



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio de marcadores moleculares para el diagnóstico no invasivo del cáncer de vejiga

M^a de las Mercedes Ingelmo Torres

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.

Estudio de marcadores moleculares para el diagnóstico no invasivo del cáncer de vejiga

Manuscrito depositado por:
M^a de las Mercedes Ingelmo Torres

Para título de:
Doctora por la Universitat de Barcelona

Tesis dirigida por:
Dra. Lourdes Mengual Brichs
Dra. Laura Izquierdo Reyes

Directora y Tutora:
Dra. Lourdes Mengual Brichs

Directora:
Dra. Laura Izquierdo Reyes

Candidata:
M^a de las Mercedes Ingelmo Torres

"Todo llega a su tiempo."

-Gandhi

A mis padres,

A David y los niños,

A mi gran familia,

AGRADECIMIENTOS:

Después de muchos años de perseguir este sueño, por fin esta etapa llega el a su fin. Esta es la culminación de muchos años de esfuerzo, de muchos caminos iniciados y muchos trabajos realizados.

En primer lugar, quiero dar las gracias a la **Dra. Lourdes Mengual** (Lou), directora, tutora, jefa del laboratorio de Urología y gran AMIGA. Sin ella, esta tesis no habría llegado nunca a ver la luz. Gracias por tanto. Gracias por animarme, ayudarme, darme la oportunidad... por permitirme realizar la tesis bajo tu dirección y por estar siempre ahí. Llevamos media vida juntas, primero en genética y luego en urología, cuanto hemos vivido juntas... pero siempre diciéndonos las cosas, ayudándonos, apoyándonos, que suerte he tenido de que te cruzaras en mi camino.

En segundo lugar, y no menos importante a la **Dra. Laura Izquierdo**, codirectora de esta tesis y parte indispensable del "equip" del laboratorio, gran uróloga y científica. Te has unido a esta tesis al final del trayecto pero has sido un motor indispensable para que hoy este aquí. Gracias por tu apoyo incondicional y por creer en mi. Llegaste al grupo para realizar tu tesis y aquí sigues, eres pura energía y siempre estás dispuesta a contar algún chisme que nos haga reír y aportar esa chispa especial a la vida. Gracias.

Al **Dr. Antonio Alcaraz**, por darme la oportunidad de formar parte de este gran grupo y por hacernos sentir siempre parte del servicio de Urología del Hospital Clinic. Por todos estos años compartidos, y los que quedan por venir, y por permitirme realizar la tesis en el laboratorio. Por demostrarnos que se es capaz de ser un gran cirujano y un gran científico a la vez. A la **Dra. M^o José Ribal**, por tantos años juntas, por enseñarme tanto de urología clínica y estar siempre dispuesta a ayudarnos tanto en la recogida de muestras como en la organización de cenas, festejos y guateques...

Durante todo este tiempo en el laboratorio de Uro, han pasado grandes personas por él. Espero no olvidarme de nadie, ya que son muchos años juntos y mucha gente la que ha sido participe de este proyecto. En primer lugar **Merche Marín**, con que ilusión empezamos el laboratorio del Clinic, tú estabas acabando la tesis pero no por ello dejaste de incorporarme al grupo y enseñarme todo lo que ya sabías de urología básica, de darme buenos consejos y acompañarme en esos inicios. Muchas gracias. Después llegó **Cris Gázquez**, como buena investigadora, a todo le daba mil vueltas y siempre estaba pensando el porqué de las cosas, cuantos buenos momentos pasamos

en el laboratorio ubicado en farmacología. Durante esa etapa vino a hacer una estancia **Toine**, ese urólogo holandés de Nijmegen que se ha convertido en un gran amigo, parte del grupo (aunque no esté siempre en Barcelona) y con el que tan buenos momentos hemos pasado tanto dentro del lab como fuera, en Barcelona y en Nijmegen. Y llegó terremoto **Ruth**, todo energía, todo ilusión, todo optimismo, siempre con una sonrisa en la cara. El laboratorio ya nunca fue el mismo, cuantos ratos compartidos, experimentos diseñados y puesta a punto de técnicas nuevas... cuantas risas, horas interminables de conversación, viajes, congresos... En ese momento empezó el "equip", GRACIAS por convertirte en mi gran compañera de poyata y amiga. Ahora no estás en el lab pero sigues presente entre nosotras. Distes el relevo a **Raquel**, Raqué como dice Laura, poco a poco te has ganado nuestro corazón y ya eres una más del grupo. Aquí estás mano a mano cada día conmigo, has vivido todos los nervios del final de la tesis, perdona por si he estado pesada. Gracias por ayudarme en todo lo que has podido, por animarme y por resolver mis interminables dudas de papeleos...

No puedo olvidarme de todos los urólogos y estudiantes de prácticas que han pasado por el laboratorio por diferentes motivos, unos para aprender alguna técnica, otros para realizar su beca fin de residencia y otros para realizar su tesis doctoral. Gracias a todos por permitirme enseñaros un poquito de "molecular". **Albert Carrión** muchas felicidades por tu tesis, muchas gracias por hacernos la vida tan fácil mientras aprendías a pipetear y por ayudarme con los trámites de la tesis. **Fiorella Roldán**, Fio, cuanto te echamos de menos en el lab, siempre dispuesta a aprender, a ayudar y a disfrutar con nosotras del laboratorio. Disfruta mucho en Suecia y te esperamos a la vuelta para que finalices tu tesis. **Tarek** bienvenido al equipo, espero que disfrutes tanto de tu estancia en el lab como tus compañeros. Gracias al **Dr. Agustin Franco** a la **Dra. Pilar Luque** y a todos los médicos del staff del servicio de urología, por hacerme la vida tan fácil. No por ello menos importante, a todas las enfermeras y auxiliares del servicio, planta, quirófano, UDU. A **Maite Dalet**, secretaria en mayúsculas, gracias por ayudarnos siempre con todo el papeleo y organizarnos todo lo que necesitemos.

Como he dicho antes, este ha sido un largo trayecto. Empecé en el laboratorio de genética del Dr. Rafael Oliva. Gracias por iniciarme en el mundo del laboratorio, por enseñarme a diseñar mis primeros experimentos y por descubrirme mi vocación investigadora. De allí me fui al laboratorio de Biología Celular del Dr Carles Enrich y Albert Pol. Cuántos años de días interminables, de aprender la biología celular al más alto nivel y de disfrutar de la ciencia... Cuántos buenos amigos, **Manolo** gran compañero de carrera y laboratorio, **Cecilia** compañera de poyata, **Vero** amiga sólo con mirarnos, Maite, Cris, Marta, Iñaki, Adam etc... cada uno estáis en lugares diferentes

pero seguimos unidos de corazón. Cuantos viajes, cenas, bodas... eh **Raquel Fucho**, Fuchito para los amigos, gracias por estar siempre ahí, por cuidarme, escucharme y seguir a mi lado, por tanto vivido.

Ahora estamos en el CELLEX, quiero dar las gracias a los compañeros de laboratorio, a ese otro gran grupo que hemos formado. **Maria**, que suerte que hayamos ido a parar a la misma planta. Gracias por hacerme reír tanto, por nuestros desayunos en las escaleras ... y sobre todo **María**, gracias por nuestras conversaciones de todo tipo, por tus buenos consejos y por entenderme siempre y por tu ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio. **Jordi**, cuanta serenidad y sabiduría, eres el contrapeso para tanta mujer junta.

Y ahora ese otro mundo que existe, sí existe., el de fuera de laboratorio. Gracias a mis amigas del alma, **lo, Belén, Guardi, Nur, Carmen**, y maridos, por tantas veces que habéis venido a comer conmigo *huevos* al Clinic, por tanto apoyo recibido, por tantos ánimos y por decirme que valía la pena cuando yo ya no lo veía. Gracias porque siempre estáis ahí para lo bueno y para lo malo. Gracias a todos mis otros amigos y amigas, **Bea y Nacho, Blanca y Javier, Mónica y Jorge, María, Luisa, Moni, Sol, Patricia** etc.. que siempre me apoyáis. No puedo nombraros a todos porque sería inacabable.

Por último, a mi **Gran Familia**... lo más importante que tengo en este mundo. En primer lugar a **PAPÁ** y **MAMÁ**, porque desde el primer momento visteis lo importante que era para mi la tesis, por enseñarme que la constancia es importante en esta vida y lo que se empieza se acaba. Por ayudarme a ser la persona que soy hoy. A todos y cada uno de mis **HERMANOS, CUÑADOS**, sobrinos y familia **Andrés** porque de cada uno aprendo algo nuevo y me hacéis mejor persona.

Y ya por acabar, GRACIAS GRACIAS GRACIAS a la persona que comparte mi vida, **DAVID**, marido, amigo, compañero, padre de nuestros cinco hijos, **Bea, Javi, Pablo, Marta y Santi** porque has tenido que aguantar los días en los que todo salía bien y los que no... mis frustraciones y alegrías. Por haber estado ahí SIEMPRE, por no dejarme abandonar este proyecto, por tu paciencia y por encargarte de nuestros *gremlins* estos últimos meses. Porque sin vosotros esto no sería posible. Porque no he podido tener más suerte con la familia que me han tocado y la que he creado.

Gracias a todos!!!!

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

AUC	Área bajo la curva (<i>Area Under the Curve</i>)
BCG	<i>Bacillus</i> de Calmette-Guérin
BMN	Biopsia Múltiple Normalizada
BTA	Antígeno del tumor de vejiga (<i>Bladder tumour antigen</i>)
cDNA	DNA complementario
Checkpoint	Punto de control
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CU	Carcinoma urotelial
CV	Cáncer de vejiga
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EMT	Transición Epitelio Mesénquima (<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>)
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
GU	Genéticamente inestable (<i>Genetically unstable</i>)
H/E	Hematoxilina-eosina
HR	Cociente de riesgos (<i>Hazard Ratio</i>)
IHQ	Immunohistoquímica
lncRNA	ARN largo no codificantes (<i>Long non-coding RNA</i>)
LSI	Sonda locus-específica (<i>Locus-specific probe</i>)
MSI	Inestabilidad de microsatélites (<i>Microsatellite instability</i>)
MIBC	Cáncer de Vejiga Músculo-Invasivo (<i>Mucle-Invasive Bladder Cancer</i>)
mRNA	RNA mensajero (<i>Messenger RNA</i>)
miRNA	microRNA
NMP22	Proteína de matriz celular nuclear 22 (<i>Nuclear matrix protein-22</i>)
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NMIBC	Cáncer de Vejiga No-Músculo-Invasivo (<i>Non-Mucle-Invasive Bladder Cancer</i>)
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)

PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PUNLMP	Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno (<i>Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential</i>)
PFS	Supervivencia Libre de Progresión (<i>Progression free survival</i>)
qPCR	PCR cuantitativa (<i>Quantitative qPCR</i>)
RT	Transcripción reversa (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RTU	Resección Transuretral (<i>Transurethral resection</i>)
RefSeq	Secuencia referencia
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SCCL	Carcinoma de células escamosas (<i>Squamous cell cancer-like</i>)
SN	Sensibilidad
SP	Especificidad
SNP	Polimorfismo puntual o de un solo nucleótido (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
TUS	Tracto Urinario Superior
TUI	Tracto Urinario Inferior
TM-TUS	Tumor de Tracto Urinario Superior
TM	Tumor
TNM	Tumor-ganglio-metástasis (<i>Tumor Node Metastasis</i>)
TC	Tomografía Computarizada
VPN	Valor predictivo negativo

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS	v
PRESENTACIÓN	xi
INTRODUCCIÓN	1
I. EL TRACTO URINARIO	3
II. EL CARCINOMA UROTELIAL	4
1. Epidemiología	4
2. Factores de riesgo.....	6
3. Clasificación de los tumores urológicos.....	8
4. Diagnóstico y seguimiento	13
5. Tratamiento	20
6. Pronóstico	25
III. BIOLOGIA MOLECULAR DEL CARCINOMA UROTELIAL	28
1. PROTOONCOGENES	28
2. GENES SUPRESORES DE TUMOR	29
3. GENES REPARADORES	31
4. SUBTIPOS MOLECULARES DEL CV	31
5. microRNAs	37
6. BIOMARCADORES UTILIZADOS EN EL CV	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
RESULTADOS	55
TRABAJO 1	57
TRABAJO 2	71
TRABAJO 3	83
TRABAJO 4	99
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	137

Esta tesis se presenta en **formato de compendio de artículos**.

La tesis consta de 4 objetivos y de 4 artículos.

1. Identificar perfiles de expresión génica específicamente implicados en la carcinogénesis del CV en muestras de orina.
2. Desarrollar y validar una firma de expresión génica en orina, con una alta precisión para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con CV.

Validation study of a noninvasive urine test for diagnosis and prognosis assessment of bladder cancer: evidence for improved models. Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Buset M, Fernández PL, Alcaraz A. JUrol. 2014 Jan; 191(1):261-9. PMID: 23831312. IF: 3,696, Q1. Urología y Nefrología

Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. 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, Alcaraz A. Eur J Cancer. 2016 Feb; 54:131-138. PMID: 26761785. IF: 6,029, Q1. Oncología

3. Identificar un perfil de expresión basado en la cuantificación de microRNAs en orina para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con CV.
4. Validar los microRNAs previamente identificados como biomarcadores del CV en una serie independiente y multicéntrica de pacientes con CV.

Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for non-muscle invasive bladder cancer. Ingelmo-Torres M, Lozano JJ, Izquierdo L, Carrion A, Costa M, Gómez L, Ribal MJ, Alcaraz A, Mengual L. Oncotarget. 2017 Mar 14;8(11):18238-18247. PMID: 28212556. IF: 5,168, Q1. Oncología

Using gene expression from urine sediment to diagnose prostate cancer: development of a new multiplex mRNA urine test and validation of current biomarkers. Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Izquierdo L, Musquera M, Ribal MJ, Alcaraz A. BMC Cancer. 2016 Feb 9; 16:76. PMID: 26856686. IF: 6,198, Q1. Oncología

PRESENTACIÓN

Esta tesis es una contribución al estudio del cáncer de vejiga (CV). Se centra en el estudio de marcadores moleculares no invasivos, en orina, para el diagnóstico y pronóstico de esta neoplasia con una potencial utilidad en la práctica clínica.

La presente tesis parte de estudios previos de nuestro grupo de investigación, en los que se observó que mediante el análisis de expresión génica de la orina era posible identificar marcadores no invasivos para el carcinoma vesical y desarrollar una firma de expresión génica con una elevada precisión para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con CV. En la primera parte de esta tesis se presentan dos trabajos en los que 1) se desarrollan firmas de expresión génica en orina mejoradas para el diagnóstico del CV y 2) se validan dichas firmas en un estudio multicéntrico e internacional. En la segunda parte de la tesis, realizada paralelamente a estos estudios de expresión génica en orina, se describe el desarrollo de firmas de expresión de microRNAs en muestras de orina con una alta precisión para el diagnóstico y pronóstico del CV.

La memoria se organiza en cinco bloques principales. Una *Introducción* general, donde se pretende reflejar los conceptos clínicos y biológicos básicos del carcinoma urotelial. El siguiente apartado es *Hipótesis y objetivos*, donde se describe el planteamiento global del estudio así como los objetivos específicos del mismo. A continuación, en el apartado de *Trabajos*, se incluyen los 4 artículos que han dado lugar a la presente tesis. Los resultados de los trabajos se discuten en el apartado de *Discusión* tanto de manera general como individual. Finalmente, se enumeran las *Conclusiones* obtenidas de estos estudios.

La tesis que se presenta a continuación está escrita en castellano, los trabajos publicados se presentan en inglés con un resumen en castellano previo a cada uno de ellos. Se ha optado por no traducir los anglicismos más utilizados en la práctica clínica y científica, los cuales aparecen a lo largo de la memoria con la terminología utilizada en los servicios de urología y en los laboratorios de investigación.

Esta tesis se ha realizado bajo la supervisión de profesionales del Servicio y Laboratorio de Urología del Hospital Clínico de Barcelona. Las muestras utilizadas proceden de pacientes de dicho centro y otros hospitales (Medical University of Vienna, Hospital Universitario Virgen del Rocío Sevilla, Radboud University Medical Centre Nijmegen y Fundació Puigvert Barcelona) que han colaborado en el estudio.

INTRODUCCIÓN

I. EL TRACTO URINARIO

El sistema urinario está formado por los órganos secretores que se encargan de producir la orina (riñones), y la vía excretora o tracto urinario que es el encargado de almacenar y conducir la orina para que sea excretada (pelvis renales, uréteres, vejiga urinaria y uretra) (Figura 1).

Desde el punto de vista anatómico, el tracto urinario se divide en:

- Tracto urinario superior (TUS) formado por la pelvis renal y los uréteres.
- Tracto urinario inferior (TUI) compuesto por la vejiga y la uretra.

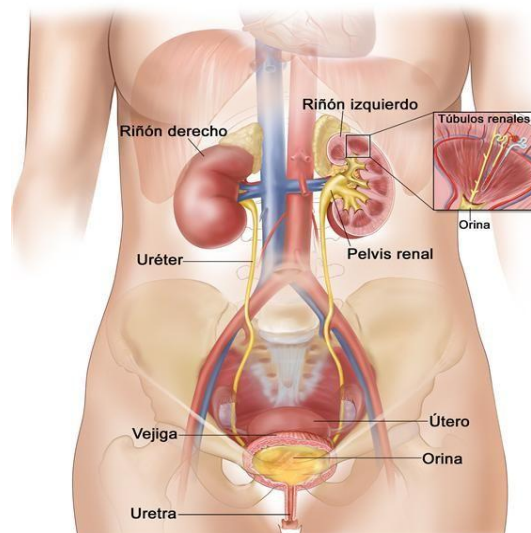


Figura 1: Estructura anatómica del tracto urinario (fuente: *National Cancer Institute*).

Todo el tracto urinario comparte una estructura histológica similar, la cual está dividida en distintas capas. La más interna, denominada urotelio, es la mucosa revestida del epitelio urotelial o de transición y es la que está en contacto con la orina. A continuación, se encuentra la lámina propia que es la capa sobre la que descansa el urotelio formada por tejido conectivo fibroelástico. Seguida de ésta encontramos la capa muscular formada por haces de músculo liso que forman una malla muscular (músculo detrusor), cuya contracción produce la salida de

toda la orina hacia el exterior durante la micción. La última capa y más superficial es la serosa o adventicia, por donde llegan los nervios y los vasos sanguíneos hacia la vejiga (Figura 2).

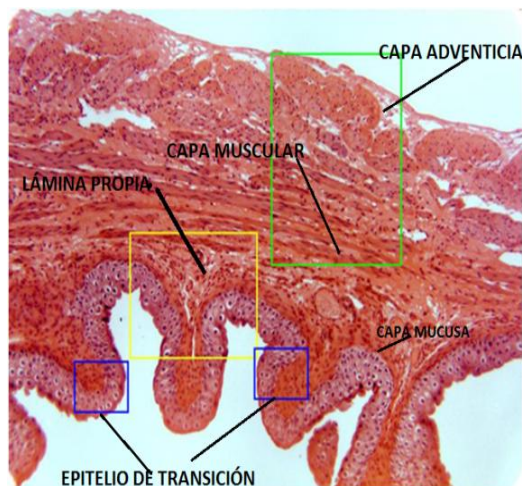


Figura 2: Histología del tracto urinario (fuente: modificada google image).

La vascularización de la vejiga se realiza a través de la arteria ilíaca interna. La mayor parte del sistema linfático drena en los ganglios linfáticos ilíacos externos, aunque también existe drenaje a los ganglios obturadores, ilíacos internos y comunes. Finalmente, la inervación de la vejiga corresponde tanto al sistema nervioso simpático como al parasimpático.

II. EL CARCINOMA UROTELIAL

1. Epidemiología

El carcinoma urotelial (CU) es una enfermedad neoplásica que se origina en el urotelio. También es conocido como carcinoma de células transicionales ya que supone el tipo histológico más habitual.

El carcinoma urotelial de vejiga o cáncer de vejiga (CV) es el séptimo cáncer más comúnmente diagnosticado en el varón en países desarrollados. La tasa de incidencia en la Unión Europea es de 19,1 varones por cada 4 mujeres. Dentro de Europa, la incidencia más alta se encuentra en Bélgica (31 varones por cada 6,2 mujeres) y la más baja en Finlandia (18,1 en varones por cada 4,3 mujeres)(Ferlay et al., 2019).

Por lo que respecta a las tasas de mortalidad del CV (por 100.000 personas/año) se sitúa en 3,2 para varones y 0,9 para mujeres en el año 2012 (Ferlay et al., 2019). Tanto la incidencia como la tasa de mortalidad varía entre los países miembros debido a diferencias en los factores de riesgo, prácticas de diagnóstico y detección, disponibilidad de recursos y tratamientos.

En el caso de España, el 6,4% de los cánceres diagnosticados en adultos en el año 2012 fueron de vejiga, por lo tanto, la incidencia fue de 13,7 casos/año(Ferlay et al., 2015). (Figura 3).

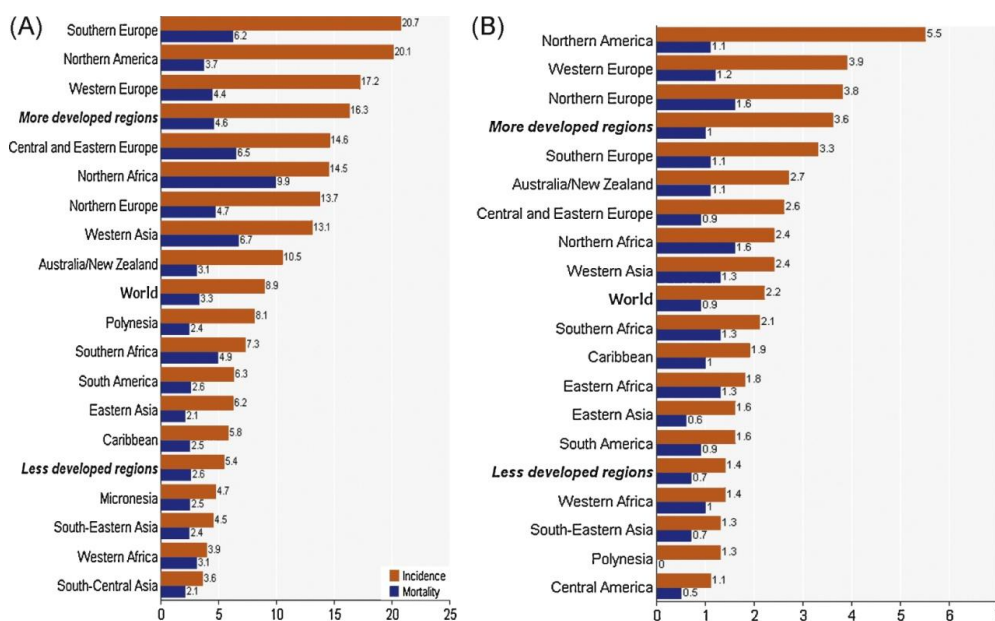


Figura 3: Incidencia y mortalidad del CU en el mundo, en el 2012 (Burger et al., 2013).

Las divergencias en frecuencia entre géneros se han atribuido a las diferentes exposiciones a los factores de riesgo. En este sentido, pese a ser más frecuente en el varón, se

observa un incremento claro de la incidencia en el sexo femenino especialmente a partir de la década de los 50, coincidiendo con el inicio de la mujer en el hábito del tabaquismo.

2. Factores de riesgo

Se conocen múltiples factores etiológicos del CV. Los más relevantes se derivan del hábito tabáquico y de las exposiciones profesionales a diferentes productos como detallaremos a continuación.

- **Tabaco:** Es considerado el principal factor de riesgo para el CV. Aunque la prevalencia del hábito de fumar y la incidencia de CV varían en todo el mundo, el CV es en promedio 4-5 veces más común en hombres que en mujeres. El tabaquismo provoca una mayor mortalidad y se sabe que este riesgo aumenta con la cantidad y duración del hábito. En el trabajo de Brennan *et al.* se observó una disminución del riesgo de CV de alrededor del 40% en los 1-4 años siguientes al cese del hábito tabáquico y del 60% después de 25 años (Brennan et al., 2000). La toxicidad del humo del tabaco viene producida por las arilaminas, las aminas heterocíclicas y diversos epóxidos, que al ser excretadas por la orina entran en contacto con las células de la vejiga produciendo un daño citotóxico.
- **Exposición ocupacional a productos químicos:** Éste es el segundo factor de riesgo más importante, ya que supone entre el 20-25% de todos los casos de CV. Los compuestos implicados en la exposición a sustancias químicas son los derivados del benceno y de las arilaminas (2-naftilamina, 4-PBA, 4,4'-metilenodianilina y o-toluidina) y es probable que se produzca en profesiones en las que se emplean colorantes, gomas, tejidos, pinturas, cueros y productos químicos. (Pashos et al., 2002) Estos productos químicos han contribuido mínimamente a la incidencia actual del CV en los países occidentales debido a la aplicación de normativas estrictas en cuanto a su uso (Burger et al., 2013). Otro agente químico relevante

son los hidrocarburos policíclicos aromáticos, relacionados con el tratamiento del aluminio, carbón, hierro y el acero.

- **Radioterapia:** Se ha descrito mayor tasa de CV secundaria a la aplicación de radioterapia externa (RTE) por neoplasias ginecológicas con un riesgo relativo de entre 2 y 4. En varones tratados por cáncer de próstata con RTE, braquiterapia (BT) y RTE-BT también se ha visto una incidencia mayor de CV a medio-largo plazo (Chrouser et al., 2005). Este hecho debe tenerse en cuenta durante el seguimiento de dichos pacientes.
- **Factores genéticos:** Se ha observado que existe un incremento en el riesgo de aparición del CV en individuos con historia de este tumor en familiares de primer grado. Por otro lado, se conoce que polimorfismos genéticos en el gen *GSTM1* (Glutation S-transferasa mu 1), que codifica enzimas involucradas en el metabolismo de la detoxificación de las aminas aromáticas y carcinógenos uroteliales (Engel et al., 2002), también contribuyen a incrementar la susceptibilidad a padecer esta enfermedad. Pacientes que acetilan lentamente las aminas aromáticas son más susceptible de presentar CU que pacientes que acetilan rápidamente dichas moléculas (García-Closas et al., 2005).
- **Algunos medicamentos:** Los análgicos, por su contenido en fenacetina, han demostrado un incremento en el riesgo de presentar un CU en el TUS. Sin embargo, este riesgo no se muestra en el consumo de paracetamol, principal metabolito de la fenacetina (Cheng et al., 2011). Otro ejemplo es la ciclofosfamida mediante su metabolito acroleina, quimioterápico ampliamente utilizado en el tratamiento de algunas neoplasias hematológicas.
- **Esquistosomiasis vesical e infección crónica del tracto urinario:** La esquistosomiasis vesical (Bilharzia) es la segunda infección parasitaria en frecuencia después de la malaria, con alrededor de 600 millones de personas expuestas en África, Asia, Sudamérica y el Caribe. Está ampliamente reconocida la

relación entre esquistomiasis y carcinoma escamoso de vejiga. De manera similar, el carcinoma escamoso de vejiga está relacionado con la presencia de infección crónica del tracto urinario (Pelucchi et al., 2006). Los cálculos urinarios y la irritación crónica o inflamación del urotelio se han descrito como posibles factores de riesgo para el CV (Yu et al., 2018).

- **Género:** Aunque los varones tengan más probabilidad de desarrollar CV que las mujeres, éstas suelen debutar con una enfermedad más avanzada y con peor tasa de supervivencia. Un meta-análisis incluyendo 28.000 pacientes mostró que el género femenino se asocia con peor pronóstico tras cistectomía radical (HR 1.20 IC 95% 1.09-1.32) comparado con el género masculino (Liu et al., 2015). Entre las posibles hipótesis que justifican este hecho se encuentran el diagnóstico tardío de la enfermedad así como diferencias hormonales en términos de niveles de estrógenos y andrógenos (Cohn et al., 2014, Dietrich et al., 2011, Scosyrev et al., 2009, Stenzl, 2010).
- **Factores alimentarios:** En la actualidad hay pocas pruebas de una relación causal entre el CV y factores alimentarios. Varios estudios respaldan la hipótesis de que el consumo de frutas y verduras reducen el riesgo de CV (Steinmaus et al., 2000).

3. Clasificación de los tumores urológicos

Según el tipo de célula en la que se origina el CV podemos diferenciar 3 tipos histológicos de CV:

- Carcinoma de células transicionales: Comprende el 94% de los tumores vesicales, ya que es el epitelio que reviste la mucosa de la vejiga.
- Carcinoma de células escamosas, o carcinoma epidermoide: Tumor agresivo, no tan frecuente, asociado a infección o irritación prolongadas (ver esquistomiasis en el apartado de factores de riesgo).

- Adenocarcinoma: Tumor agresivo que se inicia en células glandulares, como consecuencia de irritación de vestigios embriológicos en la vejiga.

Además, desde el punto de vista anátomo-patológico, existen diferenciaciones entre las cuales, las más frecuentes son: carcinoma urotelial con diferenciación parcial escamosa o glandular o trofoblástica, micropapilar y microcística, variante nested, limfoepitelioma, plasmocitoide, CU con carcinoma de célula pequeña, sarcomatoide y pobremente diferenciado.

La identificación de dichas variantes o subtipos morfológicos tiene interés de cara al pronóstico y tratamiento de esta patología. El pronóstico del CV se basa fundamentalmente en el estadio patológico y en el grado de desdiferenciación celular (grado histológico).

El estadio patológico indica el nivel de extensión del tumor entre las capas del tracto urinario e incluso si alcanza a otros órganos. Para establecer dicho estadio se utiliza la siguiente clasificación.

El sistema TNM (del inglés, *Tumor, Node, Metastasis*) hace referencia a los siguientes parámetros (Figura 4) (Tabla 1):

- **T:** indica el grado de infiltración del tumor en las capas del tracto urinario.
- **N:** indica la presencia o ausencia de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales.
- **M:** indica la presencia o ausencia de metástasis a distancia.

Tabla 1: Clasificación TNM de 2017 del cáncer de vejiga.(Brierley et al., 2019)

T. TUMOR PRIMARIO
Tx Tumor primario no evaluado
T0 Sin evidencia de tumor primario
Ta Carcinoma papilar no invasivo
Tis Carcinoma in situ
T1 Invasión del tejido conectivo subepitelial
T2 Invasión de la capa muscular T2a Invasión de la muscular superficial T2b Invasión de la muscular profunda
T3 Invasión del tejido perivesical T3a Microscópico T3b Macroscópico (masa extravesical)
T4 Invasión de las siguientes estructuras: estroma prostático, vesículas seminales, útero, vagina, pared pélvica y pared abdominal T4a Invasión de estroma prostático, vesículas seminales, útero o vagina T4b Invasión de pared pélvica o abdominal
N. GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES
Nx No se ha evaluado la afectación ganglionar
N0 Ausencia de metástasis linfáticas
N1 Metástasis ganglionar única (hipogástrico, obturador, ilíaco externo o presacro)
N2 Metástasis ganglionares múltiples (hipogástrico, obturador, ilíaco externo o presacro)
N3 Metástasis en área ganglionar de la ilíaca común
M. METÁSTASIS A DISTANCIA
M0 Ausencia de metástasis a distancia

M1a Adenopatías fuera del territorio regional
M1b Otras metástasis

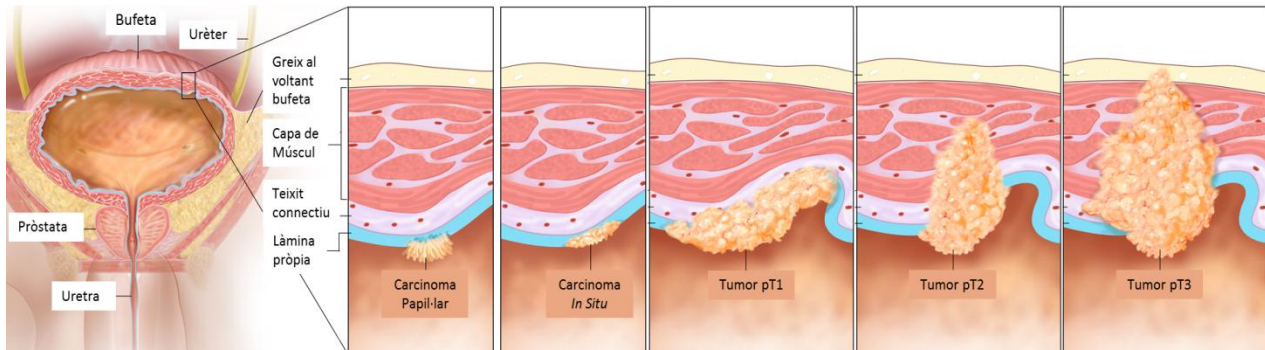


Figura 4: Esquema del estadio patológico del CV (imagen *cancer.org*)

Según el estadio patológico del tumor se clasifica en cáncer de vejiga no-músculo-invasivo (NMIBC) o en cáncer de vejiga músculo-invasivo (MIBC).

Aproximadamente, el 75% de los pacientes con CV debutan con una enfermedad confinada a la mucosa vesical (estadio Ta, carcinoma in situ o *cis*) o submucosa (estadio T1). Dicho de otro modo, presentan enfermedad no músculo-invasiva. En pacientes jóvenes (menores de 40 años) dicho porcentaje es todavía más elevado (Compérat et al., 2015). Aquellos pacientes con enfermedad no músculo-invasiva presentan una mayor supervivencia y menor riesgo de mortalidad cáncer-específica en comparación con los tumores músculo-invasivos (estadio T2-T4) (Ferlay et al., 2019, Burger et al., 2013).

Por lo que respecta al grado histológico, antiguamente, WHO 1973 clasificaba los tumores uroteliales en tres grados:

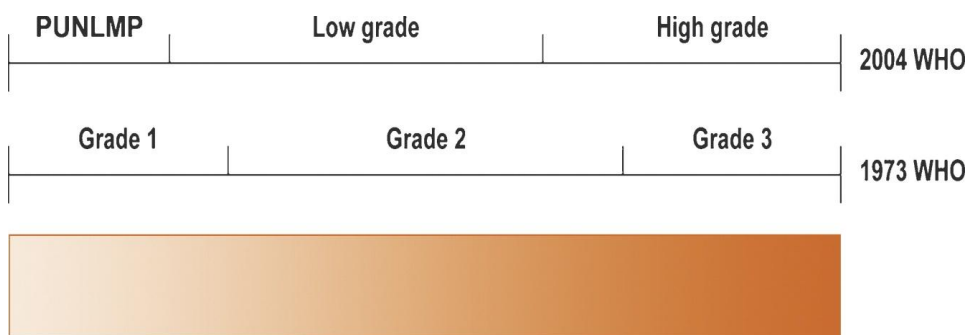
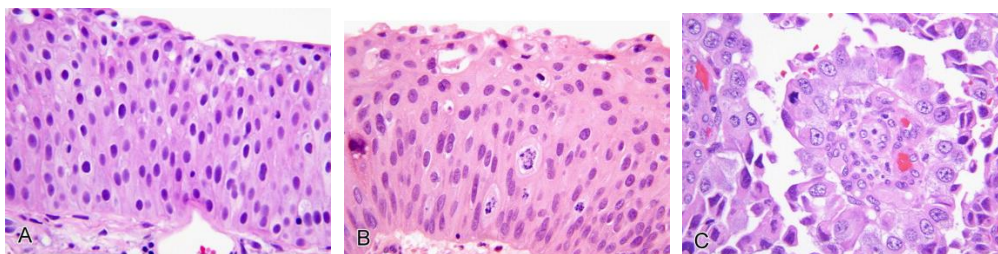
- Grado 1: células con ligera anaplasia (bien diferenciadas) o papiloma.
- Grado 2: células con moderada anaplasia o lesiones de bajo grado.
- Grado 3: tumores con marcada anaplasia o lesiones de alto grado.

Dicha clasificación basada en métodos semicuantitativos planteaba serios problemas de reproducibilidad entre patólogos, por lo que en 1999 la OMS y la Asociación Internacional de Uropatología (ISUP) elaboraron una nueva clasificación en la que los tumores se clasificaban en bajo y alto grado.

El grado histológico y el estadio patológico son dos de los factores pronóstico más importantes a la hora de determinar el riesgo de recidiva y progresión de los pacientes con CV.

Aquellos tumores con muy bajo riesgo de progresión son etiquetados como neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno o carcinomas de bajo grado; estos incluyen a los tumores de grado 1 y una parte de los de grado 2, mientras que el resto de los de grado 2 y todos los de grado 3 se engloban en la categoría de alto grado. Esta nueva clasificación ha demostrado una buena correlación con los marcadores moleculares y con el riesgo de recurrencia.

Posteriormente en 2004 la OMS añadió una nueva categoría que incluye las neoplasias uroteliales papilares con bajo potencial de malignidad o PUNLMP (*papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*) (Figura 5).



Histologic Spectrum of TCC

Figura 5: Comparación entre los diferentes sistemas de gradación de los tumores uroteliales según su histología. (McLennan, 2014)

Según el riesgo de recidiva y progresión los CV no músculo-invasivo se clasifican en:

- Bajo riesgo: tumor de debut, único, Ta G1 (PUNLMP, Bajo grado), tamaño inferior a 3 cm, ausencia de *cis*.
- Riesgo intermedio: todos aquellos tumores no incluidos en las categorías de bajo y alto riesgo.
- Alto riesgo: T1, Alto grado, presencia de *cis*, TaG2/bajo grado múltiple, recurrente y de tamaño superior a 3 cm.

4. Diagnóstico y seguimiento

La hematuria es el signo más habitual en los tumores vesicales. Los tumores sin invasión muscular no suelen causar dolor vesical, rara vez cursan con irritación vesical, disuria o tenesmo vesical; estos síntomas suelen estar relacionados con tumores músculo-invasivos. En los tumores más avanzados puede aparecer dolor pélvico relacionado con una obstrucción de las vías urinarias.

Actualmente las técnicas que se utilizan para el diagnóstico y estadiaje del CV son las siguientes:

4.1 Exploración física

La exploración física debe incluir una palpación bimanual del recto y de la vagina. En los pacientes con tumores localmente avanzados puede identificarse una masa pélvica palpable. Además, ha de realizarse una exploración bimanual antes y después de la resección transuretral (RTU) del tumor vesical para valorar si existe una masa palpable o si el tumor se encuentra fijado a la pared de la pelvis (Fosså et al., 1991, Wijkström et al., 1998).

4.2 Citología urinaria

La citología es el método diagnóstico no invasivo de referencia, descrito por Papanicolau y Marshall en 1945. La citología, en combinación con la cistoscopia, constituye el “*gold estándar*” para el diagnóstico del CV con una elevada sensibilidad y especificidad para los tumores de alto grado y el *cis*. Se estima que la combinación de ambas técnicas proporciona una sensibilidad (SN) del 80% y una especificidad (SP) del 90% para la detección del CV.

La citología consiste en el examen de orina de micción espontánea o procedente de un lavado vesical o de un cateterismo ureteral (especialmente útil en casos de lesiones sospechosas en el uréter y/o pelvis renal) en busca de células cancerosas exfoliadas. La exfoliación celular del urotelio sucede de forma fisiológica por lo que es posible el análisis morfológico de la celularidad de la orina. Consiste en una tinción de hematoxilina-eosina (H/E) del sedimento urinario (también llamada tinción Papanicolau).

El procesado de muestras de orina tiene como objetivo conseguir extendidos citológicos que, una vez fijados y teñidos, sean apropiados para su observación microscópica. Para ello, el anatómopatólogo ha de tener presentes dos importantes premisas: obtener de la muestra el mayor número posible de células del tracto urinario (sobre todo en los casos de micción espontánea) y preservar al máximo los detalles morfológicos de las células exfoliadas. Este último aspecto es muy importante, pues un retraso en la fijación de los extendidos puede acarrear una desecación de estos, con la aparición de los consiguientes artefactos en la tinción (cariomegalias, hipocromasia nuclear, acidofilia citoplasmática, pequeñas vacuolizaciones tanto en los citoplasmas como en los núcleos, etc.).

La citología se considerada un método económico para la detección del CV con una elevada especificidad, entre el 78,4 y el 99,4% pero con una sensibilidad discreta (Yafi et al., 2015). Cabe destacar que la citología tiene una sensibilidad elevada en los tumores de alto grado, pero baja en los de bajo grado, con valores comprendidos entre el 12,2 y el 79%. Por consiguiente, resulta útil cuando existe una neoplasia maligna de alto grado o *cis*; sin embargo, un resultado negativo no excluye la presencia de un cáncer de bajo grado. La citología urinaria positiva puede indicar un tumor urotelial en cualquier parte del tracto urinario desde el cáliz renal, uréteres, vejiga hasta uretra proximal. La interpretación citológica es altamente dependiente del observador (Raitanen et al., 2002) con lo que pueden existir diferencias interobservador, especialmente en los tumores de bajo grado. La evaluación puede ser

dificultosa debido a un rendimiento celular bajo, infecciones del tracto urinario, piedras o instilaciones vesicales.

En noviembre de 2015 se publicó el Sistema París para la clasificación de la citología urinaria (TPS). Esta clasificación se centra en el diagnóstico de carcinoma urotelial de alto grado (HGUC; *del inglés High Grade Urothelial Carcinoma*) porque puede ser diagnosticado de manera fiable mediante la citología y es de gran importancia para los médicos porque la mayoría de los carcinomas uroteliales invasivos están representados en gran medida por HGUC; y también proporciona criterios para definir la categoría de enfermedad atípica de células uroteliales (AUC; *del inglés Atypical Urothelial Cells*). Se utiliza la categoría AUC, con criterios específicos, mientras que categorías sospechosas de HGUC (SHGUC; *del inglés Suspicious High Grade Urothelial Carcinoma*) y HGUC comparten criterios similares pero difieren en el número de células observadas. Los criterios para detectar carcinoma urotelial de bajo grado (LGUN; *del inglés Low Grade Urothelial Neoplasia*) son tan estrictas que solo muy pocos casos pueden incluirse en esta categoría (Meilleroux et al., 2018).

El objetivo de TPS no es solo definir los criterios morfológicos para las diversas categorías en la citopatología urinaria, sino también estandarizar el sistema de notificación para ser global y universalmente aceptado. El Sistema Paris TPS clasifica las citologías en 7 categorías, teniendo en cuenta la idoneidad de las muestras. (Tabla 2)

Tabla 2. Categorías de diagnóstico del Sistema de París para la notificación de la citología urinaria (Meilleroux et al., 2018)

- 1 No diagnóstico / insatisfactorio
- 2 (NHGUC) Negativo para carcinoma urotelial de alto grado
- 3 (AUC) Células uroteliales atípicas
- 4 (SHGUC) Sospechoso de carcinoma urotelial de alto grado
- 5 (HGUC) Carcinoma urotelial de alto grado
- 6 (LGUN) Neoplasia urotelial de bajo grado
- 7 Otros: tumores primarios y secundarios y otras lesiones



4.3 Cistoscopia

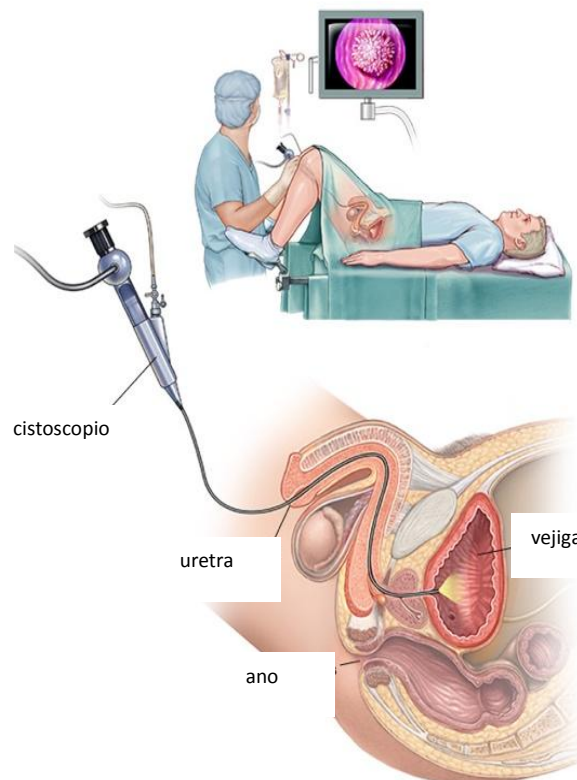
La cistoscopia consiste en la visualización directa de la vejiga mediante un cistoscopio el cual está formado por una fuente luminosa, un sistema óptico y un aparato de irrigación. En la actualidad se utilizan cistoscopios flexibles para disminuir la invasividad del procedimiento (Figura 6).

