



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO:

FISIOLÓGÍA

TESIS DOCTORAL

**Estudio de la utilidad clínica de los microARNs en
suero y orina de pacientes con cáncer de vejiga**

ANA CASTELLÓ PORCAR

DIRECTORES:

FRANCISCO DASÍ FERNÁNDEZ

JOSE MARÍA MARTÍNEZ JABALOYAS

Valencia, Marzo de 2022

Francisco Dasí Fernández, doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València, Investigador Miguel Servet, Investigador Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia / Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA y *José María Martínez Jabaloyas*, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: ***”Estudio de la utilidad clínica de los microARNs en suero y orina de los pacientes con cáncer de vejiga”***, presentada por Ana Castelló Porcar, para optar al Grado de Doctor de la Universitat de València, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, a 26 de marzo de 2022.

FIRMADO:

Prof.Dr. Fco Dasí Fernández Prof.Dr. J.M Martínez Jabaloyas

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Martínez Jabaloyas y al Dr Dasí por confiar en mi para este proyecto; por guiarme y apoyarme, por mostrarme el mundo de la investigación básica y su importancia.

A las compañeras de enfermería tanto de las Consultas Externas de Urología como de la UTQ, sin su colaboración no hubiera sido posible la recogida de las muestras biológicas.

A Sara Pastor por estar siempre disponible para la recogida de las muestras y su correcta preservación.

A Ana Reula por su minucioso trabajo de laboratorio y su paciencia al explicarme todos los procedimientos.

Al Dr Martínez García por enseñarme a crear bases de datos para que pudiera llevar a cabo este proyecto.

A mis amigos Paloma Marqués y Pablo Ruiz por ayudarme con el formato.

A mis padres, mis hermanos y mi marido por apoyarme siempre y no dudar nunca de mi capacidad.

RESUMEN

Introducción: El diagnóstico del tumor vesical requiere en muchos de los casos de un procedimiento invasivo. Los miARNs son un tipo de ARN no codificante que poseen la capacidad de regular la expresión génica por diversos mecanismos. Investigaciones recientes han permitido conocer los perfiles de expresión global de los miARNs en líneas celulares, en tejidos de cáncer de vejiga, sangre y orina, permitiendo demostrar su utilidad en el diagnóstico no invasivo, pronóstico y respuesta al tratamiento de esta enfermedad.

Objetivos: Nuestro objetivo es demostrar la utilidad diagnóstica y pronóstica de los miARNs en suero y orina para el diagnóstico de neoplasia vesical.

Material y método: Estudio de casos y controles prospectivo. En el grupo control se seleccionaron pacientes en seguimiento en las consultas de urología sin enfermedad oncológica, infecciosa ni inflamatoria. El grupo de casos eran pacientes diagnosticados de tumor vesical pendiente de confirmación mediante RTU, sin otra patología oncológica. Se tomó una muestra de orina por micción espontánea y una muestra de sangre en el momento de la canalización de la vía periférica previamente al procedimiento quirúrgico. Las muestras fueron remitidas al laboratorio donde se llevó a cabo la extracción de miARN de las mismas, el almacenamiento y posteriormente la ampliación de los miARN mediante RT-PCR. Las variables estudiadas fueron la edad, diabetes mellitus, hipertensión, dislipemia, hábito tabáquico y los miRNA 200b

(103), 200b (191), 33(103), 33(191), 92(103), 92(191) en suero y 187, 142 y 140 en orina.

Resultados: Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante con el miARN 200b en suero para distinguir entre casos y controles. Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos con tumor vesical músculo-invasivo y no músculo-invasivo para los miARNs en orina 187, 142 y 140.

Conclusiones: No hemos obtenido un grupo de miARNs que nos de un valor diagnóstico y pronóstico para el tumor vesical, pero si hemos encontrado algunos hallazgos que podrían ser de utilidad en investigaciones futuras.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGO2	Proteína Argonauta
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CEIm	Comité de Ética de la investigación con medicamentos
CIS	Carcinoma in situ
CUETO	Club Urológico Español de tratamiento oncológico
DGCR8	Di George syndrome critical region 8 gene
EBRT	Radioterapia externa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EORTC	European Organization of Research and Treatment of Cancer
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valencia
IMRT	Radioterapia de intensidad modulada
miARN/miR	Micro ARN
NPM	Proteína de matriz nuclear
NUPBPM	Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli-A	Poli-Adeninas

