al. Germline mutations in DNA repair genes are associated with bladder cancer risk and unfavourable prognosis. *BJU Int* [Internet]. 2018; : 808–13.

- doi: 10.1111/bju.14370.
103. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology*. 1993. doi: 10.1016/0016-5085(93)90368-M.
 104. Lacombe L, Dalbagni G, Reuter VE, Cardo CC. Chromosome 9 Allelic Losses and Microsatellite Alterations in Human Bladder Tumors. *Cancer Res*. 1994; .
 105. Simoneau AR, Spruck CH, Gonzalez-Zulueta M, Gonzalgo ML, Chan MF, Tsai YC, Dean M, Steven K, Horn T, Jones PA. Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res*. 1996; .
 106. Hoglund M, Gisselsson D, Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F, Sall T. Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosom Cancer*. 2001; . doi: 10.1002/gcc.1129.
 107. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: A tale of divergent pathways. *Nature Reviews Cancer*. 2005. doi: 10.1038/nrc1697.
 108. Sjødahl G, Lauss M, Lovgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, Patschan O, Aine M, Ferno M, Ringner M, Mansson W, Liedberg F, Lindgren D, et al. A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2012; 18: 3377–86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T.
 109. Sjødahl G, Lövgren K, Lauss M, Patschan O, Gudjonsson S, Chebil G, Aine M, Eriksson P, Månsson W, Lindgren D, Fernö M, Liedberg F, Höglund M. Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *Am J Pathol*. 2013; 183: 681–91. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.013.
 110. Rebouissou S, Hérault A, Letouzé E, Neuzillet Y, Laplanche A, Ofualuka K, Maillé P, Leroy K, Riou A, Lepage ML, Vordos D, De La Taille A, Denoux Y, et al. CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *J Pathol*. 2012; 227: 315–24. doi: 10.1002/path.4017.
 111. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, Kim WY. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2014; 111: 3110–5. doi: 10.1073/pnas.1318376111.
 112. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014; . doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.009.
 113. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, Kim WY. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2014; 111: 3110–5. doi: 10.1073/pnas.1318376111.
 114. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, et al. Identification of Distinct Basal and

- Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014; 25: 152–65. doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.009.
115. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, McConkey DJ. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nature Reviews Urology*. 2014. p. 400–10. doi: 10.1038/nrurol.2014.129.
116. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, Lotan Y. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2017; . doi: 10.6004/JNCCN.2013.0059.
117. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP, Vang S, Reinert T, Hermann GG, Mogensen K, Thomsen MBH, Nielsen MM, Marquez M, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016; . doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.004.
118. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 2005; . doi: 10.1038/ng1590.
119. Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013. doi: 10.1038/nrd4018.
120. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006. doi: 10.1038/nrc1840.
121. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006; . doi: 10.1093/nar/gkj112.
122. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
123. Schratt G. MicroRNAs at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009. doi: 10.1038/nrn2763.
124. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010; . doi: 10.1038/nature09267.
125. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; . doi: 10.1101/gr.082701.108.
126. Bartel DP. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009; . doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.MicroRNA.
127. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA - Implications for cancer. *Virchows Archiv*. 2008. doi: 10.1007/s00428-007-0532-2.
128. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2010; . doi: 10.1016/j.urolonc.2009.01.027.
129. Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Gazquez C, Ribal MJ, Alcaraz A. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *Int J Cancer*. 2013; 133: 2631–41. doi: 10.1002/ijc.28274.

130. Ingelmo-Torres M, Jose Lozano J, Izquierdo L, Carrion A, Costa M, Gomez L, José Ribal M, Alcaraz A, Mengual L. Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget*. 2017; . doi: 10.18632/oncotarget.15315.
131. Rey A, Lara PC, Redondo E, Valdes E, Apolinario R. Overexpression of p53 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. Relation to tumor proliferation and survival. *Cancer*. 1997; . doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19970601)79:11<2178::AID-CNCR16>3.0.CO;2-T [pii].
132. Hashimoto H, Sue Y, Saga Y, Tokumitsu M, Yachiku S. Roles of p53 and MDM2 in tumor proliferation and determination of the prognosis of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Int J Urol*. 2000; . doi: 10.1046/j.1442-2042.2000.00230.x.
133. Zigeuner R, Tsybrovskyy O, Ratschek M, Rehak P, Lipsky K, Langner C. Prognostic impact of p63 and p53 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology*. 2004; . doi: 10.1016/j.urology.2004.01.009.
134. Jeon HG, Jeong IG, Bae J, Lee JW, Won JK, Paik JH, Kim HH, Lee SE, Lee E. Expression of Ki-67 and COX-2 in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *Urology*. 2010; . doi: 10.1016/j.urology.2010.03.070.
135. Ohtsuka Y, Kawakami S, Fujii Y, Koga F, Saito K, Ando N, Takizawa T, Kageyama Y, Kihara K. Loss of uroplakin III expression is associated with a poor prognosis in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *BJU Int*. 2006; . doi: 10.1111/j.1464-410X.2006.06158.x.
136. Kosaka T, Kikuchi E, Mikami S, Miyajima A, Shirotake S, Ishida M, Okada Y, Oya M. Expression of snail in upper urinary tract urothelial carcinoma: Prognostic significance and implications for tumor invasion. *Clin Cancer Res*. 2010; . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0230.
137. Jeong IG, Kim SH, Jeon HG, Kim BH, Moon KC, Lee SE, Lee E. Prognostic value of apoptosis-related markers in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Hum Pathol*. 2009; . doi: 10.1016/j.humpath.2008.10.010.
138. Nakanishi K, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kasamatsu H, Matsuyama S, Matsuyama T, Kawai T. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha protein predicts survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Clin Cancer Res*. 2005; . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1685.
139. Inoue K, Kamada M, Slaton JW, Fukata S, Yoshikawa C, Tamboli P, Dinney CPN, Shuin T. The prognostic value of angiogenesis and metastasis-related genes for progression of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Clin Cancer Res*. 2002; .
140. Fromont G, Rouprêt M, Amira N, Sibony M, Vallancien G, Validire P, Cussenot O. Tissue microarray analysis of the prognostic value of E-cadherin, Ki67, p53, p27, survivin and MSH2 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Eur Urol*. 2005; . doi: 10.1016/j.eururo.2005.07.005.
141. Izquierdo L, Mengual L, Gazquez C, Ingelmo-Torres M, Alcaraz A. Molecular characterization of upper urinary tract tumours. *BJU Int*. 2010; 106: 868–72. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.09135.x.
142. Izquierdo L, Ingelmo-Torres M, Mallofré C, Lozano JJ, Verhasselt-Crinquette M, Leroy X, Colin P, Comperat E, Rouporet M, Alcaraz A, Mengual L. Prognostic value of microRNA

- expression pattern in upper tract urothelial carcinoma. *BJU Int.* 2014; 113: 813–21. doi: 10.1111/bju.12551.
143. Catto JWF, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005; . doi: 10.1200/JCO.2005.03.163.
144. van Oers JMM, Zwarthoff EC, Rehman I, Azzouzi AR, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC, Catto JWF. FGFR3 Mutations Indicate Better Survival in Invasive Upper Urinary Tract and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2009; . doi: 10.1016/j.eururo.2008.06.013.
145. Hashimoto K, Ikeda Y, Korenaga D, Tanoue K, Hamatake M, Kawasaki K, Yamaoka T, Iwatani Y, Akazawa K, Takenaka K. The impact of preoperative serum C-reactive protein on the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2005. doi: 10.1002/cncr.20976.
146. Lehmann J, Suttman H, Kovač I, Hack M, Kamradt J, Siemer S, Wullich B, Zwergel U, Stöckle M. Transitional Cell Carcinoma of the Ureter: Prognostic Factors Influencing Progression and Survival. *Eur Urol.* 2007; . doi: 10.1016/j.eururo.2006.11.021.
147. Williams SK, Denton KJ, Minervini A, Oxley J, Khastagir J, Timoney AG, Keeley FX. Correlation of Upper-Tract Cytology, Retrograde Pyelography, Ureteroscopic Appearance, and Ureteroscopic Biopsy with Histologic Examination of Upper-Tract Transitional Cell Carcinoma. *J Endourol.* 2008; . doi: 10.1089/end.2007.9853.
148. Skolarikos A, Griffiths TRL, Powell PH, Thomas DJ, Neal DE, Kelly JD. Cytologic analysis of ureteral washings is informative in patients with grade 2 upper tract TCC considering endoscopic treatment. *Urology.* 2003; . doi: 10.1016/S0090-4295(03)00026-8.
149. Chen AA, Grasso M. Is There a Role for FISH in the Management and Surveillance of Patients with Upper Tract Transitional-Cell Carcinoma? *J Endourol.* 2008; . doi: 10.1089/end.2008.0096.
150. Marin-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, Musquera M, Ars E, Villavicencio H, Algaba F, Alcaraz A. Utility of fluorescence in situ hybridization as a non-invasive technique in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Eur Urol.* 2007; 51: 409–15; discussion 415. doi: 10.1016/j.eururo.2006.08.045.
151. Tilki D, Burger M, Dalbagni G, Grossman HB, Hakenberg OW, Palou J, Reich O, Rouprêt M, Shariat SF, Zlotta AR. Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *European Urology.* 2011. doi: 10.1016/j.eururo.2011.05.053.
152. Mbeutcha A, Lucca I, Mathieu R, Lotan Y, Shariat SF. Current Status of Urinary Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer. *Urologic Clinics of North America.* 2016. doi: 10.1016/j.ucl.2015.08.005.
153. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TRL, N'Dow J, Nabi G, Cook J, Vale L. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technology Assessment.* 2010. doi: 10.3310/hta14040.
154. Babjuk M, Soukup V, Pešl M, Košťířová M, Drncová E, Smolová H, Szakacsová M, Getzenberg R, Pavlík I, Dvořáček J. Urinary Cytology and Quantitative BTA and UBC

- Tests in Surveillance of Patients with pT₁ Bladder Urothelial Carcinoma. *Urology*. 2008; . doi: 10.1016/j.urology.2007.12.021.
155. Raitanen MP. The role of BTA stat Test in follow-up of patients with bladder cancer: Results from FinnBladder studies. *World J Urol*. 2008; . doi: 10.1007/s00345-007-0230-3.
156. Lodde M, Mian C, Comploj E, Palermo S, Longhi E, Marberger M, Pycha A. uCyt+ test: Alternative to cystoscopy for less-invasive follow-up of patients with low risk of urothelial carcinoma. *Urology*. 2006; . doi: 10.1016/j.urology.2005.11.057.
157. Halling KC. Vysis® UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2003. doi: 10.1586/14737159.3.4.507.
158. Kavalieris L, O'Sullivan P, Frampton C, Guilford P, Darling D, Jacobson E, Suttie J, Raman JD, Shariat SF, Lotan Y. Performance Characteristics of a Multigene Urine Biomarker Test for Monitoring for Recurrent Urothelial Carcinoma in a Multicenter Study. *J Urol*. 2017; . doi: 10.1016/j.juro.2016.12.010.
159. Pichler R, Tulchiner G, Fritz J, Schaefer G, Horninger W, Heidegger I. Urinary UBC rapid and NMP22 test for bladder cancer surveillance in comparison to urinary cytology: Results from a prospective single-center study. *Int J Med Sci*. 2017; . doi: 10.7150/ijms.19929.
160. Pichler R, Fritz J, Tulchiner G, Klinglmair G, Soleiman A, Horninger W, Klocker H, Heidegger I. Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int*. 2018; . doi: 10.1111/bju.14019.
161. Yang H, Li H, Wang Z, Gao J, Guo Y. Is urinary soluble Fas an independent predictor of non-muscle-invasive bladder cancer? A prospective chart study. *Urologia Internationalis*. 2013. doi: 10.1159/000350752.
162. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, Hautmann SH, Posey JT, Duncan RC, Watson R, Rose L, Markowitz S, Soloway MS. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-stat tests. *Cancer*. 2002; . doi: 10.1002/cncr.10652.
163. Shariat SF, Casella R, Khoddami SM, Hernandez G, Sulser T, Gasser TC, Lerner SP. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer. *J Urol*. 2004; . doi: 10.1097/01.ju.0000107826.78479.90.
164. Zuiverloon TCM, van der Aa MNM, van der Kwast TH, Steyerberg EW, Lingsma HF, Bangma CH, Zwarthoff EC. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-grade non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 3011–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3013.
165. Su SF, De Castro Abreu AL, Chihara Y, Tsai Y, Andreu-Vieyra C, Daneshmand S, Skinner EC, Jones PA, Siegmund KD, Liang G. A panel of three markers hyper- And hypomethylated in urine sediments accurately predicts bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res*. 2014; . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2637.
166. Abern MR, Owusu R, Inman BA. Clinical performance and utility of a DNA methylation urine test for bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014; . doi: 10.1016/j.urolonc.2013.08.003.