La cistoscopia es la principal técnica de diagnóstico y seguimiento del CV. La sensibilidad de la cistoscopia está entre el 70-95% (Glas et al., 2003, Kausch et al., 2006). Dicho procedimiento permite en el mismo acto la realización de citología por barbotaje, muy útil en el diagnóstico de tumores de alto grado.

Figura 6. Esquema de una cistoscopia (Fuente: <https://www.mayoclinic.org>).

La información obtenida de la cistoscopia deberá incluir el número, tamaño y aspecto (papilar o sólido) del tumor, sospecha de *cis* así como una descripción de las anomalías de la mucosa vesical y uretral así como la apariencia y localización de los meatos ureterales.

Debido a la elevada tasa de recurrencia del CV, la cistoscopia se utiliza sistemáticamente en el control y seguimiento de los pacientes con CV y de TUS, ello implica la realización de



múltiples procedimientos invasivos al año en los pacientes con esta enfermedad. Es por ello, que ha aumentado el interés en buscar nuevos métodos diagnósticos no invasivos, con una elevada sensibilidad y especificidad, que puedan reducir el uso de dicha técnica por otra alternativa menos agresiva para el paciente.

Con el fin de incrementar la sensibilidad en detección de *cis*, se ha desarrollado una técnica de cistoscopia fluorescente. La cistoscopia fluorescente se lleva a cabo con luz violeta tras la instilación endovesical de un fotosensibilizante, habitualmente ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) o hexaminolevulinato (HAL) o la utilización de Hypericin antes de realizar la cistoscopia (D'Hallewin et al., 2002). La administración del fármaco de manera intravesical dará lugar a la acumulación local de porfirinas, con carácter fotorreactivo, en las células de las capas internas de la vejiga, especialmente en las células neoplásicas y preneoplásicas, debido a su mayor actividad metabólica. Dado que estos agentes son capaces de emitir una luz roja característica en respuesta a la excitación con luz azul (longitud de onda entre 380 y 450nm), las lesiones premalignas y malignas tienden a brillar en color rojo al ser iluminadas con luz azul durante la cistoscopia. Se ha confirmado que la biopsia y la resección guiadas por fluorescencia son más sensibles que los procedimientos convencionales para detectar tumores malignos, sobre todo *cis* (hasta en un 30%) (Schmidbauer et al., 2004, Witjes and Douglass, 2007). Sin embargo, la inflamación, una RTU o la instilación intravesical recientes pueden producir falsos positivos.

En los casos en que se sospecha de la presencia de un tumor en el TUS, la técnica utilizada para su diagnóstico es la tomografía computarizada (TC) y la ureteroscopia. Se trata de un procedimiento invasivo que se realiza bajo anestesia y que permite la visualización directa de todo el tracto urinario desde la inserción del uréter a la vejiga hasta los cálices renales. Esta última técnica se lleva a cabo en aquellas situaciones en que el diagnóstico mediante técnicas de radiodiagnóstico o citología es dudoso, para tomar biopsias y/o para realizar tratamiento endourológico en el mismo acto.

4.4 Técnicas de imagen

4.4.1. Ecografía

La ecografía es la técnica más empleada para el estudio de pacientes con sospecha de tumor vesical puesto que se trata de una técnica sencilla, de bajo coste, accesible y no invasiva. Además, ofrece información de la vía urinaria superior así como de otras estructuras. En este sentido, posibilita la caracterización de masas renales, la detección de hidronefrosis y la visualización de defectos de llenado intraluminales en la vejiga.

Esta técnica puede presentar una sensibilidad de hasta el 98% en la detección del CU. Por otro lado, realizada de manera transabdominal, permite detectar tumores papilares de entre 2

y 3 mm, siendo su sensibilidad menor en tumores planos y localizados en la cara anterior de la vejiga. Su principal limitación es para la detección del *cis* puesto que se trata de tumores planos. Actualmente se trata de la técnica diagnóstica de primera elección en los centros de salud de atención primaria.

4.4.2. Tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (RM)

En la práctica clínica, la TC y la RM son dos técnicas de imagen que se utilizan de forma habitual. El objetivo de la realización de las mismas es estadiar la enfermedad músculo-invasiva con el propósito de aportar información de cara al tratamiento. El estadiaje del tumor debe ser lo más preciso posible. En este sentido, las técnicas de imagen deben aportar parámetros relativos a la extensión de la invasión local, afectación ganglionar, afectación del TUS y/o diseminación a distancia.

La TC permite la obtención de imágenes de órganos y tejidos con una alta resolución, gracias a la reconstrucción computarizada de cortes tomográficos que son escaneados. De esta manera es capaz de proporcionar información de afectación extravesical con una sensibilidad que oscila entre el 55% y el 92% (Kundra and Silverman, 2003) y aumenta cuanto más avanzada está la enfermedad (Kim et al., 1994). La principal limitación de la técnica reside en que no detecta depósitos extravesicales de tumores inferiores a 1 cm de diámetro.

La RM es otra técnica de diagnóstico que permite obtener imágenes de órganos gracias a la cinética de protones en el interior del paciente, la cual crea una corriente cuya magnitud se relaciona con la intensidad del píxel en la imagen obtenida. A diferencia de la TC, la RM puede generar imágenes multiplano directas y proporcionar información específica (por ejemplo del flujo sanguíneo, líquidos estáticos, etc). La RM tiene una resolución del contraste de tejidos blandos superior a la de la TC, pero una peor resolución espacial. La RM presenta una sensibilidad entre 73%-96% en el estadiaje del tumor primario (Huang et al., 2018). Al igual que la TC, la principal limitación se encuentra en la detección de enfermedad ganglionar.

4.5 Biopsia múltiple normalizada

El CV suele ser multifocal y además puede acompañarse de *cis* o displasia. Estas lesiones pueden presentarse como zonas enrojecidas aterciopeladas indistinguibles de inflamación o no verse en absoluto. Es por ello que, de manera sistemática, ante la sospecha de dichas

lesiones y en los tumores de debut, se recomienda la realización de biopsia múltiple normalizada (BMN). Ésta es una técnica de diagnóstico mediante la toma, con pinza fría, de fragmentos mucosos de la vejiga. El número de biopsias que se suelen realizar en el mapeo vesical varía según el centro, pero en ningún caso debe ser menor de cuatro (Figura 7).

Las seis localizaciones más frecuentes de donde se obtiene una biopsia vesical son el trigono, pared posterior, pared lateral derecha, pared lateral izquierda, cúpula y uretra prostática.

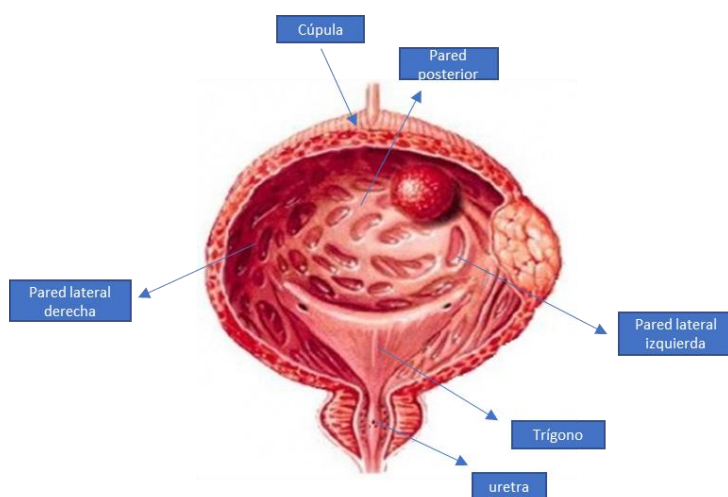


Figura 7. Esquema de la biopsia vesical múltiple, con las localizaciones frecuentes de recogida de muestras (fuente: *google image modificada*).

El material obtenido de la realización de BMN debe enviarse para un examen anatómo-patológico.

5. Tratamiento

Tras la sospecha de CV se procederá en primer lugar a la realización de una resección transuretral (RTU) con el objetivo de extirpar el tumor en su totalidad si es posible y obtener tejido para el estudio anatómo- patológico, fundamental para el manejo posterior del paciente.

5.1 Tratamiento del cáncer de vejiga no-músculo-invasivo (NMIBC)

5.1.1 Resección transuretral (RTU)

La RTU de tumor vesical es un procedimiento quirúrgico bajo anestesia durante el cual se procede a la resección de las lesiones vesicales sospechosas de tumor a través de la uretra, mediante un aparato llamado resectoscopio (Figura 8). Como hemos apuntado anteriormente, tiene una doble finalidad, por un lado, terapéutica puesto que se elimina el tumor siempre y cuando la lesión lo permita y por otro, permite establecer el diagnóstico (estudio anatómo-patológico) que aportará una información fundamental de cara al pronóstico y manejo terapéutico. La RTU de tumor vesical irá acompañada de BMN en tumores de debut o en casos de sospecha de *cis*. Toda RTU de tumor vesical debe ser realizada de forma minuciosa y precisa. En este sentido, debe incluir la capa muscular, imprescindible para poder realizar un estadiaje desde el punto de vista anatómo-patológico. En el caso en el que haya ausencia de esta capa, se informará como pTx, por lo que se recomendará llevar a cabo un re-RTU.

Pese a tratarse de un procedimiento quirúrgico menor, es una cirugía no exenta de complicaciones. El porcentaje de las mismas oscila entre un 4,7-16%, estando directamente relacionadas con las comorbilidades del paciente, el tamaño de la lesión a resecar, el número de tumores y la experiencia del cirujano (Babjuk et al., 2013).

La RTU de tumor vesical como tratamiento único tiene un escaso papel. Podría considerarse en lesiones de pequeño tamaño, únicas, superficiales con bajo riesgo de recidiva y/o progresión (Ta bajo grado con ausencia de *cis*). Para el resto de tumores vesicales, es decir, aquellos de riesgo intermedio o alto, se recomienda la realización de tratamiento adyuvante mediante instilaciones intravesicales con agentes quimio o inmunoterápicos de forma inmediata tras la RTU y posterior, ya que han demostrado eficacia a la hora de reducir el riesgo de recidiva y progresión (Babjuk et al., 2017).

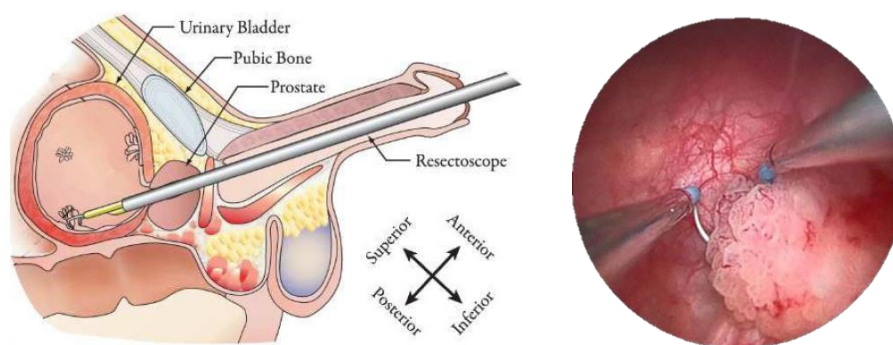


Figura 8. Esquema e imagen real de una resección transuretral (Fuente: <https://bellurology.com> y <http://www.drtrimnathan-urology.com.au>).

5.1.2 Inmunoterapia intravesical con *Bacillus de Calmette-Guérin* (BCG)

Este procedimiento consiste en la instilación intravesical de forma periódica de preparaciones del bacilo de *Calmette-Guérin* obtenidas a partir de cepas modificadas provenientes de una cepa original de *Mycobacterium Bovis*. El objetivo de la instilación es desencadenar por parte del huésped una respuesta inmunológica contra el agente bacteriano introducido. Dicha respuesta se presenta en una descamación de la vejiga, de manera que se desprenden tanto las células normales como las tumorales.

Esta reacción inmunológica pretende ser activa (ya que el sistema inmunológico del paciente es el efectador) e inespecífica (puesto que implica una respuesta inflamatoria independiente de la antigenicidad tumoral). El funcionamiento de la misma, radica en la potenciación de las células efectoras del sistema inmune del paciente.

La combinación terapéutica de instilación intravesical con BCG posteriormente a la cirugía (RTU) ha demostrado ser más afectiva que la cirugía aislada o en combinación con agentes quimioterápicos en enfermedad no músculo-invasiva a la hora de prevenir la recidiva y la progresión (Han and Pan, 2006, Shelley et al., 2004). Del mismo modo, se ha observado que el efecto de la BCG se mantiene en el tiempo (Järvinen et al., 2009). Se trata del tratamiento de elección para el *cis* y los tumores de alto grado.

Por lo que respecta a la toxicidad, la BCG tiene un perfil de efectos secundarios más elevado en comparación con los agentes quimioterápicos (Sylvester et al., 2002). En este sentido, es importante señalar que la toxicidad severa está descrita en un porcentaje inferior al 5% de los pacientes tratados y se resuelve de una manera eficaz en casi todos los casos (van der Meijden et al., 2003). La incidencia de infección por BCG tras la instilación es del 1% (Larsen et al., 2019).

5.1.3 Quimioterapia intravesical con Mitomicina C

La instilación única, inmediata a la RTU ha demostrado eficacia en la destrucción de células circulantes tumorales, así como un efecto ablativo de las células residuales tumorales del lecho quirúrgico (Koga et al., 2004). Cuatro metanálisis con 1.476-3.103 pacientes muestran que la instilación tras la RTU reduce la tasa de recurrencia en comparación con la RTU asilada (Sylvester et al., 2016, Sylvester et al., 2004, Abern et al., 2013, Perlis et al., 2013).

En la actualidad existen diferentes agentes quimioterápicos intravesicales utilizados tales como mitomicina C, epirrubicina o pirarrubicina. Todos ellos han demostrado beneficio terapéutico. A pesar de ello, no existen estudios randomizados comparativos entre ellos. A nivel de práctica clínica en nuestro ámbito, el más utilizado en la mitomicina C.

5.2 Tratamiento del cáncer de vejiga músculo-invasivo (MIBC)

5.2.1. Cistectomía

La cistectomía radical con linfadenectomía ilio-obturatriz extendida es el tratamiento de elección para la enfermedad vesical músculo-invasiva localizada/localmente avanzada (T2-T4a, N0-Nx, M0) así como para la enfermedad no músculo-invasiva de alto riesgo y recurrente, refractaria, no respondedora al tratamiento intravesical con BCG y para tumores extensos que no pueden ser controlados con RTU y terapia intravesical.

El estado general del paciente, así como la expectativa de vida marcarán de una forma notable el tratamiento a realizar. En este sentido, la cistectomía radical se considerará en primera instancia en pacientes con una larga expectativa de vida y con baja comorbilidad.

Este tratamiento comporta la exéresis completa de la vejiga, de la próstata (en caso del varón), útero (en caso de la mujer) y los ganglios linfáticos adyacentes. A ello se acompaña de la realización de una derivación urinaria llevada a cabo con intestino. Dentro de ellas señalar que existen de dos tipos, continentes e incontinentes. En este sentido, la neovejiga ortotópica y el conducto ileal son las derivaciones urinarias continente e incontinente más habituales, respectivamente.

La cistectomía radical es una cirugía mayor con una tasa de complicaciones no desdeñable. La mortalidad perioperatoria a los 30 días se sitúa entre el 1,2-3,2% y a los 90 días del 2,3-8% (Stein and Skinner, 2006, Hautmann et al., 2010). Respecto a la tasa de complicaciones tempranas (dentro de los 3 primeros meses) se sitúa en el 58% de los pacientes (Hautmann et al., 2010). Las complicaciones tardías están en relación al tipo de derivación urinaria realizada (Jentzmik et al., 2012).

5.2.2. Quimioterapia

Habitualmente, el tratamiento sistémico con quimioterapia basada en platino se utiliza en régimen de neoadyuvancia, adyuvancia o dentro del tratamiento de preservación vesical.

El tratamiento sistémico de forma aislada con agentes quimioterápicos tiene una respuesta pobre en cuanto a remisión completa duradera. Como tratamiento neoadyuvante permite una disminución del estadio patológico del tumor primario (Grossman et al., 2003).

La estrategia de preservación vesical se reserva para pacientes muy seleccionados y, en estos casos, con buenos resultados a largo plazo (Sternberg et al., 2003). En este sentido, un reciente trabajo con 1.538 pacientes tratados con RTU de tumor vesical y quimioterapia sistémica mostró una supervivencia global a los 2 y 5 años del 52% y 36%, respectivamente para pacientes T2 (Audenet et al., 2018).

5.2.3. Radioterapia (RT)

El desarrollo de la tecnología en este campo está siendo notable en los últimos tiempos de manera que en la actualidad se consigue una mayor área de cobertura con una reducción de la

dosis en tejidos adyacentes. La dosificación curativa de la RT en el cáncer vesical es de 64-66 GY (Hafeez et al., 2017). Dichas técnicas novedosas resultan en una morbilidad urinaria e intestinal inferior al 5% (Milosevic et al., 2007).

En términos generales, la RT como tratamiento aislado en la enfermedad músculo-invasiva presenta una eficacia inferior respecto a la cirugía o al tratamiento combinado. Esta modalidad terapéutica se reserva para pacientes no tributarios de tratamiento quirúrgico y /o también puede utilizarse para control hemostático.

5.2.4 Inmunoterapia

La inhibición de PD-1/PDL-1 ha demostrado beneficio significativo en pacientes con enfermedad irreseccable y metastásica en segunda línea de tratamiento y en aquellos pacientes no tributarios de quimioterapia basada en platino (Necchi et al., 2018). Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos para testar su eficacia en régimen de neoadyuvancia como tratamiento único o combinado con agentes quimioterápicos así como en régimen de adyuvancia en monoterapia con fármacos tales como atezolizumab, nivolumab o pembrolizumab.

6. Pronóstico

El pronóstico de cáncer de vejiga difiere sustancialmente en función de si estamos ante una enfermedad músculo-invasiva o no.

Para la enfermedad no músculo-invasiva se ha desarrollado una escala de puntuación para establecer el riesgo de recurrencia y progresión (Sylvester et al., 2006). El fundamento de estas tablas reside en información de pacientes diagnosticados de Ta y T1 incluidos en 7 estudios randomizados. Los pacientes con *cis* fueron excluidos. Dicho sistema de clasificación se basa en

6 de los factores clínicos y patológicos más importantes que se muestran en la siguiente tabla (tabla 3).

Tabla 3. Puntuación de recurrencia y progresión de NMIBC (Sylvester et al., 2006).

FACTOR		RECURRENCIA	PROGRESIÓN
Número tumores			
Único		0	0
2-7		3	3
≥ 8		6	3
Diámetro tumoral			
< 3 cm		0	0
≥ 3 cm		3	3
Tasa recurrencia previa			
Primario		0	0
≤ 1 recurrencia/año		2	2
> 1 recurrencia/año		4	2
Categoría			
Ta		0	0
T1		1	4
Presencia <i>cis</i>			
No		0	0
Si		1	6
Grado			
G1		0	0
G2		1	0
G3		2	5
Total		0-17	0-23

De este modo, se asigna a cada factor un valor que afectará a puntuación final para recurrencia y progresión de la enfermedad (Tabla 4).

Tabla 4. Probabilidad de recurrencia y progresión de acuerdo a la puntuación obtenida en la Tabla 2 (Sylvester et al., 2006).

PUNTUACIÓN RECURRENCIA	PROBABILIDAD RECURRENCIA 1 AÑO	PROBABILIDAD RECURRENCIA 5 AÑOS
	%	%
0	15	31
1-4	24	46
5-9	38	62
10-17	61	78

PUNTUACIÓN PROGRESIÓN	PROBABILIDAD PROGRESIÓN 1 AÑO	PROBABILIDAD PROGRESIÓN 5 AÑOS
	%	%
0	0,2	0,8
2-6	1	6
7-13	5	17
14-23	17	45

En el caso de la enfermedad músculo-invasiva, de acuerdo a un estudio con un total de 888 pacientes sometidos a cistectomía radical, la tasa de supervivencia cáncer específica y la tasa de supervivencia libre de recurrencia se sitúan en el 66% y 58%, respectivamente (Shariat et al., 2006). En pacientes con afectación ganglionar, la supervivencia libre de recurrencia a los 5 años fue del 34-43% (Madersbacher et al., 2003, Bruins et al., 2009).

De forma global, la supervivencia libre de recurrencia a los 5 años en pacientes sometidos a cirugía por enfermedad músculo-invasiva responden a 76% para los tumores en estadio pT1, 74% para los pT2, 52% para los pT3 y 36% para los pT4 (Stein et al., 2001).

III. BIOLOGIA MOLECULAR DEL CARCINOMA UROTELIAL

Como en la mayoría de neoplasias, la biología molecular del CV es sumamente compleja. En este sentido, se trata de tumores que presentan una elevada cantidad de alteraciones moleculares, especialmente en la enfermedad músculo-invasiva.

En términos generales, las lesiones moleculares responsables de la formación de una neoplasia tienen lugar en los siguientes tipos de genes reguladores:

- Protooncogenes: la principal función de su producto génico es promover la proliferación celular.
- Genes supresores de tumor: son los responsables de regular el crecimiento celular descontrolado.
- Genes reparadores: son aquellos que codifican para proteínas involucradas en el mantenimiento de la integridad del genoma.

1. PROTOONCOGENES

La función más importante de las proteínas codificadas por los protooncogenes es la transmisión de señales desde la superficie celular al citoplasma o al núcleo, así como la generación de una respuesta a estas señales a través de la fosforilación de moléculas diana e inducir la transcripción del DNA. Las mutaciones en estos genes son de ganancia o cambio de función y, promueven la proliferación y la diferenciación celular. Las mutaciones en los protooncogenes afectan solo a un alelo y prácticamente siempre resultan en cambios somáticos. Los protooncogenes mutados se denominan oncogenes.

Los primeros oncogenes relacionados con la neoplasia vesical pertenecían a la familia **RAS (H-RAS, K-RAS y N-RAS)**. Estas proteínas juegan un papel clave en la transducción de señales intracelulares (Knowles and Williamson, 1993). También se ha observado

sobreexpresión de **EGFR** y **ERBB2** en el CV, especialmente relacionados con la enfermedad músculo-invasiva (Knowles, 2001, Habuchi et al., 2005, Wolff et al., 2005).

Otros oncogenes relacionados con este tipo de neoplasia son **C-MYC**, **BCL-2**, **BIRC5** y **FAS** entre otros (Kee et al., 2001, Shiina et al., 1995, Altieri, 2003, Duffy et al., 2007, Lee et al., 1999). El **C-MYC**, localizado en 8q, es un oncogen que codifica para una fosfoproteína nuclear. Entre las funciones de esta proteína se incluyen la regulación de la transición G0/G1 del ciclo celular y la de promover la replicación del DNA. Aunque la sobreexpresión de este gen no se relaciona con la progresión tumoral y/o supervivencia, parece encontrarse con más frecuencia en tumores de alto estadio y grado (Kee et al., 2001). **BCL-2**, localizado en 18q juega un papel fundamental en la inhibición de la apoptosis. Su sobreexpresión está relacionada con fenotipos poco agresivos de tumor (Shiina et al., 1995).

Uno de los protooncogenes relacionados con la apoptosis y el CV es **BIRC5**, localizado en 17q que codifica para una proteína conocida como survivina. Esta proteína es multifuncional puesto que juega un papel clave en la inhibición de la apoptosis, interviene en la regulación del ciclo celular y promueve la angiogénesis. Se ha descrito sobre-expresada en diferentes neoplasias, incluyendo el CV. Dada su marcada diferencia en términos de expresión entre el tejido tumoral y el sano, se ha estudiado como diana terapéutica y como marcador tumoral en CV (Altieri, 2003, Duffy et al., 2007). Finalmente, **FAS** otro protooncogen importante relacionado con la señalización en la apoptosis. Mutaciones en este gen podrían limitar la muerte celular programada favoreciendo el desarrollo del CV (Lee et al., 1999).

2. GENES SUPRESORES DE TUMOR

Los genes supresores de tumores codifican para proteínas que fundamentalmente controlan y regulan el ciclo celular. En la enfermedad músculo-invasiva es habitual encontrar defectos en estos genes que codifican para proteínas involucradas en este punto del ciclo celular. Entre ellos, **TP53**, **RB1** y **CDKN2A**, presentan un pronóstico adverso (Mitra et al., 2012). Concretamente, la función de **TP53** se encuentra inactivada en el 76% del CVMI (TCGA., 2014). Sin embargo, estas mutaciones no son frecuentes en estados iniciales de la enfermedad.

Dentro de este grupo, otros genes relacionados con el CV son **CCND1**, **CKDN1A**, **CKND2B**, **PTHC1**, **DBC1** y **TSC1**. Todos ellos tienen que ver con la capacidad de recidiva y progresión de la enfermedad (TCGA., 2014, Llopis et al., 2000, Cote and Datar, 2003, Aboukassim et al., 2003, Habuchi et al., 1998, Platt et al., 2009). La inactivación de la ciclina **CCND1** está relacionada con el desarrollo de CVNMI y puede suponer un mecanismo de inactivación del punto de partida de G1 en este tipo de tumores.

Se ha observado una pérdida de heterocigosidad del locus de **RB1** en un 29-33% del CV, también una mayor frecuencia en enfermedad músculo-invasiva y mutaciones puntuales del mismo gen en aproximadamente el 27% de los pacientes (Miyamoto et al., 1995). Además, la pérdida de expresión de p16, frecuentemente alterada en CV, está inversamente correlacionada con la expresión de **RB1** y resulta en un *feedback* de altos niveles de expresión en tumores con pérdida de **RB1** (Frère-Belda et al., 2004). Estos dos cambios son utilizados como biomarcadores adversos de progresión y se encuentran en más del 50% de los tumores músculo-invasivos (Shariat et al., 2004).

Otro de los genes claves por su papel en la regulación del ciclo celular es **CDKN1A**, localizado en 6p y que codifica para la proteína P21. Se trata de un gen supresor de tumores por su capacidad de unión e inhibición de la actividad fosforilasa de las quinasas dependientes de ciclinas que regulan el ciclo celular. Su expresión está regulada de forma directa por **TP53**, siendo ambos, mediadores de la parada del ciclo celular cuando se produce un daño en el DNA. Estudios inmunohistoquímicos han mostrado en el *cis*, que la existencia de un fenotipo con ambas proteínas mutadas, TP53 y P21, está relacionado con un mayor riesgo de recidiva, progresión y mortalidad (Llopis et al., 2000, Shariat et al., 2003).

Destacar **CDKN2A** y **CDKN2B** que codifican para las proteínas P16 y P15, respectivamente, localizadas en la región 9p21, la cual se encuentra frecuentemente delecionada en estadios iniciales del CV. Estas proteínas son quinasas dependientes de ciclinas que regulan el ciclo celular. Concretamente, la pérdida de expresión de P16, un inhibidor de la fosforilación de PRb y por lo tanto inhibidor del ciclo celular, parece presentar un efecto adverso sobre la evolución clínica y la recidiva del tumor (Cote and Datar, 2003).

Por último, señalar que **TSC1** es uno de los genes más estudiados. Tiene la función de regular negativamente la expresión del brazo de mTOR hacia la vía PI3K. La pérdida de

heterocigocidad del cromosoma 9, la delección homocigota de **CDKN2A** y la pérdida de expresión de p16 en CVNMI está relacionada con una reducción del tiempo libre de recidiva en pacientes con CV (Ploussard et al., 2010, Bartoletti et al., 2007).

3. GENES REPARADORES

Estos genes codifican para proteínas que detectan y reparan errores en la síntesis del DNA. Cuando no se corrigen estos errores, aumenta el número de mutaciones a nivel de todo el genoma. Dichos errores suceden habitualmente en secuencias repetidas situadas en regiones codificantes y no codificantes.

Por lo que respecta a la enfermedad músculo-invasiva, los genes **ERCC2** y **ATM** están descritos en estudio del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) como promotores de progresión de la neoplasia (TCGA., 2014). En este sentido, la frecuencia de mutaciones germinales en genes reparadores del DNA en pacientes con cáncer vesical es aproximadamente del 10%, siendo más habituales en pacientes con enfermedad músculo-invasiva y asociándose a pronóstico desfavorable (Na et al., 2018).

4. SUBTIPOS MOLECULARES DEL CV

La falta de homogeneidad en la evolución clínica de los pacientes con CV sugiere la existencia de rasgos biológicos diferencialmente relevantes a nivel molecular entre los tumores músculo-invasivos y los que no lo son. Esta discrepancia lleva a pensar en la existencia de diversas vías de progresión de la enfermedad con varios patrones de alteraciones genéticas. La información sobre la genética y la biología molecular del CV ha ayudado a hipotetizar diferentes modelos sobre el desarrollo de estos tumores. La gran mayoría de modelos coinciden en que la delección del cromosoma 9, o al menos de su brazo p, suele ocurrir en el CV (Orlow et al., 1994, Simoneau et al., 1996). Sin embargo, existen diferentes teorías en torno a la divergencia genética entre los tumores músculo-invasivos y los no músculo-invasivos.

Höglund y colaboradores en 2001 propusieron un modelo en el que se mostraban dos vías de desarrollo del CU (Höglund et al., 2001). Una de estas vías se iniciaría con la pérdida del cromosoma 9 y continuaría con las pérdidas del 11p y con ganancias en el 1q. Esta sería la vía que seguirían aquellos tumores que empiezan siendo Ta pero que luego progresan a músculo-invasivos. Por otra parte, una segunda vía comenzaría con ganancias al cromosoma 7 y continuaría con pérdidas y ganancias del cromosoma 8q. Esta vía presentaría una correlación con los estadios T1-T3. En pasos posteriores de ambas vías se darían alteraciones genéticas comunes, de forma que estas dos vías serían inicialmente independientes pero convergerían en estadios avanzados, cuando el número de alteraciones genéticas es muy elevado.

Más adelante, en 2005, Wu y colaboradores plantean también dos vías de evolución del CV (Wu, 2005). Una de ellas se caracteriza por la presencia de mutaciones en *FGFR3* (70%) y *H-RAS* (30-40%) al inicio de la carcinogénesis. Posteriormente y asociadas a progresión, se producirían deleciones en 8p, 11p, 13q y 14q. Una segunda vía, que caracterizaría a los tumores músculo-invasivos de alto grado, se originaría a partir de un Cis, de una displasia severa, o bien *de novo*. La mayoría de los tumores que irían por esta vía tendrían mutaciones en *TP53* o en *RB1*. Además, el 50% de los tumores que seguirían esta vía generarían metástasis al intervenir en el proceso alteraciones entre otros, en moléculas de adhesión y en factores que intervienen en la angiogénesis.

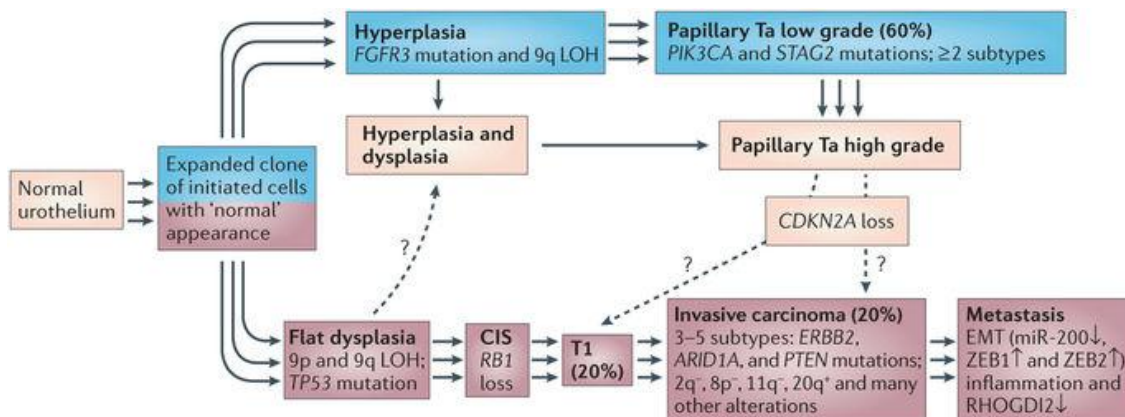


Figura 9. Potenciales vías para la formación del CV basadas en observaciones histopatológicas y moleculares. Los colores azul y rosa indican las dos vías mayoritariamente reconocidas. Actualmente, la identificación de los diferentes subtipos moleculares sugiere vías alternativas entre las dos principales vías (Knowles and Hurst, 2015).

Actualmente y gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, se puede confirmar la teoría de las dos vías: los tumores no músculo invasivos, con altas tasas de recidiva pero genéticamente estables, y los tumores músculo invasivos, genéticamente inestables y que acumulan muchas alteraciones (Figura 9).

Cabe destacar que se han encontrado tumores invasivos que presentan mutaciones en *FGFR3* y pérdida de *CDKN2A*, lo que podría sugerir una vía por la que tumores papilares no invasivos de bajo grado pueden progresar e invadir el músculo e incluso llegar a metastatizar. La reciente identificación de múltiples subtipos moleculares de NMIBC y de MIBC sugiere varias sub-vías dentro de las dos vías principales que explicarían la heterogeneidad y la variabilidad del comportamiento tumoral que se observa en la práctica clínica (Figura 10).

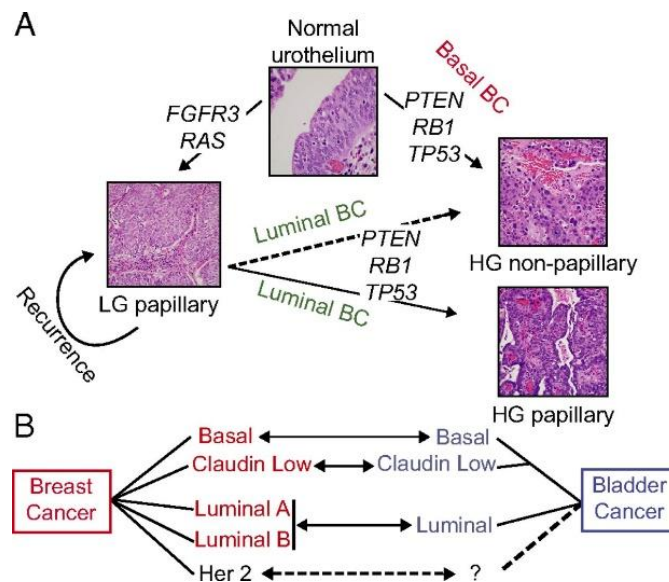


Figura 10. Propuesta de modelo para la formación del CV y la relación con los subtipos intrínsecos del cáncer de mama. **A)** Asociación de las alteraciones genéticas en los CV de bajo y alto grado. **B)** Diagrama que muestra la posible relación entre los subtipos intrínsecos de cáncer de mama y vejiga (Knowles and Hurst, 2015).

Un extenso estudio de expresión en varios tumores de vejiga de todos los estadios y grados llevado a cabo en 2012 por Sjö Dahl y colaboradores (conocido como "estudio de Lund") identificó cinco subtipos tumorales: urobasal (UroA), UroB, genéticamente inestable (del inglés, GU), carcinoma de células escamosas (del inglés, SCCL) e invasivo (Sjö Dahl et al., 2012).

El grupo SCCL comparte muchas características con el subtipo basal en cáncer de mama por lo que se ha decidido llamarlo también basal (Sjödahl et al., 2013). Los tumores UroA son de buen pronóstico; los GU y los invasivos presentan un pronóstico intermedio y los basales y los UroB tienen el peor pronóstico. Los tumores UroB tienen mutaciones en *TP53* y muchos son músculo-invasivos pero muestran características epiteliales, incluyendo mutaciones en *FGFR3*, lo que puede indicar que son una evolución del grupo de UroA. Los tumores UroB también presentan delección homocigótica de *CDKN2A*, lo que podría ser un mecanismo por el que los tumores no músculo invasivos con mutación en *FGFR3* progresaran (Rebouissou et al., 2012). Estos subtipos moleculares no correlacionan exactamente con el estadio patológico y el grado histológico de los tumores incluidos en el estudio, lo que puede tener implicaciones relevantes en el tratamiento y pronóstico de estos pacientes.

Subsecuentes estudios en MIBC realizados por Damrauer y colaboradores, han definido los subtipos transcripcionales (TCGA.,2014,Damrauer et al., 2014,Choi et al., 2014b), con grandes coincidencias (Choi et al., 2014a) ya que los dos subtipos mayoritarios (basal y luminal) muestran grandes semejanzas con los mismos subgrupos en cáncer de mama. Los tumores del subgrupo luminal de MIBCs están enriquecidos en uroplaquinas, *KRT20*, *ErbB2* y marcadores de diferenciación como *FOXA1*, *GATA3*, *TRIM24* y *PPARγ*, y además presentan una morfología papilar y sobre-expresión o mutación de *FGFR3*.

En el estudio del TCGA se han definido cuatro grupos basados en la expresión génica:

- CV basal. Dentro de este grupo se encuentran dos subgrupos basal y Claudina low-type.
- CV luminal. Dentro de este grupo se encuentran los subtipos luminal y p53-like.

El subtipo molecular p53-like se caracteriza por presentar activaciones en la vía de *TP53*, bajos niveles de marcadores de ciclo celular y de proliferación y, enriquecimiento de marcadores de matriz extracelular (Choi et al., 2014b). El subtipo Claudina low-type expresa marcadores característicos de EMT con bajos niveles de citoqueratinas (Damrauer et al., 2014). El grupo del CV basal muestra una sobreexpresión de *EGFR3* y es a grandes rasgos quimiosensible. Sin embargo, el grupo luminal puede presentar sobreexpresión de *FGFR3*, *ERBB2* y *ERBB3* y es quimioresistente (Sjödahl et al., 2012,Choi et al., 2014b,Choi et al., 2014a).

Un resumen de los diferentes subtipos moleculares del CU descritos hasta el momento se muestra en la Figura 11.

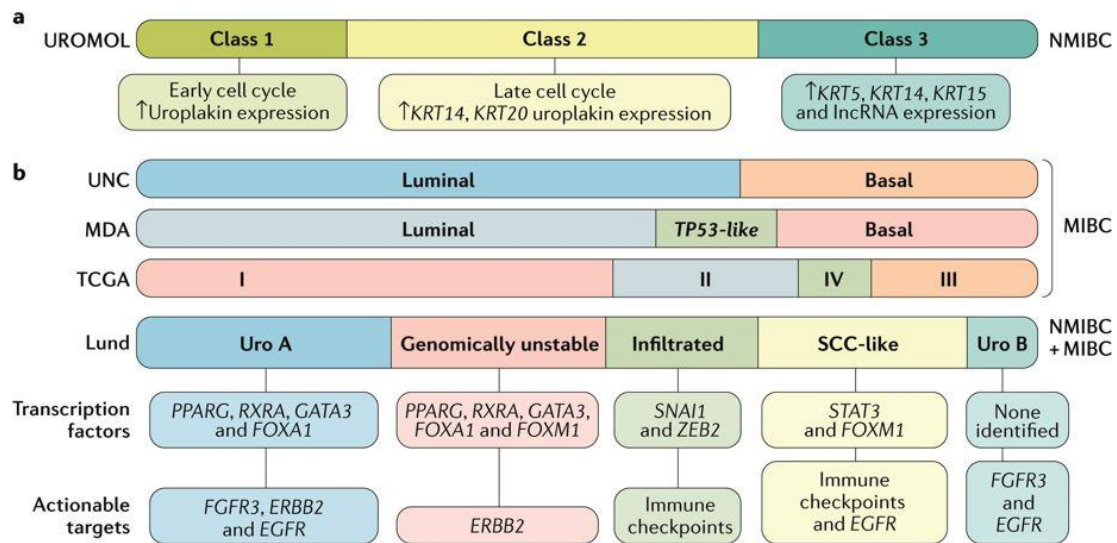


Figura 11. Subtipos moleculares del cáncer vejiga. a) Subtipos moleculares del NMIBC del estudio UROMOL. b) Nomenclatura y correlación entre los subtipos moleculares descritos por los diferentes estudios transcripcionales del MIBC (Sanli et al., 2017).

Por último, recientemente se ha descrito una nueva clasificación molecular que pretende ser la clasificación definitiva de subtipos moleculares para poderla utilizar en la práctica clínica y mejorar el tratamiento de estos tumores. Esta nueva clasificación incluye un total de 6 categorías moleculares para la enfermedad músculo-invasiva (Kamoun et al., 2020):

- Luminal papillary (LumP).
- Luminal non-specified (LumNS).
- Luminal unstable (LumU).
- Stroma-rich.
- Basal/squamous (Ba/Sq).
- Neuroendocrino-like (NE-like).

Cada uno de estos subgrupos comprende diferencias en materia de mecanismos oncogénicos, microambiente tumoral, histología y asociaciones en cuanto a clínica se refieren (Figura 12).

Esta clasificación se considera una herramienta investigadora y aunque no es aplicable en la práctica clínica diaria, si puede tenerse en cuenta de cara a la toma de decisiones.

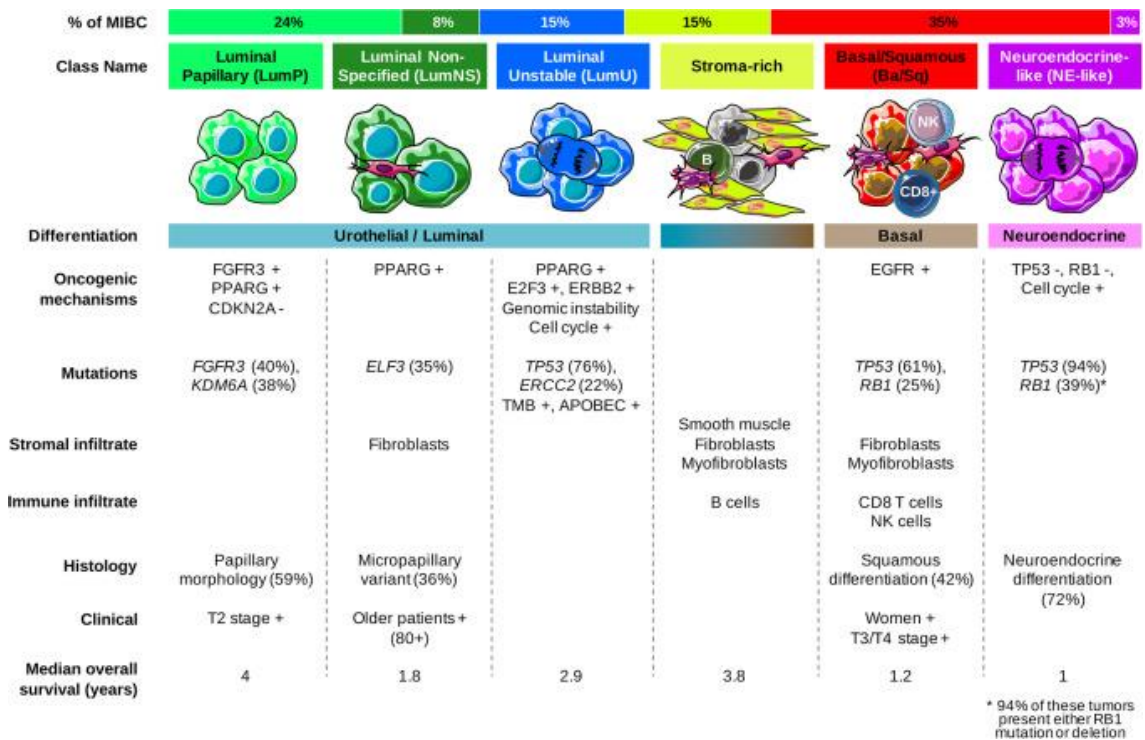


Figura 12. Resumen de las principales características de las células tumorales y sus microambientes de la nueva clasificación molecular (Kamoun et al., 2020).