Pre-miARN	Precursor ARN
Pri-miARN	Primary miRNA transcript
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
ROC	Receiver operating characteristic curve
RT	Reacción de retrotranscripción
RT-PCR	Reacción de cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RTU	Resección transuretral
TC	Tomografía computarizada
TNM	Tumor node metastasis
TV	Tumor vesical
TVNMI	Tumor vesical no músculo-invasivo
TVMI	Tumor vesical músculo-invasivo
UICC	Unión internacional contra el cáncer

ÍNDICE

1. Introducción: Tumor vesical.....	1
1.1 Epidemiología.....	3
1.2 Etiología.....	4
1.3 Histopatología.....	6
1.4 Clasificación.....	7
1.4.1 Estadio.....	10
1.4.2 Grado histológico.....	11
1.4.2.1 Grado histológico en TVNMI.....	11
1.4.2.2 Grado histológico en TVMI.....	15
1.5 Evaluación diagnóstica.....	16
1.5.1 Anamnesis.....	16
1.5.2 Síntomas.....	16
1.5.3 Exploración física.....	17
1.5.4 Pruebas de imagen.....	17
1.5.4.1 Ecografía transabdominal.....	17
1.5.4.2 Tomografía computarizada.....	18
1.5.4.2 Urografía intravenosa.....	19

1.5.4.3 Cistoscopia.....	19
1.5.5 Citología y marcadores urinario.....	20
1.5.5.1 UroVysion.....	21
1.5.5.2 Análisis de microsatélites.....	22
1.5.5.3 Inmunocitología.....	22
1.5.5.4 Otros.....	22
1.6 Manejo del tumor vesical.....	23
2. Introducción: microARNs.....	25
2.1 Historia de los microARNs.....	27
2.2 Biogénesis de los microARNs.....	27
2.2.1 Ruta canónica.....	28
2.2.2 miRtrons.....	29
2.2.3 snoARN.....	29
2.2.4 Endo-siARN.....	30
2.2.5 Pre-tARN.....	30
2.3 Mecanismo de acción de los microARNs.....	30
2.4 miARNs circulantes.....	31
2.5 Funciones biológicas e implicación en la transformación maligna.....	32
3. Hipótesis del estudio y objetivos.....	35
3.1 Hipótesis del estudio.....	37

3.2 Objetivos.....	37
4. Material y método.....	39
4.1 Pacientes.....	41
4.2 Aspectos éticos.....	42
4.3 Muestras biológicas.....	42
4.4 Extracción de miARNs.....	44
4.4.1 Extracción de miARNs en suero.....	44
4.4.2 Extracción de miARNs en orina.....	44
4.5 Amplificación mediante RT-PCR.....	45
4.5.1 Reacción de retrotranscripción.....	45
4.5.2 Determinación de la expresión de microARNs..	45
4.5.3 Análisis de los resultados.....	46
4.6 Selección de microARNs.....	46
4.7 Recogida de datos.....	47
4.8 Análisis estadístico.....	48
4.8.1 Casos y controles.....	48
4.8.2 TVMI y TVNMI.....	49
4.8.3 TVNMI: grupos de riesgo.....	50
4.8.4 TVMI.....	51
5. Resultados.....	53

5.1 Casos y controles.....	55
5.2 Tumores vesicales músculo-invasivos y no músculo-invasivos.....	62
5.3 Tumores vesicales no musculo-invasivos: grupos de riesgo.....	67
5.4 Tumores vesicales músculo-invasivos.....	73
6. Discusión.....	75
6.1 miARNs en suero.....	77
6.2 miARNs en orina.....	81
7. Fortalezas y limitaciones del estudio.....	89
7.1 Fortalezas del estudio.....	91
7.2 Limitaciones del estudio.....	91
8. Conclusiones.....	93
9. Bibliografía.....	97
10. Anexos.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capas de la vejiga.....7

Figura 2. Esquema tumor vesical en según el grado de invasión de las capas de la vejiga.....8