167. Kandimalla R, Masius R, Beukers W, Bangma CH, Orntoft TF, Dyrskjot L, Van Leeuwen N, Lingsma H, Van Tilborg AAG, Zwarthoff EC. A 3-plex methylation assay combined with the FGFR3 mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 4760–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3276.
168. Roperch JP, Grandchamp B, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, Ravery V, Ouzaid I, Roupret M, Phe V, Ciofu C, Tubach F, Cussenot O, Incitti R. Promoter hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with FGFR3 mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer.* 2016; . doi: 10.1186/s12885-016-2748-5.
169. Kumari N, Agrawal U, Mishra AK, Kumar A, Vasudeva P, Mohanty NK, Saxena S. Predictive role of serum and urinary cytokines in invasion and recurrence of bladder cancer. *Tumor Biol.* 2017; . doi: 10.1177/1010428317697552.
170. van der Aa MNM, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, Boogaard MW, Nijssen Y, van der Keur KA, van Exsel AJA, Kirkels WJ, Bangma C, van der Kwast TH. Microsatellite Analysis of Voided-Urine Samples for Surveillance of Low-Grade Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma: Feasibility and Clinical Utility in a Prospective Multicenter Study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer Trial [CEFUB]). *Eur Urol.* 2009; . doi: 10.1016/j.eururo.2008.05.001.
171. Soria F, Droller MJ, Lotan Y, Gontero P, D'Andrea D, Gust KM, Rouprêt M, Babjuk M, Palou J, Shariat SF. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World Journal of Urology.* 2018; . doi: 10.1007/s00345-018-2380-x.
172. Lughezzani G, Burger M, Margulis V, Matin SF, Novara G, Roupret M, Shariat SF, Wood CG, Zigeuner R. Prognostic factors in upper urinary tract urothelial carcinomas: A comprehensive review of the current literature. *European Urology.* 2012. doi: 10.1016/j.eururo.2012.02.030.
173. Rouprêt M, Fromont G, Azzouzi A-R, Catto JW, Vallancien G, Hamdy FC, Cussenot O. Microsatellite instability as predictor of survival in patients with invasive upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology.* 2005; . doi: 10.1016/j.urology.2005.01.019.
174. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology.* 2012. p. 590–610. doi: 10.1016/j.molonc.2012.09.006.
175. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'Brien-Jenkins A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2006; 103: 9136–41. doi: 10.1073/pnas.0508889103.
176. Wang N, Zhou Y, Zheng L, Li H. MiR-31 is an independent prognostic factor and functions as an oncomir in cervical cancer via targeting ARID1A. *Gynecol Oncol.* 2014; . doi: 10.1016/j.ygyno.2014.04.047.
177. Liu X, Sempere LF, Ouyang H, Memoli VA, Andrew AS, Luo Y, Demidenko E, Korc M, Shi W, Preis M, Dragnev KH, Li H, Drenzo J, et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest.* 2010; . doi: 10.1172/JCI39566.
178. Xu R-S, Wu X-D, Zhang S-Q, Li C-F, Yang L, Li D-D, Zhang B-G, Zhang Y, Jin J-P, Zhang B.

- The tumor suppressor gene RhoBTB1 is a novel target of miR-31 in human colon cancer. *Int J Oncol.* 2013; . doi: 10.3892/ijo.2012.1746.
179. Wang S, Li Q, Wang K, Dai Y, Yang J, Xue S, Han F, Zhang Q, Liu J, Wu W. Decreased expression of microRNA-31 associates with aggressive tumor progression and poor prognosis in patients with bladder cancer. *Clin Transl Oncol.* 2013; . doi: 10.1007/s12094-013-1014-4.
 180. Wang CJ, Stratmann J, Zhou ZG, Sun XF. Suppression of microRNA-31 increases sensitivity to 5-FU at an early stage, and affects cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *BMC Cancer.* 2010; . doi: 10.1186/1471-2407-10-616.
 181. Bonberg N, Pesch B, Behrens T, Johnen G, Taeger D, Gawrych K, Schwentner C, Wellhöfer H, Kluckert M, Leng G, Nasterlack M, Oberlinner C, Stenzl A, et al. Chromosomal alterations in exfoliated urothelial cells from bladder cancer cases and healthy men: A prospective screening study. *BMC Cancer.* 2014; . doi: 10.1186/1471-2407-14-854.
 182. Luo B, Li W, Deng C-H, Zheng F-F, Sun X-Z, Wang D-H, Dai Y-P. Utility of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; . doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.10.015.
 183. Ragan C, Zuker M, Ragan MA. Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations. *PLoS Comput Biol.* 2011; . doi: 10.1371/journal.pcbi.1001090.
 184. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2011. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.76.
 185. Jiang X, Du L, Wang L, Li J, Liu Y, Zheng G, Qu A, Zhang X, Pan H, Yang Y, Wang C. Serum microRNA expression signatures identified from genome-wide microRNA profiling serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence of bladder cancer. *Int J Cancer.* 2015; 136: 854–62. doi: 10.1002/ijc.29041.
 186. Motawi TK, Rizk SM, Ibrahim TM, Ibrahim IAR. Circulating microRNAs, miR-92a, miR-100 and miR-143, as non-invasive biomarkers for bladder cancer diagnosis. *Cell Biochem Funct.* 2016; . doi: 10.1002/cbf.3171.
 187. Kriebel S, Schmidt D, Holdenrieder S, Goltz D, Kristiansen G, Moritz R, Fisang C, Müller SC, Ellinger J. Analysis of tissue and serum microRNA expression in patients with upper urinary tract urothelial cancer. *PLoS One.* 2015; . doi: 10.1371/journal.pone.0117284.
 188. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, Fell HP, Ferree S, George RD, Grogan T, James JJ, Maysuria M, Mitton JD, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.* 2008; . doi: 10.1038/nbt1385.
 189. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordóñez B, Gullane P, Irish J, Jurisica I, Kamel-Reid S. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. *BMC Biotechnol.* 2011; . doi: 10.1186/1472-6750-11-46.
 190. Prat A, Galvan P, Jimenez B, Buckingham W, Jeiranian HA, Schaper C, Vidal M, Alvarez M, Diaz S, Ellis C, Nuciforo P, Ferree S, Ribelles N, et al. Prediction of Response to

- Neoadjuvant Chemotherapy Using Core Needle Biopsy Samples with the Prosigna Assay. *Clin Cancer Res.* 2016; . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0630.
191. Martín M, González-Rivera M, Morales S, de la Haba-Rodríguez J, González-Cortijo L, Manso L, Albanell J, González-Martín A, González S, Arcusa A, de la Cruz-Merino L, Rojo F, Vidal M, et al. Prospective study of the impact of the Prosigna assay on adjuvant clinical decision-making in unselected patients with estrogen receptor positive, human epidermal growth factor receptor negative, node negative early-stage breast cancer. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 2015; 31: 1129–37. doi: 10.1185/03007995.2015.1037730.
 192. Roth P, Keller A, Hoheisel JD, Codo P, Bauer AS, Backes C, Leidinger P, Meese E, Thiel E, Korfel A, Weller M. Differentially regulated miRNAs as prognostic biomarkers in the blood of primary CNS lymphoma patients. *Eur J Cancer.* 2015; . doi: 10.1016/j.ejca.2014.10.028.
 193. Wu S, Chen J, Dong P, Zhang S, He Y, Sun L, Zhu J, Cheng Y, Li X, Tang A, Huang Y, Gui Y, Liu C, et al. Global gene expression profiling identifies ALDH2, CCNE1 and SMAD3 as potential prognostic markers in upper tract urothelial carcinoma. *BMC Cancer.* 2014; . doi: 10.1186/1471-2407-14-836.
 194. Rosser CJ, Liu L, Sun Y, Villicana P, McCullers M, Porvasnik S, Young PR, Parker AS, Goodison S. Bladder cancer-associated gene expression signatures identified by profiling of exfoliated urothelia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18: 444–53. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1002.
 195. Urquidi V, Goodison S, Cai Y, Sun Y, Rosser CJ. A candidate molecular biomarker panel for the detection of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; 21: 2149–58. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0428.
 196. O’Sullivan P, Sharples K, Dalphin M, Davidson P, Gilling P, Cambridge L, Harvey J, Toro T, Giles N, Luxmanan C, Alves CF, Yoon HS, Hinder V, et al. A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol.* 2012; 188: 741–7. doi: 10.1016/j.juro.2012.05.003.
 197. Mengual L, Burset M, Ars E, Ribal MJ, Lozano JJ, Minana B, Sumoy L, Alcaraz A. Partially Degraded RNA from Bladder Washing is a Suitable Sample for Studying Gene Expression Profiles in Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2006; 50: 1347–56. doi: 10.1016/j.eururo.2006.05.039.
 198. Mengual L, Burset M, Ars E, Lozano JJ, Villavicencio H, Ribal MJ, Alcaraz A. DNA microarray expression profiling of bladder cancer allows identification of noninvasive diagnostic markers. *J Urol* [Internet]. 2009; 182: 741–8. doi: 10.1016/j.juro.2009.03.084.
 199. Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Burset M, Fernández PL, Alcaraz A. Validation study of a noninvasive urine test for diagnosis and prognosis assessment of bladder cancer: Evidence for improved models. *J Urol.* 2014; 191: 261–9. doi: 10.1016/j.juro.2013.06.083.
 200. Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Palou J, Rodríguez-Faba O, Witjes JA, Van Der Heijden AG, Medina R, Conde JM, Marberger M, Schmidbauer J, Fernández PL, et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer.* 2016;

- 54: 131–8. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.003.
201. Han C, Mengual L, Kang B, Lozano JJ, Yang X, Zhang C, Alcaraz A, Liang J, Ye D. Validation of Urine-based Gene Classifiers for Detecting Bladder Cancer in a Chinese Study. *J Cancer* [Internet]. 2018; 9: 3208–15. doi: 10.7150/jca.24506.
202. Sin MLY, Mach KE, Sinha R, Wu F, Trivedi DR, Altobelli E, Jensen KC, Sahoo D, Lu Y, Liao JC. Deep Sequencing of Urinary RNAs for Bladder Cancer Molecular Diagnostics. 2017; 23: 3700–11. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2610.
203. Arcaro A. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Frontiers in Pharmacology*. 2013. doi: 10.3389/fphar.2013.00030.
204. Pignot G, Vieillefond A, Vacher S, Zerbib M, Debre B, Lidereau R, Amsellem-Ouazana D, Bieche I. Hedgehog pathway activation in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer*. 2012; . doi: 10.1038/bjc.2012.55.
205. Marcar L, MacLaine NJ, Hupp TR, Meek DW. Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res*. 2010; . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1341.
206. Dyrskjøt L, Zieger K, Kissow Lildal T, Reinert T, Gruselle O, Coche T, Borre M, Ørntoft TF. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 2012; . doi: 10.1038/bjc.2012.215.
207. Munksgaard PP, Mansilla F, Brems Eskildsen AS, Fristrup N, Birkenkamp-Demtröder K, Ulhøi BP, Borre M, Agerbæk M, Hermann GG, Rntoft TF, Dyrskjøt L. Low ANXA10 expression is associated with disease aggressiveness in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2011; . doi: 10.1038/bjc.2011.404.
208. van der Heijden AG, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Ribal MJ, Fernández PL, Oosterwijk E, Schalken JA, Alcaraz A, Witjes JA. A five-gene expression signature to predict progression in T1G3 bladder cancer. *Eur J Cancer*. 2016; . doi: 10.1016/j.ejca.2016.06.003.
209. Gázquez C, Ribal MJ, Marín-Aguilera M, Kayed H, Fernández PL, Mengual L, Alcaraz A. Biomarkers vs conventional histological analysis to detect lymph node micrometastases in bladder cancer: A real improvement? *BJU Int*. 2012; . doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11025.x.
210. Marín-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, Ars E, Ríos J, Gázquez C, Villavicencio H, Alcaraz A. Utility of urothelial mRNA markers in blood for staging and monitoring bladder cancer. *Urology*. 2012; . doi: 10.1016/j.urology.2011.09.006.
211. Yang J, Moses MA. Lipocalin 2: A multifaceted modulator of human cancer. *Cell Cycle*. 2009. doi: 10.4161/cc.8.15.9224.
212. Rodvold JJ, Mahadevan NR, Zanetti M. Lipocalin 2 in cancer: When good immunity goes bad. *Cancer Letters*. 2012. doi: 10.1016/j.canlet.2011.11.002.
213. Arthurs C, Murtaza BN, Thomson C, Dickens K, Henrique R, Patel HRH, Beltran M, Millar M, Thrasivoulou C, Ahmed A. Expression of ribosomal proteins in normal and cancerous human prostate tissue. *PLoS One*. 2017; . doi: 10.1371/journal.pone.0186047.
214. Nachbar J, Lažaro-Diéguez F, Prekeris R, Cohen D, Mušch A. KIF3 promotes mitotic