Implicaciones terapéuticas para el cáncer de vejiga a partir de los resultados de TCGA

La caracterización del CV derivada de los datos obtenidos en un segundo estudio del TCGA podría tener una trascendencia clínica y terapéutica. Por ejemplo, de los nuevos subtipos identificados por RNA-seq, los tumores luminal-infiltrado y basal-escamoso podrían ser tratados con inmunoterapia (incluyendo la inhibición de PDL1, PD-1, o CTLA4), los tumores luminal-papilar podrían ser tratados con inhibidores de *FGFR3*, y los tumores neuronales (con alta expresión génica del ciclo celular) podrían tratarse con etopósido/quimioterapia neoadyuvante con cisplatino. Estos subtipos concuerdan con los cuatro grupos reportados con anterioridad (Strosberg et al., 2017, Strosberg et al., 2015) (Figura 13). Pese a ello, en la práctica clínica no se aplica de forma específica estos fármacos en función de los subtipos identificados.

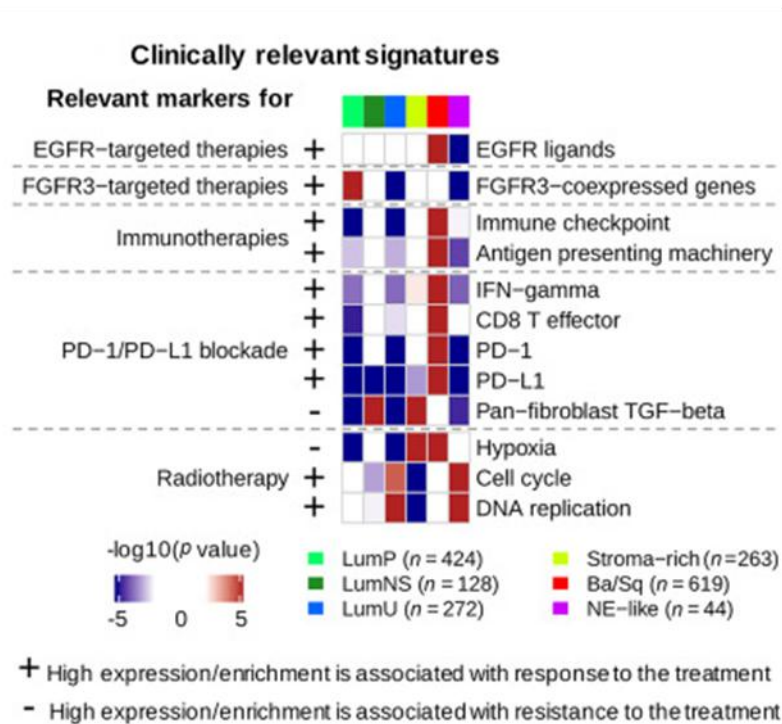


Figura 13. Características clínicas y asociaciones pronósticas. Asociación de altos niveles de expresión génica con respuesta / resistencia a la terapia correspondiente (Kamoun et al., 2020)

5. microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de cadena simple formados por 18-25 nucleótidos de longitud y que constituyen una nueva clase de genes reguladores (Bentwich et al., 2005). En general, regulan negativamente la expresión de sus dianas (un mRNA, *Messenger RNA*, es una diana de un miRNA si este miRNA regula el mRNA) de una o dos maneras dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y su diana (Figura 14).

Entre todos los elementos reguladores, los miRNAs son especialmente interesantes porque un miRNA puede regular hasta cientos de mRNA y son más estables que otros tipos de RNA.

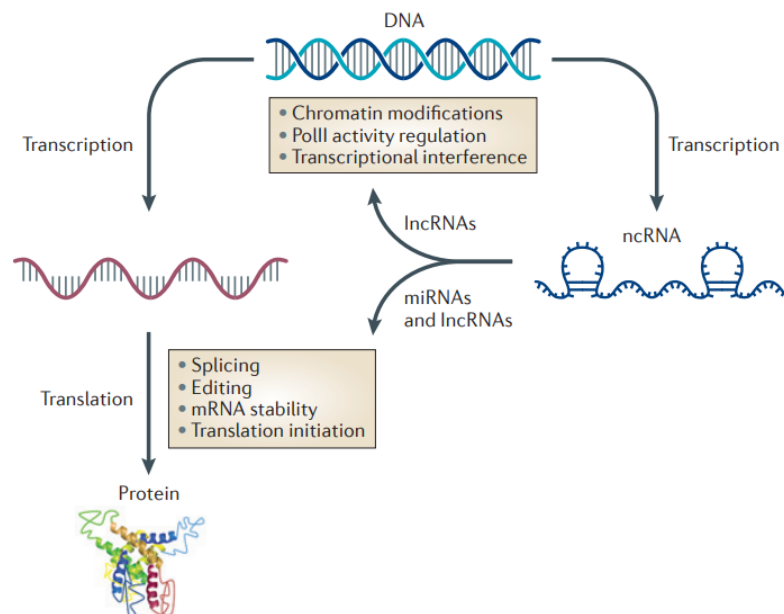


Figura 14. Resumen de los elementos básicos que regulan el DNA, la expresión en forma de mRNA y de las proteínas (Wahlestedt, 2013).

En esta tesis se han identificado miRNAs con valor diagnóstico y pronóstico para el CV, y por lo tanto, a continuación se describe la biogénesis, nomenclatura y relación de los miRNAs con el cáncer.

5.1 Biogénesis de los microRNAs

La transcripción de los genes de los miRNAs por la polimerasa II da lugar a la generación de un transcrito primario del miRNA (pri-miRNA). Un complejo formado por las proteínas Drosha y DGCR8 constituye el microprocesador que corta el pri-miRNA para formar la horquilla del miRNA precursor o pre-miRNA (Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

El pre-miRNA es exportado al citoplasma por una vía dependiente de la exportina 5. Allí, el pre-miRNA es cortado por la RNAsa Dicer (la actividad de la cual puede estar regulada por proteínas accesorias como por ejemplo *FMR1*) y se forma un dúplex que llamaremos miRNA intermediario. Este dúplex contiene dos fragmentos maduros de miRNA, los que se

llamarán 5p y 3p (por ejemplo "miR-21-5p" y el "miR-21-3p"). El fragmento que se transcribe en la dirección original de traducción será el 5p ("miR-21-5p"), mientras que el 3p (miR21-3p") será el complementario. Normalmente, uno de ellos es inmediatamente degradado (normalmente el fragmento 3p).

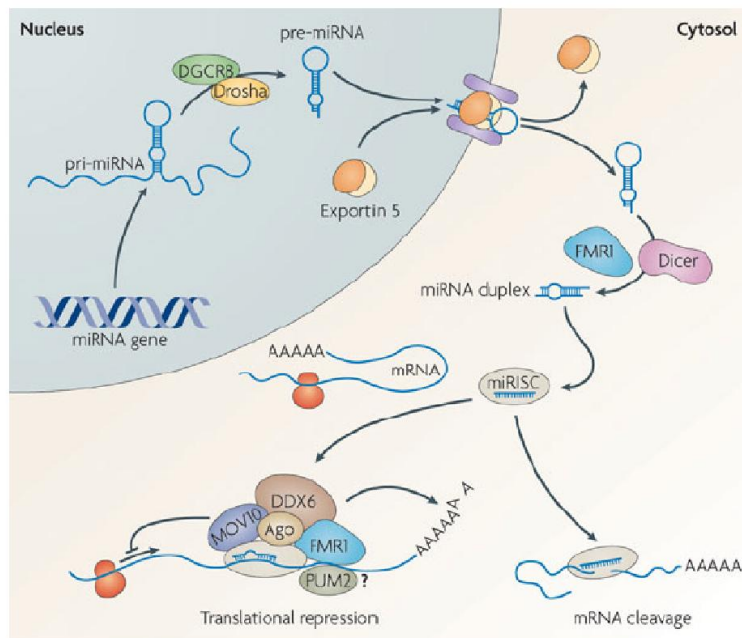


Figura 15. Biogénesis del miRNA y de su sistema de acción (Schratt, 2009).

Este miRNA maduro (ya sea el "-5p" o el "-3p") se integra en un complejo multiprotéico llamado complejo miRISC (*miRNA-induced silencing complex*). Este complejo es guiado hasta el mRNA diana y cuando ambos hibridan, preferiblemente en localizaciones cercanas al 3'UTR del mRNA (lo que se requiere una complementariedad completa a la cual llamamos *seed* del miRNA pero no a otras partes de la unión), dos opciones son posibles: la represión traslacional o la degradación del mRNA diana, normalmente esta degradación ocurre alrededor del 84% de las veces (Guo et al., 2010). En ambos casos, la proteína nunca se forma. El mecanismo detallado de miRISC es todavía controvertido pero requiere de la función de otras proteínas (helicadas como MOV10 y DDX6 o proteínas de unión al RNA como FMR1 o PUM2) (Figura 15).

5.2 Nomenclatura

La base de datos donde se recogen los miRNAs humanos descubiertos es la llamada miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006). En versiones anteriores de miRBase, el fragmento de miRNA degradado estaba marcado con un asterisco (por ejemplo miR-21*) y el otro sin más identificación que el número (por ejemplo miR-21). Sin embargo esta no es una regla general, y a veces ambos fragmentos permanecen estables y funcionales en la célula (Bartel, 2009). Es por ello que en versiones más recientes de miRBase, los miRNA maduro están referidos como '5p' y '3p'. (Figura 16)

Nomenclatura	
miRNA gen	MIR21
miRNA primario	<i>hsa-mir-21</i> (no específico)
precursor miRNA	<i>hsa-mir-21</i>
miRNA maduro	<i>hsa-miR-21-5p</i> and <i>hsa-miR-21-3p</i> (mirbase_ 18) <i>hsa-miR-21</i> and <i>hsa-miR-21*</i> (mirbase_ 17)

Figura 16. Nomenclatura de los miRNAs según su estado de maduración. A veces suele omitirse el-*hsa* del miRNA.

Se cree que más del 60% de los mRNA presentes en una célula están posiblemente regulados por miRNAs (Friedman et al., 2009). Aunque que no hay un límite biológico descrito, mientras que un miRNA puede tener muchos mRNA diana, no se espera que un mismo mRNA tenga muchos miRNAs que tengan como diana su extremo 3 ' ya que cada miRNA necesita su propia secuencia de RNA para reconocerla y hibridar (la secuencia referenciada antes como *seed*).

Los miRNAs se agrupan en familias o *clusters*. Una familia de miRNAs está formada por diferentes miRNAs que comparten la misma región *seed*. Esta región *seed* consiste en los primeros ocho nucleótidos en el extremo 5 'y es importante para el reconocimiento miRNA-mRNA (Bartel, 2009). Por lo tanto, normalmente los miRNAs de la misma familia comparten muchas de sus dianas. Por el contrario, los *clusters* son grupos de miRNAs que se transcriben juntos porque están ubicados cerca en el genoma pero no son necesariamente miembros de la

misma familia y su secuencia puede ser muy diferente y dirigirse a diferentes mRNA (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013).

Los genes de los miRNAs pueden estar en diferentes lugares del genoma. Un mismo miRNA puede estar codificado por más de un *cluster*, cada uno localizado en un cromosoma diferente (por ejemplo podemos ver que miR-19b está codificado en el *cluster* miR-17/92 del cromosoma 17 y en el *cluster* miR-106a/93 del cromosoma X). Los dos genes producirán el mismo miRNA, el cual no se podrá diferenciar y los miRNA precursores se pueden diferenciar por un número añadido a su nomenclatura (miR-19b-1 y miR-19b-2) (Figura 17).

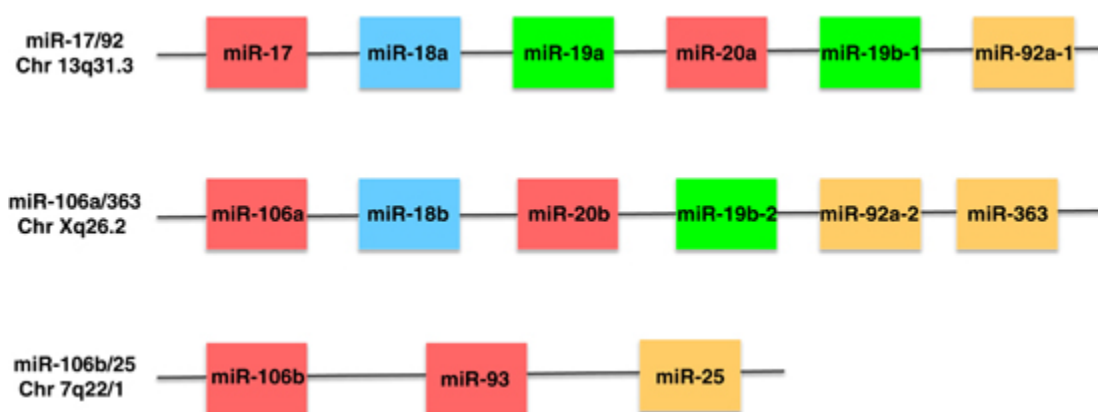


Figura 17. Figura que nos muestra la diferencia entre los clusters (filas: clusters miR-17/92, miR-106a/363 y miR-106b/25) y familias (representadas en diferentes colores. rojo: miembros de la familia miR-17; azul: miembros de la familia miR-18; verde: miembros de la familia miR-19 y amarillo: miembros de la familia miR-92) (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013).

5.3 microRNAs en cáncer

Los miRNAs, como reguladores de la expresión génica, participan en todos los procesos asociados a la carcinogénesis, controlando un amplio abanico de funciones biológicas tales como la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis. A ello, añadir que algunas vías moleculares se encuentran interconectadas, poniendo de manifiesto que el rango de funciones que pueden estar reguladas para un miRNA puede ser muy amplio. Los miRNAs pueden actuar como oncogenes y como genes supresores de tumores (por lo que se denominan “oncomirs”) dependiendo de la función del objetivo que están regulando.

El estudio de los perfiles de expresión de miRNAs ha demostrado una gran utilidad como método para la clasificación de diferentes subtipos de cáncer. Estas moléculas pueden llegar a convertirse en una herramienta de gran interés para el diagnóstico, pronóstico o incluso, tratamiento de la enfermedad. En cuanto a la utilidad de los miRNAs como marcadores diagnósticos, Hanke y colaboradores han observado su estabilidad en la orina e identifican a miR-126 y miR-152 como marcadores prometedores para el diagnóstico del CV (Hanke et al., 2010).

Los miRNAs tienen también un papel fundamental en las vías moleculares de progresión del CV. Como hemos apuntado anteriormente, las vías moleculares de los tumores de vejiga difieren en función de su agresividad. En este sentido, los tumores de bajo grado, presentan infraexpresión de miRNA-99a/100 lo cual induce la sobreexpresión de *FGFR3*. Sin embargo, los tumores de alto grado, desarrollan numerosos eventos genéticos y epigenéticos, incluyendo la transición epitelio-mesénquima mediada por la familia miRNA-200, la supresión de la vía de *TP53* (por miRNA-21), la apoptosis (por miRNA-143/145) y la proliferación mediada por la sobreexpresión del factor de transcripción *E2F3* seguida de la infraexpresión de miRNA-125b.

6. BIOMARCADORES UTILIZADOS EN EL CV

La identificación de biomarcadores en CV es de gran importancia para mejorar el diagnóstico, pronóstico y predecir la respuesta a tratamientos. Contribuirían a la reducción de la realización de cistoscopias para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes así como para detectar de forma precoz progresión de la enfermedad.

En la literatura se han descrito diferentes biomarcadores en orina para el diagnóstico y seguimiento del CV, algunos de ellos están aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA). En este sentido, a continuación, se detallan las pruebas basadas en biomarcadores más conocidas y utilizadas en la práctica clínica para el manejo del CV:

- UroVysion. Se trata de una prueba diagnóstica que utiliza técnicas de hibridación in situ fluorescente para la detección de carcinoma urotelial relacionado con

- anormalidades cromosómicas de las células de la orina. Los marcadores diana son la pérdida de 9p21 y aneuploidias en los cromosomas 3, 7 y 17. Por lo que respecta a los requerimientos técnicos, destacar los instrumentos para llevar a cabo la hibridación, microscopio de fluorescencia y experiencia por parte del evaluador para una adecuada interpretación. Presenta una sensibilidad para tumores de bajo grado del 53%, para tumores de alto grado del 79% y una especificidad del 80% (Schmitz-Dräger et al., 2015).
- ADXBladder. Utiliza técnicas de ELISA mediante anticuerpos MCM5. Sus marcadores diana son las proteínas MCM5. A nivel de requerimiento técnico se necesita un espectofotómetro. Presenta unos valores de sensibilidad y especificidad del 45% y 71%, respectivamente así como un valor predictivo negativo (VPN) de 92% (Dudderidge et al., 2020). Para tumores de alto grado la sensibilidad y especificidad son del 73% y 71%, respectivamente (Roupret et al., 2020).
 - XpertBC Monitor. Es un test basado en la detección de expresión de RNAs mediante RT-qPCR. Sus marcadores diana incluyen 5 RNAs: *ABL1*, *CRH*, *IGF2*, *UPK1B* y *ANXA10*. La combinación de los diferentes niveles de expresión de los marcadores permite clasificar las muestras como positivas o negativas mediante un modelo lineal. Los requerimientos técnicos que precisa son un laboratorio de biología molecular dotado de máquinas de real time-PCR. Presenta unos valores de sensibilidad y especificidad del 74% y 80%, respectivamente y un VPN de 93%. En tumores de alto grado la sensibilidad y especificidad es del 83% y 76%, respectivamente (Valenberg et al., 2019).
 - Bladder EpiCheck. Es un test basado en un panel de biomarcadores de metilación mediante PCR. Sus marcadores diana son un total de 15 genes a los cuales se les otorga un valor entre 0 y 100 considerando positivo valores superiores a 60. Los requerimientos técnicos que precisa son un laboratorio de biología molecular dotado de máquinas de real time-PCR. Los valores de sensibilidad y especificidad son del 63% y 86%, respectivamente. Presenta un valor predictivo negativo de 94% (Witjes et al.,

2018). Para los tumores de alto grado, los valores de sensibilidad y VPN ascienden hasta el 88% y 95%, respectivamente (Pierconti et al., 2020). Su precisión no está condicionada a la infección del tracto urinario ni a tratamientos con instilaciones intravesicales.

- CxBladder. Es un test basado en la expresión de mRNAs. Los marcadores diana que incluye son 5 mRNAs: *IGFBP5*, *HOXA13*, *MDK*, *CDK1* y *CXCR2*. También incluye información clínica acerca de si el tumor es *de novo* o es recurrente, así como el tiempo desde la última RTU. A partir de todos estos datos, se genera una puntuación de 0 a 10. Un valor mayor a 0,23 indica alta probabilidad de presentar tumor vesical y una puntuación mayor a 3,5 lo confirma y sugiere realizar un protocolo clínico para determinar la presencia del tumor. No requiere realizar ningún paso previo al envío de la muestra al laboratorio que realizará el test. Presenta unos valores de sensibilidad y especificidad del 92% y 32%, respectivamente así con un VPN de 96% (Kavalieris et al., 2017)
- Uromonitor-V2. Actualmente se encuentra pendiente de validación. Es un test que informa de mutaciones alelo específicas en diferentes genes mediante PCR. Los marcadores diana son los genes *TERT* y *FGFR3*. Igual que en el caso de CxBladder no requiere de tecnología específica. Presenta unos valores de sensibilidad y especificidad del 73,5 y 93,2, respectivamente, así como un VPN de 95,3% (Batista et al., 2019).
- Urodiag. Se trata de un test nuevo que todavía se encuentra pendiente de validación. Mediante PCR se detectan mutaciones en *FGFR3* y analiza los niveles de metilación del DNA de *HS3ST2*, *SEPTIN9* y *SLIT2*. No requiere de ninguna tecnología especial. Los valores de sensibilidad y especificidad son 90,3% y 65,1%, respectivamente y un VPN de 97% (Roperch et al., 2016).

A continuación, se detalla en las siguientes tablas el comparativo entre las pruebas ya validadas en términos de sensibilidad, especificidad y VPN para el seguimiento de pacientes con CV así como para tumores de alto grado.

Tabla 5: Comparativa entre las diferentes pruebas basadas en biomarcadores.

Alto grado	UroVysion	ADXBladder	XpertBC Monitor	CXBladder	Bladder Epicheck
Sensibilidad	79%	73%	83%	95%	86%
Global	UroVysion	ADXBladder	XpertBC Monitor	CXBladder	Bladder EpiCheck
Sensibilidad	72%	45%	74%	92%	63%
VPN	-	92%	93%	96%	94%
Especificidad	80%	71%	80%	32%	86%
VPN	-	99%	98%	-	99%

Pese a que en los últimos años se han comercializado varias pruebas para el diagnóstico no invasivo del CV, todavía no se utiliza ninguna de ellos de forma sistemática en la práctica clínica diaria, por lo que la combinación de la cistoscopia y citología sigue manteniéndose como el *gold estándar* en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En la actualidad, la estrategia diagnóstica y de seguimiento del CV se basa en la combinación de la cistoscopia y citología urinaria. La cistoscopia es una técnica con una elevada sensibilidad (91%) pero es una prueba invasiva. Contrariamente, la citología es una técnica no invasiva con una elevada especificidad (78-99%) pero que presenta una baja sensibilidad (11-76%), especialmente en tumores de estadio inicial y bajo grado y, es altamente observador dependiente. Debido a la elevada tasa de recurrencias que presenta este tipo de tumor, los pacientes deben ser sometidos a un estrecho seguimiento por lo que deben realizar dichos procedimientos en numerosas ocasiones.

Debido a las limitaciones de dicha combinación diagnóstica y de seguimiento de los pacientes con CV, sería de gran utilidad en la urología clínica la identificación de nuevos biomarcadores con alta precisión para el diagnóstico no invasivo y para la predicción de recidivas.

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que los perfiles de expresión génica en orina pueden proporcionar mayor precisión diagnóstica que la combinación de cistoscopia y citología. Además, el estudio de nuevas moléculas, como son los miRNAs nos podrían aportar información no sólo a nivel de diagnóstico, sino también de pronóstico en esta enfermedad. Por lo tanto, el estudio de la expresión génica y de miRNAs en las células de la orina podría proporcionarnos marcadores que nos sean útiles en la práctica clínica.

OBJETIVO GENERAL

Identificar marcadores moleculares con elevada precisión para el diagnóstico y pronóstico no invasivo del CV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar el test de expresión génica en orina de 12+2 genes para el diagnóstico y pronóstico del CV, desarrollado previamente por nuestro grupo de investigación, en una corte independiente.
2. Identificar perfiles de expresión génica específicamente implicados en la carcinogénesis del CV en muestras de orina. Desarrollar y validar nuevas firmas de expresión génica en orina, con una elevada precisión para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de los pacientes con CV.
3. Identificar un perfil de expresión basado en la cuantificación de microRNAs en orina para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con CV.
4. Determinar miRNAs predictivos de progresión tumoral en el grupo de pacientes con cáncer de vejiga no músculo-invasivo.

RESULTADOS

TRABAJO 1

ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE UN TEST NO INVASIVO EN ORINA PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE VEJIGA: EVIDENCIA DE MODELOS MEJORADOS

Journal of Urology. 2014 Jan;191(1):261-9

PMID: 23831312

ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE UN TEST NO INVASIVO EN ORINA PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE VEJIGA: EVIDENCIA DE MODELOS MEJORADOS

Objetivos: Validar el rendimiento diagnóstico y pronóstico para cáncer de vejiga de nuestra previamente descrita firma de 12+2 genes, basada en la expresión génica en orina. Identificar modelos alternativos que puedan mejorar la precisión del test.

Materiales y métodos: La expresión génica de 48 genes previamente descritos, entre los que están incluidos los 12+ 2 genes de la firma, fue analizada mediante arrays TaqMan® en una serie independiente de 207 muestras de orina. Posteriormente, todas las muestras analizadas hasta el momento (n=404) fueron agrupadas para obtener un grupo de entrenamiento mayor, y éste fue utilizado para identificar posibles nuevos modelos mejorados.

Resultados: Nuestra firma basada en la expresión de 12 + 2 genes presentó una sensibilidad del 80% y una especificidad del 86% (AUC 0.914) para el diagnóstico del cáncer de vejiga en la cohorte de validación. Además, obtuvimos una sensibilidad del 75% y una especificidad del 75% (AUC 0.83) para predecir la agresividad del tumor en las muestras del set de validación. Después de agrupar todas las muestras, se diseñaron 3 nuevas firmas para el diagnóstico del cáncer de vejiga que contienen 2, 5 y 10 genes, respectivamente, y 1 que contiene 6 genes para el pronóstico. El rendimiento diagnóstico de las firmas de 2, 5, 10 y 12 genes se mantuvo o mejoró en el conjunto ampliado de muestras (AUC 0.913, 0.941, 0.949 y 0.944, respectivamente). El rendimiento para predecir la agresividad tumoral también mejoró en las firmas de 14 y 6 genes (AUC 0.855 y 0.906, respectivamente).

Conclusiones: Este estudio de validación confirma la precisión de la firma de 12 + 2 genes como una herramienta no invasiva para el diagnóstico del cáncer de vejiga. También presentamos nuevos modelos mejorados con menos genes que deben validarse en futuros estudios.

Validation Study of a Noninvasive Urine Test for Diagnosis and Prognosis Assessment of Bladder Cancer: Evidence for Improved Models

Lourdes Mengual,^{*,†} María José Ribal,[†] Juan José Lozano, Mercedes Ingelmo-Torres, Moisés Buset, Pedro Luís Fernández and Antonio Alcaraz

From the Laboratory and Department of Urology (LM, MJR, MI-T, MB, AA) and Plataforma de Bioinformática, Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (JLL) and Pathology Department (PLF), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Purpose: We validated the performance of our previously reported test for bladder cancer based on urine gene expression patterns using an independent cohort. We also ascertained whether alternative models could achieve better accuracy.

Materials and Methods: Gene expression patterns of the previously reported 48 genes, including the 12 + 2 genes of the signature, were analyzed by TaqMan[®] arrays in an independent set of 207 urine samples. We pooled all samples analyzed to date to obtain a larger training set of 404 and used it to search for putative improved new models.

Results: Our 12 + 2 gene expression signature had overall 80% sensitivity with 86% specificity (AUC 0.914) to discriminate between bladder cancer and control samples. It had 75% sensitivity and 75% specificity (AUC 0.83) to predict tumor aggressiveness in the validation set of urine samples. After grouping all samples 3 new signatures for diagnosis containing 2, 5 and 10 genes, respectively, and 1 containing 6 genes for prognosis were designed. Diagnostic performance of the 2, 5, 10 and 12-gene signatures was maintained or improved in the enlarged sample set (AUC 0.913, 0.941, 0.949 and 0.944, respectively). Performance to predict aggressiveness was also improved in the 14 and 6-gene signatures (AUC 0.855 and 0.906, respectively).

Conclusions: This validation study confirms the accuracy of the 12 + 2 gene signature as a noninvasive tool for assessing bladder cancer. We present improved models with fewer genes that must be validated in future studies.

Key Words: urinary bladder, carcinoma, urothelium, gene expression, biological markers

COMBINED cystoscopy and cytology are the standard methods to detect and monitor bladder UCC. Cystoscopy is an invasive technique with high SN (91%),¹ although it can overlook flat malignancies such as CIS (Tis). Cytology that is noninvasive has high SP (90% to 96%)² but

lacks SN (11% to 76%),³ especially for LG disease.

These limitations of current diagnostic methods have prompted a search for more reliable noninvasive markers to detect and predict the biological behavior of UCC, which would be enormously useful in clinical

Abbreviations and Acronyms

CIS	= carcinoma in situ
Cq	= cycle quantification
HG	= high grade
LG	= low grade
LOOCV	= leave-one-out cross validation
MIBC	= muscle invasive bladder cancer
NMIBC	= nonMIBC
PCR	= polymerase chain reaction
SN	= sensitivity
SP	= specificity
UCC	= urothelial cell carcinoma

Accepted for publication June 24, 2013.
Study received hospital institutional review board approval.

Supported by Laboratorios Fina Biotech and an Instituto de Salud Carlos III Research Support Staff Grant (MI-T).

* Correspondence: Laboratory and Department of Urology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, sector 2B, C/Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain (telephone: +34 93 227 54 00, extension 4820; FAX: +34 93 2275545; e-mail: lmengual@clinic.ub.es).

† Equal study contribution.

See Editorial on page 9.

practice. Different tests have been commercialized and most are more sensitive than urine cytology but the latter continues to be more specific.⁴

Several previous studies describe gene expression signatures with potential clinical value for UCC using tissue samples.^{5–9} The high frequency of cell exfoliation in urine has promoted the study of gene expression in urine samples as a noninvasive method of UCC detection. However, these studies focus on a single gene or a limited number of genes.^{10,11} Since the genetic nature of bladder tumors is heterogeneous, it does not seem probable that all or most carcinomas can be identified with a single marker. Rather, a panel of markers would be needed.

To overcome this single marker limitation we previously reported a 12 + 2 urine based gene expression signature for noninvasive diagnosis (12 genes) and aggressive assessment (12 + 2 genes) of UCC. Our gene panel set showed high accuracy for UCC diagnosis (86% SN and 93% SP) and prediction of tumor aggressiveness (79% SN and 82% SP) in voided urine samples.¹² To confirm the accuracy of this gene set signature we performed a validation study in an independent cohort. In addition, we analyzed whether we could identify new improved gene expression signatures that achieved maximal accuracy with a minimal number of genes, which could allow for more feasible clinical application.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Clinical Samples

A total of 239 consecutive urine samples from patients with UCC and controls were collected between February 2009 and January 2010 at Hospital Clinic of Barcelona after receiving informed consent. This validation study is part of a long-term project to develop accurate, multiplex gene expression signatures for noninvasive assessment of UCC (fig. 1). It was previously approved by the hospital institutional review board.

Of the 239 urine samples collected 14 were excluded from study because less than 10 ng RNA were obtained. We also excluded 18 samples that did not fulfill RNA quality criteria, as described. The informative specimen rate was 87%. Thus, 207 urine specimens were analyzed, including 96 from patients treated with transurethral resection for primary or recurrent UCC who had histologically confirmed tumors (mean tumor size 1.9 cm, range 0.2 to 8) and 111 from controls with nonneoplastic urological disease (supplementary table 1, <http://jurology.com/>). Grade and stage were determined by WHO criteria¹³ and the TNM classification,¹⁴ respectively. Histological grade was considered a measure of prognosis since it represents tumor aggressiveness.

Tumors were classified according to risk in 3 categories, including low risk NMIBC—Ta and T1 LG without associated CIS, high risk NMIBC—Ta or T1 LG with

associated CIS, Ta or T1 HG, or Tis and MIBC—T2, T3 or T4 LG and HG with or without associated CIS.

Voided urine samples (50 to 100 ml) were collected in sterile containers containing 4 ml 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (pH 8.0). Urine samples were immediately stored at 4C and processed within the next 24 hours. Samples were centrifuged at 1,000 × gravity for 10 minutes at 4C. Cell pellets were resuspended in 1 ml TRIzol® reagent and frozen at –80C until RNA extraction.

Gene Expression Quantification

RNA was extracted according to manufacturer instructions (Invitrogen™) and quantified with a NanoDrop™ device. cDNA was synthesized from 10 to 500 ng total RNA depending on availability using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AB®) according to manufacturer instructions, except the final reaction volume was 25 µl. A total of 6.25 µl of each cDNA sample was used for multiplex pre-amplification of target cDNAs using TaqMan PreAmp Master Mix Kit according to manufacturer instructions, except the final reaction volume was 25 µl. All 45 target genes, including the 12 + 2 genes of the signature, and the 2 endogenous controls (*GUSB* and *PPIA*) analyzed in our previously study were used in the pre-amplification reaction (supplementary table 2, <http://jurology.com/>).¹² Pre-amplified cDNAs (5 µl) were mixed with 50 µl 2 × TaqMan Universal PCR MasterMix in a final volume of 100 µl and amplified using TaqMan arrays according to manufacturer recommendations.¹⁵ In this way we tested all 45 target genes from the previous study in all samples from the validation study to search for putative new, improved models.

Real-time quantitative PCR data were processed with SDS 2.4 and Enterprise (AB). An automatic threshold and baseline were used for all genes to record Cq values. To compare with previous data extracted using a manual threshold we reanalyzed all previous data with the automatic threshold. Data were normalized using the geometric average of the Cq of *GUSB* and *PPIA*. To guarantee result reliability samples with a *GUSB* Cq value of greater than ± 3 SD than the *GUSB* Cq mean of the whole group of patients and controls were considered to have low RNA quality and were excluded from analysis, including 12 control and 6 tumor samples (*GUSB* Cq range 22.4 to 30.27).

Data Analysis

The relative expression level of target genes in a sample was expressed using the equation, $\Delta Cq = Cq_{\text{mean of reference genes}} - Cq_{\text{target gene}}$. Genes with a Cq value of greater than 35 were considered low expressed and the ΔCqs were imputed to the minimum ΔCq value for that gene. Logistic regression was used to assess the performance of the 12 + 2 gene signature in the independent validation sample set. Multidimensional scaling plots were used to visually explore the dissimilarity between the control and tumor groups of samples as well as between HG and LG tumors according to the expression of the 12 + 2 genes. R (<http://www.r-project.org/>) was used for all calculations.

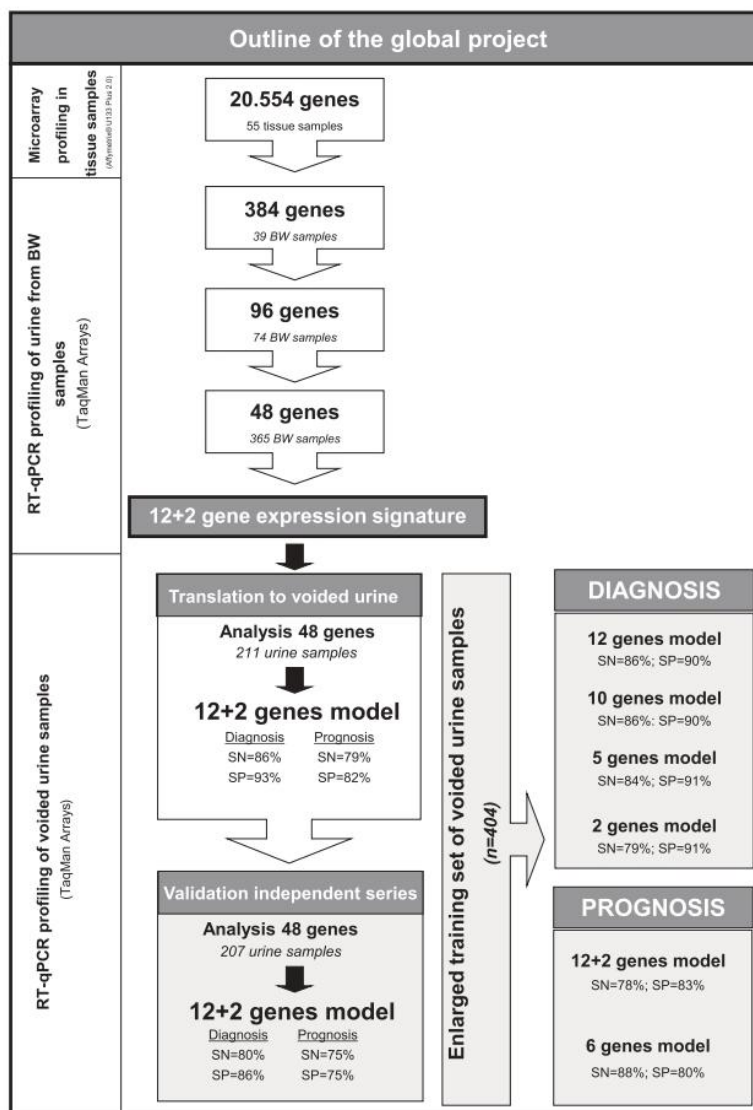


Figure 1. Project outline. DNA microarray and TaqMan arrays were used to screen gene expression profiles in bladder cancer⁹ and identify gene set expression signature to detect and stratify UCC.¹² BW, bladder washings. RT-qPCR, real-time quantitative PCR. Gray boxes represent current study.

New Gene Set Model Generation Using All Samples

To mitigate overfitting as much as possible due to using a decreased number of samples we pooled urine samples from the training and validation sets to obtain a larger set of training samples (fig. 1). Samples with a *GUSB* Cq value of higher than ± 2 SD than the *GUSB* Cq mean of the whole group of samples in the former validation set were excluded from analysis, including 11 control and 3 tumor samples. Thus, the enlarged training set of samples finally contained 404 samples (211 + 193). This enlarged set of samples was used to retest the previous 12 + 2 gene signature and, thus, to better estimate its predictive performance and propose new gene expression signatures from the 45 target genes.

Univariate and multivariate logistic regression was used to examine associations between UCC diagnostic/prognostic status and gene expression. Age and gender were included as variables in these analyses. Forward stepwise logistic regression in 3 successive runs using a different number of genes was performed to determine the best new models for diagnosis and prognosis.¹⁶ To evaluate the performance of each model we used the probability of each gene expression signature as the input. ROC curves were generated using DiagnosisMed (<http://cran.r-project.org/web/packages/DiagnosisMed/index.html>) and pROC.¹⁷ All calculations were performed using R. The globaltest algorithm¹⁸ (<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/globaltest.html>) was used to analyze the association of study genes with diagnostic and

aggressiveness prediction. Influence plots¹⁸ were created to graphically represent the influence of each evaluated gene on UCC diagnosis and tumor aggressiveness.

RESULTS

Validation of 12 + 2 Gene Expression Signature

An independent set of 207 voided urine samples was used to validate our previously published 12 + 2 gene set signature. The SN and SP of the diagnostic signature in the validation set were 80% and 86%, respectively (AUC 0.914). As in the training set of samples, SN increased through the UCC risk groups. It was lower in low risk NMIBC, representing 15 of the 19 misclassified tumor samples, and achieved 100% for MIBC (fig. 2). SP was misclassified in 15 of 111 control samples.

Overall SN and SP to discriminate urine from HG and LG UCC in the validation cohort was 75% and 75%, respectively (AUC 0.83, fig. 3). The

overall accuracy of diagnosis and prognosis in the independent validation set was 84% and 75%, respectively.

New Gene Expression Signature Generation Using All Samples

Although our 12 + 2 gene expression signature performed well in the validation cohort, translating a urine based molecular technique to clinical practice requires accuracy values in the range achieved by the current combination of cystoscopy and cytology. Also, the high cost of using multiple genes simultaneously may slow widespread clinical application so that a test containing fewer genes would be more feasible for application in the clinical setting. Bearing this in mind, in this validation study we analyzed all 45 previously analyzed genes¹² again instead of only the 12 + 2 in the model to explore the possibility of improving model accuracy. We pooled all samples analyzed to date and

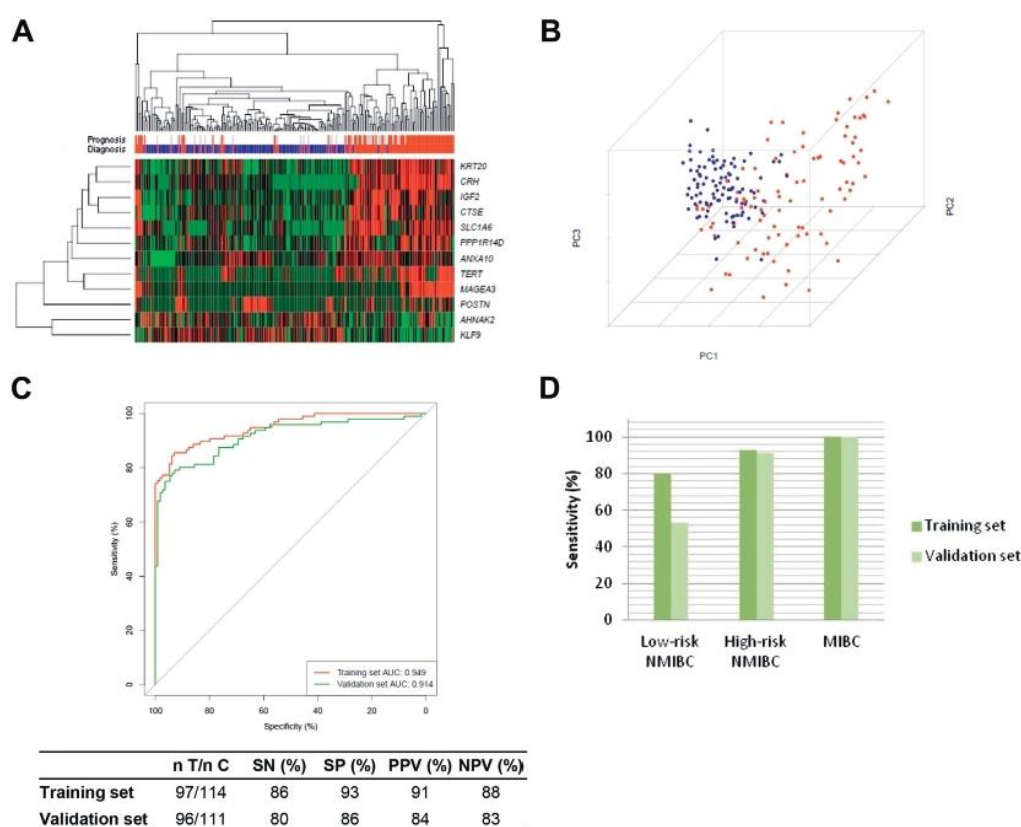


Figure 2. Diagnostic performance of 12-gene model in validation set of 207 samples. **A**, heat map shows 12-gene expression signature for UCC diagnosis. Red pixels represent increased mRNA in urine samples. Green pixels represent decreased mRNA in urine samples. Rows indicate individual genes. Columns indicate experimental samples. Blue bars indicate control. Red bars indicate tumor. **B**, multidimensional scaling plot. Red dots represent tumor. Blue dots represent control. **C**, ROC curves in training set of 211 samples and validation set of 207 with 0.525 cutoff. *n T/n C*, number of tumors/number of controls. *PPV*, positive predictive value. *NPV*, negative predictive value. **D**, SN of 12-gene signature in UCC risk groups in validation set. Ta Gx and Tx LG samples were excluded from analysis.