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. TNM 2017, cáncer de vejiga.....	9
Tabla 2. Clasificación OMS 1973 y 2004.....	12
Tabla 3. Clasificación de lesiones planas.....	13
Tabla 4. Grupos de riesgo de la Asociación Europea de Urología.....	14
Tabla 5. Resumen de los marcadores urinarios más establecidos.....	21
Tabla 6. Comparación de variables demográficas cualitativas entre grupos de casos y controles.....	55
Tabla 7. Comparación de los distintos miARNs entre grupos de casos y controles.....	56
Tabla 8. Tabla de contingencia con los diferentes miARNs como variables dicotómicas.....	58
Tabla 9. Tabla de contingencia con los diferentes miARNs como variables dicotómicas en función de su mejor punto en la curva ROC entre los grupos de casos y controles.....	60
Tabla 10. Comparación casos y controles con los miARNs con expresión.....	61
Tabla 11. Comparación de variables cualitativas entre los grupos de TVMI y TVNMI.....	62

Tabla 12. Comparación de los distintos miARNs entre los grupos de casos.....	64
Tabla 13. Comparación de frecuencias en cuanto a expresión o no expresión de los miARN 187, 142 y 140 en orina	66
Tabla 14. Comparación de los diferentes miARNs entre los tres grupos de riesgo.....	67
Tabla 15. Comparación entre los grupos de riesgo y miARNs como variables dicotómicas.....	70
Tabla 16. Comparación entre grupos de riesgo y miARNs en función de sus curvas ROC.....	71
Tabla 17. Comparación de los diferentes miARNs con expresión y los grupos de riesgo.....	72
Tabla 18. Comparación de los diferentes miARNs y la mortalidad cáncer específica.....	73

1. Introducción: Tumor vesical

1.1 Epidemiología

El cáncer de vejiga es el décimo tumor más diagnosticado en el mundo, con un número estimado de 550.000 nuevos casos y 200.000 muertes. La enfermedad es más frecuente en los hombres, en los que es el séptimo tumor más común, mientras que en las mujeres es el 17 más común. (1,2). Las tasas de incidencia estandarizada en el mundo (por 100.000 personas/año) son de 9.0 en los hombres y de 2.2 en las mujeres. La mortalidad estandarizada en el mundo (por 100.000 personas/año) es de 3.2 para hombres y de 0.9 para mujeres(3).

En Europa, la incidencia estandarizada es de 19.1 en hombres y 4.0 en mujeres, observándose diferencias regionales entre los diferentes países (4).

En España, el tumor vesical es el cuarto más frecuente, con cerca de 22.000 nuevos casos diagnosticados cada año. Según los resultados del estudio EPICAV llevado a cabo en 2011, la incidencia por edad ajustada en nuestro país es de 24.93 casos/100.000 habitantes (5).

La incidencia y la mortalidad del cáncer de vejiga varía en función de los diferentes países y eso es debido a diferencias en los factores de riesgo, diferente práctica de detección y diagnóstico y a la disponibilidad de los tratamientos (6)(7). La incidencia y la mortalidad de este tumor está descendiendo en muchos registros y esto puede ser debido a cambios tanto en la exposición a factores de riesgo como a una detección más temprana de la enfermedad (8).

1.2 Etiología

El hábito tabáquico es el factor de riesgo más importante para sufrir esta enfermedad (9). El humo del tabaco contiene aminas aromáticas e hidrocarburos policíclicos que son excretados por el riñón y su contacto con el urotelio, especialmente el vesical, por permanecer más tiempo expuesto a la orina, actuaría como carcinógeno tisular. El tabaco ocasiona aproximadamente el 50% de los casos de cáncer de vejiga. La incidencia está relacionada directamente con el tiempo y la cantidad de cigarrillos consumidos por día (10). Se ha objetivado una disminución inmediata en el riesgo de sufrir cáncer vesical en los pacientes que abandonan el hábito, siendo la reducción del riesgo de hasta un 40% en los primeros 4 años y de hasta un 60% a partir de los 25 años.

El segundo factor de riesgo más importante para el desarrollo de una neoplasia vesical es la exposición ocupacional a carcinógenos como las aminas aromáticas, los hidrocarburos policíclicos aromáticos e hidrocarburos clorados. Estos compuestos han sido identificados como compuestos promotores de la carcinogénesis, ocasionando hasta el 10-25% de los casos. Este tipo de exposición ocupacional ocurre generalmente en la industria textil, pinturas y tintes, metalurgia y derivados del petróleo (11)(12) . El riesgo de desarrollar un tumor vesical por exposición ocupacional a las aminas aromáticas es significativamente mayor a partir de los 10 años de exposición, aunque el periodo de latencia medio a menudo excede los 30 años (13)(14). Debido a las estrictas regulaciones y medidas de seguridad en los ambientes laborales, está disminuyendo la atribución

ocupacional de padecer cáncer de vejiga en hombres al 7,1%.