- progression and integrity of the central spindle in cytokinesis. *Cell Cycle*. 2014; . doi: 10.4161/cc.27266.
215. De S, Cipriano R, Jackson MW, Stark GR. Overexpression of kinesins mediates docetaxel resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2009; . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1224.
216. Ferra S, Denley R, Herr H, Dalbagni G, Jhanwar S, Lin O. Reflex UroVysion testing in suspicious urine cytology cases. *Cancer Cytopathol*. 2009; 117: 7–14. doi: 10.1002/cncy.20016.
217. Kim PH, Sukhu R, Cordon BH, Sfakianos JP, Sjoberg DD, Hakimi AA, Dalbagni G, Lin O, Herr HW. Reflex fluorescence in situ hybridization assay for suspicious urinary cytology in patients with bladder cancer with negative surveillance cystoscopy. *BJU Int*. 2014; 114: 354–9. doi: 10.1111/bju.12516.
218. Mengual L, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, Buset B, Villavicencio H, Oliver A, Alcaraz A. Clinical Utility of Fluorescent in situ Hybridization for the Surveillance of Bladder Cancer Patients Treated with Bacillus Calmette-Guerin Therapy. *Eur Urol*. 2007; . doi: 10.1016/j.eururo.2007.03.001.
219. Couffignal C, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, Ravery V, Ouzaid I, Roupret M, Phe V, Ciofu C, Tubach F, Mentre F, Cussenot O, Grandchamp B. The Diagnostic and Prognostic Performance of Urinary FGFR3 Mutation Analysis in Bladder Cancer Surveillance: A Prospective Multicenter Study. *Urology*. 2015. p. 1185–90. doi: 10.1016/j.urology.2015.07.036.
220. Zuiverloon TCM, Tjin SS, Busstra M, Bangma CH, Boevé ER, Zwarthoff EC. Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based FGFR3 mutation assay. *J Urol*. 2011; 186: 707–12. doi: 10.1016/j.juro.2011.03.141.
221. Kinde I, Munari E, Faraj SF, Hruban RH, Schoenberg M, Bivalacqua T, Allaf M, Springer S, Wang Y, Diaz LA, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, et al. TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. *Cancer Res*. 2013; 73: 7162–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2498.
222. Soloway MS, Sofer M, Vaidya A. Contemporary Management Of Stage T1 Transitional Cell Carcinoma Of The Bladder. *J Urol*. 2002; . doi: 10.1016/S0022-5347(05)65157-9.
223. Barkan GA, Wojcik EM, Nayar R, Savic-Prince S, Quek ML, Kurtycz DFI, Rosenthal DL. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Acta Cytologica*. 2016. doi: 10.1159/000446270.
224. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, King W. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in Urine. *J Mol Diagnostics*. 2000; . doi: 10.1016/S1525-1578(10)60625-3.
225. Halling KC, King W, Sokolova I a, Meyer RG, Burkhardt HM, Halling a C, Cheville JC, Sebo TJ, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz S, O’Kane DJ, Seelig S a, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* [Internet]. 2000; 164: 1768–75. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cit>

- ation&list_uids=11025767
226. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol.* 2001; . doi: 10.1309/K5P2-4Y8B-7L5A-FAA9.
 227. Placer J, Espinet B, Salido M, Solé F, Gelabert-Mas A. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur Urol.* 2002; . doi: 10.1016/S0302-2838(02)00448-7.
 228. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge J a, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, et al. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol.* 2002; 168: 1950–4. doi: 10.1097/01.ju.0000034254.89258.8e.
 229. M. B, H. H, A. B, H. G, R. B. Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: A tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU Int.* 2005; . doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05509.x.
 230. Zellweger T, Benz G, Cathomas G, Mihatsch MJ, Sulser T, Gasser TC, Bubendorf L. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer.* 2006; . doi: 10.1002/ijc.21704.
 231. Gudjónsson S, Isfoss BL, Hansson K, Domanski AM, Warenholt J, Soller W, Lundberg LM, Liedberg F, Grabe M, Månsson W. The Value of the UroVysion® Assay for Surveillance of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2008; . doi: 10.1016/j.eururo.2007.11.051.
 232. Gofrit ON, Zorn KC, Silvestre J, Shalhav AL, Zagaja GP, Msezane LP, Steinberg GD. The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2008; . doi: 10.1016/j.urolonc.2007.02.011.
 233. Daniely M, Rona R, Kaplan T, Olsfanger S, Elboim L, Freiburger A, Lew S, Leibovitch I. Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology. *Cancer.* 2007; . doi: 10.1002/cncr.23119.
 234. SKACEL M, FAHMY M, BRAINARD JA, PETTAY JD, BISCOTTI C V., LIOU LS, PROCOP GW, JONES JS, ULCHAKER J, ZIPPE CD, TUBBS RR. Multitarget Fluorescence In Situ Hybridization Assay Detects Transitional Cell Carcinoma in the Majority of Patients with Bladder Cancer and Atypical or Negative Urine Cytology. *J Urol [Internet].* 2003; 169: 2101–5. doi: 10.1097/01.ju.0000066842.45464.cc.
 235. Lotan Y, Bensalah K, Ruddell T, Shariat SF, Sagalowsky AI, Ashfaq R. Prospective Evaluation of the Clinical Usefulness of Reflex Fluorescence In Situ Hybridization Assay in Patients With Atypical Cytology for the Detection of Urothelial Carcinoma of the Bladder. *J Urol [Internet].* 2008; 179: 2164–9. doi: 10.1016/j.juro.2008.01.105.

ANNEX

7.1 Aproximacions metodològiques utilitzades en aquesta tesi

Les tècniques moleculars i citogenètiques que s'han utilitzat en aquesta tesi per a la recerca de biomarcadors diagnòstics i pronòstics en el CU es resumeixen a continuació:

7.1.1 Seqüenciació del RNA

Una de les tècniques més utilitzades avui en dia per l'anàlisi del RNA és la seqüenciació del RNA. Aquesta tecnologia, junt amb un anàlisi bioinformàtic específic, permeten l'estudi massiu i simultani de milions de seqüències de DNA en un únic experiment. Depenent de la cobertura desitjada i de l'objectiu de cada estudi hi ha diverses metodologies. En aquesta tesi hem utilitzat l'Ion AmpliSeq™ (ThermoFisher Scientific), un mètode dissenyat per l'anàlisi de l'expressió gènica, basat en la seqüenciació, que permet la quantificació de més de 20.000 transcrits RefSeq humans coneguts en una sola reacció d'amplificació. Es requereixen només 10 nanograms de RNA i és un metodologia compatible amb RNA considerat de mala qualitat o que presenti degradació com és el procedent de teixit parafinat o fluids biològics. A partir del número de transcrits identificats a cada mostra (*reads*), un cop normalitzats s'obtenen els valors d'expressió dels gens diana.

7.1.2 Hibridació *in situ* fluorescent

No hi ha cap dubte que el CU, així com la resta de neoplàsies, es deu a l'acumulació d'alteracions genètiques que acaben afectant a gens que regulen tant la divisió com la mort cel·lular. Les alteracions que més freqüentment ocasionen la neoplàsia poden suposar marcadors de la malaltia, de manera que la seva detecció podria ser clau no només en el diagnòstic del CU, sinó en el seu pronòstic.

La hibridació *in situ* fluorescent (FISH, de l'anglès, *Fluorescence in situ hybridization*) és una tècnica que permet la localització de determinades seqüències del DNA en una extensió cel·lular, identificant així la detecció de canvis numèrics i/o estructurals en aquestes regions. Aquesta tecnologia utilitza sondes de DNA marcades amb un fluorocrom les quals s'hibridaran sobre cèl·lules tant en interfase com en metafase. Existeixen dos tipus generals de sondes: les sondes d'enumeració cromosòmica (o CEPs, de l'anglès, *chromosome enumeration probes*) i les sondes locus-específiques (o LSIs, de l'anglès, *locus-specific indicators*). Les CEPs són sondes dissenyades per ser hibridades sobre el centròmer de manera que permeten la determinació del nombre de còpies d'un determinat cromosoma en una cèl·lula. CEPs per diferents cromosomes combinades en barreges multisonda poden proporcionar informació molt interessant de l'aneusomia cel·lular. Les sondes LSIs, en canvi, estan dissenyades per ser hibridades sobre locus específics, generalment en recerca d'alteracions en el nombre de còpies

d'un o varis gens d'interès. Bàsicament, la metodologia de la FISH consisteix en desnaturalitzar el DNA, hibridar-lo amb la sonda d'interès marcada i llegir la senyal en un microscopi de fluorescència (Figura 16).

Ja fa bastants anys des de que aquesta tècnica es va començar a utilitzar per a la detecció d'alteracions genètiques en el CU. En els treballs duts a terme per Sokolova i col·laboradors a l'any 2000, es va buscar la combinació de les alteracions més freqüents en el CU, amb la finalitat de realitzar un assaig en orina sensible i específic pel diagnòstic del CU mitjançant FISH. Com a regions candidates a estudiar es van incloure sondes CEPs pels cromosomes Y, 3, 7, 8, 9, 11, 15, 17 i 18, i una sonda LSI per a la regió 9p21. Com a resultat d'aquest treball es va establir que la detecció de 4 alteracions citogenètiques mitjançant 3 CEPs pels cromosomes 3, 7, i 17, i una LSI específica per a la regió 9p21, era la combinació amb més rendibilitat diagnòstica del CU, tant en sensibilitat com en especificitat. A més de la selecció de les sondes, es va establir un **criteri de positivitat** que consistia en la detecció de 4 o més nuclis amb polisomia en 2 o més cromosomes diferents, o en la detecció de 12 o més nuclis amb polisomia en un dels cromosomes marcats, o finalment en la detecció d'una deleció homozigòtica per a la regió 9p21 (com a única alteració) en el 50% o més de cèl·lules avaluades. La combinació de sondes avaluades sota aquest criteri va presentar una sensibilitat del 87% i una especificitat del 92% en la detecció del CU a partir de mostres d'orina per micció espontània [224]. A partir d'aquests resultats es va desenvolupar el kit comercial utilitzat en aquesta tesi: *Urovysion Bladder Cancer Recurrence Kit* (Vysis, Inc. Laboratoris Abbott), aprovat per l'americana FDA al 2001 pel seu ús a la pràctica clínica.

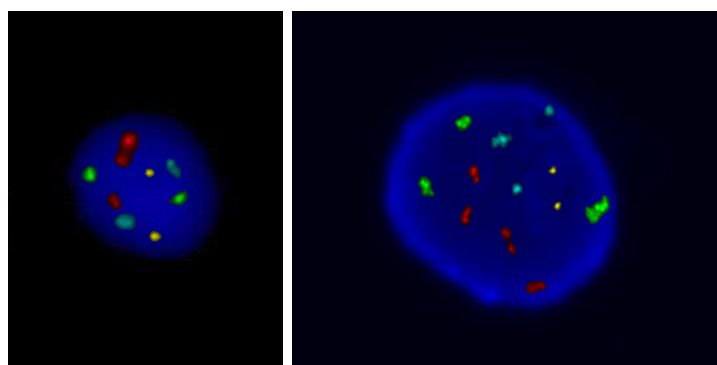


Figura 16. Composició d'imatges resultants del FISH amb superposició dels filtres per veure totes les sondes alhora. **A)** Cèl·lula amb distribució de còpies normal. **B)** Cèl·lula amb distribució de còpies anormal (vermell CEP 3: 4 còpies, verd CEP 7: 3 còpies, aqua CEP 17: 3 còpies).

Varis estudis han testat la utilitat d'aquest assaig basat en la tècnica FISH tant pel diagnòstic inicial del CU de bufeta com per les seves recurrències [157,225–228]. Alguns d'ells, com el de Bubendorf al 2001 o el de Halling al 2003 van modificar lleugerament el criteri de positivitat a les seves series de pacients amb la finalitat d'augmentar la sensibilitat de la tècnica. Aquesta tècnica també ha estat avaluada com a eina de predicció de recurrències tumorals de forma independent [229–232] o en combinació amb la citologia urinària [233], així com per acabar de dictaminar un diagnòstic en aquelles mostres amb un resultat sospitós de la citologia urinària [234,235].

7.1.3 Anàlisi de mutacions

L'anàlisi de mutacions utilitzat en aquesta tesi es basa en el Kit SNaPshot de la casa comercial Applied Biosystems. Es dissenyen sondes que hibriden al nucleòtid adjacent al lloc de la mutació diana que es vol estudiar. Aquestes sondes tenen un nombre de Ts diferent i específic per cadascuna d'elles a l'extrem 5'. Aquesta diferència de llargada permet la separació dels productes de l'extensió. Els productes es corren a un seqüenciador automàtic i s'analitzen les seqüències resultants en busca de canvis de nucleòtid.

7.1.4 Anàlisi de l'expressió gènica

Les cèl·lules tumorals presenten un patró d'expressió gènica diferent al de les cèl·lules normals del mateix teixit. A més, aquest patró d'expressió varia en funció del subtipus de tumor. Així, l'anàlisi de l'expressió gènica no només pot permetre el diagnòstic de la malaltia sinó la caracterització de la mateixa. En el present treball, les tècniques utilitzades per estudiar l'expressió gènica a nivell individual són les següents:

Transcripció reversa i PCR quantitativa

La **transcripció reversa** (RT, de l'anglès, *reverse transcription*) consisteix en convertir l'RNA missatger (RNAm) en DNA copia (cDNA), perquè així pugui ser amplificat mitjançant la **reacció en cadena de la polimerasa quantitativa** (qPCR, de l'anglès, *quantitative polymerase chain reaction*). Aquest procediment en conjunt és comunament conegut com **RT-qPCR**.

A la PCR convencional, el producte amplificat, anomenat amplicó, és detectat en un anàlisi a punt final corrent el DNA amplificat en un gel d'agarosa quan la reacció ha finalitzat. Per contra, la PCR a temps real permet l'acumulació del producte amplificat per a ser detectat i mesurat durant el progrés de la reacció, i per tant, és a "temps real".

Per altra banda, la **qPCR** és una de les tecnologies més utilitzades en els últims anys per realitzar l'anàlisi d'expressió d'un o de diversos gens d'interès. A més, aquesta tècnica també es pot utilitzar per l'anàlisi de polimorfismes com SNPs i microsatèl·lits. Algunes de les principals avantatges d'aquesta tècnica són: la necessitat de disposar de poc material de partida (10pg de cDNA), la possibilitat de detectar a temps real i d'una manera quantitativa l'amplificació dels gens d'interès, la obtenció ràpida (unes 2 hores) dels resultats, i el fet de que el mètode de detecció sigui fluorescent i per tant, no contaminant.