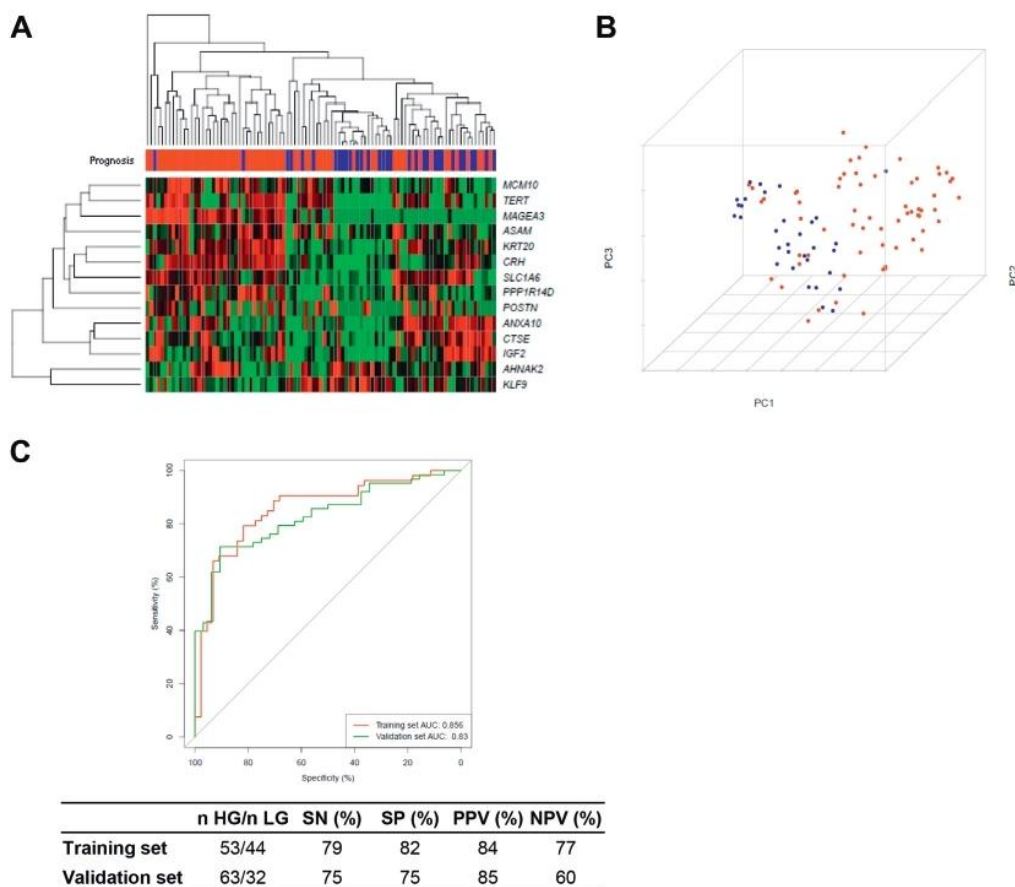


Figure 3. Prognostic performance of 12 + 2 gene set model in validation set of 95 samples. **A**, heat map shows 12 + 2 gene signature to predict UCC tumor aggressiveness in validation set. Ta Gx sample was excluded from analysis. Red pixels represent increased mRNA in urine samples. Green pixels represent decreased mRNA in urine samples. Rows indicate individual genes. Columns indicate experimental samples. Red bars indicate HG. Blue bars indicate LG. **B**, multidimensional scaling plot of HG (red dots) and LG (blue dots) tumor samples. **C**, ROC curves of 12 + 2 gene expression signature in training set of 97 samples and validation of 95 with 0.525 cutoff.

used them as an enlarged training set to reset the current model and search for new, potential improved models.

Evaluation of our redesigned 12 diagnostic model (GS_D12) in the enlarged training set of urine samples achieved 88% accuracy (AUC 0.944) for discriminating between control and UCC samples. To further improve this model and considering that the influence plot revealed several other analyzed genes strongly associated with UCC diagnosis we searched for other possible gene expression signatures (fig. 4). We found 3 putative new diagnostic gene expression signatures containing 2, 5 and 10 genes (GS_D2, GS_D5 and GS_D10, respectively) (see Appendix). Figure 4 shows the accuracy of these 3 new models for detecting UCC in urine together with data on the previously described 12 gene set model. As expected, SN was lower in the low risk NMIBC group but increased in the high

risk NMIBC and MIBC groups in the 4 diagnostic models. After applying LOOCV analysis to the GS_D2, GS_D5, GS_D10 and GS_D12 gene set models we obtained 77.49%, 82.72%, 83.25% and 81.15% SN, respectively, to discriminate between tumors and controls while SP was maintained at 90.14% (AUC 0.907, 0.933, 0.936 and 0.928 with cutoffs of 0.493, 0.440, 0.466 and 0.469, respectively).

Evaluation of our redesigned 12 + 2 prognostic model (GS_12 + 2) in the enlarged set of tumor associated urine samples achieved 81% accuracy (AUC 0.855). To further improve the prediction of disease aggressiveness we proceeded as with the diagnostic set of genes. We generated only 1 new gene set model composed of 6 genes highly associated with UCC aggressiveness (GS_P6) (see Appendix). Figure 5 shows the accuracy of this new model to predict UCC severity using urine samples

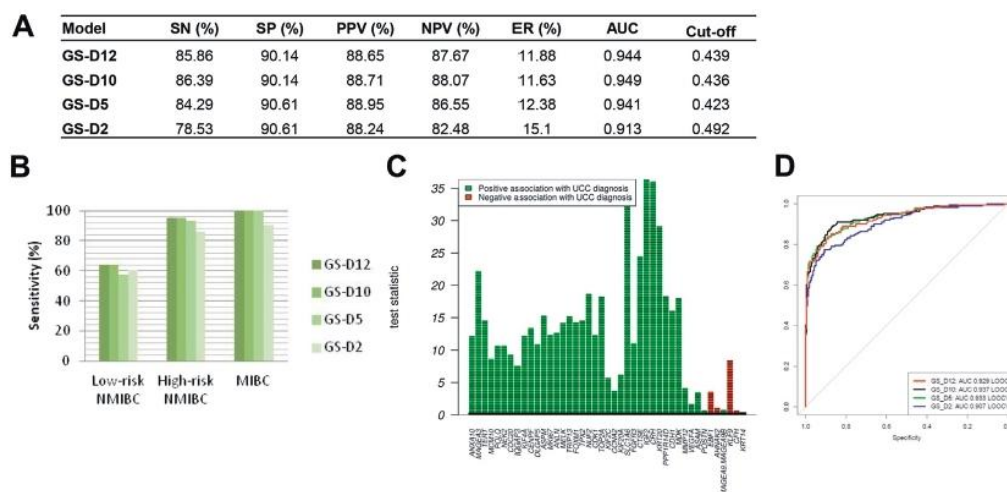


Figure 4. Diagnostic performance of new gene set signatures in enlarged training set of 404 samples, including 190 tumors and 214 controls. *A*, overall diagnostic performance of 4 new gene set signatures. *B*, SN of 4-gene expression signatures in UCC risk groups. Ta Gx and Tx LG samples were excluded from analysis. *PPV*, positive predictive value. *NPV*, negative predictive value. *ER*, error rate. *C*, influence on UCC diagnosis of each study gene. Bar height above reference line indicates statistically significant association ($p < 0.05$). Select genes for diagnostic gene signatures mostly matched those with higher bars in influence plot. *D*, ROC curves of 4 new diagnostic gene expression signatures in enlarged set using LOOCV.

together with data on the previously described 12 + 2 gene set model. When LOOCV analysis was applied to the GS_P12 + 2 and GS_P6 models, we obtained SN of 70% and 83%, and SP of 82% and 84%, respectively (AUC 0.789 and 0.884 with cutoffs of 0.6073 and 0.5976, respectively).

DISCUSSION

Detecting and assessing the true malignant potential of UCC using an accurate noninvasive method remains a challenge. In previous UCC studies we identified a 12 + 2 gene expression signature to diagnose and predict disease aggressiveness based on analysis of urine samples.¹²

The ideal method of UCC diagnosis must be accurate and cost-effective,¹⁹ and facilitate patient adherence to the surveillance schedule.²⁰ We consider that combined cystoscopy and cytology have SN and SP in the range of 80% and 90%, respectively. A potential noninvasive test that could replace the combination of cystoscopy and cytology for assessing patients with UCC must provide at least the same accuracy as the 2 tests together.

Many efforts have been made to develop molecular methods that achieve the desired accuracy based on nucleic acids or proteins to assess UCC using urine samples.²¹ As we mentioned, we previously designed and reported a urine based gene expression signature that achieved 84% SN and 89% SP for detecting UCC during LOOCV in the sample training set.¹² In the current study the

signature performed well in an independent cohort with 80% SN and 86% SP). Notably, this high SP was achieved not only in healthy controls but also in patients with nonneoplastic urological diseases. Moreover, our 12-gene expression signature in the validation set achieved an accuracy value of 84%, as high as others in the literature that are still not validated.

When Holyoake et al also attempted to validate their 4 RNA, urine based gene expression signature in an external cohort, its SN was decreased to 62% with a fixed SP of 85%.^{10,22} They developed a second generation of the original test including an additional gene (*Cxbladder-D*), which achieved 81.8% SN with a fixed SP of 85.1%, but it requires further testing in an independent cohort.²² An American group derived a 14-gene signature that achieved a high accuracy rate in the initial discovery phase,^{23,24} similar to our results at this stage.¹² However, it is important that their good results were based mainly on analysis of high risk tumors, which may involve some limitation since the SN of noninvasive urine tests decreases for low risk tumors. In fact, in the validation set our signature has 91% to 100% sensitivity for HG tumors but decreases to 53% for LG tumors, similar to other tests such as that using *Cxbladder-D*.²²

Although a consensus supports that a 6-month delay in diagnosis of low risk NMIBC does not adversely affect the patient outcome,²⁵ it would be desirable to diagnose as many low risk tumors as possible. To this end we pooled all samples analyzed

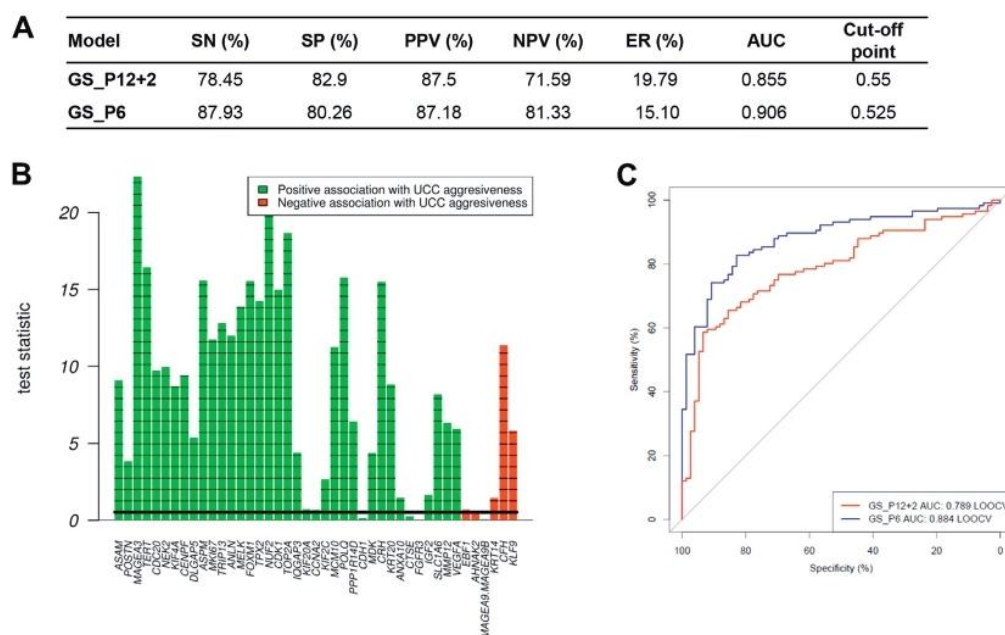


Figure 5. Prognostic performance of new gene set signatures in enlarged training set of 192 samples, including 76 LG and 116 HG tumors. **A**, overall prognostic performance. *PPV*, positive predictive value. *NPV*, negative predictive value. *ER*, error rate. **B**, influence on UCC aggressiveness of each study gene. Bar height above reference line indicates statistically significant association ($p < 0.05$). Select genes for GS_P6 mostly matched those with higher bars in influence plot. **C**, ROC curves of 2 new prognostic gene expression signatures using LOOCV.

to date into a new, enlarged set of training samples (fig. 1). The current 12-gene signature was reset in the new training population of samples and 3 new diagnostic gene signatures were designed. These models had good performance in the enlarged training set using LOOCV. We expect to maintain that performance when they are applied to independent validation data sets because in this case the overfitting effect is minimized due to the larger population. Notably, all 4 gene expression signatures share 2 common genes, *IGF2* and *MAGEA3*, which are strongly associated with UCC diagnosis (fig. 4). *IGF2* activates the RAS kinase signaling pathway,²⁶ which is abnormally expressed in NMIBC.²⁷ In contrast, high expression of *MAGEA3*, a gene associated with the p53 pathway,²⁸ is related to HG and high stage bladder tumors.²⁹

Consequently, it is not surprising that using these 2 genes involved in the 2 molecular pathways of UCC carcinogenesis³⁰ results in a good combination for overall diagnostic purposes. Actually, GS_D2 is only composed of a combination of 2 genes and it performed well in LOOCV (AUC 0.907). It is most likely that including additional genes in this 2-gene combination captures additional tumor heterogeneity and improves accuracy in the rest of the models, reaching an AUC of 0.937 LOOCV using the 10-gene signature. Any single model performed well

on LOOCV analysis with SN and SP in the range of 80% and 90%, respectively.

Assessing the potential aggressiveness of UCC at diagnosis is another major clinical challenge since early knowledge of tumor malignancy potential could improve current treatment schedules for patients with UCC. As for diagnostic models, we refined the current model to predict UCC aggressiveness and created a new model from the enlarged set of samples. Although the number of cases analyzed was not high, the new model (GS_P6, accuracy 83% LOOCV) outperformed the prediction of our current 12 + 2 gene set model (GS_P12 + 2, accuracy 75% LOOCV) and that of Holyoake et al comprising 2 genes (accuracy 42%)¹⁰ to discriminate between LG and HG tumors using urine samples.

Our study has limitations. 1) Direct comparison of our results with those of urine cytology in the same cohort would have been of great interest. However, we do not have cytology results available for all individuals so that only an incomplete comparison could be performed. 2) It may also be argued that histological grade alone is not the perfect representative of tumor aggressiveness. Nevertheless, we consider that is the best for a study with short followup, especially in patients with NMIBC, keeping in mind that mortality due to LG tumors is almost negligible with all mortality accumulating in HG tumors. 3) Our newly generated models must be

externally validated in a large cohort and correlated with long-term patient outcome. Thus, we are currently performing a multicenter validation study of these models and hope to report the ultimate validation of all of these models in the near future.

CONCLUSIONS

The results of this validation study of our previously reported gene expression signatures for UCC diagnosis and prognosis corroborate its accuracy as a noninvasive tool for assessing bladder cancer. Potential improved gene expression signatures are presented in this study. Future validation of the improved models would help us establish the real role of the test in routine clinical practice.

ACKNOWLEDGMENTS

Helena Kruyer assisted with English.

APPENDIX

Gene expression signatures to predict diagnosis and tumor aggressiveness

Gene Symbol	Diagnosis				Gene Symbol	Aggressiveness	
	GS_D12	GS_D10	GS_D5	GS_D2		GS_P12 + 2	GS_P6
<i>IGF2</i>	■	■	■	■	<i>CRH</i>	■	—
<i>MAGEA3</i>	■	■	■	■	<i>IGF2</i>	■	—
<i>KLF9</i>	■	■	■	—	<i>KLF9</i>	■	—
<i>CRH</i>	■	■	■	—	<i>SLC1A6</i>	■	—
<i>SLC1A6</i>	■	■	■	—	<i>AHNAK2</i>	■	—
<i>POSTN</i>	■	■	—	—	<i>ANXA10</i>	■	—
<i>EBF1</i>	—	■	—	—	<i>CTSE</i>	■	—
<i>CFH</i>	—	■	—	—	<i>KRT20</i>	■	—
<i>MCM10</i>	—	■	—	—	<i>POSTN</i>	■	—
<i>MMP12</i>	—	■	—	—	<i>PPP1R14D</i>	■	—
<i>TERT</i>	■	—	—	—	<i>TERT</i>	■	—
<i>AHNAK2</i>	■	—	—	—	<i>MCM10</i>	■	—
<i>ANXA10</i>	■	—	—	—	<i>ASAM</i>	■	■
<i>CTSE</i>	■	—	—	—	<i>MAGEA3</i>	■	■
<i>KRT20</i>	■	—	—	—	<i>NUF2</i>	—	■
<i>PPP1R14D</i>	■	—	—	—	<i>KIF20A</i>	—	■
					<i>VEGFA</i>	—	■
					<i>CFH</i>	—	■

REFERENCES

- Grossman HB, Soloway M, Messing E et al: Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2006; **295**: 299.
- Glas AS, Roos D, Deutekom M et al: Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* 2003; **169**: 1975.
- Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB et al: Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005; **66**: 35.
- Proctor I, Stoeber K and Williams GH: Biomarkers in bladder cancer. *Histopathology* 2010; **57**: 1.
- Dyrskjot L, Zieger K, Real FX et al: Gene expression signatures predict outcome in non-muscle-invasive bladder carcinoma: a multicenter validation study. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3545.
- Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano J et al: Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 778.
- Blaveri E, Simko JP, Korkola JE et al: Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 4044.
- Wang R, Morris DS, Tomlins SA et al: Development of a multiplex quantitative PCR signature to predict progression in non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Res* 2009; **69**: 3810.
- Mengual L, Buset M, Ars E et al: DNA Microarray expression profiling of bladder cancer allows identification of noninvasive diagnostic markers. *J Urol* 2009; **182**: 741.
- Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock R et al: Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 742.
- Xie XY, Yang X, Zhang JH et al: Analysis of hTERT expression in exfoliated cells from patients with bladder transitional cell carcinomas using SYBR green real-time fluorescence quantitative PCR. *Ann Clin Biochem* 2007; **44**: 523.
- Mengual L, Buset M, Ribal MJ et al: Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 2624.
- Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T et al: Tumours of the urinary system. In: *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. World Health Organization Classification of Tumours. Edited by JN Eble, G Sauter, JI Epstein et al. Lyon: IARC Press 2004; chapt 2, p 89.
- Sobin LH and Wittekind CH: *TNM Classification of Malignant Tumours*. International Union Against Cancer. New York: John Wiley & Sons 2002.
- Mengual L, Buset M, Marin-Aguilera M et al: Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays. *BMC Res Notes* 2008; **1**: 21.
- Hastie TJ and Pregibon D: Generalized linear models. In: *Statistical Models in S*. Edited by JM Chambers and TJ Hastie. Independence, Kentucky: Wadsworth & Brooks Cole 1992.
- Robin X, Turck N, Hainard A et al: pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011; **12**: 77.
- Goeman JJ, van de Geer SA, de Kort F et al: A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics* 2004; **20**: 93.
- Avritscher EB, Cooksley CD, Grossman HB et al: Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications. *Urology* 2006; **68**: 549.
- Van Tilborg AA, Bangma CH and Zwarthoff EC: Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol* 2009; **16**: 23.
- Cheng L, Zhang S, MacLennan GT et al: Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol* 2011; **42**: 455.
- O'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M et al: A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol* 2012; **188**: 741.
- Rosser CJ, Liu L, Sun Y et al: Bladder cancer-associated gene expression signatures identified by profiling of exfoliated urothelia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18**: 444.
- Urquidi V, Goodison S, Cai Y et al: A candidate molecular biomarker panel for the detection of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; **21**: 2149.
- Soloway MS, Sofer M and Vaidya A: Contemporary management of stage T1 transitional

- cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2002; **167**: 1573.
26. Arcaro A: Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Front Pharmacol* 2013; **4**: 30.
27. Pignot G, Vieillefond A, Vacher S et al: Hedgehog pathway activation in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2012; **106**: 1177.
28. Marcar L, Maclaine NJ, Hupp TR et al: Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 2010; **70**: 10362.
29. Dyrskjot L, Zieger K, Kissow LT et al: Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 2012; **107**: 116.
30. Goebell PJ and Knowles MA: Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol Oncol* 2010; **28**: 409.

TRABAJO 2

**TEST DE EXPRESIÓN GÉNICA PARA EL DIAGNÓSTICO NO
INVASIVO DEL CÁNCER DE VEJIGA: ESTUDIO
PROSPECTIVO, CIEGO, INTERNACIONAL Y
MULTICÉNTRICO**

European Journal of Cancer. 2016 Feb;54:131-138

PMID: 26761785

ESTUDIO DE VALIDACIÓN MULTICÉNTRICO, INTERNACIONAL Y PROSPECTIVO DE UN TEST MOLECULAR NO INVASIVO PARA DIAGNOSTICAR EL CÁNCER DE VEJIGA

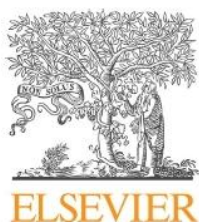
Objetivo: Validar, en una cohorte prospectiva, ciega, internacional y multicéntrica, nuestros cuatro tests no invasivos (previamente descritos y basados en los patrones de expresión génica de la orina) para el diagnóstico del cáncer de vejiga (CV).

Material y métodos: Un total de 789 muestras de orina de pacientes con CV y controles fueron recogidas de manera consecutiva y prospectiva en cinco centros europeos. Finalmente, se analizaron con éxito 525 muestras. Los valores de expresión génica se cuantificaron mediante TaqMan Arrays y posteriormente se analizaron los resultados obtenidos con los algoritmos de diagnóstico previamente reportados. Los resultados de la firma genética más precisa para el diagnóstico de CV se asociaron con parámetros clínicos mediante el análisis de la varianza.

Resultados: Se obtuvo una alta precisión diagnóstica para las cuatro firmas genéticas en el set de validación independiente [área bajo la curva (AUC) = 0.903-0.918]. La firma con mayor rendimiento diagnóstico fue la compuesta por dos genes (GS_D2; sensibilidad: 81.48%; especificidad: 91,26%; AUC: 0,918). No se obtuvo asociación estadísticamente significativa entre la precisión diagnóstica de GS_D2 y el número de tumores ($p = 0.58$), pero sí se encontró asociación de GS_D2 con el tamaño del tumor ($p = 0.008$). Además, la precisión diagnóstica de GS_D2 es mayor en tumores de alto riesgo. No encontramos diferencias en el rendimiento del test GS_D2 entre las poblaciones estudiadas y los centros de recolección tanto en la detección de tumores ($p = 0,7$) como en la de los controles ($p = 0,2$).

Conclusiones: Nuestra firma para el diagnóstico del CV GS_D2 no es invasiva, no es observador dependiente, no es especialmente laboriosa y ha demostrado una precisión diagnóstica en el estudio de validación independiente, internacional y multicéntrico, igual o superior la metodología actual (cistoscopia combinada con citología). Además, tiene una sensibilidad más alta que la citología manteniendo su

especificidad. En consecuencia, cumple con los requisitos para ser considerada como una prueba molecular aplicable a la práctica clínica en el manejo del cáncer de vejiga.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.ejcancer.com

Original Research

Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study



Maria J. Ribal ^{a,1}, Lourdes Mengual ^{a,*,1}, Juan J. Lozano ^b, Mercedes Ingelmo-Torres ^a, Joan Palou ^c, Oscar Rodríguez-Faba ^c, Johannes A. Witjes ^d, Antoine G. Van der Heijden ^d, Rafael Medina ^e, Jose M. Conde ^e, Michael Marberger ^f, Joerg Schmidbauer ^f, Pedro L. Fernández ^g, Antonio Alcaraz ^a

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

^b CIBERehd, Plataforma de Bioinformàtica, Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Spain

^c Department of Urology, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

^d Department of Urology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

^e Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain

^f Department of Urology, Medical University of Vienna, Austria

^g Pathology Department, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Spain

Received 15 May 2015; received in revised form 15 October 2015; accepted 5 November 2015
Available online 4 January 2016

KEYWORDS

Bladder cancer;
Biomarkers;
Gene expression;
Molecular test;
Non-invasive

Abstract Objective: This study aimed to validate, in a prospective, blinded, international and multicenter cohort, our previously reported four non-invasive tests for bladder cancer (BC) diagnosis based on the gene expression patterns of urine.

Methods: Consecutive voided urine samples from BC patients and controls were prospectively collected in five European centres (n = 789). Finally, 525 samples were successfully analysed. Gene expression values were quantified using TaqMan Arrays and previously reported

* Corresponding author: Laboratory of Urology, Hospital Clínic de Barcelona, Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, Office B22, C/Casanova, 143, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 227 54 00x4820.

E-mail addresses: mjribal@clinic.ub.es (M.J. Ribal), lmengual@clinic.ub.es (L. Mengual), juanjo.lozano@ciberehd.org (J.J. Lozano), INGELMO@clinic.ub.es (M. Ingelmo-Torres), jpalou@fundacio-puigvert.es (J. Palou), orodriguez@fundacio-puigvert.es (O. Rodríguez-Faba), Fred.Witjes@radboudumc.nl (J.A. Witjes), Toine.vanderHeijden@radboudumc.nl (A.G. Van der Heijden), rantonio.medina.sspa@juntadeandalucia.es (R. Medina), jose.conde.sspa@juntadeandalucia.es (J.M. Conde), michael.marberger@AI.net (M. Marberger), joerg.schmidbauer@meduniwien.ac.at (J. Schmidbauer), PLFERNAN@clinic.ub.es (P.L. Fernández), ALCARAZ@clinic.ub.es (A. Alcaraz).

¹ Both authors have contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.003>
0959-8049/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

diagnosis;
Sensitivity and
specificity;
Urine

diagnostic algorithms were applied to gene expression data. Results from the most accurate gene signature for BC diagnosis were associated with clinical parameters using analysis of variance test.

Results: High diagnostic accuracy for the four gene signatures was found in the independent validation set (area under curve [AUC]=0.903–0.918), with the signature composed of two genes (GS_D2) having the best performance (sensitivity: 81.48%; specificity: 91.26%; AUC: 0.918). The diagnostic accuracy of GS_D2 was not affected by the number of tumours ($p = 0.58$) but was statistically associated with tumour size ($p = 0.008$). Also, GS_D2 diagnostic accuracy increases with increasing BC tumour risk. We found no differences in the performance of the GS_D2 test among the populations and centres in detecting tumours ($p = 0.7$) and controls ($p = 0.2$).

Conclusions: Our GS_D2 test is non-invasive, non-observer dependent and non-labour-intensive, and has demonstrated diagnostic accuracy in an independent, international and multicenter study, equal or superior to the current gold standard (cystoscopy combined with cytology). Additionally, it has higher sensitivity than cytology while maintaining its specificity. Consequently, it meets the requirements for consideration as a molecular test applicable to clinical practice in the management of BC.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Current guidelines define cystoscopy and cytology as the standard of care in bladder cancer (BC) diagnosis and follow-up [1]. Cystoscopy is an invasive technique with patients' discomfort and possible complications such as urinary tract infections or haematuria and 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 in cases of gross haematuria or patients with abnormal bladder mucosa due to an inflammation process [2,3]. For this reason, cystoscopy is always associated with cytology in the BC diagnostic and follow-up schedules as its specificity (SP) reaches 98% [4]. Cytology is a non-invasive methodology but it has some limitations, such as low sensitivity (SN), inter-observer variability, subjective evaluation and low-accuracy in low grade (LG) tumours [5].

Finding a reliable non-invasive marker of BC would be enormously useful in clinical practice. In fact, several urinary biomarkers have been reported in the literature, but although they improve the overall SN of cytology, they do not reach the desired SP [6] which is why they are not incorporated into routine practice [7].

We have previously reported and validated a 12 gene expression signature (GS_D12) in urine for the non-invasive diagnosis of BC. Although the signature performed well in the validation cohort, it did not achieve the diagnostic accuracy of the current gold standard. Thus, we developed three new urinary gene expression signatures composed of two, five and ten genes respectively (GS_D2, GS_D5 and GS_D10) and an improved GS_D12. These gene panel sets have demonstrated a high accuracy for BC diagnosis (area under curve [AUC] 0.913–0.949) in voided urine samples [8].

However, to demonstrate the potential clinical utility of these gene signatures, they should be externally validated. In this paper we present the results of a prospective, blinded, international and multicenter study to establish the true accuracy of our gene set panels in BC diagnosis.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Prospective, multicentre and international clinical trial performed according to the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) guidelines [9]. The protocol was approved by an institutional review committee at the Hospital Clinic of Barcelona (Spain), and by local committees of the four external participating institutions. External centres were asked to collect and prepare the urine samples for final processing at the Hospital Clinic.

BC patients submitted to transurethral resection of the bladder (TURB) and controls with non-neoplastic urological diseases were consecutively enrolled between February 2009 and July 2010 in the different centres. The inclusion and exclusion criteria for BC patients and controls, as well as sample processing details, are reported in the [supplementary material](#).

2.2. Gene expression quantification and data analysis

RNA extraction, complementary DNA synthesis and gene expression quantification were performed in the Hospital Clinic as described in the [supplementary material](#) [8,10]. All the 45 target genes and two endogenous controls analysed in our previously reported studies were also analysed in the present study [8,11].

Relative expression values (ΔCq) for the genes (Supplementary data) contained in the four evaluated predictive models (GS_D2, GS_D5, GS_D10 and GS_D12; Table 1S) [8] were used to calculate the risk of presenting BC. If the predicted probability in each of the models 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 of samples were blinded to the patients' clinical data, ensuring the reliability of the results. R-software was used for all calculations.

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by a contract research organisation. Analysis of variance was performed in R (function *aov*). Post-hoc pairwise comparisons were performed with the R function Tukey honestly significant differences. Comparisons with a *P* value <0.05 were considered significant. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were generated using the *DiagnosisMed* (<http://CRAN.R-project.org/package=DiagnosisMed>) and *pROC* package [12].

3. Results

3.1. Patients included in the study

A total of 789 consecutive voided urine samples were collected prospectively in five European centres participating in the study. After excluding those non-evaluable patients (Supplementary data), 525 patients were included in the validation study. (Fig. 1; Table 1). The grade and stage of the tumours were determined

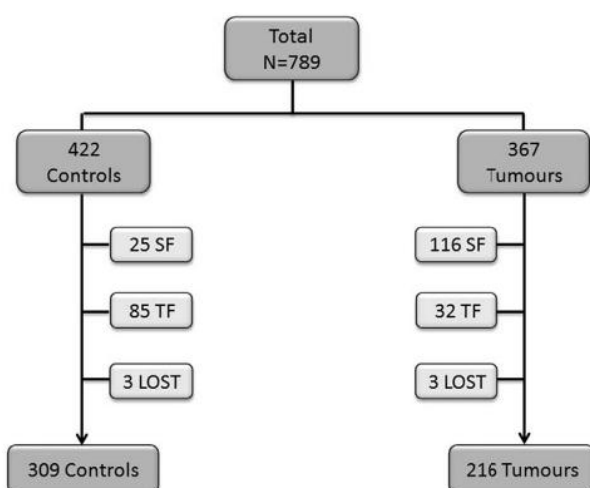


Fig. 1. Flow diagram of participants satisfying the criteria for inclusion. Abbreviations: SF, screening failure (included patients that did not meet the inclusion criteria); TF, technical failure (samples that yielded insufficient RNA and samples that did not meet the *GUSB* RNA quality control; see supplementary material)

according to World Health Organisation criteria [13] and tumour-node-metastasis classification [14], respectively.

Tumours were classified according to their risk in three categories: Low-risk non-muscle invasive bladder cancer (LR-NMIBC; Ta and T1 LG without associated carcinoma *in situ* [CIS]), high-risk NMIBC (HR-NMIBC; Ta or T1 LG with associated CIS, Ta or T1 high grade (HG), Tis) and muscle invasive bladder cancer (MIBC; T2, T3, T4, any grade, with or without associated CIS). Of the 216 BC patients included, 124 were incident tumours and the remaining (*N* = 92) were recurrent cases.

3.2. Cytology results in bladder tumour samples

Cytology results were available for 150 of the 216 BC (69%) patients included in the study. Of these, 73 were positive (49%), 62 negative (41%) and 15 suspicious (10%). Considering failure in diagnosis only in those patients that presented with negative cytology, we found that cytology failed to diagnose 62% of LR-NMIBC (42 out of 67), 32% of HR-NMIBC (18 out of 56) and 7% of MIBC (2 out of 27). We could observe a statistically significant association between histological grade and positive cytology result (*p* = 0.0001), as well as between cytology results and tumour size (*p* = 0.02). However, we did not observe association between cytology results and tumour multiplicity (*p* = 0.3).

3.3. Validation of diagnostic gene expression signatures

An independent set of 525 voided urine samples was used to validate our previously published four gene signatures [8]. ROC curves for the four diagnosis gene expression signatures are shown in Fig. 2, GS_D2 having the best performance. Using the same cut-off as previously reported [8] for discrimination between tumour and controls, we found a high accuracy for the four gene signatures in the validation set (Table 2). Additionally, all four gene-signature accuracies were analysed based on the risk groups. We could observe that SN increases through the BC risk groups, being lower in LR-NMIBC. Considering GS_D2 as the best in overall validation analysis, its SN for LR-NMIBC was 67.86%, but it increased up to 94.74% in MIBC. As regards the tumour samples misclassified by the test (*n* = 40), 27 were LR-NMIBC which means that the test failed to diagnose 32% of the LR NMIBC, 10 were HR-NMIBC (11%) and 2 MIBC (5%) (Table 2). On the other hand, the overall SN of the GS_D2 test in recurrent cases was 77.17% (*n* = 92) while it increases to 84.68% (*n* = 124) in initial ones.

3.4. Comparison of GS_D2 gene signature results with clinical data and cytology results

We analysed the association between the performance of GS_D2 and tumour multiplicity and size. Interestingly,

Table 1
Clinical and histopathological variables for the patients and controls included in the study.

a) Validation set N = 525		
Tumour urine samples	N	%
Gender		
Male	171	79.02
Female	45	20.8
Age	Mean (year)	Range (year)
	70	30–94
Stage	N	%
Tis	2	0.9
Ta	109	50.5
T1	63	29.2
T2–T4	38	17.6
Tx	4	1.8
Grade	N	%
LG	89	41.2
HG	124	57.4
Gx	3	1.4
Total tumours	216	100
Control urine samples		
Control urine samples	N	%
Gender		
Male	159	51.4
Female	150	48.6
Age	Mean (year)	Range (year)
	55	19–89
Urological pathology	N	%
Benign prostate hyperplasia	36	11.7
Urolithiasis	154	49.8
Incontinence	42	13.6
Urinary tract infections	15	4.85
Others	59	19.09
Non-urological disease	N	%
	3	0.97
Total controls	309	100
Total	525	100

b)					
	Hospital clinic	Fundacio Puigvert	Virgen del Rocio	University of Vienna	Radboud University Nijmegen
N	59	115	22	14	6
Median age (range)	72 (51–88)	74 (38–90)	65 (45–83)	72 (59–94)	65 (30–83)
Stage					
Tx	1	2	1	-	-
Cis	2	-	-	-	-
Ta	20	70	8	7	4
T1	26	20	11	4	2
≥T2	10	23	2	3	-
Grade					
Gx	-	-	1	-	-
LG	21	44	14	8	2
HG	38	71	7	6	4

a) Clinical and pathological characteristics of patients and controls in the overall group. b) Pathological features of tumour samples included in each participating centre (LG: Low-grade; HG: High grade).

GS_D2 accuracy was not affected by the number of tumours ($p = 0.58$) but it was statistically associated with tumour size ($p = 0.008$) (Fig. 3A and 3B). Of note, the SN of the test in Ta LG cases of low tumour volume (≤ 5 mm) was 67% ($n = 27$), maintaining SP at 91.26%.

Performance of the GS_D2 signature was also analysed in BC patients where cytology results were available ($n = 150$). All positive cytologies were confirmed by the GS_D2 gene signature except in four cases (5%). On the contrary, of all the patients diagnosed by GS_D2, cytology failed to detect BC in 43% of them. Moreover 10% of patients ($n = 15$) with BC showed suspicious cytology and in 11 of these (73%) the GS_D2 gene signature gave positive results (Fig. 3C).

In this special subset of patients with known BC diagnosis, GS_D2 performed better than cytology, not only in the overall population, but also when we stratified patients according to BC risk groups (Fig. 3D).

3.5. Heterogeneity among centres

We analysed the accuracy of the tests in the different hospitals participating in the study. Considering the GS_D2 model as the best in the overall validation, we found no differences in the performance of the test among the populations and centres in detecting tumours ($p = 0.7$) and controls ($p = 0.2$) (Table 3).

4. Discussion

Non-invasive diagnosis of BC represents a significant challenge and it has generated a large volume of research in recent years [15]. The present study confirms that gene expression signatures based on urine samples can be used to diagnose BC. To our knowledge, this is the first time in which different genetic signatures have been validated in a large and independent cohort of patients enrolled in a prospective, blinded, international and multicenter clinical trial.

The current gold standard method used to diagnose BC is the combination of cytology and cystoscopy. A meta-analysis of 36 studies showed a SN and SP of 44% and 96%, respectively, for urine cytology. This low overall SN is mainly due to the low SN for detection of LG tumours, approximately 4–31% [4]. The combination of cytology with cystoscopy tries to overcome the limitations of both techniques. This combination achieves a high SN and SP in the diagnosis and monitoring of the disease (SN: 71%, SP: 96%) [4]. Nevertheless, the invasiveness of cystoscopy has led to the search for markers in urine. An important number of Food and Drug Administration approved urinary tests for diagnosis of BC have been developed [1], however, although they improve the SN (30–91%) of the referral test i.e. cytology [16], none of them achieve its SP [4]. For this reason, to date there is no accepted urine marker in the clinical setting as none of them achieve the results of the combination of cytology and cystoscopy.

In our previous work, based on the analysis of 45 genes in 404 urine samples, we designed four gene expression signatures for BC diagnosis with an AUC

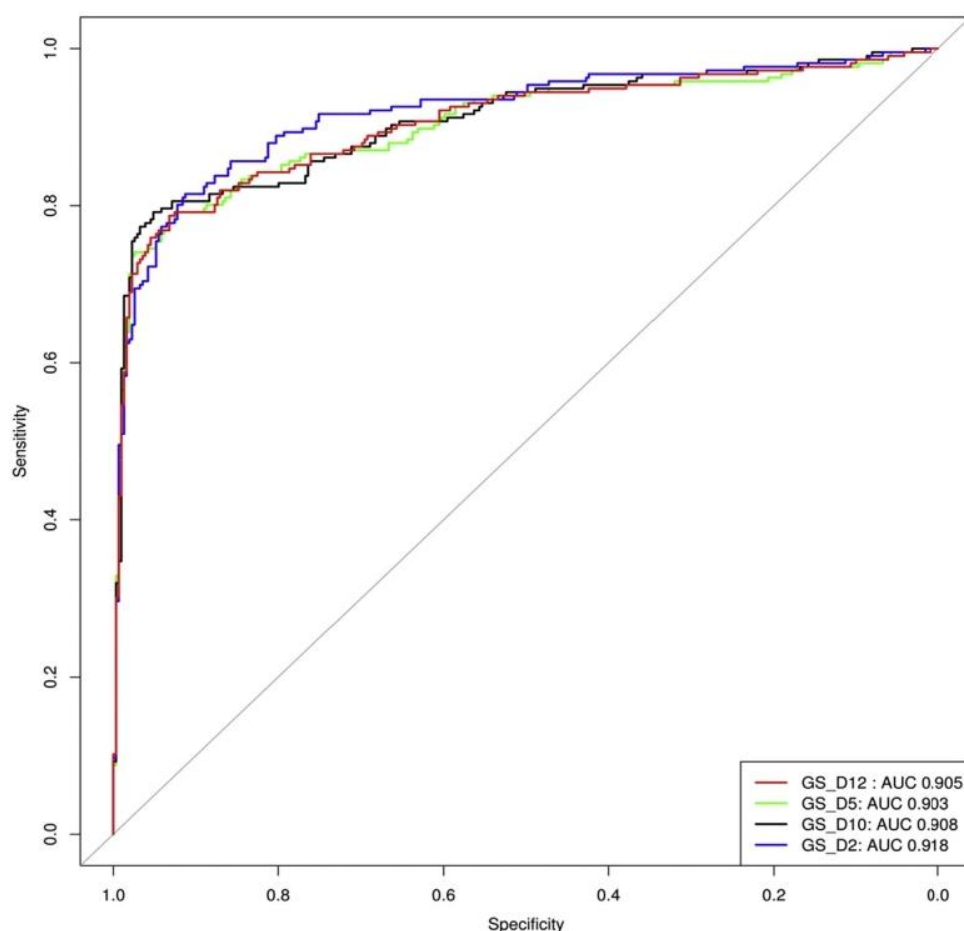


Fig. 2. ROC curves of the four diagnostic gene expression signatures in the validation set of 525 samples. Abbreviation: AUC, area under curve.

0.913–0.949 in detecting BC [8]. Here, the four models have proven to have a high accuracy for BC diagnosis in a prospective, blinded, international and multicenter study (AUC 0.903–0.918). Notably, the four models share two genes (*IGF2* and *MAGEA3*), which make up the hard core for BC diagnosis. Particularly, the GS_D2 model (containing only these two genes) had the best performance, achieving AUC: 0.918, although the four models perform quite similarly. Of note, this accuracy has been achieved using samples from patients with different urological disorders as controls and it is maintained among the populations and centres. As we described previously, these two genes are strongly associated with BC and involved in the two well-known molecular pathways of BC carcinogenesis [17]. It is therefore not surprising that their use results in a good combination for overall diagnostic purposes.

The GS_D2 signature achieved levels of SP (91%), comparable to cytology. Furthermore, its accuracy (87.24%) is higher than other urinary molecular tests reported in the literature based on multiple markers [18,19]. Of note, none of these tests have been validated yet. Moreover, a common problem in all these tests is a

decrease in SN for detecting LG tumours. In fact, GS_D2 showed a lower SN (68%) in the validation set for detecting LR-NMIBC in contrast to 89% for HR-NMIBC and 95% for MIBC. Actually, 27 of the 40 cases misclassified by GS_D2 tumour samples are LR-NMIBC. But even in the very low-risk group (Ta LG cases of low tumour volume; ≤ 5 mm), we achieved a higher SN in the validation set than those achieved for reported single markers for BC [20], and, furthermore, higher than that described for cytology in this specific subset of patients (27%) [4]. As often occurs with urinary BC assays, our assay performs less efficiently in prevalent than in incident cases, although our GS_D2 test achieves a good performance in the subgroup of recurrent cases (SN = 77%; negative predictive value = 93%).

In our population, cytology was performed on 150 patients out of 216, and in this subset of patients, cytology failed to diagnose 73% of the LR-NMIBC compared to 34% for GS_D2. On the contrary, both cytology and gene signature models performed similarly in HR-NMIBC and MIBC. Of concern, 5% (two cases) of MIBC were misclassified by GS_D2 and 7% (two cases) by cytology if we only consider negative results

Table 2
Diagnostic performance of four gene signatures in validation set of 525 samples.

Validation set N = 525				
Overall				
n Tumours/ n controls	216/309			
	GS_D2	GS_D5	GS_D10	GS_D12
AUC	0.918	0.903	0.908	0.905
SN (%)	81.48	79.17	79.63	78.7
SP (%)	91.26	91.59	93.53	93.2
PPV (%)	86.7	86.8	89.58	89.01
NPV (%)	87.58	86.28	86.79	86.23
ER (%)	12.76	13.52	12.19	12.76
Low risk NMIBC (Ta or T1 LG without associated CIS)				
n Tumours/ n controls	84/309			
	GS_D2	GS_D5	GS_D10	GS_D12
SN (%)	67.86	66.67	67.86	67.86
SP (%)	91.26	91.59	93.53	93.2
PPV (%)	67.86	68.29	74.03	73.08
NPV (%)	91.26	91.00	91.46	91.43
ER (%)	13.74	13.74	11.96	12.21
High risk NMIBC (Ta or T1 LG with associated CIS, Ta or T1 HG, Tis)				
n Tumours/ n controls	88/309			
	GS_D2	GS_D5	GS_D10	GS_D12
SN (%)	88.64	86.36	86.36	85.23
SP (%)	91.26	91.59	93.53	93.2
PPV (%)	74.29	74.51	79.17	78.12
NPV (%)	96.58	95.93	96.01	95.68
ER (%)	9.32	9.57	8.06	8.56
MIBC (T2, T3, T4 HG, with or without associated CIS)				
n Tumours/ n controls	38/309			
	GS_D2	GS_D5	GS_D10	GS_D12
SN (%)	94.74	89.47	89.47	86.84
SP (%)	91.26	91.59	93.53	93.2
PPV (%)	57.14	56.67	62.96	61.11
NPV (%)	99.3	98.61	98.63	98.29
ER (%)	8.36	8.65	6.92	7.49

Abbreviations: n = number; SN = sensitivity; SP = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; ER = overall error rate; AUC = area under curve; NMIBC = non-muscle invasive bladder cancer; MIBC = muscle invasive bladder cancer; CIS, carcinoma *in situ*.

and in 19% (five cases) if we consider both negative and suspicious or inconclusive results for cytology. Of the two MIBC cases not detected by the GS_D2 signature, one tumour was less than 1 cm while the other was of 2 cm. The early detection of MIBC and high-risk recurrence is critical, since this scenario can be life threatening. In contrast, small LG recurrences do not pose a threat, and early detection is not essential [21].

From the initial tumour population 20% of cases were considered screening failures because the final TURB did not find BC. This rate of false positive results for cystoscopy is higher than that achieved for our gene expression signature (8.4%). In fact, the overall SN and SP reported for conventional cystoscopy is 71% (range 49–93%) and 72% (47–96%) respectively [4] that correlates with the cystoscopy results found in our series. This highlights that cystoscopy is often overrated as a diagnostic tool in BC by the urology community.

The ratio of false-positive results that could lead to aggressive manoeuvres could affect the clinical implementation of a molecular test. The ideal cancer detection biomarker should be found specifically in malignant conditions and not in non-malignant pathologies. Achieving a high SP value is important and it is of note that many of the diagnostic tests discussed in the literature result in a high number of false positives under common conditions in urology. To minimise the impact of these conditions on the results of our gene expression signatures, the control population used in our study consisted of urological patients suffering from common diseases such as infection, stones or benign prostatic hyperplasia. In addition, the SP of our test was fixed at a minimum of 90%, which is within the range of that achieved by the current gold standard diagnosis method and higher than those reported for commercially available urine markers used for BC detection (70.6%, range 56–79%) [1]. The higher the SP, the lower the risk we have of triggering aggressive manoeuvres in non-BC patients which impacts directly on the cost-effectiveness of the test.

The current clinical objectives for molecular markers in BC include being a substitute for some cystoscopies during follow-up for BC, thus they should have a high SN, particularly for HG tumours [22]. Our gene expression signature equals or exceeds the performance of the current gold standard, provides an objective measure without inter-observer variability, as it is polymerase chain reaction-based, it is not as labour-intensive as other urine tests and the laboratory personnel executing and reading the urinary assay requires no special expertise, so it could be considered as a valid alternative for clinical practice.

On the other hand, a high variability for cytology results has been previously described among centres [23]. In contrast, we observed that there were no differences in the performance of GS_D2 among the different centres.

In the present study, we had an informative specimen rate of 86%, which is the same as that already described in our previous report (87%) [8] and in the same range of previously informative specimen rates described in the literature for similar gene expression urinary tests [24,25]. Another limitation of our study is the lack of cytology in the control group that does not allow for a direct calculation of the SP of cytology in our own series. Of note, the strength of our study is that it is an independent validation study, performed in a multi-center and international population. Our test does manage to achieve the results of the current standard combination of cytology and cystoscopy and all of this after a process of external validation. Thus, our test could be used in the follow-up of patients with BC and could help us to re-schedule the monitoring in selected patients and spare some cystoscopies. However, as has been reported, once the methods for assessment of the marker have been established and initial results showed

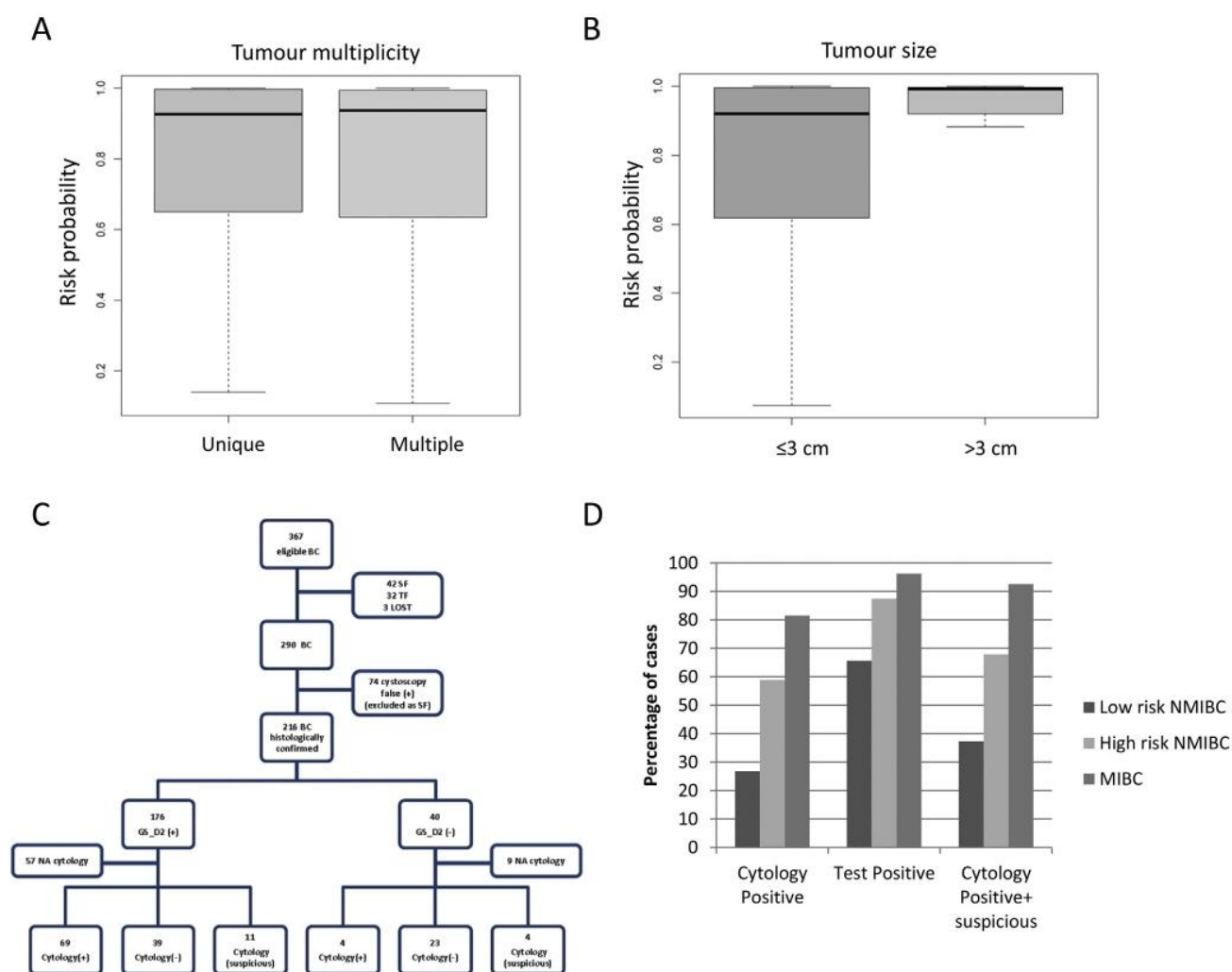


Fig. 3. Comparison of GS_D2 gene signature results with clinical data and cytology results. A) Association between the performance of GS_D2 and tumour multiplicity and B) size. C) Participant flow diagram according to GS_D2 molecular test and cytology results. D) Cytology and GS_D2 results based on risk groups on tumour samples. Abbreviations: BC, bladder cancer; NA, not available; SF, screening failure; TF, technical failure; NMIBC, non-muscle invasive bladder cancer; MIBC, muscle invasive bladder cancer.

promise, the marker needs to be tested in a clinical trial. Validating these results through prospective large-scale randomised clinical trials is crucial for assessing its final place in clinical practice [26].

Our study shows that biomarkers can provide specific and unique information to be added to the clinical and

pathological data. Our two gene expression test is non-invasive, non-observer dependent and non-labour-intensive. So it is an easy to perform technique and, most importantly, it has demonstrated a diagnostic accuracy equal or superior to the current gold standard composed of cystoscopy and cytology.

Table 3
Diagnostic performance of GS_D2 among different populations and centres.

N total	Hospital Clínic	Fundació Puigvert	Radboud University	University of Vienna	Hospital Virgen del Rocio
	Barcelona, Spain	Barcelona, Spain	Nijmegen, The Netherlands	Vienna, Austria	Sevilla, Spain
	153	246	22	48	56
SN (%)	79.66	79.13	83.33	92.86	90.9
SP (%)	90.43	90.84	93.75	88.24	97.06
PPV (%)	83.93	88.35	83.33	76.47	95.24
NPV (%)	87.63	83.22	93.75	96.77	94.29
ER (%)	13.73	14.63	9.09	10.42	5.36

Abbreviations: n = number; SN = sensitivity; SP = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; ER = overall error rate.

Conflict of interest statement

Lourdes Mengual, María José Ribal, Juan José Lozano, and Antonio Alcaraz are inventors of patent EP13382030.8 applied by Fina Biotech S.L. on January 31st, 2013. All other authors declared no conflicts of interest.

Grant information

This work was supported by laboratorios FINA BIOTECH. MI-T has a Research Support Staff Grant from Instituto de Salud Carlos III.

Role of the funding source

The study sponsor had no role in study design, in the collection, analysis, or interpretation of data neither in the writing of the report.

Acknowledgements

This work was supported by FINA-BIOTECH. MI-T has a Research Support Staff Grant from Instituto de Salud Carlos III (CA07/00221).

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 Helena Kruyer for the English correction of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.003>.

References

- [1] Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 2013;64(4):639–53.
- [2] Goh AC, Lerner SP. Application of new technology in bladder cancer diagnosis and treatment. *World J Urol* 2009;27(3):301–7.
- [3] Smith ZL, Guzzo TJ. Urinary markers for bladder cancer. *F1000Prime Rep* 2013;5(21).
- [4] Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, et al. 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(4):i–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(5):388–92.
- [6] Tilki D, Burger M, Dalbagni G, et al. Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2011;60(3):484–92.
- [7] Witjes JA, Comperat E, Cowan NC, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol* 2014;65(4):778–92.
- [8] Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, 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(1):261–9.
- [9] Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. 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(5):639–50.
- [10] 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(1):21.
- [11] Mengual L, Burset M, Ribal MJ, et al. Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16(9):2624–33.
- [12] Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011;12(77).
- [13] Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, et al. Tumours of the urinary system. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. World Health Organization classification of tumours*. Lyon: IARC Press; 2004. p. 89–157.
- [14] Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumours*. UICC International Union Against Cancer. ed. 7. New York: Wiley-Blackwell; 2009.
- [15] Musquera M, Mengual L, Ribal MJ. Non-invasive diagnosis bladder cancer: new molecular markers and future perspectives. *Arch Esp Urol* 2013;66(5):487–94.
- [16] Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol* 2011;42(4):455–81.
- [17] Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol Oncol* 2010;28(4):409–28.
- [18] O'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M, et al. A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol* 2012;188(3):741–7.
- [19] Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock R, et al. Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2008;14(3):742–9.
- [20] Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003;61(1):109–18.
- [21] Soloway MS, Sofer M, Vaidya A. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2002;167(4):1573–83.
- [22] Soukup V, Babjuk M, Bellmunt J, et al. Follow-up after surgical treatment of bladder cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol* 2012;62(2):290–302.
- [23] Karakiewicz PI, Benayoun S, Zippe C, et al. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 2006;97(5):997–1001.
- [24] Laxman B, Morris DS, Yu J, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68(3):645–59.
- [25] Jamaspishvili T, Kral M, Khomeriki I, et al. Quadriplex model enhances urine-based detection of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2011;14(4):354–60.
- [26] Lotan Y, Shariat SF, Schmitz-Drager BJ, et al. Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urol Oncol* 2010;28(4):441–8.

TRABAJO 3

DESARROLLO DE UN TEST NO INVASIVO PARA EL CÁNCER DE VEJIGA MEDIANTE EL ESTUDIO DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE microRNAs EN MUESTRAS DE ORINA.

International Journal of Cancer. 2013 Dec 1;133(11):2631-41

PMID:23686449

DESARROLLO DE UN TEST NO INVASIVO PARA EL CÁNCER DE VEJIGA MEDIANTE EL ESTUDIO DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE **microRNAs** EN MUESTRAS DE ORINA

Introducción: Actualmente los métodos estándar para detectar y monitorizar el carcinoma de células uroteliales de vejiga son invasivos o tienen una baja sensibilidad. La incorporación a la práctica clínica de una herramienta no invasiva para la evaluación del CV mejoraría enormemente la calidad de vida y el seguimiento de dichos pacientes.

Objetivo: El objetivo de este estudio es identificar los perfiles de expresión de **microRNAs** en la orina de pacientes con CV para desarrollar un método diagnóstico no invasivo, preciso y fiable y que además nos proporcione información sobre la agresividad del tumor.

Metodología: Un total de 40 pacientes con CV y controles fueron analizados mediante TaqMan arrays de **microRNAs** humanos para identificar los perfiles de expresión de **microRNAs** de las células urinarias. Posteriormente se validaron 22 **miRNAs** como posibles marcadores de diagnóstico y pronóstico en una cohorte independiente de 277 muestras utilizando la metodología **miRCURY LNA qPCR**. Mediante el análisis de regresión logística multivariante se desarrollaron varias firmas basadas dichos **microRNAs** y se validaron internamente.

Resultados: En la cohorte inicial de pacientes, identificamos 40 y 30 **miRNAs** diferencialmente expresados entre paciente con CV y controles y entre tumores de alto y bajo grado, respectivamente. La validación de 22 **miRNAs** en una cohorte independiente resultó en la identificación de una firma de diagnóstico de seis **miRNA** con una sensibilidad del 84,8% y una especificidad del 86,5% (AUC 0,92). Además, se desarrollo un modelo pronóstico de dos **miRNAs** con una sensibilidad del 84,95% y una especificidad del 74,14% (AUC 0,83). El análisis interno de validación cruzada confirmó la precisión de ambos modelos, lo que refuerza la solidez de nuestros hallazgos.

Conclusiones: Aunque los datos deben ser validados externamente, el análisis de **miRNAs** en orina parece ser una herramienta adecuada para el diagnóstico no invasivo de CV.



Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer

Lourdes Mengual^{1*}, Juan José Lozano^{2*}, Mercedes Ingelmo-Torres¹, Cristina Gazquez¹, María José Ribal¹ and Antonio Alcaraz¹

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

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

Current standard methods used to detect and monitor bladder urothelial cell carcinoma (UCC) are invasive or have low sensitivity. The incorporation into clinical practice of a non-invasive tool for UCC assessment would enormously improve patients' quality of life and outcome. This study aimed to examine the microRNA (miRNA) expression profiles in urines of UCC patients in order to develop a non-invasive accurate and reliable tool to diagnose and provide information on the aggressiveness of the tumor. We performed a global miRNA expression profiling analysis of the urinary cells from 40 UCC patients and controls using TaqMan® Human MicroRNA Array followed by validation of 22 selected potentially diagnostic and prognostic miRNAs in a separate cohort of 277 samples using a miRCURY LNA™ qPCR system. miRNA-based signatures were developed by multivariate logistic regression analysis and internally cross-validated. In the initial cohort of patients, we identified 40 and 30 aberrantly expressed miRNA in UCC compared with control urines and in high compared with low grade tumors, respectively. Quantification of 22 key miRNAs in an independent cohort resulted in the identification of a six miRNA diagnostic signature with a sensitivity of 84.8% and specificity of 86.5% (AUC = 0.92) and a two miRNA prognostic model with a sensitivity of 84.95% and a specificity of 74.14% (AUC = 0.83). Internal cross-validation analysis confirmed the accuracy rates of both models, reinforcing the strength of our findings. Although the data needs to be externally validated, miRNA analysis in urine appears to be a valuable tool for the non-invasive assessment of UCC.

Cystoscopy and cytology are the standard methods used to detect and monitor bladder urothelial cell carcinoma (UCC). Cystoscopy is an invasive technique that has a high sensitivity, except in cases of flat malignancies such as carcinoma *in situ* (CIS, Tis).¹ Cytology has the advantage of being non-invasive with a high specificity (90–96%), but it lacks sensitivity, especially for low grade disease.²

All these limitations of the current diagnostic methods have prompted a search for more reliable non-invasive markers for

detecting and predicting the biological behavior of UCC. In fact, various urine tests have been commercialized with such a purpose, but even though most of them are more sensitive than urine cytology, the latter continues to be more specific.^{3,4} With the aim of overcoming this lack of reliable non-invasive markers, we previously developed a urine-based gene expression signature that outperforms the diagnostic accuracy of the current gold standard,^{5,6} although further improvement of this test is still possible and warrants further research.

Key words: biomarkers, bladder cancer, diagnosis and prognosis, expression signature, microRNA, urine

Abbreviations: AUC: area under curve; BPH: benign prostatic hyperplasia; Cq: cycle quantification; CIS, Tis: carcinoma in situ; ER: error rate; FC: fold change; FDR: false discovery rate; HG: high grade; LG: low grade; LNA: locked nucleic acid; MIBC: muscle invasive bladder cancer; miRNA: microRNA; NA: non-available; NMIBC: non-muscle invasive bladder cancer; NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value; qPCR: quantitative PCR; RT-qPCR: reverse transcription quantitative PCR; SN: sensitivity; SP: specificity; TUR: transurethral resection; UCC: urothelial cell carcinoma

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*L.M. and J.J.L. contributed equally to this work

Grant sponsor: Spanish Urological Association; **Grant number:** FIU 2009; **Grant sponsor:** Fondo de Investigaciones Sanitarias and Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Unión Europea; **Grant number:** PI10/01145; **Grant sponsor:** Instituto de Salud Carlos III; **Grant number:** CA07/00221; **Grant sponsors:** IDIBAPS; **Grant number:** PhD student fellowship grant 2007-11

DOI: 10.1002/ijc.28274

History: Received 24 Jan 2013; Accepted 29 Apr 2013; Online 17 May 2013

Correspondence to: Lourdes Mengual, Laboratory and Service of Urology, Hospital Clínic, Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, Casanova, 143 08036 Barcelona, Spain, Tel.: +34-93-2275400 Ext. 4820, Tel.: +34-93-2275545, Fax: +34-93-2275545, E-mail: lmengual@clinic.ub.es

What's new?

Accurate urinary tests to detect urothelial cell carcinoma (UCC) would improve patients' quality of life and outcome. Here, in the first global urine miRNA profiling study of UCC patients, the authors provide a list of dysregulated miRNAs that are candidate clinical biomarkers for the non-invasive assessment of UCC. Furthermore, they describe miRNA panels consisting of a modest number of miRNAs that provide high UCC diagnostic and prognostic accuracy. Although clinical trials are needed to validate the data, the findings open the door to the possibility of implementing an accurate and reliable system for the non-invasive assessment of UCC in clinical routine.

The rapid advance in understanding of the molecular biology of carcinogenic processes has led to the appearance of promising new cancer biomarkers such as microRNAs (miRNAs). miRNAs are a class of small non-coding RNAs that regulate various biological processes post-transcriptionally and are dysregulated in most cancer types,^{7–11} including bladder cancer.^{12–20} Aberrant expression of selected miRNAs has been also analyzed in urine samples of UCC patients as a non-invasive diagnostic tool,^{21–25} but to our knowledge, the complete miRNA profiling of the urinary cells from UCC patients has not been yet explored. Unlike mRNA, miRNAs have been shown to be unusually well preserved in a range of specimens, including urine samples.²⁶ This stability offers a distinct advantage of miRNA over mRNA as the analyte in the clinical setting, and has led to a considerable interest in the development of miRNAs as biomarkers for molecular diagnostic applications.

Here, we aimed to examine, for the first time, the miRNA expression profiles in urine samples of UCC patients in order to develop accurate and reliable miRNA expression signatures to diagnose and provide information on the aggressiveness of the tumor.

MATERIAL AND METHODS**Patients and clinical samples**

Under Institutional Review Board approval and patients' informed consent, we prospectively collected freshly voided urine samples from UCC patients and controls at Hospital Clínic of Barcelona, starting January 2008. Urines were centrifuged and separated into cellular pellet and supernatant before storage at -80°C in a urinary biorepository.

For this study, 317 available banked cellular pellets from urine samples collected between January 2008 and July 2010 at Hospital Clínic of Barcelona were used for analysis. These included 181 samples from patients subjected to transurethral resection (TUR) for a primary or recurrent UCC and 136 controls without history of UCC. The grade and stage of the tumors were determined according to WHO criteria²⁷ and TNM classification,²⁸ respectively (Table 1). A flowchart of the entire study is shown in Figure 1.

The grading of the tumors was considered as a measure for prognosis since it is representative of tumor aggressiveness. Tumors were classified according to their risk into three categories: low-risk non-muscle invasive bladder cancer

[NMIBC; Ta and T1 low grade (LG) without associated CIS], high-risk NMIBC [Ta or T1 LG with associated CIS, Ta or T1 high grade (HG), Tis] and muscle invasive bladder cancer (MIBC; T2, T3, T4 LG and HG with or without associated CIS). Adjuvant intravesical chemotherapy was used for low grade tumors and Bacillus Calmette-Guerin therapy was used for high grade NMIBC in those included patients that had a recurrent bladder tumor. None of the included patients had an upper urinary tract tumor.

RNA extraction

Around 50–100 ml of urine was collected from each UCC patient the day before the TUR. In controls, urine was collected the day before treatment for benign urinary pathology or during their examination in outpatients. Urine samples were processed as previously described,²⁹ except that collected urines were stored at 4°C and processed within the next 24 hr instead of ice cooled. RNAs from the urinary cell pellets were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and quantified with a NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Global screening phase

A total of 40 RNAs from urine samples were randomly selected from 10 control subjects, 10 LG NMIBC, 10 HG NMIBC and 10 MIBC patients (Table 1) for global miRNA profiling using TaqMan® Human MicroRNA Array (Applied Biosystems, Foster City, CA, hereafter referred to as AB). Briefly, miRNAs were reverse transcribed with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (AB) using 100 ng of total RNA and pools of miRNA specific stemloop primers following manufacturer's instructions (Megaplex RT primers for Human Pool A and B, AB). After reverse transcription, 2.5 μl of cDNA was preamplified with Megaplex PreAmp primers for pool A and B following manufacturer's instructions, except that the final volume of the reaction was 25 μl instead of 50 μl . Then, an aliquot of 1 μl of preamplified cDNA was applied to verify the actual amount of RNU48 using the specific primer/probe set (AB) via quantitative PCR (qPCR) and standard reaction and amplification conditions (final volume of qPCR reaction of 20 μl). Those samples that provided RNU48 cycle quantification (Cq) values³⁰ lower than 16, were diluted with water to ensure a homogeneous amount of

Table 1. Clinicohistopathologic features of the bladder cancer patients and controls studied in this report

	Screening phase	Discovery phase
Tumor urine samples		
Gender		
Male	18	120
Female	12	31
Age		
Mean	69	72
Range	34–95	38–94
Stage and grade ^{27,28}		
Tis	–	6
Ta LG	– CIS	10
	+ CIS	–
Ta HG	– CIS	–
	+ CIS	–
T1 HG	– CIS	9
	+ CIS	1
T2, T3, T4 HG	– CIS	8
	+ CIS	2
Subtotals	30	151
Control urine samples		
Gender		
Male	3	48
Female	7	78
Age		
Mean	75	63
Range	47–92	22–89
Urinary condition		
BPH	3	16
Urolithiasis	2	45
Incontinence	2	21
Urethral stricture	1	7
Healthy	2	25
Others	–	12
Subtotals	10	126
Totals	40	277

Abbreviations: BPH, benign prostatic hyperplasia; CIS, carcinoma *in situ*; LG, low grade; HG, high grade.

cDNA in all the samples and the correct quantification of miRNAs. Afterwards, miRNAs were analyzed by TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards Set v2.0 following manufacturer's instructions (AB). Each sample was assayed with A & B card resulting in the analysis of a total of 754 unique assays specific to human miRNAs. In addition, each card contains four control assays. Briefly, for each sample 80 µl of diluted pre-amplified cDNAs were mixed with 400 µl

of 2X TaqMan Universal PCR MasterMix (AB) in a final volume of 800 µl. TaqMan® Human MicroRNA Arrays were carried out in an ABI7900HT instrument using standard amplification conditions.

Technical validation of differentially expressed miRNAs

A total of 32 differentially expressed miRNAs obtained in TaqMan® Human MicroRNA Array (Supporting Information Table 1S) were selected for validation in the same samples previously analyzed, using miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Reverse transcription-qPCR (RT-qPCR) reactions were performed according to the manufacturers' instructions (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Briefly, total RNA (100 ng) containing miRNA was polyadenylated, and cDNA was synthesized using a poly(T) primer with a 3' degenerate anchor and a 5' universal tag. Then, cDNA was served as a template for miRNA RT-qPCR amplification with locked nucleic acid (LNA) primers and SYBR Green master mix. Specific LNA PCR primer sets used are listed in Supporting Information Table 1S. PCR reactions were carried out using a Light Cycler 480 instrument. The amplification profile was denatured at 95°C for 10 min followed by 45 amplification cycles of 95°C for 10 sec and 60°C for 1 min. At the end of the PCR cycles, melting curve analyses were performed.

Classifier discovery phase

Twenty-two key miRNAs from the global screening phase were selected to be tested in an independent series of 277 urine samples (Table 1). Selection of miRNAs was based on false discovery rate (FDR) ≤ 0.1 and/or absolute fold change (FC) ≥ 2 between controls and tumors, between distinct UCC risk groups and/or between HG and LG tumors in TaqMan® Human MicroRNA Array. Special attention was paid to adding miRNAs to discriminate low risk NMIBC and controls, since these groups showed a similar global miRNA expression profile (Fig. 2a). RT-qPCR reactions were performed as described above (Exiqon, Vedbaek, Denmark).

Data analysis

TaqMan® human microRNA array. RT-qPCR data was processed with SDS 2.4 and Enterprise software packages (AB). An automatic threshold and baseline was used for all the miRNAs to record the Cq value. At this point three samples were removed from the study as more than 70% of their miRNAs had Cq values above 35 (three tumor samples; two T1 HG and one T2 HG). In addition, those miRNAs with Cq values above 35 in at least 70% of samples were filtered out, giving a total of 257 valid miRNAs.

Data normalization was carried out using a global mean normalization method.³¹ Subsequently, miRNAs with expression levels correlating to the global mean Cq values were identified and the two miRNAs that most resemble the mean Cq value were selected by using GeNorm (miR-103 and miR-

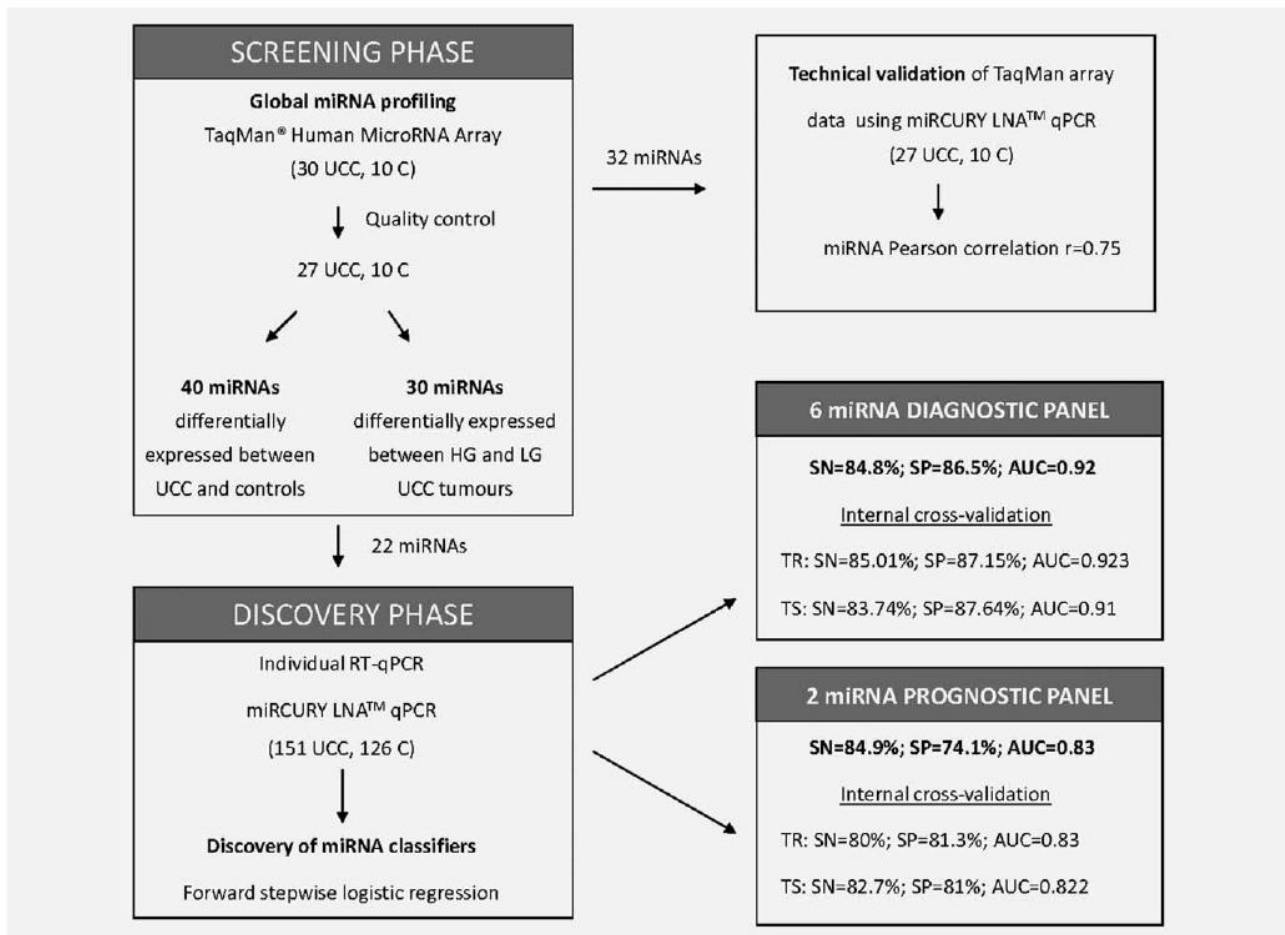


Figure 1. Study outline. Urine samples were obtained from a total of 181 urothelial cell carcinoma patients and 136 controls. Samples were divided into a screening (40 samples) and discovery phase (277 samples). miRNAs differentially expressed between UCC and control urines and between high and low grade tumor urines were first identified in the screening phase using the TaqMan® Human MicroRNA Array. A technical validation of 32 miRNAs in the same cohort using a different platform was performed. This was followed by a search to identify genetic classifiers for UCC diagnosis and prediction of tumor aggressiveness, which resulted in a six and two miRNA expression signature, respectively. None of the samples from the screening set were employed for the genetic classifier discovery process. In addition, an internal cross-validation strategy was performed on the proposed signatures. UCC = urothelial cell carcinoma; C = controls; HG = high grade; LG = low grade; SN = sensitivity; SP = specificity; AUC = area under curve; TR = training group; TS = testing group.

30c) and were both used as reference miRNAs, as recommended.³²

Relative expression levels of target miRNAs within a sample was expressed as ΔCq ($\Delta Cq = Cq_{\text{global mean}} - Cq_{\text{target miRNA}}$). For the valid samples ($n = 37$), miRNAs with Cq values above 35 were considered as lowly expressed, and their ΔCq were imputed to minimum ΔCq value for that miRNA. Differences in miRNA expression levels between controls and tumors and between HG and LG tumors were explored using the Student's t test. Significance was defined as FDR values of less than 0.1. Fold change values were generated from the median expression of the miRNAs from the TaqMan® Human MicroRNA Array in the groups compared.

The 257 filtered miRNAs were used on the 37-sample set to conduct a correspondence analysis, as implemented in the bga (between-group analysis) function included in the made4

package. Bga plots are based on principal component analysis, where $pc1$ corresponds to the x -axis and $pc2$ corresponds to the y -axis. This method is capable of visualizing high-dimensional data (such as multiple expression measurements) in a two-dimensional graph in which the areas delimited by the ellipses represent 95% of the estimated binormal distribution of the sample scores on the first and second axes.³³

miRCURY LNA™ RT-qPCR. No miRNAs with Cq values above 35 were found when using LNA primers. miRNA expression correlation between TaqMan® Human MicroRNA Array data and miRCURY LNA™ PCR primer set data were carried out with the Pearson correlation. A forward stepwise logistic regression was performed to determine the best models for diagnosis and prognosis.³⁴ Age and sex were included as variables in this analysis. Multidimensional scaling plots

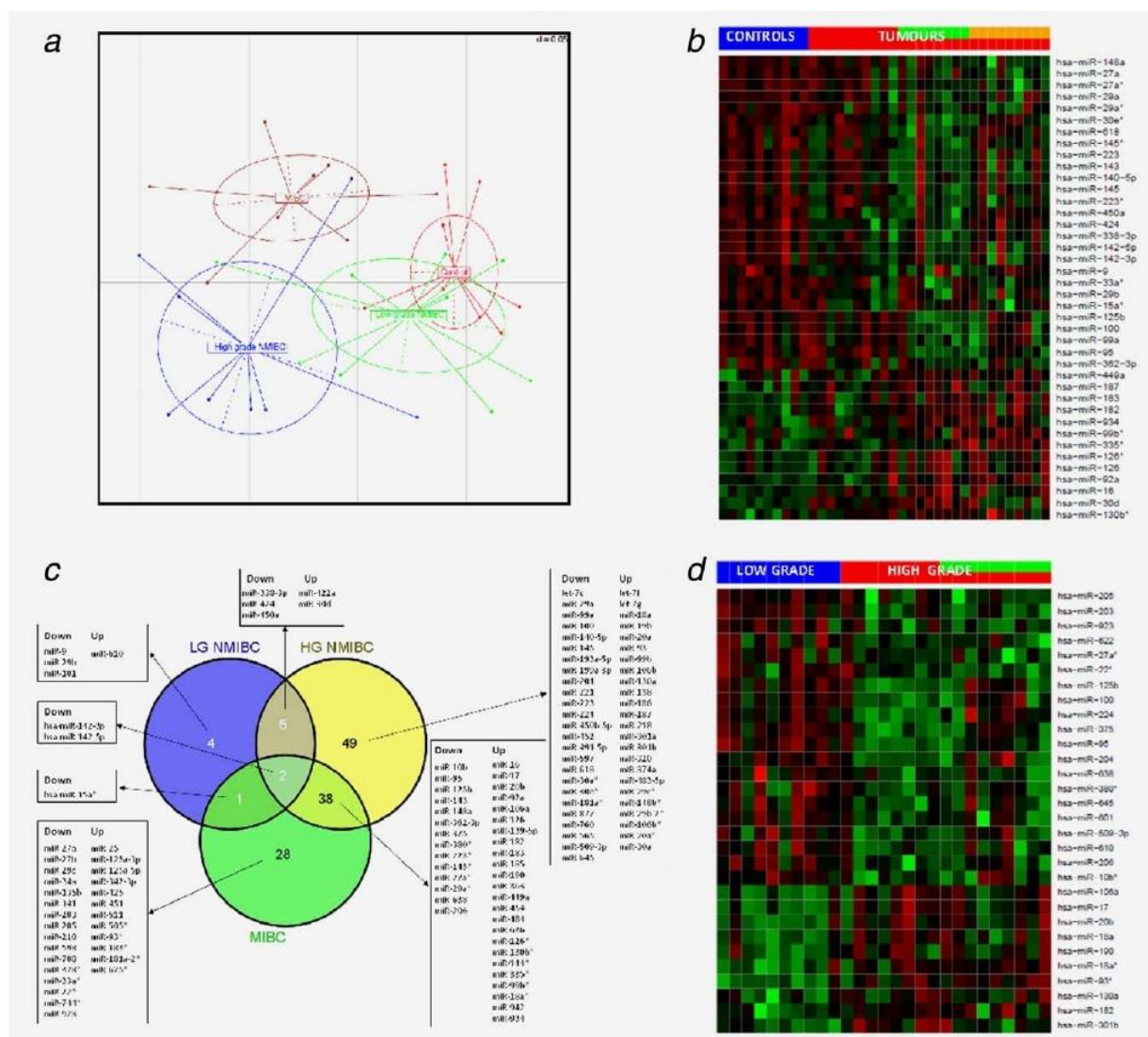


Figure 2. Urine miRNA expression profiling from UCC patients and controls and according to tumor phenotype. (a) Non-supervised between-group analysis (BGA) conducted employing urine expression data from the total filtered 257 probeset in the TaqMan® Human MicroRNA Array obtained from the following groups of patients: controls, low risk NMIBC (Ta LG), high risk NMIBC (T1 HG) and MIBC (T2 HG). Individuals (dots) and groups (ellipses) are positioned on the two-dimensional plane on the basis of their multiple miRNA expression measurements. The areas delimited by the ellipses cluster 95% of the points belonging to the estimated binomial expression distribution of each of the groups analyzed. (b) Heat map displaying the miRNAs differentially expressed between UCC and control urines ($n = 40$; $FDR \leq 0.1$) in the TaqMan® Human MicroRNA Array (27 UCC, 10 controls). The bar indicates the control (blue) and tumor (red) urine samples. The three UCC risk groups are indicated inside the red tumor bar as: LG NMIBC (red), HG NMIBC (green) and MIBC (orange). (c) Venn diagram showing the differentially expressed miRNAs in each of the three and their overlap. (d) Heat map displaying the miRNAs differentially expressed between HG and LG tumor urines ($n = 30$; $FDR \leq 0.1$) in the TaqMan® Human MicroRNA Array (10 LG, 17 HG tumors). The bar indicates LG (blue) and HG (red) tumor samples. The different stages of HG tumors are indicated inside the red HG bar as: NMIBC (red) and MIBC (green). In the heat maps, normalization of miRNAs was carried out with the Global Mean normalization method. Red pixels correspond to an increased abundance of miRNA in the urine samples, whereas green pixels indicate decreased mRNA levels. Rows represent individual miRNAs and columns represent experimental samples. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

were performed to visually explore the dissimilarity between the control and tumor group of samples according to the expression of the miRNAs diagnostic model. For each candidate model the optimal probability cutoff was computed through a ROC analysis using DiagnosisMed ([\[CRAN.R-project.org/package=DiagnosisMed\]\(http://CRAN.R-project.org/package=DiagnosisMed\)\) and pROC package.³⁵ To evaluate the performance of the models, we computed sensitivity \(SN\), specificity \(SP\), negative predictive value \(NPV\), positive predictive value \(PPV\) and overall error rates \(ER\) for each miRNA expression signature. An](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Table 2. Profiles of the 22 selected key miRNAs in the independent cohort

miRNA	ID ¹	Diagnostic performance												Prognostic performance		
		Overall			Low-risk NMIBC			High-risk NMIBC			MIBC			FC	p ³	AUC
		FC ²	p ³	AUC	FC	p	AUC	FC	p	AUC	FC	p	AUC			
hsa-miR-148a	204121	-1.74	0.036	0.744	1.14	0.015	0.510	-1.88	0.681	0.825	-2.75	0.014	0.933	-2.83	0.002	0.794
hsa-miR-27a*	205409	-7.28	0.019	0.767	-1.59	0.020	0.570	-8.95	0.503	0.850	-16.71	0.005	0.911	-5.98	0.001	0.735
hsa-miR-25	204361	1.38	0.155	0.652	-1.15	0.108	0.520	1.15	0.861	0.544	2.02	0.195	0.900	2.20	0.001	0.706
hsa-miR-18a*	204523	2.02	0.162	0.681	1.07	0.030	0.520	2.40	0.946	0.688	4.26	0.228	0.900	3.26	0.002	0.753
hsa-miR-95	204288	-3.10	0.090	0.696	1.86	0.000	0.590	-9.94	0.500	0.850	-3.10	0.003	0.878	-14.57	0.010	0.882
hsa-miR-92a	204258	1.98	0.024	0.711	-1.13	0.114	0.530	1.79	0.323	0.788	3.57	0.024	0.844	3.60	0.001	0.729
hsa-miR-205	204487	-2.65	0.199	0.678	-1.74	0.037	0.550	-2.24	0.945	0.650	-5.16	0.300	0.844	-2.90	0.043	0.765
hsa-miR-450a	204519	-3.36	0.001	0.856	-5.77	0.805	0.850	-6.49	0.003	0.925	-1.97	0.001	0.800	1.77	0.022	0.535
hsa-miR-126*	204584	5.07	0.077	0.715	2.30	0.526	0.660	7.25	0.265	0.688	10.52	0.156	0.800	4.51	0.038	0.588
hsa-miR-140-5p	204540	-2.94	0.011	0.800	-2.55	0.515	0.780	-3.67	0.091	0.850	-3.16	0.003	0.778	-1.24	0.034	0.618
hsa-miR-125b	204465	-3.39	0.029	0.726	-1.98	0.008	0.560	-15.69	0.628	0.900	-3.39	0.001	0.756	-5.60	0.048	0.788
hsa-miR-142-5p	204722	-4.12	0.001	0.856	-4.08	0.722	0.860	-5.12	0.003	0.963	-3.98	0.000	0.756	-1.01	0.034	0.553
hsa-miR-375	204362	-1.81	0.148	0.644	1.49	0.001	0.600	-18.85	0.450	0.850	-3.56	0.006	0.733	-8.63	0.074	0.865
hsa-miR-142-3p	204291	-4.37	0.003	0.815	-4.82	0.870	0.830	-5.38	0.006	0.900	-4.10	0.002	0.722	1.16	0.055	0.512
hsa-miR-143	204190	-4.20	0.014	0.767	-2.79	0.254	0.720	-8.54	0.095	0.875	-4.20	0.002	0.722	-2.91	0.062	0.665
hsa-miR-183	204652	3.48	0.039	0.722	2.62	0.431	0.680	5.07	0.194	0.800	3.48	0.052	0.700	1.88	0.063	0.612
hsa-miR-204	204507	-2.47	0.323	0.622	1.42	0.013	0.590	-4.81	0.350	0.875	-3.09	0.004	0.633	-6.04	0.379	0.806
hsa-miR-149	204321	3.13	0.237	0.637	3.29	0.493	0.720	3.26	0.085	0.625	1.16	0.551	0.556	-2.24	0.473	0.559
hsa-miR-200b	204650	1.09	0.617	0.607	1.30	0.094	0.730	1.34	0.074	0.638	-2.72	0.894	0.556	-1.38	0.665	0.653
hsa-miR-187	204018	5.04	0.063	0.600	3.75	0.523	0.640	23.67	0.245	0.625	4.14	0.028	0.533	3.71	0.380	0.541
hsa-miR-338-3p	204719	-4.55	0.006	0.767	-4.57	0.928	0.860	-6.16	0.016	0.913	-3.52	0.001	0.533	1.11	0.112	0.559
hsa-miR-424	204736	-2.71	0.001	0.826	-3.25	0.155	0.970	-3.58	0.000	0.988	-1.90	0.000	0.522	1.20	0.306	0.676

¹ID from microRNA LNATM PCR primer sets (Exiqon).

²Fold change (FC) values were generated from the median expression of the miRNAs from LNATM real-time RT-qPCR in the groups compared.