Els dos sistemes d'RT-qPCR més utilitzats, segons el mètode de detecció de l'amplificació, són els basats en *SYBER Green* i els basats en sondes *TaqMan*. El mètode utilitzat en aquest treball ha estat el basat en *SYBER Green*, que consisteix en la incorporació a la reacció d'una molècula fluorescent capaç d'unir-se a la obertura menor de la doble hèlix del DNA. Així, a mesura que es va produint l'amplificació i va augmentant el nombre de molècules de doble cadena, també va augmentant la fluorescència emesa.

nCounter

Una altra metodologia utilitzada en aquest treball per l'anàlisi de l'expressió gènica, així com per la detecció de microRNAs és el nCounter (NanoString Technologies, Seattle).

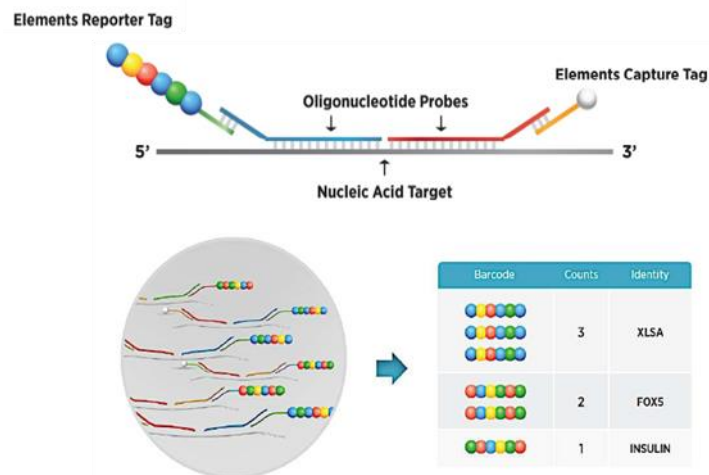


Figura 17. Esquema del disseny de les sondes per l'anàlisi amb el nCounter (cedides per IZASA Scientific).

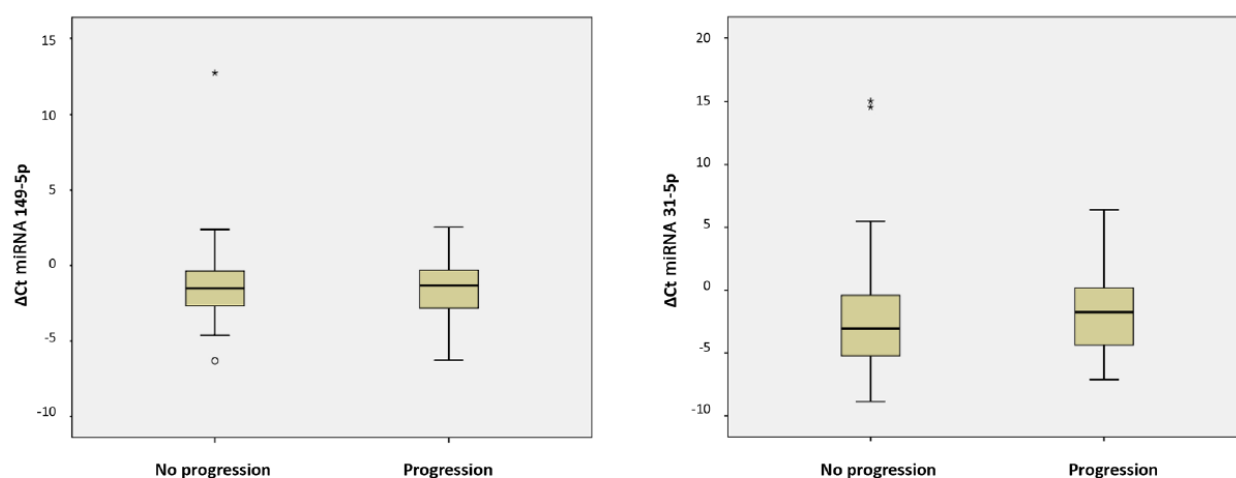
Aquesta metodologia permet detectar mRNAs o microRNAs a través d'uns codis moleculars anomenats *Reporter Probes* sense necessitar transcripció reversa de l'RNA (RT) ni necessitat d'amplificació. Està basada en la detecció digital i la codificació molecular directa de les molècules diana a través de parelles de sondes codificades. Una de les sondes, la *Reporter Probe*, s'uneix a l'extrem 5' de l'RNA i es tracta de la senyal codi específica per a la molècula

diana. La segona sonda, anomenada *Capture Probe*, és una biotina que s'uneix a l'extrem 3' de la molècula i serveix per provocar una conformació òptima de la molècula diana per a la lectura del codi. El codi de colors de la *Reporter Probe* consta de 6 posicions i cadascuna d'aquestes pot ser un de 4 colors, donant lloc a una gran diversitat de tags que poden ser barrejats conjuntament en una mateixa reacció per a una hibridació directa i en multiplex amb la molècula diana. Aquesta reacció, tot i ser en multiplex segueix sent específica i individualment identificable al moment de la recollida de dades (Figura 17).

7.1 Annex Treball 1

Prognostic microRNAs in upper tract urothelial carcinoma: multicenter and international validation study

SUPPLEMENTARY FIGURE AND TABLE



Supplementary Figure 1: Box plot of miRNA-149-5p and miRNA-31-5p expression pattern in progressing and non-progressing UTUC patients.

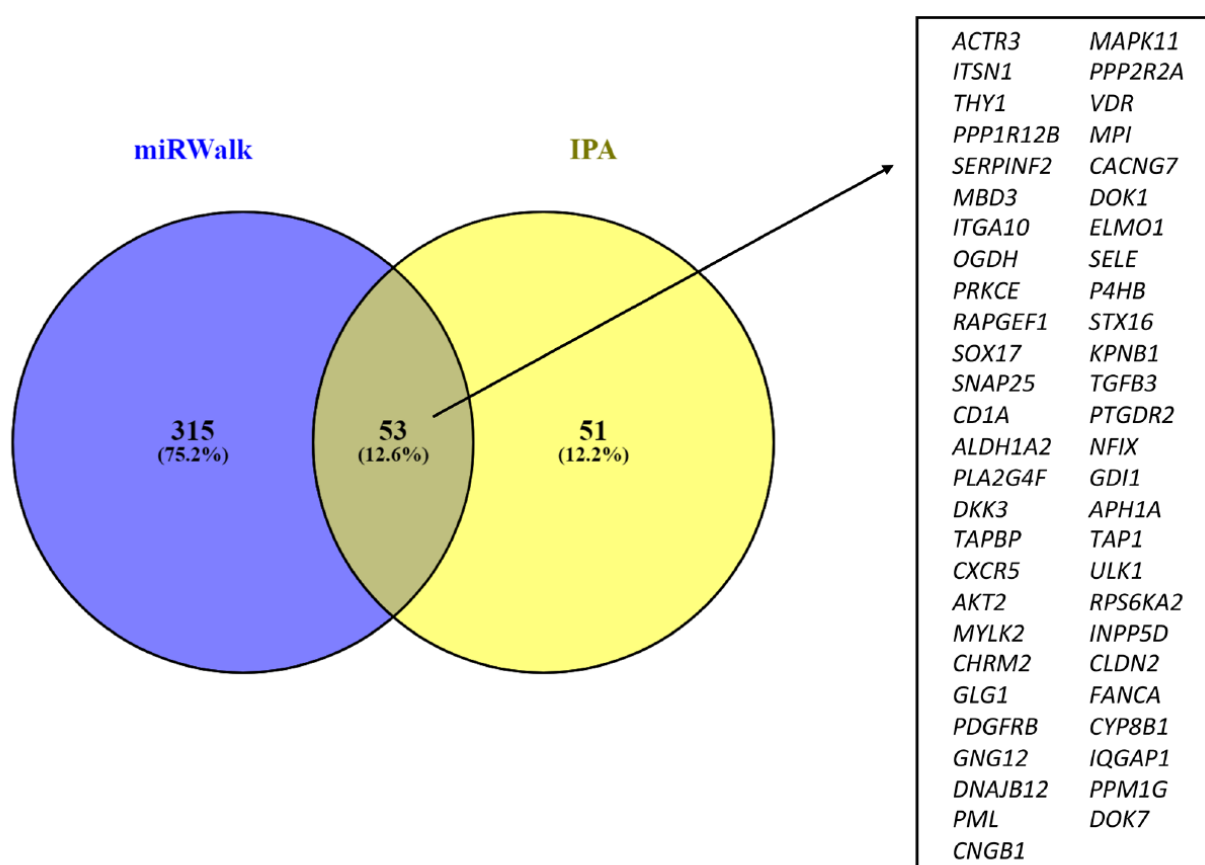
Supplementary Table 1: Altered predicted kyoto encyclopedia of genes and genomes pathways by miR-31-5p

KEGG pathway	miRNA-31-5p p-value	Genes involved
Thyroid hormone signaling pathway	0.0008	<i>MED12, ATP181, THRA, RCAN2, MED24, CCND1, HIF1A, ATP2A2, ATP1A1, RXRB and ACTB</i>
Steroid biosynthesis	0.0028	<i>DHCR24, CYP27B1</i>
Adherens junction	0.0089	<i>MET, VCL, RHOA, CTNNA1, PTPRJ, RAC1, MAP3K7, ACTB</i>
TNF signaling pathway	0.0100	<i>NFKB1, SELE, RPS6KA5, ICAM1, MAP3K14, MAPK9, MAPK8, CREB3L2, RIPK1, MAP3K7</i>
cGMP-PKG signaling pathway	0.0448	<i>CALM1, PPP1CC, GNA13, PDE3A, PPP3R1, ATP1B1, SLC25A5, RHOA, CALM2, PRKCE, IRS4, ITPR1, ITPR1, GNAQ, CREB3L2, ATP2A2, ATP1A1</i>
Inflammatory mediator regulation of TRP channels	0.0448	<i>IL1RAP, IL1R1, CALM1, PPP1CC, CALM2, PRKCE, MAPK9, MAPK8, PTGER2, ITPR1, GNAQ</i>

7.2 Annex Treball 2

Prognostic value of circulating microRNAs in upper tract urinary carcinoma

SUPPLEMENTARY MATERIALS



Supplementary Figure 1: Venny diagram showing target genes for miR-151b from miRWalk and IPA analysis. The 53 genes in common are listed in the box.

Supplementary Table 1: IPA predicted gene targets for miR-151b using TargetScan Human source.

See Supplementary File 1

7.3 Annex Treball 3

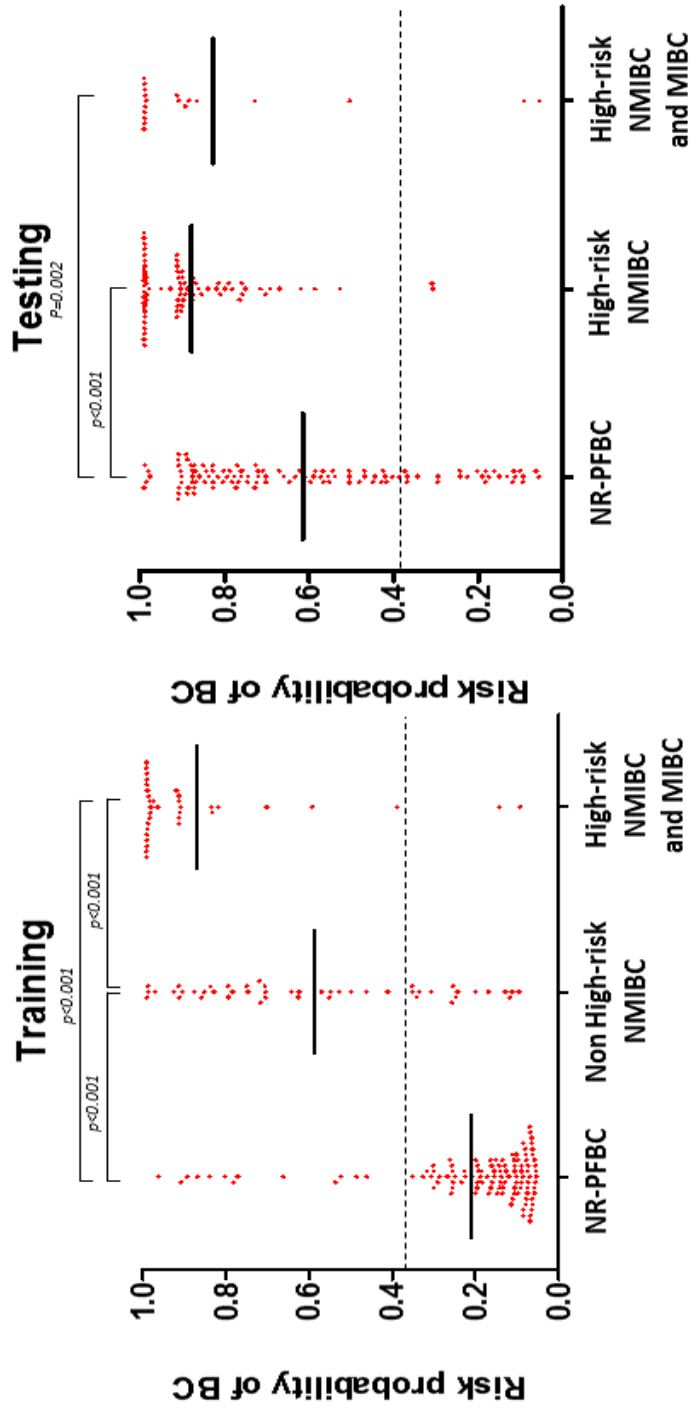
Supplementary Table 1. IPA predicted gene targets for miR-151b using TargetScan Human source.