³Student's *t* test *p* values.

additional validation strategy was carried out on the proposed logistic regression models. Data for the subjects from different subgroups was randomly divided into the training (~2/3 of all subjects in a given subgroup) and test (~1/3 of the subjects) sets. Test sets were excluded from model construction. Following construction of logistic regression models using training sets, the models were then used to predict status of the subjects in the testing sets. This procedure was repeated 100 times, different subjects in training and testing sets were included and a new logistic regression model was constructed each time. We computed the corresponding random sampling cross-validated area under the curve (AUC) measures: (AUC, SN, SP) as mean and standard deviation in both sets: training (2/3) and testing (1/3).³⁶ R-software was used for all calculations and to construct heat maps.

Pathway enrichment analysis

DIANA-mirPath tool,³⁷ using TargetScan as the target prediction algorithm, was used to identify targets of the miRNAs

composing the diagnostic signature, and subsequent target enrichment analysis was performed in order to discover possible canonical altered pathways.

RESULTS

Global screening phase

miRNA profiling in UCC urine samples. Overall, analysis of TaqMan® Human MicroRNA Array-derived expression data from tumor and control urines resulted in the identification of 40 miRNAs with a FDR of less than 10%; 27 downregulated and 13 upregulated miRNAs in UCC urines (Supporting Information Table 2S). Heat map based on differentially expressed miRNAs shows a distinction between UCC and control samples (Fig. 2b).

Expression of miRNAs with respect to tumor phenotype. When analyzing differentially expressed miRNAs according to the three UCC risk groups (low risk NMIBC, high risk NMIBC and MIBC) we found that there is global and specific differential miRNA expression in each of the groups

(Fig. 2c). Since many miRs were shared between the HG NMIBC and MIBC groups, we merged these groups and compared them with LG NMIBC to create a grade defining signature. This signature is representative of tumor aggressiveness and may act as measure for tumor prognosis. Thus, based on tumor grade, we identified 30 aberrantly expressed miRNAs in HG compared to LG tumors; 20 miRNAs were downregulated and 10 were upregulated in HG UCC urines (Supporting Information Table 2S). Heat map based on differentially expressed miRNAs shows a clear distinction between HG and LG tumors (Fig. 2d).

Technical validation of differentially expressed miRNAs

To assure the consistency in the experimental procedures followed in the screening phase, we used a different approach, based in LNATM PCR primer sets, to quantify 32 selected miRNAs (Supporting Information Table 1S) in the same 37 samples evaluated using the TaqMan[®] Human MicroRNA Array. Even though there are several methodological differences between both platforms, expression of these 32 miRNAs correlated significantly between both platforms ($y = 0.74x + 0.05$; $r = 0.75$; $p < 0.01$; $n = 1156$) (Supporting Information Fig. 1S).

Classifier discovery phase

To test whether the expression profile of differentially expressed miRNAs in urine can be used as a signature to diagnose and determine UCC aggressiveness, we selected 22 key miRNA to validate in an independent cohort of 277 urine samples (Table 2). This analysis allowed us to identify a subset of six miRNAs (miR-187, miR-18a*, miR-25, miR-142-3p, miR-140-5p, miR-204) capable of correctly classifying UCC patients with an overall SN of 84.8% with a SP of 86.5% (AUC = 0.92; 95%CI, 0.89–0.95) (Fig. 3). Three of the six miRNAs of the signature were overexpressed in UCC urines (miR-187, miR-18a*, miR-25) while three were underexpressed (miR-142-3p, miR-140-5p, miR-204).

When analyzing SN of this miRNA signature according to the UCC risk groups, we found a slightly lower SN in low risk NMIBC maintaining the specificity at 86.51% in all three groups (13 out of 23 misclassified samples correspond to low risk NMIBC). Internal cross-validation analysis of our six miRNA diagnosis model allow us to accurately diagnose UCC patients with a mean (\pm standard error) sensitivity, specificity and AUC of 85.01 ± 0.032 , 87.15 ± 0.030 and 0.923 ± 0.011 , respectively, in the training set. These results were confirmed in the testing set with mean (\pm standard error) values of 83.74 ± 0.057 , 87.64 ± 0.043 and 0.91 ± 0.024 , respectively.

Regarding the prediction of tumor aggressiveness, a two miRNA gene expression signature composed of miR-92a and miR-125b was developed (Fig. 4). These two miRNAs provided significant accuracy in discriminating LG from HG tumor urine samples (AUC = 0.83; 95%CI, 0.75–0.90; SN of 84.94%; SP of 74.14%). miR-92a was overexpressed in HG tumors while miR-125b was underexpressed. After cross-

validation, our two miRNA prognostic model allows us to accurately identify HG patients with a mean (\pm standard error) sensitivity, specificity and AUC of 80 ± 0.063 , 81.3 ± 0.068 and 0.83 ± 0.028 , respectively, in the training set and 82.7 ± 0.076 , 81 ± 0.102 and 0.822 ± 0.061 , respectively in the testing set.

DISCUSSION

Finding a non-invasive reliable biomarker for UCC would be very useful in clinical practice. Several prior studies have described tests of potential clinical value using urine samples, but even though most of them achieve the sensitivity of the current gold standard, the latter continues to be more specific.^{3,4} We have also previously described a urine-based gene expression signature for the assessment of UCC.^{5,6} The current study was designed to describe the global miRNA expression profile of UCC urine samples and to determine whether using a similar approach, we could identify a miRNA expression signature that yields reproducible results across different transcriptional platforms, comprising a modest number of miRNAs and providing high diagnostic and prognostic accuracy.

miRNA expression signatures have some methodological advantages over mRNA expression signatures, especially regarding to their application in the clinical setting. First, it is harder to obtain high quality long-chain mRNA from urine samples due to the high concentrations of RNases in urine leading to RNA degradation. Contrary, short mature miRNAs are more stable against nuclease degradation due to their smaller size²¹ and actually, the isolation of high quality miRNA from a wide range of cell or tissue sources, including urine and other body fluids, has already been reported.²⁶

Even though there are few studies in the literature that have evaluated the urine levels of miRNAs in UCC patients and their diagnostic potential,^{21–25} to our knowledge this is the first time that global complete miRNA profiling of urine samples from UCC patients is examined. We identified a list of 40 miRNAs differentially expressed between tumors and control urines, and interestingly, some of the dysregulated urine miRNAs found in this study were previously reported by other authors who investigated miRNA expression in urines from UCC patients (*e.g.* miR-126, miR-182, miR-183 and miR-100).^{21,22,25} In addition, some of the miRNAs of our list had been previously identified as aberrantly expressed in bladder cancer tissue samples (*e.g.* miR-182, miR-183 miRNA-143, miR-125b, miR-145, miR-29a)^{15,17,18,24} confirming that the urine miRNA expression pattern reflects, at least partially, tissue miRNA expression profiles.³⁸ It has to be taken into account that urine contains different cell types (including renal tubular cells, lymphocytes, red blood cells, normal urothelial cells, tumor cells, *etc.*) and the proportion of tumor cells in each subject is different. Thus, the fact that some of the differentially expressed urine miRNAs found in our study overlaps with those found in previous studies using tissue specimens reinforce the strength of our findings and

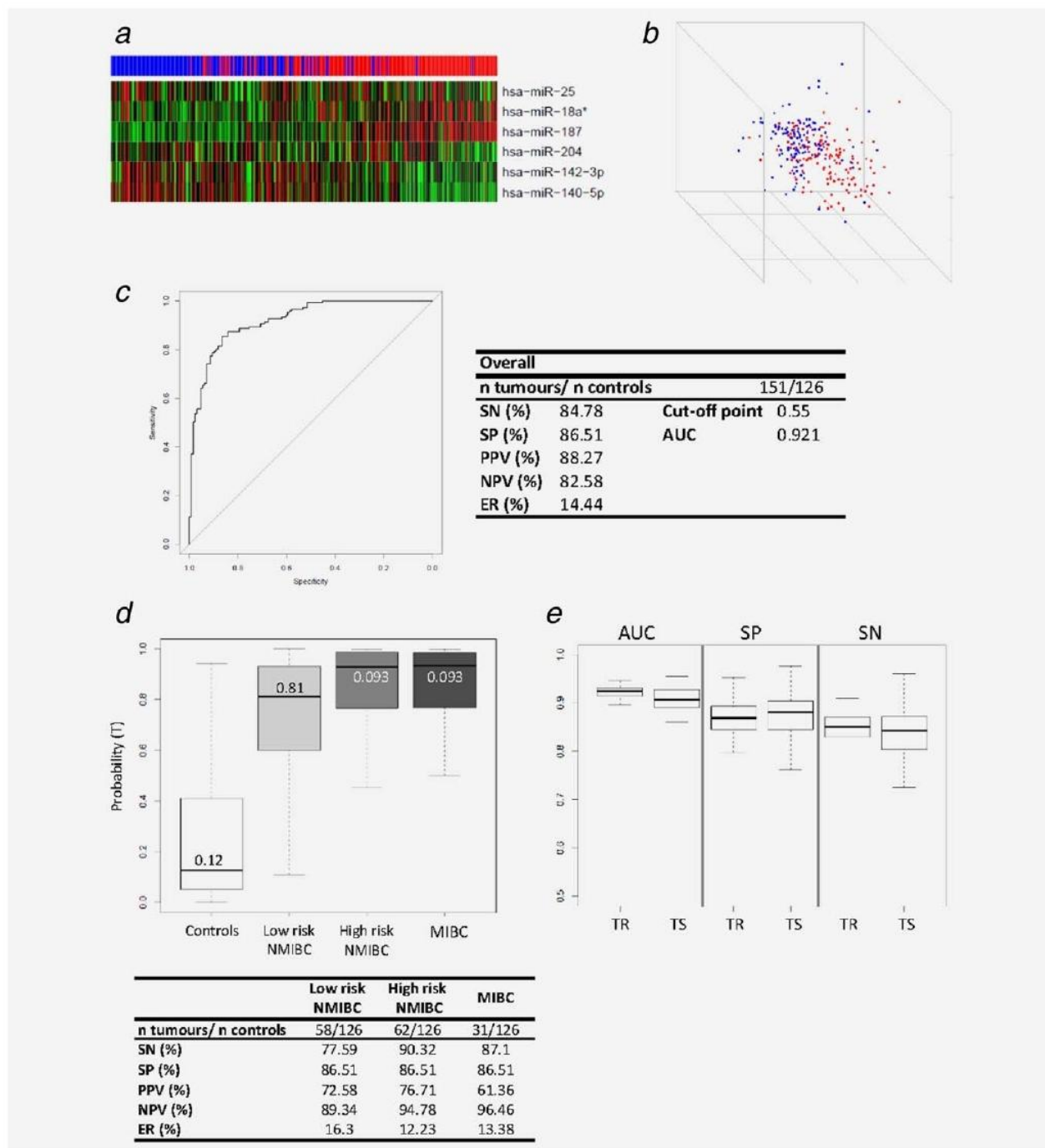


Figure 3. Diagnostic performance of the six miRNA expression signature. (a) Heat map representation of the six miRNA model for bladder cancer diagnosis in the 227 samples examined in the discovery phase. The bar graph indicates the control (blue) and tumor (red) urine samples. Samples are ordered from the right to the left according to their lower to higher probability of being a tumor. (b) Multidimensional scaling plot of control (blue) and tumor (red) urine samples according to the expression of the six miRNA model. Distances between samples plotted in the three-dimensional graph are proportional to their dissimilarities in miRNA expression. (c) ROC curve for the six miRNA expression signature and overall diagnostic performance of the model. (d) Probabilistic sensitivity analysis of the six miRNA signature in the different UCC risk groups. Boxplots represent the distribution of the probability for each risk group of being a tumor. The table shows diagnostic performance of the model for each phenotype. (e) Box plot representation of AUC, SN and SP values of the six miRNA panel in the training and testing sets from the internal cross-validation. SN = sensitivity; SP = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; ER = overall error rate; AUC = area under curve; TR = training group; TS = testing group. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

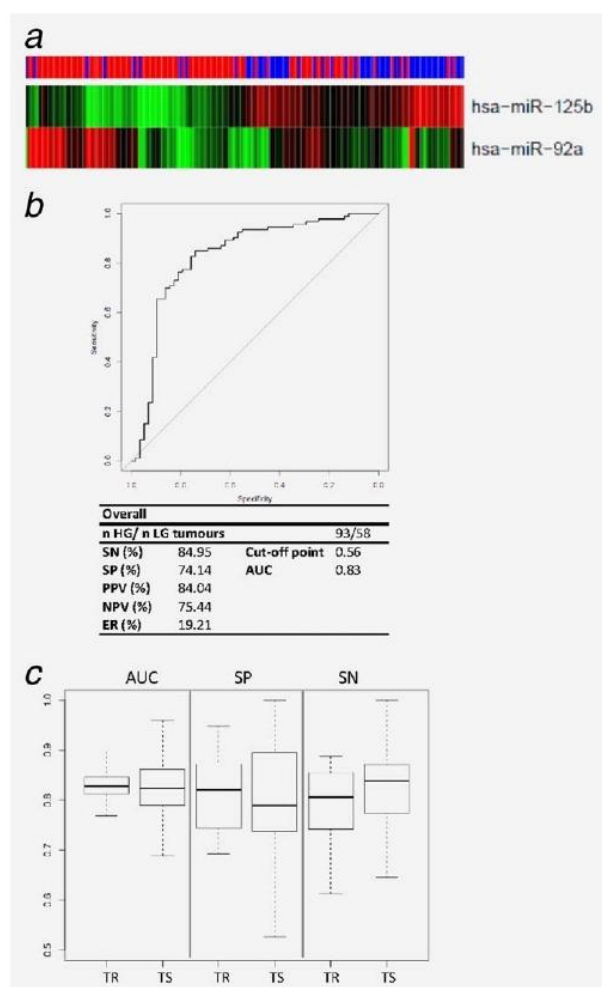


Figure 4. Prognostic performance of the two miRNA expression signature. (a) Heat map representation of the two miRNA expression signature for UCC prognosis in the 151 UCC urine samples of the validation set. The graph bar indicates LG (blue) and HG (red) tumor samples. Samples are ordered from the right to the left according to their lower to higher probability of being a HG tumor. (b) ROC curve for the two miRNA expression signature and prognostic performance of the model. (c) Box plot representation of AUC, SN and SP values of the two miRNA panel in the training and testing sets from the internal cross-validation. SN = sensitivity; SP = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; ER = overall error rate; AUC = area under curve. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

supports the use of urine miRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers.

To give robustness to the study and being aware that the preliminary cDNA preamplification step performed on urine RNA could significantly distort relative miRNA levels, we deemed it necessary to technically validate the data using a different approach. A high correlation was found for the 32 miRNAs tested with both platforms used ($r = 0.75$), indicating that the whole TaqMan Array procedure reported is a

robust and reproducible approach for miRNA profiling purposes.

To further confirm the reliability of the deregulated urine miRNAs found in this study, we have searched for potential mRNA targets of these dysregulated miRNAs in the well-established two-pathway model associated with different types of bladder cancer development. Abnormal activation of the *FGFR3* by means of either mutations or over-expression is found in approximately 80% of LG NMIBC.^{39,40} This gene and several other growth factor receptors participate in the activation of the RAS kinase signaling pathway which leads to the increased cell proliferation, motility and cancer transformation through hyperplasia of normal urothelium. Some of the dysregulated miRNAs of our list, including miR-29a/b, miR-143, miR-145, miR-182 or miR-183 are predicted *in silico* to target the *FGFR* pathway. More interestingly, some of the altered urine miRNA found specifically in the NMIBC phenotype such as miR-29a/b, miR-101, miR-100, miR-99a, miR-143, miR-145 or miR-182 are also predicted to target genes of the *FGFR* pathway.⁴¹ Indeed, regulation of *FGFR* by miR-99a and miR-100 has been experimentally validated.¹⁶ Other studies demonstrate that induced transcription of miR-143 in bladder cancer cells lines led to decreased expression of RAS.^{42–44} On the other hand, the other major pathway altered in UCC mainly contains mutations in the *TP53*. These mutations are characteristic of MIBC. So far there is no validated experimental data available on the role of differentially regulated miRNA on the regulation of the p53 pathway. However, several miRNAs frequently found to be aberrantly expressed in UCC were bioinformatically predicted to target p53 directly or some of its regulators.⁴¹ Examples of this in our list of dysregulated miRNAs include miR-125b and miR-143 that are predicted to target p53 directly. Taken together, our study confirms, using UCC urines, that miRNAs are altered in a tumor phenotype-specific manner^{16,19} and identifies miRNAs that may be used as diagnostic, prognostic and therapeutic targets.

One of the goals of this study is to identify a reduced set of miRNAs in urine samples that provides information on the diagnosis and aggressiveness of the UCC and that can be used in the clinical routine. To this end, we selected 22 key miRNAs from our TaqMan array experiments, to validate them in an independent cohort. The quantification of these selected key miRNAs resulted in the identification of a six miRNA diagnostic signature with a remarkable accuracy in discriminating UCC from control samples. Of note, this performance is maintained in the cross-validation. This overall accuracy should be considered relevant since cystoscopy, as the gold standard, provides an overall diagnostic sensitivity of 91%,¹ while remaining invasive and relatively expensive for UCC surveillance. Urinary cytology in turn, though not invasive, provides overall diagnostic accuracies in the range of 11 to 76% while failing in low grade tumors.² Although there are few studies in the literature that have evaluated the urinary levels of miRNAs as a non-invasive diagnostic tool

for UCC, the diagnostic accuracy of our miRNA signature outperforms all of them (Supporting Information Table 3S). It is most likely that the specific selection of aberrantly expressed miRNAs in urine samples, rather than from lists of dysregulated miRNAs in solid UCC, as well as the combination of several miRNAs in a model, the large number of samples analyzed, the use of different methodological platforms for miRNA analysis and the identification of suitable miRNA normalizers could account for this increased performance.

Since low risk NMIBC have similar miRNA expression profiles to control urines (Fig. 2a) and the diagnostic sensitivity for many UCC urine markers decreases in this subset of patients,^{6,45,46} we conducted a biased selection of miRNA markers to gain accuracy in this subgroup of tumors. Although slightly lower than in high risk UCC group, the accurate results of our six miRNA signature in low risk NMIBC group makes its future implementation in clinical practice very desirable.

Several possible pathways were predicted to be modified by the six miRNAs comprising our diagnostic signature including adherens junction, MAPK signaling pathway, mTOR signaling pathway, ECM-receptor interaction or calcium signaling, Notch signaling pathway and other cancer-related pathways (Supporting Information Table 4S). Interestingly, some of these predicted pathways have been previously associated with bladder cancer in tissue transcriptomic studies. Li *et al.*,⁴⁷ similar to our results, reported alterations in pathways including the MAPK signaling pathway, ECM-receptor interaction or calcium signaling pathway. Moreover, our study indicates the presence of an alteration of several cancer-related pathways.

In addition to the diagnostic utility of miRNA expression in urine samples, our study suggests a potential role of miRNA in predicting disease aggressiveness. This is in concordance with the already reported role of miRNAs promoting an aggressive tumor phenotype by changing the expression of their mRNA targets.¹⁸ Our prognostic model contains a strikingly small number of miRNA capable of discriminating between HG and LG tumors using urine samples. This data could have an important clinical impact, since the knowledge of the malignant potential of the tumor at the time of diagnosis may improve current treatment schedules

of UCC patients, prioritizing high risk patients for urgent cystoscopy or TUR or delaying or prolonging the interval between examinations in low risk patients.

We acknowledge that our study has several limitations. First, a direct comparison of our results with urine cytology in the same cohort would have been of great interest. However, we do not have cytology results for all the patients and controls, and only an incomplete comparison could be performed. Next, banked urine samples were analyzed, so we cannot calculate the rate of experiment failure due to low quality/quantity of miRNA extracted. However, our experience is that the failure rate is around 10%. It could be also argued that grade is a weak prognostic factor of tumor aggressiveness. Nevertheless, we consider that is the best for a study with short follow-up, especially for NMIBC patients, keeping in mind that mortality for LG tumors is almost negligible, accumulating all the mortality in HG tumors. Lastly, our results must be externally validated in a large cohort and correlated with long-term patient outcome.

Overall, we report here the first global urine miRNA profiling study of UCC patients and provide a list of dysregulated miRNAs that are candidate clinical biomarkers in the assessment of UCC. Furthermore, we describe miRNA panels consisting of a modest number of miRNAs that provide high UCC diagnostic and prognostic accuracy. Although future studies are needed to validate this data in a proper clinical trial, our findings open the door to the possibility of implementing an accurate reliable system for the non-invasive assessment of UCC in clinical routine.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Urological Association (FIU 2009 to L.M.), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI10/01145 to A.A.) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Unión Europea. Una manera de hacer Europa. M.I.-T. has a Research Support Staff Grant from Instituto de Salud Carlos III (CA07/00221) and C.G. has a fellowship from IDIBAPS (PhD student grant 2007-10 to C.G.). 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 Helena Kruyer for the English correction of the article.

References

- Grossman HB, Soloway M, Messing E, et al. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2006;295:299-305.
- Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66:35-63.
- van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005;47:736-48.
- Bassi P, De Marco V, De Lisa A, et al. Non-invasive diagnostic tests for bladder cancer: a review of the literature. *Urol Int* 2005;75:193-200.
- Mengual L, Burset M, Ars E, et al. DNA microarray expression profiling of bladder cancer allows identification of noninvasive diagnostic markers. *J Urol* 2009;182:741-8.
- Mengual L, Burset M, Ribal MJ, et al. Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:2624-33.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793-801.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9:189-98.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007;297:1901-8.
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008;299:425-36.
- Liu N, Chen NY, Cui RX, et al. Prognostic value of a microRNA signature in nasopharyngeal carcinoma: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2012;13:633-41.
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-8.

13. Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol* 2011;59: 671–81.
14. Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, et al. MicroRNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007;25:387–92.
15. Han Y, Chen J, Zhao X, et al. MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2011;6: e18286.
16. Catto JW, Miah S, Owen HC, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res* 2009;69: 8472–81.
17. Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer* 2009;125:345–52.
18. Dyrskjot L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res* 2009;69:4851–60.
19. Veerla S, Lindgren D, Kvist A, et al. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int J Cancer* 2009;124:2236–42.
20. Zabolotneva AA, Zhavoronkov A, Garazha AV, et al. Characteristic patterns of microRNA expression in human bladder cancer. *Front Genet* 2012;3:310.
21. Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010;28:655–61.
22. 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;102:522–9.
23. Wang G, Chan ES, Kwan BC, et al. Expression of microRNAs in the Urine of Patients With Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2012;10: 106–13.
24. Puerta-Gil P, Garcia-Baquero R, Jia AY, et al. miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Am J Pathol* 2012; 180:1808–15.
25. Miah S, Dudzic E, Drayton RM, et al. An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer. *Br J Cancer* 2012; 107:123–8.
26. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010;56:1733–41.
27. Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, et al. Tumours of the urinary system. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, et al., editors. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: World Health Organization Classification of Tumours, 2004. 89–157.
28. Sobin LH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumours. international union against cancer, 6 edn. New York: John Wiley & Sons, 2002.
29. Mengual L, Buset M, Marin-Aguilera M, et al. Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays. *BMC Res Notes* 2008;1:21.
30. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
31. 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.
32. Vandensompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3: RESEARCH0034.
33. Culhane AC, Thioulouse J, Perriere G, et al. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics* 2005;21: 2789–90.
34. Hastie TJ, Pregibon D. Generalized linear models. In: Chambers JM, Hastie TJ, editors. Statistical Models in S. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, 1992.
35. Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011;12:77.
36. Johansen KK, Wang L, Aasly JO, et al. Metabolomic profiling in LRRK2-related Parkinson's disease. *PLoS One* 2009;4:e7551.
37. Papadopoulos GL, Alexiou P, Maragkakis M, et al. DIANA-mirPath: integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics* 2009;25:1991–3.
38. Mengual L, Buset M, Ars E, et al. Partially degraded RNA from bladder washing is a suitable sample for studying gene expression profiles in bladder cancer. *Eur Urol* 2006;50:1347–56.
39. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999;23:18–20.
40. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001; 158:1955–9.
41. Fendler A, Stephan C, Yousef GM, et al. MicroRNAs as regulators of signal transduction in urological tumors. *Clin Chem* 2011;57:954–68.
42. Lin T, Dong W, Huang J, et al. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J Urol* 2009;181:1372–80.
43. Kent OA, Chivukula RR, Mullendore M, et al. Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Dev* 2010;24: 2754–9.
44. Noguchi S, Yasui Y, Iwasaki J, et al. Replacement treatment with microRNA-143 and -145 induces synergistic inhibition of the growth of human bladder cancer cells by regulating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Cancer Lett* 2013;328: 353–61.
45. Marin-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, et al. Utility of a multiprobe fluorescence in situ hybridization assay in the detection of superficial urothelial bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;173:131–5.
46. Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock R, et al. Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2008; 14:742–9.
47. Li X, Chen J, Hu X, et al. Comparative mRNA and microRNA expression profiling of three genitourinary cancers reveals common hallmarks and cancer-specific molecular events. *PLoS One* 2011;6:e22570.

TRABAJO 4

MicroRNAs EN LAS CÉLULAS DE LA ORINA COMO MARCADORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO INVASIVO

Oncotarget. 2017 Feb 14 ;8(11):18238-18247

PMID: 28212556

MicroRNAs EN LAS CÉLULAS DE LA ORINA COMO MARCADORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO INVASIVO

Introducción: Las herramientas de pronóstico actuales para el cáncer de vejiga no-músculo-invasivo (NMIBC) no permiten discriminar y predecir el riesgo de progresión tumoral. El objetivo de este estudio es identificar, en células de la orina, los microRNA que puedan ser útiles como biomarcadores predictivos de progresión tumoral en pacientes con NMIBC.

Metodología: Se incluyeron en el estudio 210 muestras de orina de pacientes con NMIBC. Se cuantificó y analizó la expresión de 8 microRNAs, previamente descritos por nuestro grupo, mediante PCR cuantitativa en el RNA extraído de dichas muestras de orina. Se desarrolló un modelo de predicción de la progresión tumoral mediante el análisis de regresión Cox y se validó mediante un método de remuestreo (*bootstrapping*).

Resultados: Los microRNAs miR-140-5p y miR-92a-3p fueron identificados, mediante análisis de regresión, como marcadores independientes de progresión tumoral. La puntuación de riesgo derivada del modelo que contiene estos dos microRNAs fue capaz de discriminar entre dos grupos de pacientes con una diferente probabilidad de progresión tumoral (HR 5.204; $p < 0.001$), que se mantuvo cuando los pacientes se estratificaron según su riesgo tumoral. El algoritmo también fue capaz de discriminar dos grupos con diferente probabilidad de supervivencia cáncer específica (HR 3.879; $p = 0.021$).

Conclusiones: Aunque los datos deben ser validados externamente, el análisis de microRNAs en orina parece ser una herramienta de pronóstico valiosa en pacientes con cáncer de vejiga no músculo invasivo.

Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for non-muscle invasive bladder cancer

Mercedes Ingelmo-Torres¹, Juan José Lozano², Laura Izquierdo¹, Albert Carrion¹, Meritxell Costa¹, Lidia Gómez¹, María José Ribal¹, Antonio Alcaraz¹, Lourdes Mengual¹

¹Laboratory and Department of Urology, Hospital Clínic de Barcelona, Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²CIBERehd, Plataforma de Bioinformàtica, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence to: Lourdes Mengual, **email:** lmengual@clinic.ub.es

Keywords: biomarkers, bladder cancer, microRNA, tumour progression, urine

Received: October 11, 2016

Accepted: November 30, 2016

Published: February 14, 2017

ABSTRACT

Current prognostic tools for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) do not have enough discriminative capacity to predict the risk of tumour progression. This study aimed to identify urinary cell microRNAs that may be useful as non-invasive predictive biomarkers of tumour progression in NMIBC patients. To this end, 210 urine samples from NMIBC patients were included in the study. RNA was extracted from urinary cells and expression of 8 microRNAs, previously described by our group, was analysed by quantitative PCR. A tumour progression predicting model was developed by Cox regression analysis and validated by bootstrapping. Regression analysis identified miR-140-5p and miR-92a-3p as independent predictors of tumour progression. The risk score derived from the model containing these two microRNAs was able to discriminate between two groups with a highly significant different probability of tumour progression (HR, 5.204; $p < 0.001$) which was maintained when patients were stratified according to tumour risk. The algorithm was also able to identify two groups with different cancer-specific survival (HR, 3.879; $p = 0.021$). Although the data needs to be externally validated, miRNA analysis in urine appears to be a valuable prognostic tool in NMIBC patients.

INTRODUCTION

Non-muscle invasive bladder cancers (NMIBC) have a 1- and 5-year disease-progression rate of up to 17% and 45%, respectively [1]. The current most important clinical prognosticators in NMIBC patients, according to the EORTC risk tables, are stage T1, high grade (HG) and presence of concomitant carcinoma *in situ* (CIS) [2]. Nevertheless, these prognostic factors do not have sufficient discriminative capacity to predict, at the patient level, the risk of tumour progression. Progressive patients deserve careful attention, particularly because therapeutic decisions change when patients are likely to progress. Many efforts have been made to develop biomarkers for assessing aggressiveness and for predicting the prognosis of NMIBC patients (reviewed in [3]), but to date none of the identified biomarkers is being used in the clinical

setting due to their limited value. Thus, there is a clear need for accurate and reliable predictive biomarkers that can distinguish progressive from non-progressive NMIBC.

In recent years it has become apparent that gene expression is controlled post-transcriptionally by microRNAs (miRNAs), short (21–23 nt) non-coding RNAs which bind to specific mRNAs. Experimental work has shown that miRNAs are dysregulated in most cancer types, including bladder cancer (BC) [4–7], and have demonstrated significant diagnostic and prognostic values in different malignancies [8–11]. In the case of BC, the assessment of the levels of these aberrantly expressed miRNAs in urine samples appears to be a promising approach to identify diagnostic and prognostic biomarkers in a non-invasive way. Urine is a particular source of such biomarkers since tumour cells are in direct contact with it, it is collected noninvasively and miRNA have shown

high stability and easy detectability in urine [12]. Using a case-control design, we have shown that urinary miRNA profiles vary significantly between urines from control and BC patients and between high and low grade tumours [13]. Since we have previously found a urinary miRNA signature representative of tumour aggressiveness, we decided to explore the hypothesis that urinary miRNAs may be useful as predictive biomarkers of progression in NMIBC patients. We thus compared the urinary miRNA profiles from individuals with NMIBC who progressed with those who did not progress. Subsequently, we developed a prognostic urinary miRNA signature that was further internally cross-validated.

RESULTS

Characteristics of the dataset

A total of 210 consecutive urinary samples from BC patients with NMIBC subjected to transurethral resection of the bladder (TURB) were included (Table 1). Overall, 22 (11%) patients developed tumour progression and 42 patients (20%) died, 10 of them (5%) due to BC, after a mean follow up of 47 months. The mean time to tumour progression and cancer-specific survival was 19 and 23 months, respectively.

The clinical classifiers for progression, stage, grade, presence of CIS, multiplicity and tumour size were analysed in both progressive and non-progressive patients. Stage T1 and HG tumours were identified in 44% and 54% of non-progressive and in 41% and 68% of progressive patients, respectively. Concomitant CIS was found in 18% of progressive and non-progressive patients. Multiplicity was found in 22% and 68% of non-progressive and progressive patients, respectively. A tumour diameter of > 3 cm was found in 34 out of 188 (18%) non-progressive and 6 out of 22 (27%) progressive patients. Recurrent tumours were identified in 59% of progressive and 49% of non-progressive patients.

Association of miRNA expression and clinical features with progression of NMIBC patients

Among the eight previously reported miRNA [13] tested in the present work, miR-187-3p and miR-25-3p were excluded from further analyses because expression data was not available in >30% of samples (insufficient cDNA was available to perform all qPCR reactions). Supplementary Table 1 shows the fold change differences of the miRNAs between the groups and in relation to the previous study on these miRNAs. Univariate Cox regression analysis including clinical covariates and urinary expression levels of miRNAs identified miR-140-5p, miR-142-3p, miR-18a-3p and miR-92a-3p as predictors of tumour progression (Table 2). Of note, none of the clinical covariates were significantly associated with

progression in our cohort of NMIBC. After including the above-mentioned miRNAs in the multivariate stepwise regression analysis, urinary expression of miR-140-5p and miR-92a-3p were found as independent prognostic factors of tumour progression (Table 3).

Development of a miRNA-based prognostic classifier for NMIBC patients

A 2-miRNA prognostic classifier was developed by combining miR-140-5p and miR-92a-3p expression values. A risk score (RS) for tumour progression was calculated for each patient according to a mathematical algorithm containing miR-140-5p and miR-92a-3p expression values. The median value of this RS was -0.206 (range -1.469 to 1.621). Thereafter, a receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis of the model (Figure 1) allowed the selection of a cut-off value of 1.62 to classify patients into a high-risk group for tumour progression (20%) and low-risk group for tumour progression (80%) with an accuracy of 81% (55% sensitivity and 84% specificity). Figure 2 depicts Kaplan-Meier curves generated using the selected cut-off point. As shown, RS generated using miRNA expression values was able to discriminate between two groups of NMIBC patients with a highly significant different probability of tumour progression (HR, 5.21; 95%CI, 2.24-12.06; $p=0.0001$) (Figure 2A). It is important to point out that when patients were stratified according to BC risk groups, the RS continued to discriminate two subgroups of different probability of progression (non-high-risk NMIBC group: HR, 9.59; 95%CI, 1.84-50.09, $p=0.007$ and high-risk NMIBC group: HR, 3.92; 95%CI, 1.42-10.81, $p=0.008$) (Figure 3). Moreover, although it did not constitute a primary outcome, accuracy of the RS was also evaluated regarding the probability of being a predictor of cancer-specific survival. Using the same cut-off point, the algorithm was also able to distinguish between two groups with significantly different probabilities of cancer-specific survival (HR 3.88; 95%CI, 1.12-13.44, $p=0.033$) (Figure 2B).

Finally, robustness of the mathematical model was evaluated by bootstrapping with 1,000 resamples, obtaining a C-index after bootstrapping of 0.7306723.

Target prediction and functional enrichment of the two miRNA signature

The DIANA-miRPath miRNA analysis, by using the 2 miRNAs of the model, showed several statistically significant predicted KEGG terms related to cell cycle, TGF- β signalling pathway, MAPK signalling pathway, Wnt signalling pathway, p53 signalling pathway, and pathways in cancer among others. Consistently, when analysing the data by the gene intersection and union mode, with the two miRNAs targeting the same gene,

Table 1: Clinicohistopathologic features of the bladder cancer patients

VARIABLES	
Gender_N (%)	
Male	157 (75)
Female	53 (25)
Age_years	
Mean	71
Range	37-94
Tumour stage and grade_N (%)¹	
Tis	15 (7)
Ta LG	77 (37)
Ta LG+CIS	1
Ta HG	22 (10)
Ta HG+CIS	3 (1)
T1 LG	1
T1 LG+CIS	15 (7)
T1 HG	59 (28)
T1 HG+CIS	17 (8)
Tumour focality_N (%)	
Unifocal	108 (51)
Multifocal	102 (49)
Tumour diameter (%)	
≤3 cm	170 (81)
>3 cm	40 (19)
Prior recurrence (%)	
Primary tumours	104 (50)
Recurrent tumours	106 (50)
BCG treatment (%)	
	98 (47)
TOTAL	210

¹The grade and stage of the tumours were determined according to WHO criteria [38] and TNM classification [39], respectively.

Abbreviations: CIS or Tis, Carcinoma *in situ*; LG, Low grade; HG, High grade; BCG, Bacillus Calmette-Guerin

common terms appear to be significantly enriched such as the p53 signalling pathway, TGF- β signalling pathway, cell cycle, and pathways in cancer (Figure 4 and Supplementary Figure 1).

DISCUSSION

Prediction of disease progression for patients diagnosed with NMIBC is an important clinical challenge. The most important clinical classifiers for progression

currently used, stage T1, HG and presence of CIS [2] where unable to predict progression in our cohort of patients. Neither, the less distinctive clinical prognostic classifiers; recurrence, multiplicity and tumour size, could distinguish progressive from non-progressive patients. One explanation could be that the vast majority of our cohort corresponds to HG NMIBC tumours. This fact could minimize the impact of clinicopathological features on predicting progression, and precisely confirms the critical need for new objective methods to identify

Table 2: Univariate analysis of predictors of tumour progression

Variable	Cut-off level/ categories	HR	95% CI	P value
Tumour focality	uni vs. multifocal	2.25	0.92-5.52	0.0768
Tumour size	≤3 cm vs. >3 cm	1.69	0.66-4.33	0.2718
BCG treatment	no vs yes	1.29	0.56-2.98	0.5546
Stage ¹	Ta vs. T1	1.06	0.72-1.56	0.7738
Grade ¹	LG vs. HG	1.85	0.75-4.54	0.1792
Concomitant CIS	without CIS vs. CIS	1	0.34-2.95	0.9974
miR-140-5p	-4.4	2.89	1.13-7.39	0.0267*
miR-142-3p	1.01	3.09	1.26-7.6	0.0139*
miR-18a-3p	-7.02	4.40	1.72-11.29	0.0020*
miR-92a-3p	-0.555	5.35	1.81-15.53	0.0025*
miR-125b-5p	-1.74	0.60	0.23-1.53	0.2813
miR-204-5p	-5.15	0.93	0.39-2.21	0.8612

Results of dichotomous clinical variables are expressed considering category placed in second term as the reference category

¹The grade and stage of the tumours were determined according to WHO criteria [38] and TNM classification [39], respectively.

*Statistically significant

Abbreviations: CIS, Carcinoma *in situ*; LG, Low grade; HG, High grade; BCG, Bacillus Calmette-Guerin; HR, hazard ratio; 95%CI, confidence interval.

Table 3: Independent predictors of tumour progression resulting from multivariate stepwise Cox regression analysis

Variable	HR	95% CI	P value
miR-140-5p	3.53	1.38-9.06	0.0086*
miR-92a-3p	6.21	2.09-18.45	0.0010*

Abbreviations: HR, hazard ratio; 95%CI, confidence interval.

*Statistically significant

those NMIBC patients that are likely to progress. Here, we show that a 2-miRNA urinary signature is able to identify a subgroup of NMIBC patients with high-risk of progression, thus providing additional risk stratification beyond clinicopathological prognosticators.

We and others have previously provided evidence that urinary miRNAs can be used as non-invasive diagnostic biomarkers for BC patients [13–17]. Cell-free urine and serum have also been used as a source of non-invasive diagnostic and prognostic biomarkers of BC [18–20], but as far as we could ascertain, this is the first study that has evaluated urinary cell miRNAs as prognostic biomarkers of BC. The results of this study demonstrate that expression of miR-140-5p and miR-92a-3p in urinary cells independently predicts tumour progression in NMIBC patients. This miRNA signature provides an easy-to-use and reliable algorithm to identify a subgroup of patients with a higher

probability of tumour progression and shorter cancer specific survival. An accurate estimation of the progression risk would help to identify the most appropriate therapy for each individual patient. For instance, patients at high risk of progression could benefit from re-TURB, adjuvant therapies, more aggressive treatments or more intensive surveillance. In addition, the 2-miRNA model maintains its prognostic ability when NMIBC patients are stratified according to their clinicopathological risk group, thus reinforcing the validity of our model. Of special interest is the predictive value of the model for progression in the subset of non-high risk NMIBC that are supposed to have low-intermediate risk of progression. Identification of those non-high risk NMIBC patients which are more likely to progress may help to change current treatment schedules for this particular subset of NMIBC patients, intensifying their surveillance schedule.

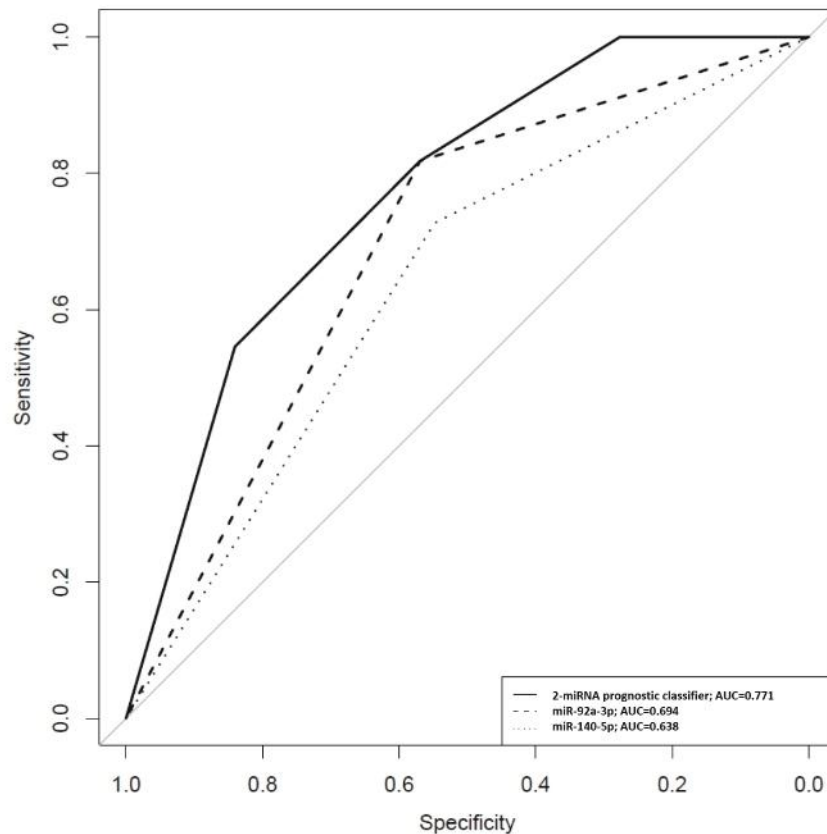


Figure 1: ROC curves for miR-140-5p, miR-92a-3p and the 2-miRNA prognostic classifier based on results obtained by quantitative PCR in urinary samples of NMIBC patients. A RS for tumour progression was calculated for each patient according to a mathematical algorithm containing miR-140-5p and miR-92a-3p expression values as described in Patients and methods section. In this equation, miR-140-5p and miR-92a-3p were introduced as dichotomous variables (miR-140-5p expression $\geq -4.4=1$; $< -4.4=0$ and miR-92a-3p expression $\geq -0.555=1$; $< -0.555=0$). At fixed sensitivity of 80%, specificity for miR-140-5p and miR-92a-3p individually and combined in the 2-miRNA classifier was 32%, 38% and 59%, respectively.

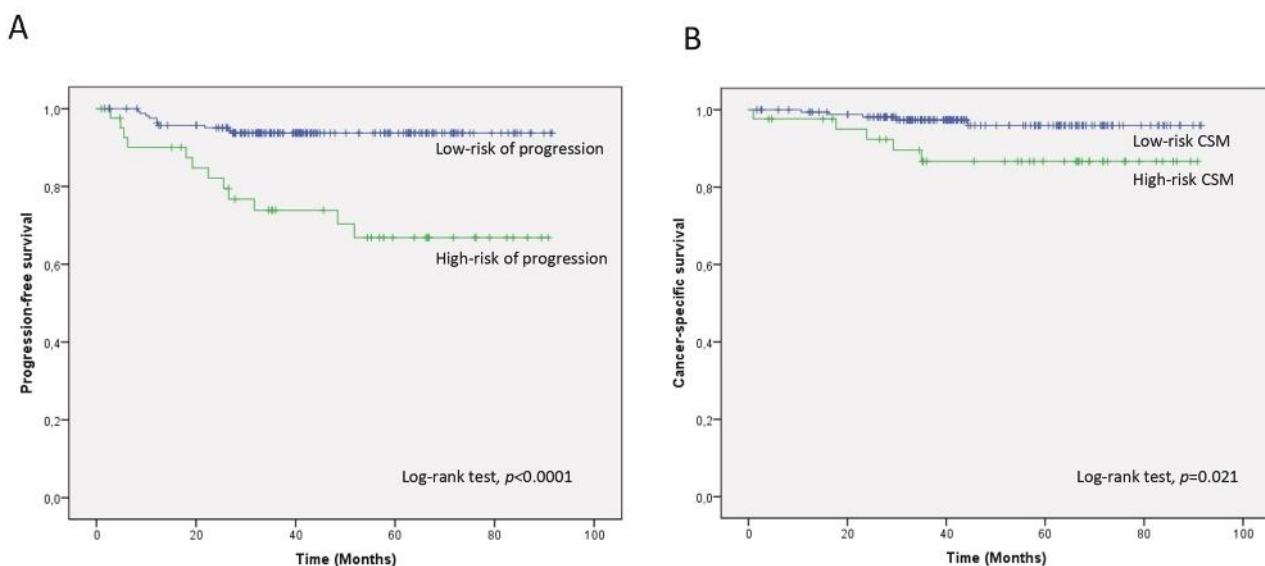
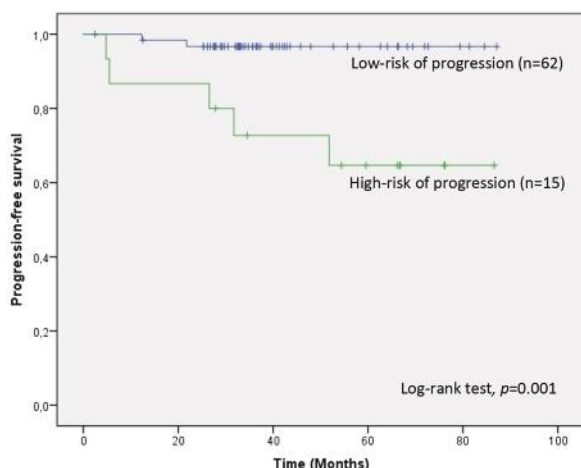


Figure 2: Kaplan-Meier curves for the two-miRNA prognostic classifier showing, A. time to progression and **B.** time to cancer-specific survival for low-risk ($RS < 1.62$; $n=168$) and high-risk ($RS > 1.62$; $n=42$) groups of NMIBC patients. CSM; cancer-specific mortality.

A. Non high-risk NMIBC clinicopathological group



B. High-risk NMIBC clinicopathological group

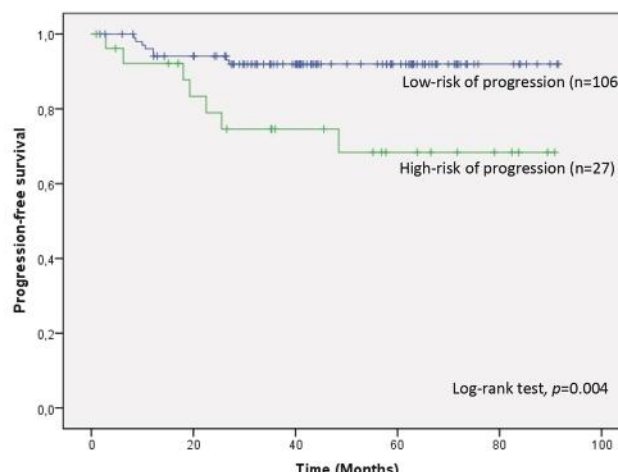


Figure 3: Kaplan-Meier curves for the two-miRNA prognostic classifier showing time to progression in clinicopathological groups of risk. A. non high-risk NMIBC (n=77) and B. high-risk NMIBC (n=133) patients. Patients were divided within each clinicopathological NMIBC risk group according to their RS (RS<1.62, low-risk of progression; RS>1.62, high-risk of progression).

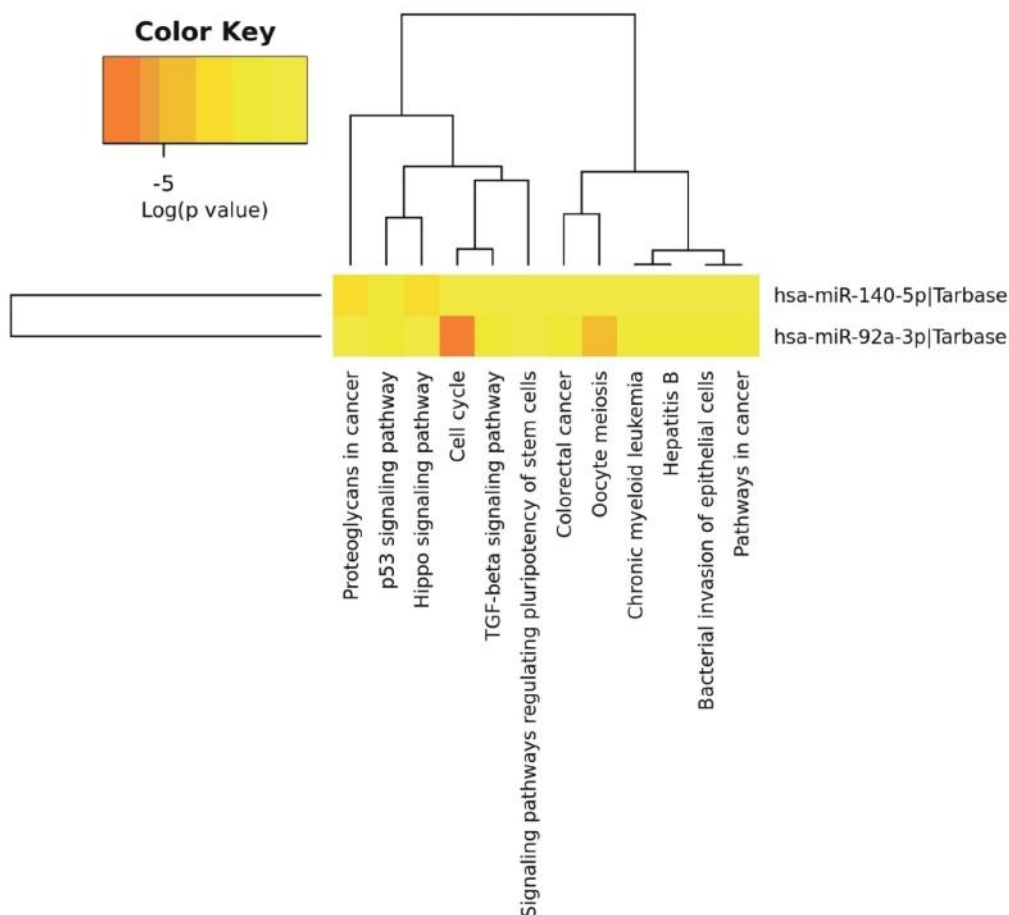


Figure 4: Heatmap of the KEGG pathways enriched in two miRNA target genes. Heatmap from intersection of targeted genes (genes targeted by the two miRNAs from the model) is shown. The two miRNAs are involved in multiple common pathways, especially in cancer-specific pathways (DIANA-miRpath computes \log_{10} P-values).

Regarding the genetic markers included in our algorithm, miR-140-5p has been previously suggested to inhibit the expression of TGF- β and MAPK/ERK signalling pathways in several malignancies [21–25]. In addition, a recent publication reveals that overexpression of miR-140-5p has an inhibitory effect on BC by downregulating the expression of the oncogenic isoform $\Delta Np63$ of *TP63* [26], a key gene localized in region 3q28 associated with BC risk [27]. In agreement with this data, we previously found a statistically significant downregulation of miR-140-5p in urinary cells from BC patients as well as in high grade BC tumours [13], although this statistically significant downregulation is not seen in the present cohort of NMIBC progressive patients. It is most likely that the different cell types and the variable proportion of tumour cells in the urine of each subject accounts for this lack of statistically significant differences.

Aberrations in miR-92a-3p expression have been previously reported in many cancers [28–30], but to our knowledge, this is the first time miR-92a-3p has been associated with BC. In recent studies, it was observed that overexpression of miR-92a-3p can disrupt PI3K/Akt/mTOR pathway by targeting two negative regulatory factors of this pathway, *PTEN* and *PHLPP* [29, 31]. Different studies have reported that overexpression of miR-92a-3p is involved in the development of metastasis and correlates with survival in different malignancies [32–34]. Our study shows that miR-92a-3p is significantly overexpressed in urinary cells of NMIBC progressing patients which is in concordance with its role as oncomiR.

KEGG pathway analysis corroborates that the 2-miRNA signature is biologically meaningful. It shows that the target genes of the two miRNA take part in many important signalling pathways such as cancer pathways, cell cycle, TGF- β pathway and p53 signalling pathway, among others. Moreover, it has been reported that several of the genes targeted by our miRNAs (e.g. *TP63*, *PTEN*) [35, 36] play a role in the genetic pathogenesis of BC.

The strengths of this study lie in the fact that it includes a cohort of patients attended in a single centre, homogeneously treated, with prospective data collection and long term follow-up. Furthermore, the use of urine samples to obtain the miRNA prognostic signature may allow the development of a non-invasive bladder cancer prognostic tool with an easy translation into clinical practice. However, some limitations should be acknowledged. First, banked urine samples were analysed, so we cannot calculate the rate of experiment failure due to low cellularity of the sample. Nonetheless, our experience is that the failure rate is low (~5%) in the case of tumour samples [37]. Second, the number of events in the cancer-specific survival analysis is limited. Thus, this part of the results must be taken with care until a validation in a cohort with larger number of events is performed. Next, because of our interest in magnifying the probability to

identify reliable prognostic miRNAs, all available samples were included in the evaluation set, thus preventing an independent validation. To overcome this drawback, we strictly ascertained the robustness of the mathematical algorithm by bootstrapping, obtaining a high concordance index. However, the performance of this miRNA signature would be more reliable if validation is performed in an independent external data set. Finally, we have evaluated a limited number of candidate miRNAs previously included in our signatures. Other attractive candidate miRNAs with prognostic value in BC are reported in the literature. Thus, our study rather than establishing a definitive prognostic miRNA expression signature, may contribute to describe prognostic miRNAs which warrant further prospective evaluation in carefully and specifically designed studies.

In summary, our results showed a 2-miRNA urinary signature which significantly predicts progression and cancer-specific survival in NMIBC patients, indicating that it may be a novel potential biomarker for prognosis of NMIBC patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and clinical samples

Under Institutional Review Board approval and patients' informed consent, we prospectively collected freshly voided urine samples from BC patients at Hospital Clinic of Barcelona, starting January 2008. Urines were centrifuged and separated into cellular pellet and supernatant prior to storage at -80°C in a urinary biorepository.

For this study, consecutive available banked cellular pellets from urine samples collected between January 2008 and July 2013 at Hospital Clinic of Barcelona were used for analysis. These included 210 samples from urothelial cell carcinoma of the bladder patients subjected to TURB (Table 1) [38, 39]. The only exclusion criterion was the lack of follow-up after TURB. Tumours were classified according to their clinicopathological risk into two categories: high-risk NMIBC tumours [any of the following: T1 tumours, HG tumours, CIS, and multiple, recurrent, large (>3 cm) Ta low grade tumours (all conditions must present for the last point)] and non high-risk NMIBC tumours (all tumours not defined in the other category). None of the patients included had an upper urinary tract tumour. All patients were followed-up postoperatively following the EAU guidelines [1]. Tumours were considered to be in progression when pathological stage or histological grade increasing and/or distant metastasis or pathological nodes were developed during the follow-up.

RNA extraction

Around 50-100 ml of urine was collected from each BC patient the day before the TURB. Urine samples

were processed as previously described [40], except that collected urines were stored at 4°C and processed within the next 24 hours instead of ice cooled. RNAs from the urinary cell pellets were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and quantified with a NanoDrop1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

miRNA analysis

A total of 8 key miRNAs (miR-25-3p, miR-18a-3p, miR-92a-3p, miR-140-5p, miR-125b-5p, miR-142-3p, miR-204-5p and miR-187-3p), previously described by our group [13], were selected for examination in urinary samples from NMIBC patients by quantitative PCR by using miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark), as previously described [13]. Briefly, total RNA (100 ng) containing miRNA was polyadenylated, and cDNA was synthesized using a poly(T) primer with a 3' degenerate anchor and a 5' universal tag. Then, cDNA was served as a template for miRNA RT-qPCR amplification with the specific locked nucleic acid (LNA) primers (Supplementary Table 2) and SYBR Green master mix. PCR reactions were carried out using a Light Cycler 480 instrument. The amplification profile was denatured at 95°C for 10 min followed by 45 amplification cycles of 95°C for 10s and 60°C for 1 min. At the end of the PCR cycles, melting curve analyses were performed. miR-103-3p and miR-30c-5p were used as endogenous controls, as previously described [13, 41].

Statistical analysis

Univariate Cox regression analysis was performed on each covariate to examine its influence on tumour progression and cancer-specific survival. Thereafter, a multivariate forward stepwise Cox regression analysis was performed. After establishing the multivariate model, a RS for the miRNAs of the model was calculated for each patient as the linear combination of the model according to the following $RS = \beta_1 \times \text{miR-140-5p} + \beta_2 \times \text{miR-92a-3p}$. RS was subjected to a ROC analysis in order to choose the most appropriate threshold for predicting tumour progression. Then, Kaplan-Meier curves for tumour progression and cancer-specific survival were generated using the selected cut-off point and compared according to the log-rank test. Statistical significance was established at p-value of 0.05. R-software and SPSS v23.0 were used for calculations.

Finally, robustness of the mathematical algorithm resulting from the multivariate analysis was evaluated by bootstrapping with 1,000 resamples. For this purpose, validate function from RMS Package was used and the optimism-adjusted estimate of concordance index was computed (<http://CRAN.R-project.org/package=rms>).

Pathway enrichment analysis

DIANA-miRPath v3.0 software (<http://www.microrna.gr/miRPathv3>) [42] using experimentally validated miRNA interactions derived from DIANA-TarBase v7 was used to identify targets of the miRNAs composing the prognostic signature. Subsequent target enrichment analysis was performed in order to discover possible canonical altered pathways using DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>).

Abbreviations

BC; bladder cancer
 BCG; bacillus Calmette-Guerin
 CI; confidence interval
 CIS/Tis; carcinoma *in situ*
 CSM; cancer-specific mortality
 HG; high grade
 HR; hazard ratio
 KEGG; kyoto encyclopedia of genes and genomes
 LG; low grade
 LNA; locked nucleic acid
 miRNA; microRNA
 NMIBC; non-muscle invasive bladder cancer
 ROC; receiver-operating characteristic
 RS; risk score
 TURB; transurethral resection of the bladder

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. 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 grants from the Spanish Urological Association (FIU 2009 to LM), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI10/01145 to AA), Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Unión Europea. Una manera de hacer Europa and CERCA Programme/ Generalitat de Catalunya.

Author contributions

Study concepts and design: LM, MJR, AA, LI, JJJ
 Data acquisition: MIT, AC, MC, LG
 Data analysis and interpretation: MIT, LM, JJJ, MJR, AA, LI

22. Zhai H, Fesler A, Ba Y, Wu S, Ju J. Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy. *Oncotarget*. 2015; 6: 19735-19746. doi: 10.18632/oncotarget.3771.
23. Butz H, Liko I, Czirjak S, Igaz P, Korbonits M, Racz K, Patocs A. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFbeta pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2011; 14: 112-124.
24. Pais H, Nicolas FE, Soond SM, Swingler TE, Clark IM, Chantry A, Moulton V, Dalmay T. Analyzing mRNA expression identifies Smad3 as a microRNA-140 target regulated only at protein level. *RNA*. 2010; 16: 489-494.
25. Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular pathways: targeting the TGF-beta pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 4514-4521.
26. Wang M, Du M, Ma L, Chu H, Lv Q, Ye D, Guo J, Gu C, Xia G, Zhu Y, Ding Q, Yuan L, Fu G, et al. A functional variant in TP63 at 3q28 associated with bladder cancer risk by creating an miR-140-5p binding site. *Int J Cancer*. 2016; 139: 65-74.
27. Kiemenev LA, Thorlacius S, Sulem P, Geller F, Aben KK, Stacey SN, Gudmundsson J, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Sigurdsson A, Blondal T, Witjes JA, Vermeulen SH, et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet*. 2008; 40: 1307-1312.
28. Liu C, Zhang Y, Chen H, Jiang L, Xiao D. Function analysis of rs9589207 polymorphism in miR-92a in gastric cancer. *Tumour Biol*. 2016; 37: 4439-4444.
29. Ren P, Gong F, Zhang Y, Jiang J, Zhang H. MicroRNA-92a promotes growth, metastasis, and chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Tumour Biol*. 2016; 37: 3215-3225.
30. Zhao JY, Wang F, Li Y, Zhang XB, Yang L, Wang W, Xu H, Liu DZ, Zhang LY. Five miRNAs Considered as Molecular Targets for Predicting Esophageal Cancer. *Med Sci Monit*. 2015; 21: 3222-3230.
31. Schee K, Boye K, Abrahamsen TW, Fodstad O, Flatmark K. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2012; 12: 505.
32. Ahmadi S, Sharifi M, Salehi R. Locked nucleic acid inhibits miR-92a-3p in human colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits cell proliferation. *Cancer Gene Ther*. 2016; 23: 199-205.
33. Wong N, Khwaja SS, Baker CM, Gay HA, Thorstad WL, Daly MD, Lewis JS, Jr., Wang X. Prognostic microRNA signatures derived from The Cancer Genome Atlas for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Med*. 2016; 5:1619-1628.
34. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, Langmeierova L, Weinberger V, Zaveska DL, Hulkova M, Horinek A, Duskova D, Feyereisl J, Minar L, Kohoutova M. Evaluation of Cell-Free Urine microRNAs Expression for the Use in Diagnosis of Ovarian and Endometrial Cancers. A Pilot Study. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21: 1027-1035.
35. Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP, Ince TA, McKeon FD, Cordon-Cardo C. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol*. 2002; 161: 1199-1206.
36. Sanguedolce F, Bufo P, Carrieri G, Cormio L. Predictive markers in bladder cancer: do we have molecular markers ready for clinical use? *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014; 51: 291-304.
37. 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, 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: 131-138.
38. 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, Simon R, Amin MB, Tyczynsky JE. Tumours of the Urinary System. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press, 2004: p. 89-157.
39. Sobin LH, Wittekind CH, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*. International Union Against Cancer, 6th ed. New York: John Wiley & Sons, 2002.
40. Mengual L, Buset 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.
41. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3: RESEARCH0034.
42. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: W460-W466.

DISCUSIÓN

Tal y como hemos visto a lo largo de los apartados anteriores, el CV es una neoplasia con una alta prevalencia e incidencia en nuestro entorno. De hecho, es el quinto tumor más frecuente en los países industrializados y presenta una tasa de mortalidad no desdeñable. Es por ello que el estudio del CV supone un objetivo prioritario para nuestro sistema de salud actual.

Desde el punto de vista clínico, existe un consenso acerca del esquema diagnóstico, terapéutico y de seguimiento de estos pacientes. Sin embargo, desde la perspectiva de la investigación, pese a los grandes progresos que se han producido en los últimos años a nivel tecnológico y en el campo de la biología molecular del cáncer, ha habido una escasa traslación de estos avances a la práctica clínica del CV. Es en este punto en el que se inicia la presente tesis doctoral, que se engloba en el contexto de la investigación traslacional, es decir, aquella cuyo objetivo final es aplicar descubrimientos generados durante la investigación en el laboratorio y en estudios preclínicos a la práctica clínica.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis tiene una amplia y dilatada trayectoria en el campo de la investigación traslacional en uro-oncología, con múltiples trabajos publicados en este ámbito, especialmente en el CV. Una de las líneas prioritarias de estudio del grupo es el desarrollo de métodos no invasivos para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico del CV, dadas las limitaciones actuales de las pruebas de referencia de diagnóstico y seguimiento del CV y de los factores pronósticos actuales.

En la actualidad la cistoscopia en combinación con la citología urinaria representa el *gold estándar* en el diagnóstico y seguimiento del CV. Ambas pruebas se complementan. Por un lado, la cistoscopia presenta una elevada sensibilidad (80-90%) para la detección del CV (Grossman et al., 2006), pero es una técnica invasiva, cara y que puede llegar a infradiagnosticar hasta un 30% del CIS. Por otro lado, la citología urinaria es una prueba no invasiva con una elevada especificidad (90-96%), aunque con baja sensibilidad (11-76%) especialmente para los tumores de bajo grado (Glas et al., 2003, Lokeshwar et al., 2005). Además, presenta una reproducibilidad inter e intra observador pobre (Sherman et al., 1984).

Debido a las limitaciones de esta combinación para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con CV, la identificación de nuevos biomarcadores de precisión para el diagnóstico no invasivo y para la predicción de recidivas supone hoy en día uno de los principales retos de la urología clínica. Se considera que la combinación de la cistoscopia y la citología urinaria

presenta una sensibilidad y una especificidad en el rango del 80% y 90%, respectivamente. Es por ello que, cualquier test no invasivo que pretenda reemplazar esta combinación diagnóstica debe presentar como mínimo la misma precisión que las dos pruebas conjuntamente.

Siguiendo esta línea, en los últimos tiempos se han venido comercializando diferentes test diagnósticos no invasivos para la detección del CV, aunque hasta la fecha ninguno de ellos se utiliza de rutina en la práctica clínica, muy probablemente porque no han podido superar en coste-efectividad a la combinación de cistoscopia y citología.

La presente tesis es una contribución a la mejora y desarrollo de modelos moleculares con una finalidad no sólo diagnóstica de la enfermedad, sino también pronóstica. La tesis se centra en la identificación y validación de modelos de expresión génica y de miRNAs para el diagnóstico y pronóstico no invasivo del CV.

El método ideal de diagnóstico y seguimiento del CV debe ser preciso, rentable y facilitar al paciente el cumplimiento del programa de vigilancia. A su vez, también sería interesante poder detectar y evaluar el verdadero potencial maligno del CV. Con la intención de poder mejorar a la combinación cistoscopia y citología, el test no invasivo propuesto debería tener como mínimo la misma precisión diagnóstica. En este sentido, se ha invertido mucho esfuerzo con el fin de desarrollar métodos moleculares en muestras de orina basados en ácidos nucleicos o proteínas. A día de hoy se pueden encontrar en la literatura una gran variedad de marcadores moleculares en orina para el diagnóstico no invasivo de CV, habiendo sido alguno de ellos aprobados por la FDA. Pero como ya hemos apuntado, ninguno de ellos se está utilizando en la práctica urológica de manera rutinaria.

En este sentido, el primer trabajo que comprende esta tesis se centró en validar un modelo de 14 genes (12 + 2) previamente descrito por nuestro grupo. El modelo de expresión génica comprendía un modelo de 12 genes para el diagnóstico y 2 genes para el pronóstico del CV. Este modelo mostró en los estudios iniciales una elevada precisión para el diagnóstico del CV (SN 86% y SP 93%) y para la predicción de agresividad tumoral (SN 79% y SP 82%) en muestras de orina (Mengual et al., 2010).

Tras la validación del modelo de 12 genes en una cohorte independiente de 207 pacientes y controles se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 80% y 86%, respectivamente. Dicha elevada especificidad se logró no sólo utilizando controles sanos, sino

usando también como controles pacientes con enfermedades urológicas no neoplásicas. Además, nuestra firma de expresión de 12 genes alcanzó un valor de precisión en la cohorte de validación del 84%, tan alto como otros test de la literatura que todavía no se han validado. Por ejemplo, Holyoake y colaboradores intentaron validar su modelo de expresión génica de 4 genes en orina en una cohorte independiente y la sensibilidad del modelo disminuyó al 62%, con una especificidad fijada en el 85% (Holyoake et al., 2008, Cheng et al., 2011). Esto hizo que desarrollaran una segunda generación de su test original añadiendo un nuevo gen (*Cxbladder-D*), que alcanzó una sensibilidad del 81.8% con una especificidad fijada en el 85.1%. Sin embargo este nuevo test requiere una nueva validación en una cohorte independiente (O'Sullivan et al., 2012). Otro grupo americano también diseñó un test de 14 genes que logró una alta precisión en la fase inicial (Rosser et al., 2009, Urquidi et al., 2012), similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, cabe destacar que sus buenos resultados se deben principalmente a que en el estudio se analizaron tumores de alto riesgo, y esto puede implicar una desviación en los resultados, ya que la sensibilidad disminuye considerablemente en las muestras de orina de tumores de bajo riesgo. De hecho, en la validación de nuestro test obtenemos una sensibilidad entre el 91% y 100% para los tumores de alto grado, pero ésta disminuye al 53% para los tumores de bajo grado, tal y como le sucede a otros test como el *Cxbladder-D* (O'Sullivan et al., 2012).

Cabe apuntar que aunque se ha descrito que el retraso de hasta 6 meses en el diagnóstico de tumores de bajo grado no afectaría de forma adversa al pronóstico de estos pacientes, sería de gran utilidad poder minimizar este periodo pudiendo proceder al diagnóstico de este tipo de tumores lo antes posible.

Con este objetivo en mente, el de mejorar la sensibilidad en la detección en orina de los tumores de bajo grado, se agruparon todas las muestras analizadas hasta el momento en una nueva cohorte (n=404). A partir de los datos de expresión génica que se disponían de estas muestras, se diseñaron 3 nuevos modelos diagnósticos que contenían 2, 5 y 10 genes, aparte de recalcular el algoritmo diagnóstico para el modelo de 12 genes.

Las AUC de los cuatro modelos (2, 5, 10 y 12 genes) en esta cohorte de 404 muestras fueron 0,913, 0,941, 0,949 y 0,944, respectivamente. Estos valores están en el rango del resto de test comercializados y se mantuvieron tras la validación cruzada de los datos.

Se observó que los 4 modelos generados compartían 2 genes en común (*IGF2* y *MAGEA3*) fuertemente relacionados con el CV. *IGF2* es el responsable de la activación de la vía de señalización de la kinasa *RAS*, la cual está anormalmente expresada en el NMIBC (Pignot et al., 2012, Arcaro, 2013). Contrariamente, la elevada expresión de *MAGEA3*, un gen asociado con la vía de p53, se relaciona con tumores de alto grado y alto estadio patológico (Arcaro, 2013, Pignot et al., 2012, Marcar et al., 2010, Dyrskjot et al., 2012).

Por ello, no sorprende que la combinación de estos dos genes involucrados en dos vías metabólicas de la carcinogénesis sea de utilidad en el diagnóstico del CV. Es probable que añadiendo más genes al actual modelo de dos genes se abarque una mayor heterogeneidad del tumor y mejore la precisión diagnóstica, como en el caso del modelo de 10 genes (2 genes AUC 0.907 vs 10 genes AUC 0.937). Sin embargo, cabe destacar que los cuatro modelos presentan una SN y SP en el rango de 80% y 90%, respectivamente.

Otro desafío clínico importante es evaluar la potencial agresividad del CV, ya que el conocimiento precoz de la malignidad del tumor podría mejorar el tratamiento y seguimiento a aplicar a los pacientes con CV. Fue por ello que decidimos refinar el modelo actual para predecir la agresividad del tumor y crear un nuevo modelo ampliando el conjunto de muestras estudiadas. Aunque el número de casos analizados no fue alto, el nuevo modelo de 6 genes logró una precisión del 83%, superando la predicción de nuestro modelo de 12+ 2 genes que tiene una precisión del 75% y la del modelo de Holyoke (Holyoake et al., 2008), compuesto por 2 genes, y que presenta una precisión del 42% para discriminar los tumores de bajo de los de alto grado en muestras de orina.

En cuanto a las limitaciones del estudio, señalar que hubiera sido de gran interés poder comparar los resultados obtenidos con la citología urinaria, hecho que no se pudo llevar a cabo puesto que no se disponía de la citología de todos los sujetos del estudio. La segunda limitación del trabajo parte de la base que el grado histológico por sí mismo no es la referencia a la hora de determinar la agresividad del tumor. A pesar de ello, nos basamos en dicho factor para el presente estudio dado el corto seguimiento, especialmente para pacientes con enfermedad no- músculo-invasiva dada su baja tasa de mortalidad con respecto a la mortalidad acumulada en tumores de alto grado. Por último, sería de gran interés poder llevar a cabo una validación externa de los nuevos modelos generados y poderlos correlacionar con el desenlace de la enfermedad. Este último aspecto supone el punto de partida del segundo trabajo de esta tesis.

En el segundo trabajo se llevó a cabo una validación de los 4 modelos desarrollados en el trabajo anterior, en una muestra prospectiva, internacional y multicéntrica que incluyó un total de 525 pacientes procedentes de 5 centros europeos pertenecientes a 3 países. Los resultados que se obtuvieron de este trabajo revelaron que los cuatro modelos presentan una elevada precisión en esta cohorte de validación (AUC 0,903-0,918), siendo el modelo que contiene 2 genes (*IGF2* y *MAGEA3*) el que mostró mejores resultados en términos de sensibilidad (81,5%), especificidad (91,3%) y AUC (AUC 0,918). Esta precisión obtenida está en el rango del actual *gold estándar* de diagnóstico, con la salvedad que el modelo de expresión génica proporciona una objetividad medible, sin variabilidad inter-observador, que la metodología que se utiliza es de fácil acceso y, no requiere especial experiencia por parte del técnico y que la muestra que se analiza se obtiene de una manera no invasiva. Cabe destacar que esta precisión se ha logrado utilizando muestras de orina de pacientes con diferentes patologías urológicas como controles y se mantiene entre las poblaciones y los diferentes centros. Tal y como hemos descrito previamente, estos dos genes están fuertemente asociados al CV e involucrados en las dos vías moleculares de carcinogénesis más conocidas (Goebell and Knowles, 2010). Es por ello, que no sorprende que su uso sea una buena combinación para el diagnóstico.

La especificidad que alcanzó el modelo de 2 genes (91%), es comparable a la de la citología. Además, su precisión del 87,24% es superior a otros test moleculares en orina publicados que utilizan múltiples marcadores (O'Sullivan et al., 2012, Holyoake et al., 2008) y que todavía no han sido validados. Además, un problema común a todos los test es la disminución de la sensibilidad para la detección de tumores de bajo grado. De hecho, nuestro modelo de 2 genes mostró una SN más baja (68%) en el conjunto de validación para detectar los tumores no músculo invasivos de bajo grado en contraste con el 89% para los tumores no músculo invasivo de alto grado y el 95% para los tumores músculo invasivos; 27 de los 40 casos clasificados erróneamente por el modelo de 2 genes son tumores músculo invasivos de bajo grado. Pero incluso en el grupo de tumores de muy bajo riesgo (Ta de bajo grado con un volumen tumoral $\leq 5\text{mm}$) logramos una mayor sensibilidad en la cohorte de validación que las logradas para marcadores únicos publicados (Lotan and Roehrborn, 2003), y además es más alta que la descrita para la citología para el mismo subgrupo de pacientes (27%) (Mowatt et al., 2010).

Además, es interesante destacar que nuestro modelo de 2 genes logró un buen resultado en el subgrupo de pacientes recurrentes, con una SN del 77% y un valor predictivo negativo del 93%. A ello añadir que los resultados en cuanto a rendimiento diagnóstico obtenidos con el modelo de 2 genes, mejoran cuando se trata de tumores de mayor tamaño y de alto riesgo y no se ven modificados por la presencia de multiplicidad tumoral.

En esta cohorte de validación, se realizó citología urinaria a un total de 150 pacientes de los 216. El 73% de los tumores no-músculo-invasivos de bajo riesgo no fueron diagnosticados por la citología urinaria, mientras que este porcentaje fue del 34% para el modelo de 2 genes. Sin embargo, la citología y el modelo presentaron similitudes en el diagnóstico de tumores de alto riesgo y en enfermedad músculo-invasiva. Es importante destacar que el 5% (dos pacientes) con MIBC fueron clasificados erróneamente por el modelo de 2 genes y el 7% (dos pacientes) por citología si sólo consideramos resultados negativos y un 19% (5 pacientes) si consideramos tanto negativos como resultados sospechosos o no concluyentes para la citología. De los dos pacientes con MIBC no detectados por el modelo de 2 genes, uno media menos de 1 cm mientras que el otro era de 2 cm. La detección temprana de tumores músculo invasivos y con un alto riesgo de recurrencia es crítica, ya que en dichos casos se puede poner en riesgo la vida del paciente. Por el contrario, como ya hemos apuntado anteriormente, las recurrencias en tumores pequeños de bajo grado no representan una amenaza y la detección temprana no es esencial (Soloway et al., 2002).

Por otro lado, de los casos tumorales inicialmente incluidos en el estudio (n=367), el 20% resultaron fallo de inclusión, dado que no pudo demostrarse la presencia de tumor en la RTU. Esta tasa de falsos positivos para la cistoscopia es mayor que la alcanzada para nuestra firma de expresión (8.4%). De hecho, el SN y SP informada para cistoscopia convencional es de 71% y 72%, respectivamente (Mowatt et al., 2010), lo que se correlaciona con los resultados encontrados en nuestra serie. Esto nos indica, que la cistoscopia es una herramienta diagnóstica a menudo sobrevalorada para el detectar el CV por los urólogos.

Esta proporción de resultados falsos positivo, que podrían conducir a una práctica invasiva, podría afectar negativamente a la implementación clínica de un test molecular. El test ideal para la detección del cáncer de vejiga debe tener un valor de SP alto para intentar reducir el alto número de falsos positivos. Para minimizar dicho impacto, en nuestro estudio la población de control consistió en pacientes urológicos que padecen enfermedades comunes como infección, cálculos o hiperplasia benigna de próstata. Además, la SP se fijó en un mínimo

de 90%, que se encuentra dentro del rango de lo alcanzado por el método de diagnóstico estándar actual y superior al reportado para los marcadores de orina disponibles comercialmente para la detección del CV (Babjuk et al., 2013). A mayor SP, menor es el riesgo que tenemos de aplicar maniobras invasivas en pacientes sin CV que impacta directamente sobre la rentabilidad del test.

Actualmente el objetivo clínico para los test moleculares en el CV es poder sustituir algunas cistoscopias durante el seguimiento de dicho tumor. Por ello, estos tests deben tener una elevada sensibilidad, particularmente para los tumores de alto grado (Soukup et al., 2012). Nuestro test de expresión génica iguala o supera el rendimiento diagnóstico del actual *gold estándar*, proporciona una medida objetiva sin variabilidad interobservador basada en la PCR, no es tan laborioso como otros test de orina y el personal que procesaría y evaluaría el test no requiere una especial cualificación para dicha tarea, por lo que podría considerarse como una alternativa válida para la práctica clínica.

Por otro lado, la elevada variabilidad de los resultados de la citología urinaria entre diferentes centros es un hecho ampliamente conocido (Karakiewicz et al., 2006). Contrariamente, cabe destacar que con el modelo de 2 genes, no se observaron diferencias en los resultados en los diferentes centros.

Como limitaciones del trabajo destacar que la tasa de muestras analizadas fue del 86%, cifra que está en el rango de la descrita en publicaciones de test de expresión génica (Laxman et al., 2008, Jamaspishvili et al., 2011). La falta de citología en el grupo control podría suponer otra limitación del estudio puesto que no permite el cálculo de la especificidad de dicha técnica en nuestra serie. De todos modos, el tamaño, el diseño y el carácter multicéntrico e internacional confieren calidad a los resultados obtenidos. Nuestro test consigue los mismos resultados que el actual *gold estándar* de combinación de citología y cistoscopia, y todo ello después de un proceso de validación externo. Por lo tanto, nuestro test podría utilizarse en el seguimiento de pacientes con CV y podría ayudarnos modificar la monitorización de pacientes seleccionados evitándoles así algunas cistoscopias. Sin embargo, una vez que los criterios de evaluación del test han sido definidos y los resultados iniciales han resultado prometedores, el test debería ser validado en un ensayo clínico. En este sentido, validar los resultados en un ensayo clínico prospectivo, randomizado y a gran escala es crucial para poder aplicar el test a la práctica clínica (Lotan et al., 2010).

Los miRNAs se han convertido en uno de los nuevos focos de atención en la biomedicina. Están formados por unos 22 nucleótidos y tienen un papel muy importante en diferentes procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la migración o el metabolismo. Además, se encuentran desregulados en muchas neoplasias humanas (Calin et al., 2005; Yanaihara et al., 2006; Bloomston et al., 2007; Schetter et al., 2008; Liu et al., 2012).

Las firmas de expresión de miRNAs tienen algunas ventajas sobre las firmas de expresión de mRNA, especialmente en cuanto a su aplicación en el ámbito clínico. Primero, es más difícil de obtener el mRNA de cadena larga de alta calidad a partir de la orina, debido a las altas concentraciones de RNAsas en la orina que conducen a la degradación del RNA. Los miRNAs maduros son más cortos y estables frente a la degradación de nucleasas debido a su menor tamaño y por ello es más fácil el aislamiento de alta calidad de una amplia gama de fuentes de células, tejidos, orina y otros fluidos corporales (Weber et al., 2010).

Estas ventajas de los miRNAs sobre los mRNAs hicieron que pusiéramos énfasis en la búsqueda de nuevos biomarcadores para el CV en dichas moléculas. Por ello, diseñamos un estudio para describir el perfil global de miRNA en muestras de orina en pacientes con CV y determinar si utilizando un enfoque similar al utilizado en los estudios de expresión génica, podríamos identificar un modelo de expresión basado en miRNA que sea reproducible mediante diferentes plataformas transcripcionales, que contenga un número limitado de miRNAs y que nos proporcione un elevado rendimiento diagnóstico y una alta precisión pronóstica.

A pesar de que existen algunos estudios en la literatura que han evaluado los niveles de miRNA en orina en pacientes con CV y su potencial de diagnóstico (Hanke et al., 2010, Yamada et al., 2011, Wang et al., 2012, Puerta-Gil et al., 2012, Miah et al., 2012), hasta lo que nosotros sabemos, este estudio es el primero en reportar el perfil global de miRNA completo en orina de pacientes con CV.

En este trabajo, hemos identificado una lista de 40 miRNA diferencialmente expresados entre muestras de orina tumorales y controles. Varios de estos miRNAs están descritos en la literatura relacionados con el CV (miR-126, miR-182, miR-183 y miR-100) (Hanke et al., 2010, Yamada et al., 2011, Miah et al., 2012). Además, algunos de los miRNA de nuestra lista habían sido previamente identificados con una expresión aberrante en muestras de tejido con CV (por ejemplo miR-182, miR-183, miR-143, miR-125b, miR-145 y miR-29a)

confirmando que el patrón de expresión de miRNA obtenido en orina refleja, al menos parcialmente, patrones de expresión de miRNA tisulares (Mengual et al., 2006). Hay que tener en cuenta que la orina contiene diferentes tipos de células (incluyendo células tubulares renales, linfocitos, glóbulos rojos, células uroteliales, células tumorales etc) y que la proporción de células tumorales varía en cada paciente. Por tanto, el hecho de que algunos de los miRNAs diferencialmente expresados en la orina que se encuentran en nuestro estudio coincide con los identificados en estudios anteriores utilizando muestras de tejido refuerza la solidez de nuestros hallazgos y apoya la utilización de los miRNAs en orina como posible marcador diagnóstico y pronóstico.

Para confirmar la fiabilidad de los miRNAs diferencialmente expresados determinados en dicho estudio, hemos buscado posibles potenciales dianas de mRNA de estos miRNA desregulados en las dos vías de señalización asociadas a los diferentes tipos de desarrollo del CV. En aproximadamente el 80% de los NMIBC de bajo riesgo encontramos activaciones anormales de *FGFR3* debido a mutaciones o a la sobreexpresión de dicho gen (Cappellen et al., 1999, Billerey et al., 2001). Este gen y otros factores de crecimiento participan en la activación de la vía de señalización de la quinasa *RAS* que da lugar al aumento de la proliferación celular, la motilidad y la transformación del urotelio normal en un urotelio hiperplásico cancerígeno. Algunos de los miRNAs desregulados en nuestra lista, como miR-29a/b, miR-143, miR-145, miR-182 o miR-183 han sido predichos *in silico* como diana de la vía de *FGFR*. Más interesante aún, algunos de los miRNAs alterados en orina encontrados específicamente en los pacientes con NMIBC, como miR-29a/b, miR-101, miR-100, miR-99a, miR-143, miR-145 o miR-183 también han sido predichos como diana de genes de la vía de *FGRF* (Fendler et al., 2011). De hecho, la regulación de *FGFR* por miR-99 y miR-100 se ha validado experimentalmente (Catto et al., 2009). Otros estudios demuestran que la transcripción inducida de miR-143 en líneas celulares de CV condujo a una disminución de la expresión de *RAS* (Lin et al., 2009, Kent et al., 2010, Noguchi et al., 2013). Por otro lado, la otra principal vía alterada en el CV está causada por mutaciones *TP53*. Estas mutaciones son características del MIBC. Hasta ahora no hay datos experimentales validados sobre el papel de miRNAs desregulados como reguladores de la vía de *TP53*. Sin embargo, varios miRNAs que frecuentemente se encuentran diferencialmente expresados en el CV son bioinformáticamente predichos como diana directa de *TP53* o de alguno de sus reguladores (Fendler et al., 2011). En nuestra lista encontramos ejemplos de ello, como son miR-125b y miR-143 que se predicen directamente como diana de *TP53*. En

conjunto, nuestro estudio confirma, usando orinas de pacientes con CV, que los miRNAs están alterados específicamente en el fenotipo tumoral (Catto et al., 2009, Veerla et al., 2009) e identifica a los miRNAs como posibles moléculas a utilizar en el diagnóstico, pronóstico y como dianas terapéuticas.

Cabe destacar que para dar robustez al estudio y debido a la posible distorsión que podría provocar la metodología utilizada (preamplificación preliminar de cDNA realizada en orina), se procedió a validar técnicamente los datos obtenidos mediante un enfoque diferente. Se encontró una alta correlación para los 32 miRNAs estudiados mediante ambas plataformas utilizadas ($r=0.75$), lo que indica que todo el procedimiento utilizado es robusto y reproducible para el estudio del perfil de miRNA.

El objetivo final de este trabajo era identificar un grupo reducido de miRNAs en orina que aportara información acerca del diagnóstico y agresividad del CV para poder extrapolarlo a la práctica asistencial. Para ello, se seleccionaron 22 miRNAs del experimento anterior para ser validados en una cohorte independiente. La cuantificación de estos miRNAs en esta nueva cohorte permitió el desarrollo de 2 modelos; uno enfocado hacia diagnóstico y otro hacia pronóstico. El modelo diagnóstico contenía 6 miRNAs y obtuvo unos resultados de sensibilidad y especificidad de 84,8% y 86,5%, respectivamente con un AUC de 0,83. El modelo pronóstico con 2 miRNAs mostró una sensibilidad y especificidad de 84,9% y 74.1%, respectivamente.

Cabe destacar que el rendimiento diagnóstico y pronóstico se mantuvo tras la validación cruzada. Aunque existen pocos estudios en la literatura que hayan evaluado los niveles de miRNAs en orina como herramienta de diagnóstico no invasiva para el CV, la precisión diagnóstica de nuestro modelo supera a todos ellos. Lo más probable es que esta mejora en la precisión se deba a la selección específica de miRNAs diferencialmente expresados en orina (no en tejido con CV), así como a la combinación de varios miRNAs para crear un modelo, la gran cantidad de muestras analizadas y el uso de diferentes metodologías para el análisis y la identificación de los miRNAs adecuados.