Confidence of miR-151b target	Gene Symbol
Moderate (predicted)	<i>ABL1</i>
Moderate (predicted)	<i>ACTR3</i>
Moderate (predicted)	<i>ALDH1A2</i>
Moderate (predicted)	<i>AP1B1</i>
Moderate (predicted)	<i>AP1M2</i>
Moderate (predicted)	<i>ARHGDI1A</i>
Moderate (predicted)	<i>BET1L</i>
Moderate (predicted)	<i>CAPN1</i>
Moderate (predicted)	<i>CCNE1</i>
Moderate (predicted)	<i>CD1A</i>
Moderate (predicted)	<i>CDC7</i>
Moderate (predicted)	<i>CHRNA7</i>
Moderate (predicted)	<i>CHRNA4</i>
Moderate (predicted)	<i>CKM</i>
Moderate (predicted)	<i>CNGB1</i>
Moderate (predicted)	<i>CSK</i>
Moderate (predicted)	<i>CTF1</i>
Moderate (predicted)	<i>CXCL5</i>
Moderate (predicted)	<i>CXCR5</i>
Moderate (predicted)	<i>CYP8B1</i>
Moderate (predicted)	<i>DKK3</i>
Moderate (predicted)	<i>DLL1</i>
Moderate (predicted)	<i>DNAJB12</i>
Moderate (predicted)	<i>DNM1</i>
Moderate (predicted)	<i>DNM2</i>
Moderate (predicted)	<i>DYRK1B</i>
Moderate (predicted)	<i>EDNRA</i>
Moderate (predicted)	<i>EEF2</i>
Moderate (predicted)	<i>ELMO1</i>
Moderate (predicted)	<i>EPN1</i>
Moderate (predicted)	<i>FRAT1</i>
Moderate (predicted)	<i>GLG1</i>
Moderate (predicted)	<i>GNG12</i>
Moderate (predicted)	<i>GSTM4</i>
Moderate (predicted)	<i>IGF2</i>
Moderate (predicted)	<i>IL1RAPL1</i>
Moderate (predicted)	<i>IL27</i>
Moderate (predicted)	<i>INPP5D</i>
Moderate (predicted)	<i>IQGAP1</i>
Moderate (predicted)	<i>ITSN1</i>
Moderate (predicted)	<i>JUND</i>
Moderate (predicted)	<i>KPNB1</i>
Moderate (predicted)	<i>LSM4</i>
Moderate (predicted)	<i>MAP3K20</i>
Moderate (predicted)	<i>MAPK15</i>
Moderate (predicted)	<i>MXD1</i>
Moderate (predicted)	<i>MYL4</i>
Moderate (predicted)	<i>MYLK2</i>
Moderate (predicted)	<i>NDUFA11</i>
Moderate (predicted)	<i>NFIX</i>

Moderate (predicted)	<i>OGDH</i>
Moderate (predicted)	<i>P4HB</i>
Moderate (predicted)	<i>PABPN1</i>
Moderate (predicted)	<i>PAK6</i>
Moderate (predicted)	<i>PDGFA</i>
Moderate (predicted)	<i>PDGFRB</i>
Moderate (predicted)	<i>PKMYT1</i>
Moderate (predicted)	<i>PLA2G2C</i>
Moderate (predicted)	<i>PLA2G4F</i>
Moderate (predicted)	<i>PLD1</i>
Moderate (predicted)	<i>PPM1G</i>
Moderate (predicted)	<i>PPP1R14B</i>
Moderate (predicted)	<i>PPP2R2A</i>
Moderate (predicted)	<i>PRKCE</i>
Moderate (predicted)	<i>PSMF1</i>
Moderate (predicted)	<i>RAPGEF1</i>
Moderate (predicted)	<i>RPS6KA2</i>
Moderate (predicted)	<i>S1PR2</i>
Moderate (predicted)	<i>SELE</i>
Moderate (predicted)	<i>SNAP25</i>
Moderate (predicted)	<i>SNRNP25</i>
Moderate (predicted)	<i>SOX12</i>
Moderate (predicted)	<i>SOX17</i>
Moderate (predicted)	<i>STX16</i>
Moderate (predicted)	<i>TAP1</i>
Moderate (predicted)	<i>TAPBP</i>
Moderate (predicted)	<i>TGFB3</i>
Moderate (predicted)	<i>THY1</i>
Moderate (predicted)	<i>UBE2Z</i>
Moderate (predicted)	<i>ULK1</i>
Moderate (predicted)	<i>VDR</i>
High (predicted)	<i>AKT2</i>
High (predicted)	<i>APH1A</i>
High (predicted)	<i>CACNG7</i>
High (predicted)	<i>CHRM2</i>
High (predicted)	<i>CLDN2</i>
High (predicted)	<i>DOK1</i>
High (predicted)	<i>DOK7</i>
High (predicted)	<i>FANCA</i>
High (predicted)	<i>FKBP1A</i>
High (predicted)	<i>GDI1</i>
High (predicted)	<i>GRIN1</i>
High (predicted)	<i>GSTM1</i>
High (predicted)	<i>IL36RN</i>
High (predicted)	<i>ITGA10</i>
High (predicted)	<i>LHCGR</i>
High (predicted)	<i>MAPK11</i>
High (predicted)	<i>MBD3</i>
High (predicted)	<i>MPI</i>
High (predicted)	<i>PML</i>
High (predicted)	<i>PPP1R12B</i>
High (predicted)	<i>PTGDR2</i>
High (predicted)	<i>SERPINF2</i>
High (predicted)	<i>SH3BP4</i>

Supplementary material

Figure S1. Risk of tumor probability representation according to the 8-gene expression classifier in combination with cytology results in training and testing sets (cut-off = 0.38).



Abbreviations: BC, Bladder Cancer, NR-PFBC, non-recurrent control patients in follow up for BC; NMIBC, Non-Muscle Invasive Bladder Cancer; MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer.

Supplementary Table 1. List of the 521 genes differentially expressed specifically in low/intermediate-risk tumors.

HGNC symbol	ID	p-value	FC	FDR
<i>LYSMD1</i>	NM_212551	0,000	-2,0	0,321
<i>MDK</i>	NM_001012334	0,033	-1,8	0,615
<i>SLC2A1</i>	NM_006516	0,036	-1,8	0,615
<i>TMEM106C</i>	NM_001143842	0,007	-1,8	0,609
<i>PIAS3</i>	NM_006099	0,001	-1,7	0,563
<i>TWSG1</i>	NM_020648	0,015	-1,7	0,615
<i>SNORA71C</i>	NR_003017	0,006	-1,7	0,609
<i>ARHGEF5</i>	NM_005435	0,013	-1,7	0,615
<i>NR_037605</i>	NR_037605	0,011	-1,7	0,615
<i>NR_001566</i>	NR_001566	0,050	-1,7	0,616
<i>DLG5</i>	NM_004747	0,019	-1,7	0,615
<i>PGRMC1</i>	NM_006667	0,019	-1,7	0,615
<i>POLG2</i>	NM_007215	0,003	-1,7	0,609
<i>UBE2O</i>	NM_022066	0,009	-1,6	0,609
<i>DSG2</i>	NM_001943	0,044	-1,6	0,615
<i>PIGT</i>	NM_015937	0,001	-1,6	0,564
<i>FRRS1</i>	NM_001013660	0,009	-1,6	0,609
<i>LGALS3BP</i>	NM_005567	0,043	-1,6	0,615
<i>NUSAP1</i>	NM_018454	0,020	-1,6	0,615
<i>PRIMPOL</i>	NM_152683	0,001	-1,6	0,604
<i>EPN2</i>	NM_014964	0,021	-1,6	0,615
<i>MEX3C</i>	NM_016626	0,002	-1,6	0,609
<i>FAM46C</i>	NM_017709	0,049	-1,6	0,616
<i>NR_023358</i>	NR_023358	0,014	-1,6	0,615
<i>PTPLB</i>	NM_198402	0,006	-1,6	0,609
<i>EIF2AK1</i>	NM_014413	0,000	-1,6	0,376
<i>YES1</i>	NM_005433	0,017	-1,6	0,615
<i>RETSAT</i>	NM_017750	0,006	-1,6	0,609
<i>NR_003003</i>	NR_003003	0,008	-1,6	0,609
<i>DAG1</i>	NM_001177639	0,019	-1,6	0,615
<i>CASK</i>	NM_003688	0,008	-1,6	0,609
<i>HIST2H3D</i>	NM_001123375	0,031	-1,5	0,615
<i>NR_003265</i>	NR_003265	0,001	-1,5	0,563
<i>ID2</i>	NM_002166	0,030	-1,5	0,615
<i>HIST1H2AH</i>	NM_080596	0,035	-1,5	0,615
<i>PLXNA2</i>	NM_025179	0,004	-1,5	0,609
<i>PPP1R16A</i>	NM_032902	0,018	-1,5	0,615
<i>ROCK2</i>	NM_004850	0,005	-1,5	0,609
<i>CSNK2A1</i>	NM_001895	0,006	-1,5	0,609
<i>MED24</i>	NM_014815	0,022	-1,5	0,615

PGRMC2	NM_006320	0,033	-1,5	0,615
CKS1B	NM_001826	0,035	-1,5	0,615
HIST1H4A	NM_003538	0,031	-1,5	0,615
LIG1	NM_000234	0,048	-1,5	0,616
HIST1H2AG	NM_021064	0,042	-1,5	0,615
ADAM15	NM_207197	0,047	-1,5	0,615
CARM1	NM_199141	0,007	-1,5	0,609
NR_026900	NR_026900	0,026	-1,5	0,615
NCOA6	NM_014071	0,000	-1,5	0,377
TARS	NM_152295	0,039	-1,5	0,615
DDRGK1	NM_023935	0,029	-1,5	0,615
MOGS	NM_006302	0,009	-1,5	0,609
VPS72	NM_005997	0,004	-1,5	0,609
SHC1	NM_001130040	0,000	-1,5	0,321
PSMG1	NM_003720	0,016	-1,5	0,615
SPICE1	NM_144718	0,032	-1,5	0,615
FAM210B	NM_080821	0,025	-1,5	0,615
NEDD4	NM_198400	0,016	-1,5	0,615
GDPD3	NM_024307	0,045	-1,4	0,615
CUL7	NM_001168370	0,027	-1,4	0,615
TBCD	NM_005993	0,017	-1,4	0,615
C14orf1	NM_007176	0,040	-1,4	0,615
UAP1	NM_003115	0,034	-1,4	0,615
WRB	NM_004627	0,000	-1,4	0,321
HIST1H2AM	NM_003514	0,039	-1,4	0,615
H2AFX	NM_002105	0,025	-1,4	0,615
RAB13	NM_002870	0,002	-1,4	0,609
PMM1	NM_002676	0,008	-1,4	0,609
POLR3D	NM_001722	0,031	-1,4	0,615
ZNF8	NM_021089	0,002	-1,4	0,609
TAF1C	NM_139353	0,036	-1,4	0,615
DGKQ	NM_001347	0,018	-1,4	0,615
MCM7	NM_005916	0,032	-1,4	0,615
BET1	NM_005868	0,037	-1,4	0,615
HIST1H2BD	NM_021063	0,026	-1,4	0,615
PRKRA	NM_003690	0,045	-1,4	0,615
PIEZO1	NM_001142864	0,043	-1,4	0,615
RPP21	NM_001199120	0,010	-1,4	0,609
SIPA1L3	NM_015073	0,014	-1,4	0,615
NR_003108	NR_003108	0,012	-1,4	0,615
NCAPD2	NM_014865	0,011	-1,4	0,615
UQCC3	NM_001085372	0,015	-1,4	0,615
NOL10	NM_024894	0,012	-1,4	0,615
TMEM39A	NM_018266	0,020	-1,4	0,615
QSOX1	NM_002826	0,012	-1,4	0,615

EXT1	NM_000127	0,031	-1,4	0,615
TSTD1	NM_001113207	0,018	-1,4	0,615
DMAP1	NM_001034024	0,004	-1,4	0,609
PTOV1	NM_017432	0,000	-1,4	0,391
JAGN1	NM_032492	0,029	-1,4	0,615
RBM4B	NM_031492	0,039	-1,4	0,615
HIST1H2BE	NM_003523	0,043	-1,4	0,615
ZNF737	NM_001159293	0,042	-1,4	0,615
PPP2R5D	NM_006245	0,013	-1,4	0,615
VRK1	NM_003384	0,048	-1,4	0,615
MTMR4	NM_004687	0,002	-1,4	0,609
ZNF692	NM_017865	0,020	-1,4	0,615
RPRD1B	NM_021215	0,001	-1,4	0,563
DPM2	NM_003863	0,043	-1,4	0,615
DDX49	NM_019070	0,020	-1,4	0,615
HMGN1	NM_004965	0,040	-1,4	0,615
MBNL1	NM_207293	0,004	-1,4	0,609
ERGIC3	NM_198398	0,038	-1,4	0,615
NOMO3	NM_001004067	0,029	-1,4	0,615
KRTCAP2	NM_173852	0,035	-1,4	0,615
HECTD3	NM_024602	0,016	-1,4	0,615
MALSU1	NM_138446	0,010	-1,4	0,609
CEP57L1	NM_173830	0,036	-1,4	0,615
PEX19	NM_001193644	0,016	-1,4	0,615
DDB1	NM_001923	0,035	-1,4	0,615
LRRC14	NM_014665	0,034	-1,4	0,615
MPZL1	NM_003953	0,016	-1,4	0,615
ROMO1	NM_080748	0,048	-1,4	0,616
UCKL1	NM_017859	0,047	-1,4	0,615
COG4	NM_015386	0,001	-1,4	0,604
DALRD3	NM_001009996	0,021	-1,4	0,615
DVL1	NM_004421	0,032	-1,4	0,615
PCMTD1	NM_052937	0,017	-1,4	0,615
TOMM20	NM_014765	0,040	-1,4	0,615
RPN2	NM_002951	0,048	-1,4	0,615
CRYZL1	NM_145858	0,014	-1,4	0,615
INCENP	NM_001040694	0,047	-1,4	0,615
PDZD11	NM_016484	0,046	-1,4	0,615
KARS	NM_001130089	0,023	-1,4	0,615
LCLAT1	NM_001002257	0,028	-1,4	0,615
EMC8	NM_006067	0,011	-1,4	0,615
PIGC	NM_153747	0,006	-1,4	0,609
NUDCD3	NM_015332	0,018	-1,4	0,615
TSTA3	NM_003313	0,005	-1,4	0,609
ACOT8	NM_005469	0,003	-1,4	0,609

VKORC1L1	NM_173517	0,035	-1,4	0,615
MCFD2	NM_001171507	0,013	-1,4	0,615
MAF1	NM_032272	0,004	-1,4	0,609
ATF4	NM_182810	0,008	-1,4	0,609
SIAH2	NM_005067	0,016	-1,4	0,615
MPLKIP	NM_138701	0,005	-1,4	0,609
BCL2L1	NM_138578	0,026	-1,4	0,615
VAMP4	NM_003762	0,008	-1,4	0,609
SLC38A2	NM_018976	0,045	-1,4	0,615
CDK2	NM_001798	0,019	-1,4	0,615
PPP2R5B	NM_006244	0,010	-1,4	0,609
MIB1	NM_020774	0,004	-1,3	0,609
HIST1H4D	NM_003539	0,041	-1,3	0,615
DCAF12	NM_015397	0,047	-1,3	0,615
C16orf52	NM_001164579	0,028	-1,3	0,615
JOSD2	NM_138334	0,040	-1,3	0,615
ANKMY2	NM_020319	0,045	-1,3	0,615
UBXN6	NM_025241	0,010	-1,3	0,609
MEA1	NM_014623	0,006	-1,3	0,609
USP42	NM_032172	0,007	-1,3	0,609
TTL12	NM_015140	0,014	-1,3	0,615
F11R	NM_016946	0,010	-1,3	0,609
FOCAD	NM_017794	0,022	-1,3	0,615
C1GALT1	NM_020156	0,019	-1,3	0,615
USP39	NM_006590	0,006	-1,3	0,609
TUBB4B	NM_006088	0,041	-1,3	0,615
TTC33	NM_012382	0,004	-1,3	0,609
TECR	NM_138501	0,039	-1,3	0,615
C16orf70	NM_025187	0,019	-1,3	0,615
TCEB3	NM_003198	0,037	-1,3	0,615
COMMD2	NM_016094	0,003	-1,3	0,609
MAT2A	NM_005911	0,042	-1,3	0,615
FAM220A	NM_001037163	0,011	-1,3	0,615
SMG5	NM_015327	0,006	-1,3	0,609
MEAF6	NM_022756	0,022	-1,3	0,615
EIF2B4	NM_172195	0,032	-1,3	0,615
SIKE1	NM_001102396	0,008	-1,3	0,609
CCP110	NM_001199022	0,032	-1,3	0,615
PCGF1	NM_032673	0,048	-1,3	0,615
UNC119B	NM_001080533	0,009	-1,3	0,609
PYGO2	NM_138300	0,024	-1,3	0,615
POLR1D	NM_152705	0,027	-1,3	0,615
ZNF841	NM_001136499	0,047	-1,3	0,615
SRSF6	NM_006275	0,024	-1,3	0,615
TMEM101	NM_032376	0,036	-1,3	0,615

COP56	NM_006833	0,031	-1,3	0,615
PNPLA2	NM_020376	0,027	-1,3	0,615
TBPL1	NM_004865	0,004	-1,3	0,609
NFKBIL1	NM_005007	0,004	-1,3	0,609
ASCC2	NM_032204	0,008	-1,3	0,609
CCNL2	NM_030937	0,037	-1,3	0,615
MAPK9	NM_002752	0,014	-1,3	0,615
PPCS	NM_024664	0,004	-1,3	0,609
FAM98C	NM_174905	0,008	-1,3	0,609
SLC39A7	NM_001077516	0,041	-1,3	0,615
DPY30	NM_032574	0,030	-1,3	0,615
WDR45B	NM_019613	0,037	-1,3	0,615
DYNC1LI2	NM_006141	0,019	-1,3	0,615
CTDSPL2	NM_016396	0,016	-1,3	0,615
SESTD1	NM_178123	0,044	-1,3	0,615
RNF138	NM_001191324	0,042	-1,3	0,615
STK35	NM_080836	0,007	-1,3	0,609
KLHL36	NM_024731	0,028	-1,3	0,615
BTBD6	NM_033271	0,045	-1,3	0,615
CEP350	NM_014810	0,004	-1,3	0,609
WASF2	NM_006990	0,037	-1,3	0,615
C3orf38	NM_173824	0,032	-1,3	0,615
IRF3	NM_001571	0,006	-1,3	0,609
FOXJ3	NM_014947	0,000	-1,3	0,321
NR_040058	NR_040058	0,040	-1,3	0,615
SF3B5	NM_031287	0,040	-1,3	0,615
EIF4G1	NM_001194947	0,025	-1,3	0,615
H2AFZ	NM_002106	0,010	-1,3	0,610
TMED2	NM_006815	0,011	-1,3	0,615
COX6A1	NM_004373	0,010	-1,3	0,609
TMEM185A	NM_032508	0,031	-1,3	0,615
HECTD4	NM_001109662	0,039	-1,3	0,615
PTBP1	NM_002819	0,007	-1,3	0,609
PSMD2	NM_002808	0,017	-1,3	0,615
FAM122B	NM_001170756	0,046	-1,3	0,615
GPAA1	NM_003801	0,039	-1,3	0,615
WDR13	NM_017883	0,004	-1,3	0,609
LMBR1L	NM_018113	0,008	-1,3	0,609
YTHDF1	NM_017798	0,015	-1,3	0,615
ANKIB1	NM_019004	0,027	-1,3	0,615
SNRNP200	NM_014014	0,026	-1,3	0,615
ZFP91	NM_053023	0,007	-1,3	0,609
TMEM87B	NM_032824	0,028	-1,3	0,615
SMARCD2	NM_001098426	0,005	-1,3	0,609
SUMO2	NM_006937	0,009	-1,3	0,609

C9orf78	NM_016520	0,030	-1,3	0,615
ZNF836	NM_001102657	0,032	-1,3	0,615
HSDL1	NM_031463	0,023	-1,3	0,615
HEATR5B	NM_019024	0,015	-1,3	0,615
BTD	NM_000060	0,013	-1,3	0,615
MED19	NM_153450	0,021	-1,3	0,615
DNA2	NM_001080449	0,038	-1,3	0,615
SRRT	NM_015908	0,040	-1,3	0,615
RAB6A	NM_002869	0,003	-1,3	0,609
PSMB4	NM_002796	0,009	-1,3	0,609
SLC10A3	NM_001142392	0,041	-1,3	0,615
PSMA7	NM_002792	0,015	-1,3	0,615
ATL2	NM_001135673	0,037	-1,3	0,615
SSR2	NM_003145	0,035	-1,3	0,615
NR_038361	NR_038361	0,049	-1,3	0,616
NUP54	NM_017426	0,014	-1,3	0,615
TMUB1	NM_001136044	0,050	-1,3	0,616
KLC4	NM_201523	0,032	-1,3	0,615
AP2M1	NM_001025205	0,014	-1,3	0,615
PEX5	NM_000319	0,046	-1,3	0,615
WRAP73	NM_017818	0,039	-1,3	0,615
MTIF3	NM_001166261	0,007	-1,3	0,609
DNAJB11	NM_016306	0,046	-1,3	0,615
NDUFS2	NM_001166159	0,033	-1,3	0,615
RWDD4	NM_152682	0,029	-1,3	0,615
TEX261	NM_144582	0,025	-1,3	0,615
CLK2	NM_003993	0,037	-1,3	0,615
RNF7	NM_014245	0,041	-1,3	0,615
SPPL2B	NM_152988	0,048	-1,3	0,615
MRPL53	NM_053050	0,036	-1,3	0,615
ELOF1	NM_032377	0,022	-1,3	0,615
SMURF2	NM_022739	0,032	-1,3	0,615
GTF3C2	NM_001035521	0,047	-1,3	0,615
IDH3G	NM_004135	0,041	-1,3	0,615
HDAC1	NM_004964	0,017	-1,3	0,615
CLPTM1	NM_001294	0,013	-1,3	0,615
MAN1A2	NM_006699	0,027	-1,3	0,615
CRCP	NM_001142414	0,005	-1,2	0,609
TMEM87A	NM_015497	0,035	-1,2	0,615
APH1A	NM_001077628	0,011	-1,2	0,615
TAOK2	NM_016151	0,017	-1,2	0,615
CLEC16A	NM_015226	0,007	-1,2	0,609
RCE1	NM_005133	0,034	-1,2	0,615
PSMC4	NM_006503	0,030	-1,2	0,615
NR_024565	NR_024565	0,021	-1,2	0,615

RAB40C	NM_001172665	0,042	-1,2	0,615
DEK	NM_003472	0,014	-1,2	0,615
TCHP	NM_001143852	0,027	-1,2	0,615
ARNT	NM_001668	0,009	-1,2	0,609
UBR7	NM_175748	0,049	-1,2	0,616
LTN1	NM_015565	0,033	-1,2	0,615
PIGS	NM_033198	0,031	-1,2	0,615
YWHAZ	NM_001135699	0,012	-1,2	0,615
PTPRA	NM_080841	0,010	-1,2	0,610
VPS4A	NM_013245	0,031	-1,2	0,615
C5orf51	NM_175921	0,037	-1,2	0,615
COPG1	NM_016128	0,017	-1,2	0,615
NUCB1	NM_006184	0,009	-1,2	0,609
ENSA	NM_004436	0,036	-1,2	0,615
CCDC59	NM_014167	0,047	-1,2	0,615
COX19	NM_001031617	0,033	-1,2	0,615
ZNF12	NM_016265	0,020	-1,2	0,615
MKRN1	NM_013446	0,019	-1,2	0,615
HAX1	NM_006118	0,038	-1,2	0,615
SYS1	NM_033542	0,012	-1,2	0,615
POLR2B	NM_000938	0,025	-1,2	0,615
DAD1	NM_001344	0,014	-1,2	0,615
ARIH2	NM_006321	0,015	-1,2	0,615
ZMPSTE24	NM_005857	0,049	-1,2	0,616
COX15	NM_078470	0,029	-1,2	0,615
HADHB	NM_000183	0,030	-1,2	0,615
VBP1	NM_003372	0,044	-1,2	0,615
DCAF11	NM_001163484	0,017	-1,2	0,615
MTA2	NM_004739	0,035	-1,2	0,615
YIPF6	NM_173834	0,023	-1,2	0,615
PI4KB	NM_001198774	0,032	-1,2	0,615
PSMF1	NM_006814	0,043	-1,2	0,615
WIPI2	NM_016003	0,037	-1,2	0,615
INPPL1	NM_001567	0,023	-1,2	0,615
TBC1D20	NM_144628	0,008	-1,2	0,609
POGZ	NM_015100	0,041	-1,2	0,615
AHCYL1	NM_006621	0,046	-1,2	0,615
LSM14B	NM_144703	0,027	-1,2	0,615
ATXN1L	NM_001137675	0,035	-1,2	0,615
XPO7	NM_015024	0,044	-1,2	0,615
GABPA	NM_002040	0,030	-1,2	0,615
INTS4	NM_033547	0,043	-1,2	0,615
ADRM1	NM_175573	0,048	-1,2	0,616
CPSF6	NM_007007	0,039	-1,2	0,615
KHNYN	NM_015299	0,025	-1,2	0,615