Un dato interesante que se observó durante el estudio fue que la expresión de miRNAs en enfermedad no músculo-invasiva de bajo grado presentaba unas características muy similares entre las muestras de pacientes y controles. Es por ello que la precisión diagnóstica de los diferentes biomarcadores urinarios es menor en este tipo de pacientes (Marín-Aguilera et al., 2007). Teniendo esto en cuenta, realizamos una selección sesgada de miRNAs como

marcadores para ganar precisión en este subgrupo de tumores. Los resultados de precisión diagnóstica de nuestro modelo de 6 miRNAs en los pacientes con enfermedad no músculo-invasiva de bajo grado, a pesar de ser ligeramente más bajos que en los pacientes con CV de alto riesgo, permite que su futura implementación en la práctica clínica sea muy deseable.

Varias posibles vías se han predicho que podrían ser modificadas por los 6 miRNAs que componen nuestro modelo diagnóstico como las uniones adherentes, la vía de señalización de *MAPK*, la vía de señalización de *mTOR*, las interacciones ECM-receptor, la vía de señalización de *Notch* y otras vías relacionadas con el cáncer. Curiosamente, algunas de estas vías predichas se han asociado previamente con el CV en estudios transcriptómicos en tejidos por Li et al (Li et al., 2011), observando alteraciones en las vías que incluyen la vía de señalización de *MAPK*, la interacción ECM-receptor o la vía de señalización del calcio, similar a nuestros resultados. Además, nuestro estudio indica la alteración de varias vías relacionadas con el cáncer.

Además de la utilidad diagnóstica de los miRNAs en muestras de orina, nuestro estudio sugiere a los miRNAs como potenciales marcadores en la predicción de la agresividad de la enfermedad. Esto está en concordancia con el papel descrito de que los miRNAs promueven un fenotipo tumoral agresivo al cambiar la expresión de sus dianas de mRNA (Dyrskjot et al., 2009). Nuestro modelo pronóstico que contiene un número sorprendentemente pequeño de miRNAs (miR-125b y miR-92a) es capaz de discriminar entre tumores de alto grado y de bajo grado en muestras de orina. Estos datos podrían tener un impacto clínico importante, ya que del conocimiento del potencial maligno del tumor en el momento del diagnóstico se puede mejorar los programas de tratamiento actuales en los pacientes con CV, priorizando a los pacientes de alto riesgo en cuanto a la realización de una cistoscopia o una RTU tanto como el prolongar el intervalo de pruebas a realizar a los pacientes de bajo riesgo.

Respecto a las limitaciones de este trabajo señalar de nuevo la falta de comparación con la citología puesto que no se pudo disponer de esos datos. Otra limitación podría suponer el hecho de trabajar con muestras de orina almacenadas previamente, por lo que impide calcular la tasa de pérdida de muestras debido a la cantidad o calidad del miRNA extraído. Sin embargo, nuestra experiencia es que la tasa de fallos técnicos ronda el 10%. Por último apuntar que el grado histológico es un factor por sí mismo pobre para el pronóstico. Pese a ello, lo consideramos útil en nuestro estudio dado el corto seguimiento especialmente para

tumores con enfermedad no músculo-invasiva. A ello añadir la importancia de validar nuestros resultados en una serie externa independiente con largo seguimiento.

Finalmente, en el último trabajo de la tesis, nos hemos centrado en el estudio de miRNAS enfocado al pronóstico de la enfermedad no músculo-invasiva

La tasa de progresión al año y a los 5 años del tumor vesical no músculo invasivo es del 17% y 45%, respectivamente (Babjuk et al., 2017). En la actualidad, los factores más importantes que pronostican progresión son el estadio T1, alto grado y la presencia de cis (Sylvester et al., 2006). En nuestra cohorte, estos factores por sí solos son incapaces de discriminar aquellos pacientes que presentarán progresión de la enfermedad de los que no. Tampoco otros factores de pronóstico clínico menos significativos como recurrencia, multiplicidad y tamaño del tumor son capaces de distinguir los pacientes que progresaran de los que no. Una explicación podría ser que la gran mayoría de nuestra cohorte son pacientes NMIBC de alto grado.

En este trabajo hemos desarrollado un modelo de 2 miRNAS (miRNA-140-5p y miRNA-92a-3p) en orina que identifica al subgrupo de pacientes con NMIBC con elevada probabilidad de progresión tumoral y menor supervivencia cáncer específica. Una estimación precisa del riesgo de progresión tumoral ayudaría a identificar la terapia más adecuada para cada paciente. Por ejemplo, pacientes con alto riesgo de progresión tumoral podrían beneficiarse de una re-RTU, terapia adyuvante, tratamientos más agresivos o un seguimiento más estricto.

Hasta lo que nosotros sabemos, este es el primer estudio en el que se ha evaluado los miRNAs urinarios como biomarcadores pronósticos del CV no músculo-invasivo (Záveský et al., 2015). Además, el modelo que presentamos mantiene la capacidad pronóstica aun cuando los pacientes con enfermedad no músculo-invasiva son estratificados de acuerdo a su riesgo clínico-patológico, hecho que refuerza la validez del modelo. Otro aspecto a destacar es el valor pronóstico del modelo para tumores de bajo riesgo o riesgo intermedio de progresión. En este sentido, es interesante conocer también en estos grupos de tumores, pese a no ser de alto riesgo, cuales tienen más probabilidad de progresión, ya que puede ser útil a la hora de la toma de decisiones en cuanto a esquema de tratamiento y/o seguimiento.

Respecto a los marcadores moleculares incluidos en nuestro algoritmo, destacar que miRNA-140-5p está descrito como inhibidor de la expresión de la vía TGF- β y MAPK/ERK en diferentes neoplasias (Yang et al., 2013, Zhai et al., 2015, Butz et al., 2011, Pais et al., 2010, Smith

et al., 2012). Además, recientemente se ha publicado que la sobreexpresión de este miRNA tiene un efecto inhibitor del CV (Wang et al., 2016). De acuerdo con este dato, en nuestro estudio hemos observado una infraexpresión estadísticamente significativa de miRNA-140-5p en células de orina de pacientes afectados de CV así como en pacientes con tumor vesical de alto grado (Mengual et al., 2013) .

También se han reportado en diferentes tipos de cáncer alteraciones en la expresión de miRNA-92a-3p (Liu et al., 2016, Ren et al., 2016, Zhao et al., 2015), aunque el presente trabajo es el primero que relaciona dicho miRNA con el CV. En estudios recientes, se ha observado que la sobreexpresión de miRNA-92a-3p puede alterar la vía metabólica de *PI3K/Akt/mTOR* mediante dos factores reguladores negativos tales como *PTEN* y *PHLPP* (Han et al., 2011, Zhao et al., 2015, Ren et al., 2016, Schee et al., 2012). Otros trabajos muestran que la sobreexpresión de miRNA-92a-3p está involucrada en el desarrollo de metástasis y se correlaciona con supervivencia en diferentes enfermedades (Ahmadi et al., 2016, Wong et al., 2016, Závěský et al., 2015). En este sentido, nuestro trabajo muestra que miRNA-92a-3p presenta una sobreexpresión significativa en las células de la orina de pacientes con enfermedad vesical no músculo-invasiva que progresan, de acuerdo con su papel de oncomiRNA.

El análisis de las vías metabólicas KEGG, corrobora que el modelo de los 2 miRNAs que hemos obtenido tiene significación biológica. Este análisis muestra que las dianas de estos dos miRNAs están involucradas en importantes vías metabólicas del cáncer como el ciclo celular, vía *TGF-β* y la vía de *TP53* entre otras. A ello añadir que se han descrito diferentes genes diana de nuestros miRNAs (por ejemplo, *TP63* y *PTEN*) como protagonistas en la patogénesis del CV (Urist et al., 2002, Sanguedolce et al., 2014).

Como limitaciones de este trabajo, tal y como se ha descrito en el trabajo anterior, se trabajó con muestras de orina almacenadas previamente por lo que es difícil cuantificar la tasa de pérdida de muestras por los motivos comentados anteriormente. Segundo, el número de eventos para el análisis de supervivencia cáncer específica fue limitado. Tercero, todas las muestras fueron incluidas en el análisis del set de miRNAs seleccionados, por lo que no se han podido validar los resultados en una cohorte independiente. Por último, comentar que se evaluó un número limitado de miRNAs. El análisis de un mayor número de miRNAs podría mejorar el actual modelo.

En resumen, nuestros resultados muestran un modelo de 2 miRNA que es capaz de predecir de forma significativa la progresión tumoral y la supervivencia cáncer específica en pacientes con tumor vesical no músculo-invasivo, pudiendo llegar a convertirse en potenciales biomarcadores pronóstico.

Como ocurre en otras neoplasias, el CV sigue constituyendo a día de hoy un reto en la urología oncológica. Pese a los esfuerzos realizados en el campo de la investigación básica para describir moléculas que nos ayuden a diagnosticar, predecir e individualizar el pronóstico de estos pacientes, todavía nos encontramos lejos de poder hacerlo.

Parece más que probable que, ante el complejísimo proceso carcinogénico, la respuesta a nuestra duda diagnóstica y pronóstica se encuentre en la combinación de un grupo de biomarcadores involucrados en diferentes mecanismos tumorales más que una sola molécula. Este motivo condiciona la necesidad de una continuidad investigadora en este ámbito.

En este sentido, esta tesis contribuye a la investigación básica de diferentes moléculas con posible aplicación diagnóstica y pronóstica del CV.

CONCLUSIONES

1. El test de expresión génica en orina de 12+2 genes previamente descrito por nuestro grupo de investigación, ha sido validado en una cohorte independiente con un rendimiento diagnóstico para el cancer de vejiga del 80% de sensibilidad y un 86% de especificidad (AUC 0,92).
2. El test de expresión génica en orina de 12+2 genes ha sido validado para el pronóstico del cáncer de vejiga con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 75% (AUC 0,83).
3. Se han desarrollado tres nuevos modelos de expresión génica y se ha mejorado el algoritmo del modelo de 12+2 genes. Estos nuevos modelos contienen 2, 5 y 10 genes y presentan unas AUC para el diagnóstico del CV en orina de 0,913, 0,941 y 0,949, respectivamente. El modelo de 12+2 mejorado presenta una AUC de 0,944.
4. Se ha desarrollado un nuevo modelo de expresión génica de 6 genes para el pronóstico del CV. Este modelo presenta una AUC de 0,906 para la predicción de la agresividad del tumor vesical en muestras de orina.
5. Los cuatro modelos de diagnóstico basados en expresión génica en muestras de orina han sido validados en una cohorte prospectiva, independiente, internacional y multicéntrica con unas AUC de 0,918, 0,903, 0,908 y 0,905, siendo el modelo de 2 genes el que presenta un rendimiento diagnóstico mayor, con una sensibilidad del 81,5% y una especificidad del 91,3%.
6. El modelo de 2 genes podría aplicarse en la práctica clínica urológica para los pacientes con CV, ya que presenta una sensibilidad mayor que la citología manteniendo su especificidad.
7. Se ha descrito por primera vez el perfil global de miRNAs completo en orina de pacientes con CV, con el fin de desarrollar una herramienta no invasiva precisa y fiable para el diagnóstico y propóstico de dichos pacientes.

8. Se han identificado 40 miRNAs diferencialmente expresados entre muestras de orina de pacientes con CV e individuos sanos. De estos, 22 miRNAs han sido validados en una cohorte independiente.

9. Se ha desarrollado un modelo de 6 miRNAs para el diagnóstico del CV con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 87% (AUC 0,92). También se ha desarrollado un modelo de 2 miRNAs para el pronóstico del CV con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 74% (AUC 0,83).

10. Se ha desarrollado un modelo de 2 miRNA (miR-140-5p Y miR-92a-3p) capaz de predecir de forma significativa la progresión tumoral y la supervivencia cáncer específica en pacientes con tumor vesical no músculo-invasivo, pudiendo llegar a convertirse en potenciales biomarcadores pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014; (507): 315-322.
- Abern M R, Owusu R A, Anderson M R, Rampersaud E N, Inman B A. Perioperative intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; (11): 477-484.
- Aboukassim T O, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer. *Oncogene* 2003; (22): 2967-2971.
- Ahmadi S, Sharifi M, Salehi R. Locked nucleic acid inhibits miR-92a-3p in human colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits cell proliferation. *Cancer Gene Ther* 2016; (23): 199-205.
- Altieri D C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003; (3): 46-54.
- Arcaro A. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Front Pharmacol* 2013; (4): 30.
- Audenet F, Waingankar N, Ferket B S, Niglio S A, Marqueen K E, Sfakianos J P, Galsky M D. Effectiveness of Transurethral Resection plus Systemic Chemotherapy as Definitive Treatment for Muscle Invasive Bladder Cancer in Population Level Data. *J Urol* 2018; (200): 996-1004.
- Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat E M, Hernáiz V, Kaasinen E, Palou J, Rouprêt M, van Rhijn B W, Shariat S F, Soukup V, Sylvester R J, Zigeuner R. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol* 2017; (71): 447-461.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat S F, van Rhijn B W, Compérat E, Sylvester R J, Kaasinen E, Böhle A, Palou R J, Rouprêt M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 2013; (64): 639-653.
- Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; (136): 215-233.
- Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Roberta G 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): 422-427.
- Batista R, Vinagre J, Prazeres H, Sampaio C, Peralta P, Conceição P, Sismeiro A, Leão R, Gomes A, Furriel F, Oliveira C, Torres J N, Eufrásio P, Azinhais P, Almeida F, Gonzalez E R, Bidovanets B, Ecke T, Stinjs P, Pascual Á, Abdelmalek R, Villafruela A, Beardo-Villar P, Fidalgo N, Öztürk H, Gonzalez-Enguita C, Monzo J, Lopes T, Álvarez-Maestro M, Servan P P, De La Cruz S M P, Perez M P S, Máximo V, Soares P. Validation of a Novel, Sensitive, and Specific Urine-Based Test for Recurrence Surveillance of Patients With Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer in a Comprehensive Multicenter Study. *Front Genet* 2019; (10): 1237.
- 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; (37): 766-770.

- Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton M H, Ricol D, Gil Diez d M, Van Rhijn B, Bralet M P, Lefrere-Belda M A, Lahaye J B, Abbou C C, Bonaventure J, Zafrani E S, van der K T, Thiery J P, Radvanyi F. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001; (158): 1955-1959.
- Bloomston M, Frankel W L, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan J P, Liu C G, Bhatt D, Taccioli C, Croce C M. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; (297): 1901-1908.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jöckel K H, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000; (86): 289-294.
- Brierley J, O'Sullivan B, Asamura H, Byrd D, Huang S H, Lee A, Piñeros M, Mason M, Moraes F Y, Rösler W, Rous B, Torode J, van Krieken J H, Gospodarowicz M. Global Consultation on Cancer Staging: promoting consistent understanding and use. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; (16): 763-771.
- Bruins H M, Huang G J, Cai J, Skinner D G, Stein J P, Penson D F. Clinical outcomes and recurrence predictors of lymph node positive urothelial cancer after cystectomy. *J Urol* 2009; (182): 2182-2187.
- Burger M, Catto J W, Dalbagni G, Grossman H B, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny L A, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013; (63): 234-241.
- Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rác K, Patócs A. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β ² pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 2011; (14): 112-124.
- Calin G A, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik S E, Iorio M V, Visone R, Sever N I, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C G, Kipps T J, Negrini M, Croce C M. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; (353): 1793-1801.
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery J P, Radvanyi F. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999; (23): 18-20.
- Catto J W, Miah S, Owen H C, Bryant H, Myers K, Dudzic E, Larre S, Milo M, Rehman I, Rosario D J, Di Martino E, Knowles M A, Meuth M, Harris A L, Hamdy F C. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res* 2009; (69): 8472-8481.
- Cheng L, Zhang S, MacLennan G T, Williamson S R, Lopez-Beltran A, Montironi R. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol* 2011; (42): 455-481.
- Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, McConkey D J. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2014a; (11): 400-410.

- Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack E R, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee I L, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney C P, McConkey D J. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014b; (25): 152-165.
- Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol* 2005; (174): 107-110.
- Cohn J A, Vekhter B, Lyttle C, Steinberg G D, Large M C. Sex disparities in diagnosis of bladder cancer after initial presentation with hematuria: a nationwide claims-based investigation. *Cancer* 2014; (120): 555-561.
- Compérat E, Larré S, Roupret M, Neuzillet Y, Pignot G, Quintens H, Houéde N, Roy C, Durand X, Varinot J, Vordos D, Rouanne M, Bakhri M A, Bertrand P, Jeglinski S C, Cussenot O, Soulié M, Pfister C. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch* 2015; (466): 589-594.
- Cote R J, Datar R H. Therapeutic approaches to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; (46 Suppl): S67-S83.
- D'Hallewin M A, Bezdetsnaya L, Guillemin F. Fluorescence detection of bladder cancer: a review. *Eur Urol* 2002; (42): 417-425.
- Damrauer J S, Hoadley K A, Chism D D, Fan C, Tiganelli C J, Wobker S E, Yeh J J, Milowsky M I, Iyer G, Parker J S, Kim W Y. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; (111): 3110-3115.
- Dietrich K, Demidenko E, Schned A, Zens M S, Heaney J, Karagas M R. Parity, early menopause and the incidence of bladder cancer in women: a case-control study and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2011; (47): 592-599.
- Dudderidge T, Stockley J, Nabi G, Mom J, Umez-Eronini N, Hrouda D, Cresswell J, McCracken S R C. A Novel, non-invasive Test Enabling Bladder Cancer Detection in Urine Sediment of Patients Presenting with Haematuria-A Prospective Multicentre Performance Evaluation of ADXBLADDER. *Eur Urol Oncol* 2020; (3): 42-46.
- Duffy M J, O'Donovan N, Brennan D J, Gallagher W M, Ryan B M. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 2007; (249): 49-60.
- Dyrskjot L, Ostensfeld M S, Bramsen J B, Silahatoglu A N, Lamy P, Ramanathan R, Frstrup N, Jensen J L, Andersen C L, Zieger K, Kauppinen S, Uhlöj B P, Kjems J, Borre M, Orntoft T F. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res* 2009; (69): 4851-4860.
- Dyrskjot L, Zieger K, Kissow L T, Reinert T, Gruselle O, Coche T, Borre M, Orntoft T F. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 2012; (107): 116-122.
- Engel L S, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus P M, Lan Q, Boffetta P, Vineis P, Autrup H, Bell D A, Branch R A, Brockmoller J, Daly A K, Heckbert S R, Kalina I, Kang D, Katoh T, Lafuente A, Lin H J, Romkes M, Taylor J A, Rothman N. Pooled analysis and meta-analysis of

- glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002; (156): 95-109.
- Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; (6): 259-269.
- Fendler A, Stephan C, Yousef G M, Jung K. MicroRNAs as regulators of signal transduction in urological tumors. *Clin Chem* 2011; (57): 954-968.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D M, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; (144): 1941-1953.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D M, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; (136): E359-E386.
- Fosså SD, Ous S, Berner A. Clinical significance of the "palpable mass" in patients with muscle-infiltrating bladder cancer undergoing cystectomy after pre-operative radiotherapy. *Br J Urol* 1991; (67): 54-60.
- Frère-Belda M A, Gil Diez d M, Daher A, Martin N, Albaud B, Heudes D, Abbou C C, Thiery J P, Zafrani E S, 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): 817-824.
- Friedman R C, Farh K K, Burge C B, Bartel D P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; (19): 92-105.
- García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein D W, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real F X, Rothman N. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005; (366): 649-659.
- Glas A S, Roos D, Deutekom M, Zwinderman A H, Bossuyt P M, Kurth K H. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* 2003; (169): 1975-1982.
- Goebell P J, Knowles M A. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol Oncol* 2010; (28): 409-428.
- Griffiths-Jones S, Grocock R J, van Dongen S, Bateman A, Enright A J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; (34): D140-D144.
- Grossman H B, Natale R B, Tangen C M, Speights V O, Vogelzang N J, Trump D L, deVere White R W, Sarosdy M F, Wood D P, Jr., Raghavan D, Crawford E D. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 2003; (349): 859-866.
- Grossman H B, Soloway M, Messing E, Katz G, Stein B, Kassabian V, Shen Y. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2006; (295): 299-305.

- Guo H, Ingolia N T, Weissman J S, Bartel D P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010; (466): 835-840.
- Habuchi T, Luscombe M, Elder P A, Knowles M A. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics* 1998; (48): 277-288.
- Habuchi T, Marberger M, Droller M J, Hemstreet G P, III, Grossman H B, Schalken J A, Schmitz-Dräger B J, Murphy W M, Bono A V, Goebell P, Getzenberg R H, Hautmann S H, Messing E, Fradet Y, Lokeshwar V B. Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005; (66): 64-74.
- Hafeez S, McDonald F, Lalondrelle S, McNair H, Warren-Oseni K, Jones K, Harris V, Taylor H, Khoo V, Thomas K, Hansen V, Dearnaley D, Horwich A, Huddart R. Clinical Outcomes of Image Guided Adaptive Hypofractionated Weekly Radiation Therapy for Bladder Cancer in Patients Unsuitable for Radical Treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017; (98): 115-122.
- Han R F, Pan J G. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology* 2006; (67): 1216-1223.
- Han Y, Chen J, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, Jiang Z, Zhang Z, Yang R, Chen J, Li Z, Tang A, Li X, Ye J, Guan Z, Gui Y, Cai Z. MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2011; (6): e18286.
- Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller A C, Kausch I, Jocham D, Warnecke J M, 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* 2010; (28): 655-661.
- Hautmann R E, de Petriconi R C, Volkmer B G. Lessons learned from 1,000 neobladders: the 90-day complication rate. *J Urol* 2010; (184): 990-994.
- Höglund M, Gisselsson D, Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F, Säll T. Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; (31): 156-171.
- Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock R, Best T, Watanabe J, Kajita Y, Matsui Y, Ito M, Nishiyama H, Kerr N, da Silva T F, Cambridge L, Toro T, Ogawa O, Guilford P. Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2008; (14): 742-749.
- Huang L, Kong Q, Liu Z, Wang J, Kang Z, Zhu Y. The Diagnostic Value of MR Imaging in Differentiating T Staging of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Radiology* 2018; (286): 502-511.
- Jamaspishvili T, Kral M, Khomeriki I, Vyhnankova V, Mgebrishvili G, Student V, Kolar Z, Bouchal J. Quadriplex model enhances urine-based detection of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2011; (14): 354-360.
- 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-year follow-up. *Eur Urol* 2009; (56): 260-265.

- Jentzmik F, Schrader A J, de Petriconi R, Hefty R, Mueller J, Doetterl J, Eickhoff A, Schrader M. The ileal neobladder in female patients with bladder cancer: long-term clinical, functional, and oncological outcome. *World J Urol* 2012; (30): 733-739.
- Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, Sjö Dahl G, Robertson A G, Seiler R, Hoadley K A, Groeneveld C S, Al Ahmadie H, Choi W, Castro M A A, Fontugne J, Eriksson P, Mo Q, Kardos J, Zlotta A, Hartmann A, Dinney C P, Bellmunt J, Powles T, Malats N, Chan K S, Kim W Y, McConkey D J, Black P C, Dyrskjot L, Höglund M, Lerner S P, Real F X, Radvanyi F. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol* 2020; (77): 420-433.
- Karakiewicz P I, Benayoun S, Zippe C, Lüdecke G, Boman H, Sanchez-Carbayo M, Casella R, Mian C, Friedrich M G, Eissa S, Akaza H, Huland H, Hedelin H, Rupesh R, Miyanaga N, Sagalowsky A I, Marberger M J, Shariat S F. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 2006; (97): 997-1001.
- Kausch I, Doehn C, Jocham D. Recent improvements in the detection and treatment of nonmuscle-invasive bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; (6): 1301-1311.
- Kavalieris L, O'Sullivan P, Frampton C, Guilford P, Darling D, Jacobson E, Suttie J, Raman J D, Shariat S F, 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.
- Kee K H, Lee M J, Ro J Y. Oncoprotein changes in the flat lesions with atypia and invasive neoplasms of the urinary bladder. *Oncol Rep* 2001; (8): 579-583.
- Kent O A, Chivukula R R, Mullendore M, Wentzel E A, Feldmann G, Lee K H, Liu S, Leach S D, Maitra A, Mendell J T. Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Dev* 2010; (24): 2754-2759.
- Kim B, Semelka R C, Ascher S M, Chalpin D B, Carroll P R, Hricak H. Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1- and T2-weighted MR imaging, dynamic gadolinium-enhanced imaging, and late gadolinium-enhanced imaging. *Radiology* 1994; (193): 239-245.
- Knowles M A. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* 2001; (54): 215-221.
- Knowles M A, Hurst C D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015; (15): 25-41.
- Knowles M A, 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; (53): 133-139.
- 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): 153-157.

- Kundra V, Silverman P M. Imaging in oncology from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Imaging in the diagnosis, staging, and follow-up of cancer of the urinary bladder. *AJR Am J Roentgenol* 2003; (180): 1045-1054.
- Larsen E S, Nordholm A C, Lillebaek T, Holden I K, Johansen I S. The epidemiology of bacille Calmette-Guérin infections after bladder instillation from 2002 through 2017: a nationwide retrospective cohort study. *BJU Int* 2019; (124): 910-916.
- Laxman B, Morris D S, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, Lonigro R J, Tsodikov A, Wei J T, Tomlins S A, Chinnaiyan A M. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res* 2008; (68): 645-649.
- Lee S H, Shin M S, Park W S, Kim S Y, Dong S M, Pi J H, Lee H K, Kim H S, Jang J J, Kim C S, Kim S H, Lee J Y, Yoo N J. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res* 1999; (59): 3068-3072.
- Li X, Chen J, Hu X, Huang Y, Li Z, Zhou L, Tian Z, Ma H, Wu Z, Chen M, Han Z, Peng Z, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, Chen J, Zhao J, Jiang B, Yang H, Gui Y, Cai Z, Zhang X. Comparative mRNA and microRNA expression profiling of three genitourinary cancers reveals common hallmarks and cancer-specific molecular events. *PLoS One* 2011; (6): e22570.
- 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.
- Liu C, Zhang Y, Chen H, Jiang L, Xiao D. Function analysis of rs9589207 polymorphism in miR-92a in gastric cancer. *Tumour Biol* 2016; (37): 4439-4444.
- Liu N, Chen N Y, Cui R X, Li W F, Li Y, Wei R R, Zhang M Y, Sun Y, Huang B J, Chen M, He Q M, Jiang N, Chen L, Cho W C, Yun J P, Zeng J, Liu L Z, Li L, Guo Y, Wang H Y, Ma J. Prognostic value of a microRNA signature in nasopharyngeal carcinoma: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2012; (13): 633-641.
- Liu S, Yang T, Na R, Hu M, Zhang L, Fu Y, Jiang H, Ding Q. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol* 2015; (47): 951-958.
- Llopis J, Alcaraz A, Ribal M J, Soler M, Ventura P J, Barranco M A, Rodriguez A, Corral J M, Carretero P. p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. *Eur Urol* 2000; (37): 644-653.
- Lokeshwar V B, Habuchi T, Grossman H B, Murphy W M, Hautmann S H, Hemstreet G P, III, Bono A V, Getzenberg R H, Goebell P, Schmitz-Dräger B J, Schalken J A, Fradet Y, Marberger M, Messing E, Droller M J. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005; (66): 35-63.
- Lotan Y, Roehrborn C G. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003; (61): 109-118.
- Lotan Y, Shariat S F, Schmitz-Dräger B J, Sanchez-Carbayo M, Jankevicius F, Racioppi M, Minner S J, Stöhr B, Bassi P F, Grossman H B. Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; (28): 441-448.

- Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, Thalmann G N, Danuser H, Markwalder R, Studer U E. Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2003; (21): 690-696.
- Marcar L, Maclaine N J, Hupp T R, Meek D W. Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 2010; (70): 10362-10370.
- Marín-Aguilera M, Mengual L, Ribal M J, Burset M, Arce Y, Ars E, Oliver A, Villavicencio H, Algaba F, Alcaraz A. Utility of a multiprobe fluorescence in situ hybridization assay in the detection of superficial urothelial bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; (173): 131-135.
- McLennan M T. Interstitial cystitis: epidemiology, pathophysiology, and clinical presentation. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2014; (41): 385-395.
- Meilleroux J, Daniel G, Aziza J, d'Aure D M, Quintyn-Ranty M L, Basset C M, Evrard S M, Courtade-Saidi M M. One year of experience using the Paris System for Reporting Urinary Cytology. *Cancer Cytopathol* 2018; (126): 430-436.
- Mengual L, Burset M, Ars E, Ribal M J, Lozano J J, 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): 1347-1355.
- Mengual L, Burset M, Ribal M J, 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): 2624-2633.
- Mengual L, Lozano J J, Ingelmo-Torres M, Gazquez C, Ribal M J, Alcaraz A. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *Int J Cancer* 2013; (133): 2631-2641.
- Miah S, Dudzic E, Drayton R M, Zlotta A R, Morgan S L, Rosario D J, Hamdy F C, Catto J W. An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer. *Br J Cancer* 2012; (107): 123-128.
- Milosevic M, Gospodarowicz M, Zietman A, Abbas F, Haustermans K, Moonen L, Rödel C, Schoenberg M, Shipley W. Radiotherapy for bladder cancer. *Urology* 2007; (69): 80-92.
- Mitra A P, Hansel D E, Cote R J. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. *Semin Oncol* 2012; (39): 524-533.
- Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S, Iwasaki Y, Kubota Y. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer* 1995; (71): 831-835.
- Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ* 2013; (20): 1603-1614.
- Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths T R, 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.

- Na R, Wu Y, Jiang G, Yu H, Lin X, Wang M, Conran C A, Fantus R J, Zhang N, Liu S, Helfand B T, Zheng S L, Isaacs W B, Ding Q, Shen Z, Xu J. Germline mutations in DNA repair genes are associated with bladder cancer risk and unfavourable prognosis. *BJU Int* 2018; (122): 808-813.
- Necchi A, Anichini A, Raggi D, Briganti A, Massa S, Lucianò R, Colecchia M, Giannatempo P, Mortarini R, Bianchi M, Farè E, Monopoli F, Colombo R, Gallina A, Salonia A, Messina A, Ali S M, Madison R, Ross J S, Chung J H, Salvioni R, Mariani L, Montorsi F. Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol* 2018; (36): 3353-3360.
- Noguchi S, Yasui Y, Iwasaki J, Kumazaki M, Yamada N, Naito S, Akao Y. Replacement treatment with microRNA-143 and -145 induces synergistic inhibition of the growth of human bladder cancer cells by regulating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Cancer Lett* 2013; (328): 353-361.
- O'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M, Davidson P, Gilling P, Cambridge L, Harvey J, Toro T, Giles N, Luxmanan C, Alves C F, Yoon H S, Hinder V, Masters J, Kennedy-Smith A, Beaven T, Guilford P J. A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol* 2012; (188): 741-747.
- Orlow I, Lianes P, Lacombe L, Dalbagni G, Reuter V E, Cordon-Cardo C. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res* 1994; (54): 2848-2851.
- Pais H, Nicolas F E, Soond S M, Swingler T E, Clark I M, Chantry A, Moulton V, Dalmay T. Analyzing mRNA expression identifies Smad3 as a microRNA-140 target regulated only at protein level. *RNA* 2010; (16): 489-494.
- Pashos C L, Botteman M F, Laskin B L, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract* 2002; (10): 311-322.
- Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2006; (3): 327-340.
- Perlis N, Zlotta A R, Beyene J, Finelli A, Fleshner N E, Kulkarni G S. Immediate post-transurethral resection of bladder tumor intravesical chemotherapy prevents non-muscle-invasive bladder cancer recurrences: an updated meta-analysis on 2548 patients and quality-of-evidence review. *Eur Urol* 2013; (64): 421-430.
- Pierconti F, Martini M, Fiorentino V, Cenci T, Capodimonti S, Straccia P, Sacco E, Pugliese D, Cindolo L, Larocca L M, Bassi P F. The combination cytology/epicheck test in non muscle invasive bladder carcinoma follow-up: Effective tool or useless expence? *Urol Oncol* 2020.
- 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; (106): 1177-1186.
- Platt F M, Hurst C D, Taylor C F, Gregory W M, Harnden P, Knowles M A. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2009; (15): 6008-6017.

- Ploussard G, Dubosq F, Soliman H, Verine J, Desgrandchamps F, De ThÃ© H, Mongiat-Artus P. Prognostic value of loss of heterozygosity at chromosome 9p in non-muscle-invasive bladder cancer. *Urology* 2010; (76): 513-518.
- Puerta-Gil P, García-Baquero R, Jia A Y, Ocaña S, Alvarez-Múgica M, Alvarez-Ossorio J L, Cordon-Cardo C, Cava F, Sánchez-Carbayo M. miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Am J Pathol* 2012; (180): 1808-1815.
- Raitanen M P, Aine R, Rintala E, Kallio J, Rajala P, Juusela H, Tammela T L. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol* 2002; (41): 284-289.
- Rebouissou S, Héroult A, Letouzé E, Neuzillet Y, Laplanche A, Ofualuka K, Maillé P, Leroy K, Riou A, Lepage M L, Vordos D, de la T A, Denoux Y, Sibony M, Guyon F, Lebreton T, Benhamou S, Allory Y, Radvanyi F. CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *J Pathol* 2012; (227): 315-324.
- Ren P, Gong F, Zhang Y, Jiang J, Zhang H. MicroRNA-92a promotes growth, metastasis, and chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Tumour Biol* 2016; (37): 3215-3225.
- Roperch J P, 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; (16): 704.
- Rosser C J, Liu L, Sun Y, Villicana P, McCullers M, Porvasnik S, Young P R, Parker A S, Goodison S. Bladder cancer-associated gene expression signatures identified by profiling of exfoliated urothelia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; (18): 444-453.
- Roupret M, Gontero P, McCracken S R C, Dudderidge T, Stockley J, Kennedy A, Rodriguez O, Sieverink C, Vanié F, Allasia M, Witjes J A, Colombel M, Sylvester R, Longo F, Montanari E, Palou J. Diagnostic Accuracy of MCM5 for the Detection of Recurrence in Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Followup: A Blinded, Prospective Cohort, Multicenter European Study. *J Urol* 2020; (204): 685-690.
- Sanguedolce F, Bufo P, Carrieri G, Cormio L. Predictive markers in bladder cancer: do we have molecular markers ready for clinical use? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; (51): 291-304.
- Sanli O, Dobruch J, Knowles M A, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen M E, Lotan Y. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2017; (3): 17022.
- Schee K, Boye K, Abrahamsen T W, Fodstad Å, Flatmark K. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012; (12): 505.
- Schetter A J, Leung S Y, Sohn J J, Zanetti K A, Bowman E D, Yanaihara N, Yuen S T, Chan T L, Kwong D L, Au G K, Liu C G, Calin G A, Croce C M, Harris C C. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; (299): 425-436.

- Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinat fluorescence cystoscopy. *J Urol* 2004; (171): 135-138.
- Schmitz-Dräger B J, Droller M, Lokeshwar V B, Lotan Y, Hudson M A, van Rhijn B W, Marberger M J, Fradet Y, Hemstreet G P, Malmstrom P U, Ogawa O, Karakiewicz P I, Shariat S F. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urol Int* 2015; (94): 1-24.
- Schratt G. microRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2009; (10): 842-849.
- Scosyrev E, Noyes K, Feng C, Messing E. Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Cancer* 2009; (115): 68-74.
- Shariat S F, Karakiewicz P I, Palapattu G S, Lotan Y, Rogers C G, Amiel G E, Vazina A, Gupta A, Bastian P J, Sagalowsky A I, Schoenberg M P, Lerner S P. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. *J Urol* 2006; (176): 2414-2422.
- Shariat S F, Kim J, Raptidis G, Ayala G E, Lerner S P. Association of p53 and p21 expression with clinical outcome in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology* 2003; (61): 1140-1145.
- Shariat S F, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala G E, Benedict W F, Lerner S P. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2004; (22): 1014-1024.
- Shelley M D, Wilt T J, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason M D. Intravesical bacillus Calmette-Guérin 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): 485-490.
- Sherman A B, Koss L G, Adams S E. Interobserver and intraobserver differences in the diagnosis of urothelial cells. Comparison with classification by computer. *Anal Quant Cytol* 1984; (6): 112-120.
- 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): 708-713.
- Simoneau A R, Spruck C H, III, Gonzalez-Zulueta M, Gonzalgo M L, Chan M F, Tsai Y C, Dean M, Steven K, Horn T, Jones P A. 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; (56): 5039-5043.
- Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, Patschan O, Aine M, Fernö M, Ringnér M, Månsson W, Liedberg F, Lindgren D, Höglund M. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; (18): 3377-3386.
- Sjödahl 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): 681-691.
- Smith A L, Robin T P, Ford H L. Molecular pathways: targeting the TGF- β pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2012; (18): 4514-4521.

- Soloway M S, Sofer M, Vaidya A. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2002; (167): 1573-1583.
- Soukup V, Babjuk M, Bellmunt J, Dalbagni G, Giannarini G, Hakenberg O W, Herr H, Lechevallier E, Ribal M J. Follow-up after surgical treatment of bladder cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol* 2012; (62): 290-302.
- Stein J P, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng A C, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner D G. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 2001; (19): 666-675.
- Stein J P, Skinner D G. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure. *World J Urol* 2006; (24): 296-304.
- Steinmaus C M, Nunez S, Smith A H. Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *Am J Epidemiol* 2000; (151): 693-702.
- Stenzl A. Words of wisdom. Re: sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Eur Urol* 2010; (57): 729.
- Sternberg C N, 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): 1644-1652.
- Strosberg J, El Haddad G, Wolin E, Hendifar A, Yao J, Chasen B, Mittra E, Kunz P L, Kulke M H, Jacene H, Bushnell D, O'Dorisio T M, Baum R P, Kulkarni H R, Caplin M, Lebtahi R, Hobday T, Delpassand E, Van Cutsem E, Benson A, Srirajaskanthan R, Pavel M, Mora J, Berlin J, Grande E, Reed N, Seregni E, Öberg K, Lopera S M, Santoro P, Thevenet T, Erion J L, Ruzsniwski P, Kwekkeboom D, Krenning E. Phase 3 Trial of (177)Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med* 2017; (376): 125-135.
- Strosberg J R, Yao J C, Bajetta E, Aout M, Bakker B, Hainsworth J D, Ruzsniwski P B, Van Cutsem E, Öberg K, Pavel M E. Efficacy of octreotide long-acting repeatable in neuroendocrine tumors: RADIANT-2 placebo arm post hoc analysis. *Endocr Relat Cancer* 2015; (22): 933-940.
- Sylvester R J, Oosterlinck W, Holmang S, Sydes M R, Birtle A, Gudjonsson S, De Nunzio C, Okamura K, Kaasinen E, Solsona E, Ali-El-Dein B, Tatar C A, Inman B A, N'Dow J, Oddens J R, Babjuk M. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol* 2016; (69): 231-244.
- Sylvester R J, Oosterlinck W, van der Meijden A P. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2004; (171): 2186-90, quiz.
- Sylvester R J, van der Meijden A P, Lamm D L. 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* 2002; (168): 1964-1970.

- Sylvester R J, van der Meijden A P, Oosterlinck W, Witjes J A, Bouffoux C, Denis L, Newling D W, 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): 466-5.
- Urist M J, Di Como C J, Lu M L, Charytonowicz E, Verbel D, Crum C P, Ince T A, McKeon F D, Cordon-Cardo C. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol* 2002; (161): 1199-1206.
- Urquidi V, Goodison S, Cai Y, Sun Y, Rosser C J. A candidate molecular biomarker panel for the detection of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; (21): 2149-2158.
- Valenberg F J P V, Hiar A M, Wallace E, Bridge J A, Mayne D J, Beqaj S, Sexton W J, Lotan Y, Weizer A Z, Jansz G K, Stenzl A, Danella J F, Shepard B, Cline K J, Williams M B, Montgomery S, David R D, Harris R, Klein E W, Bradford T J, Wolk F N, Westenfelder K R, Trainer A F, Richardson T A, Egerdie R B, Goldfarb B, Zadra J A, Ge S, Zhao S, Simon I M, Campbell S A, Rhees B, Bates M P, Higuchi R G, Witjes J A. Prospective Validation of an mRNA-based Urine Test for Surveillance of Patients with Bladder Cancer. *Eur Urol* 2019; (75): 853-860.
- van der Meijden A P, Sylvester R J, Oosterlinck W, Hoeltl W, Bono A V. Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol* 2003; (44): 429-434.
- Veerla S, Lindgren D, Kvist A, Frigyesi A, Staaf J, Persson H, Liedberg F, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Mönsson W, Rovira C, Höglund M. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int J Cancer* 2009; (124): 2236-2242.
- Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nat Rev Drug Discov* 2013; (12): 433-446.
- Wang G, Chan E S, Kwan B C, Li P K, Yip S K, Szeto C C, Ng C F. Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2012; (10): 106-113.
- Wang M, Du M, Ma L, Chu H, Lv Q, Ye D, Guo J, Gu C, Xia G, Zhu Y, Ding Q, Yuan L, Fu G, Tong N, Qin C, Yin C, Xu J, Zhang Z. A functional variant in TP63 at 3q28 associated with bladder cancer risk by creating an miR-140-5p binding site. *Int J Cancer* 2016; (139): 65-74.
- Weber J A, Baxter D H, Zhang S, Huang D Y, Huang K H, Lee M J, Galas D J, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; (56): 1733-1741.
- Wijkström H, Norming U, Lagerkvist M, Nilsson B, NÅrslund I, Wiklund P. Evaluation of clinical staging before cystectomy in transitional cell bladder carcinoma: a long-term follow-up of 276 consecutive patients. *Br J Urol* 1998; (81): 686-691.
- Witjes J A, Douglass J. The role of hexaminolevulinat fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2007; (4): 542-549.
- Witjes J A, Morote J, Cornel E B, Gakis G, van Valenberg F J P, Lozano F, Sternberg I A, Willemsen E, Hegemann M L, Paitan Y, Leibovitch I. Performance of the Bladder EpiCheckâ„¢ Methylation Test for Patients Under Surveillance for Non-muscle-invasive

- Bladder Cancer: Results of a Multicenter, Prospective, Blinded Clinical Trial. *Eur Urol Oncol* 2018; (1): 307-313.
- Wolff E M, Liang G, Jones P A. Mechanisms of Disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2005; (2): 502-510.
- Wong N, Khwaja S S, Baker C M, Gay H A, Thorstad W L, Daly M D, Lewis J S, Jr., Wang X. Prognostic microRNA signatures derived from The Cancer Genome Atlas for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Med* 2016; (5): 1619-1628.
- Wu X R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005; (5): 713-725.
- Yafi F A, Brimo F, Steinberg J, Aprikian A G, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol* 2015; (33): 66-31.
- 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.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens R M, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin G A, Liu C G, Croce C M, Harris C C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; (9): 189-198.
- Yang H, Fang F, Chang R, Yang L. MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor β 2 receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013; (58): 205-217.
- Yu Z, Yue W, Jiuzhi L, Youtao J, Guofei Z, Wenbin G. The risk of bladder cancer in patients with urinary calculi: a meta-analysis. *Urolithiasis* 2018; (46): 573-579.
- Záveský L, Jandáková E, Turyna R, Langmeierová L, Weinberger V, Záveská D L, Hulková M, Horínek M, Duáková D, Feyereisl J, Minár, L, Kohoutová M. Evaluation of Cell-Free Urine microRNAs Expression for the Use in Diagnosis of Ovarian and Endometrial Cancers. A Pilot Study. *Pathol Oncol Res* 2015; (21): 1027-1035.
- Zhai H, Fesler A, Ba Y, Wu S, Ju J. Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy. *Oncotarget* 2015; (6): 19735-19746.
- Zhao J Y, Wang F, Li Y, Zhang X B, Yang L, Wang W, Xu H, Liu D Z, Zhang L Y. Five miRNAs Considered as Molecular Targets for Predicting Esophageal Cancer. *Med Sci Monit* 2015; (21): 3222-3230.