WDR83OS	NM_016145	0,016	-1,2	0,615
MLX	NM_170607	0,014	-1,2	0,615
ATG4B	NM_013325	0,040	-1,2	0,615
CHTOP	NM_001206612	0,025	-1,2	0,615
RALGAPB	NM_020336	0,023	-1,2	0,615
ZFPL1	NM_006782	0,032	-1,2	0,615
RAB22A	NM_020673	0,032	-1,2	0,615
ALKBH5	NM_017758	0,047	-1,2	0,615
UBTF	NM_014233	0,029	-1,2	0,615
RARS2	NM_020320	0,049	-1,2	0,616
RNF114	NM_018683	0,025	-1,2	0,615
CIAO1	NM_004804	0,008	-1,2	0,609
NAPG	NM_003826	0,050	-1,2	0,616
BSDC1	NM_018045	0,048	-1,2	0,616
HP1BP3	NM_016287	0,046	-1,1	0,615
SCAF8	NM_014892	0,014	1,2	0,615
SPAG7	NM_004890	0,034	1,2	0,615
HIAT1	NM_033055	0,036	1,2	0,615
PHF20	NM_016436	0,047	1,2	0,615
TRIM33	NM_015906	0,019	1,2	0,615
ECD	NM_007265	0,029	1,2	0,615
ACTR2	NM_001005386	0,039	1,2	0,615
ARPC4	NM_001024959	0,025	1,2	0,615
RPS6KA3	NM_004586	0,050	1,2	0,616
PHF11	NM_001040443	0,046	1,3	0,615
TRAK1	NM_001042646	0,020	1,3	0,615
MAP7D1	NM_018067	0,037	1,3	0,615
ATP6V1A	NM_001690	0,028	1,3	0,615
BLOC1S2	NM_173809	0,034	1,3	0,615
TMSB4X	NM_021109	0,036	1,3	0,615
FUS	NM_004960	0,013	1,3	0,615
SH3BP2	NM_001145856	0,045	1,3	0,615
FAM53B	NM_014661	0,027	1,3	0,615
RNASEK	NM_001004333	0,031	1,3	0,615
PM20D2	NM_001010853	0,024	1,3	0,615
RNF135	NM_032322	0,016	1,3	0,615
NFKBIE	NM_004556	0,043	1,3	0,615
ATOX1	NM_004045	0,035	1,3	0,615
TEP1	NM_007110	0,042	1,3	0,615
SGK3	NM_001033578	0,036	1,3	0,615
IFNGR2	NM_005534	0,026	1,3	0,615
NR_033417	NR_033417	0,028	1,3	0,615
NMT2	NM_004808	0,046	1,3	0,615
DOPEY2	NM_005128	0,046	1,3	0,615
NR_026891	NR_026891	0,039	1,3	0,615

TCF20	NM_005650	0,024	1,3	0,615
TINF2	NM_001099274	0,006	1,3	0,609
ZNF44	NM_001164276	0,008	1,3	0,609
TPCN2	NM_139075	0,023	1,3	0,615
ZNF708	NM_021269	0,021	1,3	0,615
SREBF1	NM_001005291	0,021	1,4	0,615
MARCKS	NM_002356	0,029	1,4	0,615
SERPINB8	NM_002640	0,039	1,4	0,615
HIVEP2	NM_006734	0,047	1,4	0,615
SMYD4	NM_052928	0,044	1,4	0,615
GNAI2	NM_002070	0,050	1,4	0,616
QKI	NM_006775	0,020	1,4	0,615
ORAI2	NM_032831	0,043	1,4	0,615
ARSB	NM_000046	0,033	1,4	0,615
RHOQ	NM_012249	0,012	1,4	0,615
TLR7	NM_016562	0,048	1,4	0,615
CPEB4	NM_030627	0,044	1,4	0,615
C21orf62	NM_001162496	0,047	1,4	0,615
TGFB1	NM_000660	0,042	1,4	0,615
RELB	NM_006509	0,012	1,4	0,615
LONRF1	NM_152271	0,015	1,4	0,615
HPSE	NM_001098540	0,032	1,4	0,615
ZNF2	NM_021088	0,042	1,4	0,615
RANBP2	NM_006267	0,014	1,4	0,615
MYLK3	NM_182493	0,047	1,4	0,615
CORO7- PAM16	NM_001201472	0,044	1,4	0,615
TRPM6	NM_001177310	0,046	1,4	0,615
NR_038862	NR_038862	0,036	1,4	0,615
TRAPPC2	NM_001128835	0,042	1,4	0,615
FTH1	NM_002032	0,022	1,4	0,615
SGTB	NM_019072	0,043	1,4	0,615
ITPR2	NM_002223	0,031	1,4	0,615
SPIB	NM_003121	0,026	1,4	0,615
ITM2B	NM_021999	0,028	1,4	0,615
NUAK2	NM_030952	0,038	1,4	0,615
GNL3L	NM_019067	0,042	1,4	0,615
PSTPIP2	NM_024430	0,033	1,4	0,615
CYBA	NM_000101	0,034	1,4	0,615
RAPGEF2	NM_014247	0,007	1,4	0,609
POU2AF1	NM_006235	0,040	1,4	0,615
SLC25A15	NM_014252	0,030	1,4	0,615
SIRPB2	NM_001122962	0,036	1,5	0,615
RNF144B	NM_182757	0,048	1,5	0,616
CHST6	NM_021615	0,034	1,5	0,615

ZFYVE16	NM_014733	0,033	1,5	0,615
NR_027180	NR_027180	0,043	1,5	0,615
CXCL16	NM_022059	0,030	1,5	0,615
ATP6V0A2	NM_012463	0,006	1,5	0,609
PLEKHH1	NM_020715	0,017	1,5	0,615
SLC5A5	NM_000453	0,047	1,5	0,615
NR_038444	NR_038444	0,039	1,5	0,615
UBOX5	NM_014948	0,007	1,5	0,609
BHMT2	NM_017614	0,043	1,5	0,615
RASSF5	NM_182663	0,024	1,5	0,615
TMEM213	NM_001085429	0,033	1,5	0,615
ATP2A3	NM_174953	0,048	1,5	0,615
NR_037879	NR_037879	0,034	1,5	0,615
TLR6	NM_006068	0,027	1,5	0,615
ATG7	NM_006395	0,007	1,5	0,609
KCNJ5	NM_000890	0,022	1,5	0,615
MILR1	NM_001085423	0,021	1,5	0,615
IFIH1	NM_022168	0,022	1,5	0,615
SV2B	NM_014848	0,014	1,5	0,615
IMPA2	NM_014214	0,018	1,5	0,615
DFFB	NM_004402	0,009	1,5	0,609
NCKAP1L	NM_005337	0,041	1,5	0,615
RNF130	NM_018434	0,049	1,5	0,616
CARF	NM_001104586	0,016	1,5	0,615
SEPT6	NM_015129	0,028	1,5	0,615
CCDC88B	NM_032251	0,037	1,5	0,615
NR_003503	NR_003503	0,018	1,5	0,615
C10orf54	NM_022153	0,048	1,5	0,615
TATDN3	NM_001042552	0,010	1,5	0,609
ZFP42	NM_174900	0,013	1,5	0,615
DENND1C	NM_024898	0,044	1,5	0,615
MTRNR2L8	NM_001190702	0,003	1,5	0,609
TNFAIP2	NM_006291	0,026	1,6	0,615
KLHL5	NM_001007075	0,001	1,6	0,563
TNFAIP8	NM_014350	0,044	1,6	0,615
SLC15A4	NM_145648	0,040	1,6	0,615
AXL	NM_021913	0,013	1,6	0,615
LYN	NM_002350	0,029	1,6	0,615
TMEM154	NM_152680	0,040	1,6	0,615
NPL	NM_030769	0,044	1,6	0,615
PNMA2	NM_007257	0,004	1,6	0,609
SLC43A2	NM_152346	0,040	1,6	0,615
LAPTM5	NM_006762	0,049	1,6	0,616
PELI2	NM_021255	0,041	1,6	0,615
DUSP2	NM_004418	0,015	1,6	0,615

UTRN	NM_007124	0,023	1,6	0,615
OGFRL1	NM_024576	0,028	1,6	0,615
HILPDA	NM_001098786	0,005	1,6	0,609
NR_022006	NR_022006	0,008	1,6	0,609
FKBP5	NM_004117	0,020	1,6	0,615
GPR183	NM_004951	0,031	1,6	0,615
PLAU	NM_002658	0,042	1,6	0,615
MXRA7	NM_001008528	0,007	1,6	0,609
IL10	NM_000572	0,003	1,6	0,609
ST8SIA4	NM_005668	0,018	1,6	0,615
QPCT	NM_012413	0,050	1,7	0,616
TNFRSF9	NM_001561	0,005	1,7	0,609
VAV1	NM_005428	0,040	1,7	0,615
LSP1	NM_001013253	0,037	1,7	0,615
SRGN	NM_002727	0,048	1,7	0,616
NR_028138	NR_028138	0,023	1,7	0,615
VASP	NM_003370	0,028	1,7	0,615
CHSY1	NM_014918	0,031	1,7	0,615
IL2RG	NM_000206	0,014	1,7	0,615
ITGB2	NM_000211	0,040	1,7	0,615
PLCB2	NM_004573	0,034	1,7	0,615
CYFIP2	NM_001037333	0,010	1,7	0,610
MS4A6A	NM_152851	0,042	1,7	0,615
SORL1	NM_003105	0,035	1,7	0,615
NINJ1	NM_004148	0,032	1,7	0,615
NOTCH1	NM_017617	0,033	1,7	0,615
NSMAF	NM_001144772	0,044	1,7	0,615
EVI2A	NM_014210	0,044	1,7	0,615
PTPRE	NM_006504	0,034	1,7	0,615
TBXAS1	NM_001061	0,044	1,7	0,615
JAK3	NM_000215	0,032	1,7	0,615
S100A4	NM_002961	0,002	1,7	0,609
GNG2	NM_053064	0,047	1,7	0,615
TNFRSF1B	NM_001066	0,025	1,7	0,615
CORO1A	NM_007074	0,041	1,7	0,615
ADORA2A	NM_000675	0,042	1,7	0,615
PREX1	NM_020820	0,047	1,7	0,615
LCP1	NM_002298	0,029	1,7	0,615
PIK3CD	NM_005026	0,047	1,8	0,615
FGL2	NM_006682	0,033	1,8	0,615
SLA	NM_006748	0,045	1,8	0,615
TANK	NM_004180	0,015	1,8	0,615
TMEM176B	NM_001101312	0,030	1,8	0,615
WAS	NM_000377	0,040	1,8	0,615
KCNE3	NM_005472	0,017	1,8	0,615

DOCK2	NM_004946	0,016	1,8	0,615
PLXNC1	NM_005761	0,042	1,8	0,615
RNASE6	NM_005615	0,007	1,8	0,609
FAM129A	NM_052966	0,034	1,8	0,615
PILRA	NM_013439	0,040	1,8	0,615
S100A9	NM_002965	0,025	1,8	0,615
IL10RA	NM_001558	0,010	1,8	0,609
SLC15A3	NM_016582	0,010	1,8	0,609
RGS2	NM_002923	0,048	1,8	0,616
RILPL2	NM_145058	0,013	1,9	0,615
AIF1	NM_001623	0,020	1,9	0,615
CXCR4	NM_003467	0,012	1,9	0,615
VNN2	NM_004665	0,044	1,9	0,615
FMNL1	NM_005892	0,022	1,9	0,615
MPEG1	NM_001039396	0,002	1,9	0,609
ANXA1	NM_000700	0,038	1,9	0,615
S100A8	NM_002964	0,028	1,9	0,615
BEST1	NM_004183	0,025	1,9	0,615
HCK	NM_001172133	0,028	2,0	0,615
ARHGAP15	NM_018460	0,012	2,0	0,615
CYTH4	NM_013385	0,020	2,0	0,615
LRRC25	NM_145256	0,011	2,0	0,615
LCN2	NM_005564	0,045	2,0	0,615
C15orf48	NM_032413	0,006	2,0	0,609
SASH3	NM_018990	0,007	2,0	0,609
TLR1	NM_003263	0,022	2,1	0,615
HPD	NM_002150	0,005	2,1	0,609
GPX3	NM_002084	0,002	2,3	0,609
ECM1	NM_004425	0,046	2,3	0,615
KRT13	NM_153490	0,030	2,5	0,615
CRYAB	NM_001885	0,006	2,7	0,609
SPRR3	NM_001097589	0,006	3,1	0,609

Supplementary Table 2. Gene expression signatures for bladder cancer diagnosis previously reported by our group [1,2].

Gene symbol	GS_D12	GS_D10	GS_D5	GS_D2
<i>IGF2</i>	■	■	■	■
<i>MAGEA3</i>	■	■	■	■
<i>KLF9</i>	■	■	■	
<i>CRH</i>	■	■	■	
<i>SLC1A6</i>	■	■	■	
<i>POSTN</i>	■	■		
<i>EBF1</i>		■		
<i>CFH</i>		■		
<i>MCM10</i>		■		
<i>MMP12</i>		■		
<i>TERT</i>	■			
<i>AHNAK2</i>	■			
<i>ANXA10</i>	■			
<i>CTSE</i>	■			
<i>KRT20</i>	■			
<i>PPP1R14D</i>	■			

[1] Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Buset M, Fernandez PL, et al. Validation Study of a Noninvasive Urine Test for Diagnosis and Prognosis Assessment of Bladder Cancer: Evidence for Improved Models. *J Urol* 2014; 191: 261-9.

[2] Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Palou J, Rodriguez-Faba O, et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer* 2016; 54: 131-8.

Supplementary Table 3. Genes selected in the two different sets of training phase.

Genes	Set 1 training (n=134 samples)				Set 2 training (n=79 samples)			
	Best Comparison	p-value	FC	FDR	Best Comparison	p-value	FC	FDR
ABTB2	grade	0,000	-3,4	0,000	TvsHT	0,000	-3,5	0,000
ADIPOR2	grade	0,000	-2,5	0,000	TvsHT	0,000	-2,6	0,000
AHNAK2	grade	0,000	-2,7	0,000	TvsHT	0,000	-2,8	0,000
ANXA1	grade	0,000	-3,7	0,001	BCvsC	0,000	-2,4	0,000
ANXA10	TavsHT	0,000	2,5	0,001	TavsHT	0,000	6,7	0,000
BPGM	BCvsC	0,002	-1,7	0,001	TvsHT	0,000	-2,0	0,000
CAPN2	BCvsC	0,000	-2,1	0,000	TvsHT	0,000	-2,3	0,000
CFB	grade	0,002	-2,8	0,001	TvsHT	0,000	-2,8	0,050
CFH	grade	0,000	-3,2	0,000	TvsHT	0,005	-1,6	0,000
CRH	grade	0,006	3,2	0,001	TvsHT	0,000	3,8	0,007
CTSE	TavsC	0,020	2,5	0,002	BCvsC	0,132	1,4	0,000
EBF1	grade	0,001	-3,0	0,000	BCvsC	0,267	-1,2	0,000
EMP1	grade	0,001	-3,7	0,000	TvsHT	0,000	-3,5	0,282
EPS8L1	BCvsC	0,000	-2,4	0,000	TvsHT	0,000	-3,2	0,326
ERO1L	BCvsC	0,000	-2,7	0,000	TvsHT	0,000	-3,1	0,000
FBL	TavsC	0,006	1,8	0,001	BCvsC	0,000	1,9	0,000
GADD45GIP1	TavsC	0,002	1,8	0,001	BCvsC	0,001	1,4	0,000
H1FO	TavsC	0,002	-2,3	0,000	TvsHT	0,000	-2,0	0,000
HLA-C	TavsC	0,006	-2,7	0,001	BCvsC	0,011	-1,5	0,011
HMOX1	BCvsC	0,000	-2,5	0,049	TvsHT	0,000	-2,8	0,000
HPD	grade	0,000	-4,2	0,000	TavsHT	0,076	-1,5	0,032
IGF2	TavsHT	0,000	2,5	0,078	BCvsC	0,000	3,5	0,000
IL18	grade	0,001	-3,3	0,002	TvsHT	0,000	-3,1	0,489
ITPKC	BCvsC	0,000	-2,5	0,000	TvsHT	0,000	-3,0	0,000
KIFC3	grade	0,000	-2,6	0,083	TvsHT	0,000	-2,6	0,000
KLF9	grade	0,010	-1,8	0,023	TvsHT	0,002	-1,4	0,000
KRT13	grade	0,000	-4,6	0,000	TvsHT	0,000	-4,0	0,000
KRT20	grade	0,000	6,4	0,052	BCvsC	0,000	8,1	0,002
LCN2	grade	0,000	-4,3	0,099	TvsHT	0,000	-4,0	0,000
LMO7	grade	0,000	-2,9	0,000	TvsHT	0,000	-3,5	0,000
MAGEA3	BCvsC	0,001	2,1	0,000	TvsHT	0,000	4,9	0,000
MALL	BCvsC	0,000	-3,0	0,001	BCvsC	0,000	-3,5	0,000
MCM10	TavsC	0,405	1,3	0,090	BCvsC	0,000	2,3	0,000
MLLT4	TavsC	0,002	-2,5	0,041	BCvsC	0,000	-2,3	0,000
MMP12	grade	0,005	2,7	0,000	TvsHT	0,001	2,6	0,002
MT1H	grade	0,005	-3,5	0,003	TvsHT	0,000	-2,5	0,000
NCOA6	TavsC	0,000	-2,4	0,000	TvsHT	0,000	-2,1	0,001
OSBPL3	BCvsC	0,000	-2,0	0,005	TvsHT	0,000	-3,0	0,000
PHLDA1	BCvsC	0,000	-3,1	0,000	TvsHT	0,000	-3,6	0,000
PI4K2A	TavsC	0,001	-2,4	0,002	BCvsC	0,000	-2,1	0,000
PIK3IP1	grade	0,000	-2,0	0,000	TvsHT	0,000	-2,5	0,000
POSTN	grade	0,044	1,9	0,000	TvsHT	0,005	2,0	0,000
PPL	grade	0,001	-3,5	0,000	TvsHT	0,000	-4,1	0,000
PPP1R14D	grade	0,033	2,0	0,001	BCvsC	0,000	2,8	0,012

PRPF19	TavsC	0,010	1,6	0,000	BCvsC	0,000	1,7	0,000
RIOK3	grade	0,002	-2,0	0,050	BCvsC	0,000	-1,7	0,000
RPS21	TavsC	0,013	1,5	0,000	BCvsC	0,000	1,7	0,000
RPS6	BCvsC	0,003	1,3	0,083	BCvsC	0,000	1,6	0,000
SASH1	BCvsC	0,000	-2,7	0,010	BCvsC	0,000	-3,4	0,000
SIK1	grade	0,001	-2,0	0,000	TvsHT	0,000	-2,3	0,000
SLC1A6	TavsC	0,055	2,3	0,001	BCvsC	0,000	4,8	0,000
SMC4	BCvsC	0,000	-2,3	0,003	TvsHT	0,000	-2,7	0,000
SNRPF	grade	0,000	2,0	0,000	BCvsC	0,010	1,4	0,000
SPNS2	grade	0,000	-3,9	0,001	TvsHT	0,000	-4,1	0,000
SWAP70	TavsC	0,001	-2,2	0,094	TvsHT	0,000	-2,6	0,074
TERT	grade	0,002	2,8	0,000	TvsHT	0,002	2,4	0,000
TRIP10	grade	0,000	-3,2	0,113	TvsHT	0,000	-3,3	0,000
ZNF431	TavsC	0,004	-2,3	0,000	TavsHT	0,000	-2,3	0,148
CDH16	grade	0,000	-4,5	0,007				
AIM1L	grade	0,001	-2,4	0,000				
ARL4C	grade	0,003	-2,1	0,067				
ASF1B	grade	0,135	-1,6	0,000				
ATF3	grade	0,000	-1,9	0,001				
ATP1B1	grade	0,000	-2,3	0,000				
BCAS1	grade	0,010	-1,9	0,000				
BRAF	TavsC	0,024	-1,7	0,008				
BTN3A2	grade	0,348	-1,3	0,000				
C4orf19	grade	0,001	-2,5	0,006				
C6orf132	grade	0,001	-2,7	0,000				
CCNC	grade	0,003	-1,7	0,017				
CEACAM6	grade	0,001	-2,5	0,000				
CEP135	grade	0,000	-3,1	0,003				
CGNL1	grade	0,000	-3,5	0,004				
CKB	grade	0,001	-2,2	0,001				
CLIC3	grade	0,001	-2,5	0,001				
CRYAB	grade	0,000	-3,5	0,001				
CSNK1E	grade	0,002	-2,0	0,000				
CSTB	TavsC	0,000	-4,2	0,082				
CXCL6	grade	0,001	-4,0	0,005				
CYBRD1	TavsC	0,123	-1,7	0,014				
DNAJA4	grade	0,073	-1,5	0,000				
DNMT1	TavsHT	0,262	1,1	0,000				
DUOXA2	grade	0,000	-6,5	0,000				
DUSP10	grade	0,001	-1,9	0,089				
DUSP5	grade	0,000	-2,5	0,000				
ECM1	grade	0,000	-6,0	0,003				
EPHA2	grade	0,001	-2,5	0,029				
F3	grade	0,000	-4,3	0,000				
FAM102A	grade	0,003	-1,9	0,000				
FUT2	grade	0,000	-3,1	0,077				
GPRC5A	grade	0,011	-1,7	0,000				
GPX3	grade	0,000	-3,5	0,000				
GSK3B	TavsC	0,046	-1,5	0,000				

HEG1	grade	0,000	-4,2	0,000
HIST2H3D	TavsC	0,012	-1,8	0,000
HPGD	grade	0,004	-2,4	0,083
HSPH1	BCvsC	0,004	-1,4	0,000
INSR	grade	0,016	-1,5	0,001
KCTD11	grade	0,028	-1,6	0,000
LGALS3	grade	0,002	-2,1	0,017
METTL7A	grade	0,055	-1,4	0,001
MPDU1	grade	0,015	-1,6	0,000
MT1F	grade	0,001	-3,6	0,122
NDRG2	grade	0,001	-2,4	0,000
NFATC3	grade	0,442	-1,2	0,013
PARD6B	BCvsC	0,010	-1,6	0,001
PDZK1IP1	grade	0,000	-3,5	0,002
PFKFB4	TavsC	0,111	-1,7	0,000
PLAT	grade	0,000	-4,4	0,187
PROM2	grade	0,001	-1,9	0,001
PRSS8	grade	0,001	-2,5	0,000
PSCA	grade	0,015	-1,9	0,000
RAB9A	grade	0,024	-1,6	0,000
RARRES3	grade	0,003	-2,4	0,000
RDH10	grade	0,002	-2,9	0,000
RND3	grade	0,000	-3,2	0,099
RPL10A	BCvsC	0,028	1,2	0,001
SDCBP2	grade	0,000	-3,5	0,022
SLC25A23	grade	0,000	-3,7	0,000
SNORA14A	TavsC	0,019	-1,6	0,000
SPP1	grade	0,511	1,2	0,002
SPRR3	grade	0,001	-5,6	0,007
STX18	grade	0,001	-1,9	0,042
TJP2	grade	0,001	-2,0	0,053
TMEM176B	BCvsC	0,055	-1,3	0,000
TMPRSS2	grade	0,001	-2,5	0,000
TRIB2	grade	0,005	-1,8	0,001
TUBB	grade	0,105	1,2	0,001
ULK1	TavsC	0,002	-2,1	0,000
ULK3	grade	0,002	-1,9	0,000

7.4 Annex Treball 4

Supplementary Table 1. A) PCR primer sequences for FGFR3 and TERT and B) SNaPshot probe sequences.

A) FGFR3 PCR Primer Mix

Primer	Sequence (5'→3')	Product size (bp)	Concentration in PCR mix (μM)
FGFR3 ex7 FWD	5'-AGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAG-3'	115	1,2
FGFR3 ex7 REV	5'-GCACCGCCGTCTGTTGG-3'		1,2
FGFR3 ex10 FWD	5'-CAACGCCATGTCTTTGCAG-3'	138	0,7
FGFR3 ex10 REV	5'-AGGCGGCAGAGCGTCACAG-3'		0,7
FGFR3 ex15 FWD	5'-GACCGAGGACAACGTGATG-3'	160	0,7
FGFR3 ex15 REV	5'-GTGTGGGAAGGCGGTGTG-3'		0,7

TERT PCR Primer Mix

Primer	Sequence (5'→3')	Product size (bp)	Concentration in PCR mix (μM)
hTERT FWD	AGCGCTGCCTGAAACTCG	155	0,5
hTERT REV	CCCTCACCTCCAGCTC		0,5

B) FGFR3/hTERT Probe Mix

Primer	Sequence	Strand	Wild-type	Mutant	Concentration (pmol/ML)
R248C	T48CGTCATCTGCCCCACAGAG	sense	C	T	2.0
S249C	T37TCTGCCCCACAGAGCGCT	sense	C	G	1.2
G372C	T29GGTGGAGGCTGACGAGGCG	sense	G	T	0.4
Y375C	T46ACGAGGCGGGCAGTGTGT	sense	A	G	0.6
A393E	T32CCTGTTTCATCCTGGTGGTGG	sense	C	A	2.4
K652E/Q	T50GCACAACCTCGACTACTACAAG	sense	A	G/C	1.2
K652M/T	T18CACAACCTCGACTACTACAAGA	sense	A	T/C	0.8
hTERT 1295228	T19 GGCTGGGAGGGCCCGGA	sense	G	A/T	1
hTERT 1295242	T27 GGAGGGGGCTGGGCCGG	sense	G	A	1.4
hTERT 1295250	T43 CTGGGCCGGGACCCGG	sense	G	A	2

Supplementary Table 2. nCounter Element probes for gene expression analysis.

Gene ID	Sequence Probe A
IGF2	GCACGAGGCGAAGGCCAAGAAGGTGAGAAGCACCAGCATCGACTTCCCCCTCAAGACC TAAGCGACAGCGTGACCTTGTTTCA
MAGEA3	CACCGAGCCTGGGCCGGCTTCCCTCCGCCGACGTCAGCATCCTCTTCTTTTCTGGTGTTG AGAAGATGCTC
ANXA10	GCACATAGTCTCCACAAAACATTTTGATGGTAATTGTTAACCTCAGGGATCACAATTCTG CGGGTTAGCAGGAAGGTTAGGGAAC
KRT20	CTAGAGTGTGCTCCAAAGACTCTTTCATGCTGAGATGGGACTGGAGTTCTCAAAGACGC CTATCTCCAGTTTGATCGGGAAACT
KIFC3	CGTGTACGTCTTGCCGGCGCCGTCTGGCCGTACGCAAAGATGCAGACATCTTCCTTCT GTGTTCCAGCTACAAACTTAGAAAC
RPS21	TGCGTGGTCTTGGCACCGATGATGCGATTGCTAGCGGAGCATTTCTGTTGAGATTATT GAGCTTCATCATGACCAGAAG
LCN2	GGTTGTCCTGGAAGTTCTGCTGCAGAGGGACCTTGCTACGGTTACCGTCTTTATAAGTGA ACAAAACCGG
Gene ID	Sequence Probe B
IGF2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCACAGGGTCTCACTGGGGCGGTAAGCAGCAATGC A
MAGEA3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCAGGTCAGCCTGTCCCCTCAGAACCTTGCCTCCT
ANXA10	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGGGCATCCATTATGGGATTGAAATTGGGAGCT GGGAAGATGGTTCCTT
KRT20	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCAGCGACTGGAGGTTGGCTAACTGGCTGCTGTAA CGGGCCTTGGTCTCCT
KIFC3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGGTTGATACCTGGGTTCTCAGCGGTCCCCTCCAT
RPS21	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTAAACCTGCCTGTGACCTTGTCAACCTCGGCCAC GTTTCATCTGGATGGA
LCN2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCTGCCAGGCCTACCACATACCACTTCCCCTGGAAT T