Otro factor de riesgo es la radioterapia previa. El riesgo relativo de sufrir segundas neoplasias tras el tratamiento de tumores ginecológicos con radioterapia externa (EBRT) es de 2-4. Estudios más actuales demuestran que la asociación de técnicas más avanzadas como la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) en el tratamiento de cáncer de próstata no se asocia a un aumento de neoplasias vesicales o rectales, pero sí al aumento de los melanomas. Sin embargo, dado que los tumores vesicales tienen un periodo de latencia largo y no existen resultados a largo plazo, se considera que los pacientes con larga esperanza de vida y tratados con radioterapia pélvica presentan un riesgo aumentado de desarrollar un tumor vesical (15).

La esquistosomiasis es la segunda infección por parásitos más frecuente después de la malaria. Está infección es un factor de riesgo bien establecido para el cáncer de vejiga variedad escamosa. El carácter endémico de esta infección en países como Egipto, Kuwait, Iraq y Zambia hace que la incidencia de esta enfermedad esté aumentada en estos países.

Otros factores como la infección urinaria crónica y la administración de ciclofosfamida, también aumentan el riesgo de padecer cáncer de vejiga.

Cada vez hay más datos acerca de la influencia de los factores de susceptibilidad genética y la asociación familiar en el cáncer de vejiga. Un estudio español relacionó la asociación entre sufrir este cáncer con la historia familiar. El riesgo de presentar un tumor vesical

aumentaba significativamente en aquellas personas con un familiar de primer grado afecto de este cáncer, siendo esta asociación mayor en pacientes jóvenes; aunque podría haber factores ambientales que se comportaran como factores de confusión (16).

Por último, en un estudio prospectivo llevado a cabo sobre una cohorte de 477.321 personas en 10 países europeos, se ha descrito la asociación inversa entre la ingesta de flavonoides y lignanos y el riesgo de presentar un cáncer de vejiga (17).

1.3 Histopatología

La pared vesical posee cuatro capas (figura 1):

1. Urotelio: epitelio pseudoestratificado que recubre la parte interna de la pared vesical. A este estrato se le denomina también mucosa.
2. Lámina propia: separada del epitelio por abundante tejido conectivo. En esta capa se encuentra una fina capa muscular a veces incompleta, la *muscularis mucosae*. A este estrato se le denomina también submucosa.
3. Muscular propia (detrusor).
4. Serosa: tejido conectivo rodeado de grasa que separa a la vejiga de los tejidos circundantes.

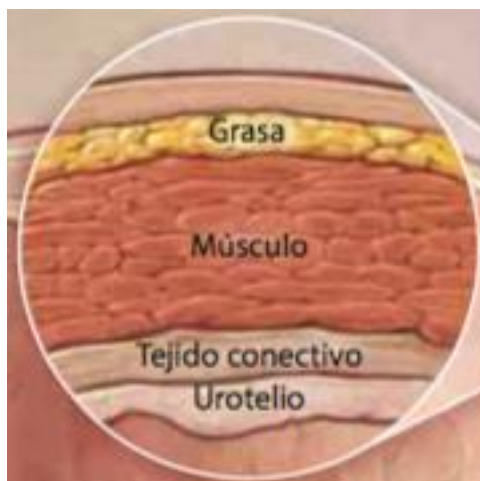


Figura 1. Capas de la vejiga(18).

El tipo más común de cáncer de vejiga, representando el 90-95% de estas neoplasias, es el carcinoma de células de transición, que se desarrolla en las células uroteliales. Otros tipos de cáncer de vejiga menos frecuentes incluyen el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma, junto a otras estirpes, representando solo el 5% de estas neoplasias.

1.4 Clasificación

El grado y el estadio tumoral determinan el comportamiento y el pronóstico de la enfermedad.

Aproximadamente el 75% de los pacientes diagnosticados de tumor vesical presentan una enfermedad confinada a la mucosa (estadio Ta o carcinoma *in situ* [CIS]) o a la submucosa (estadio T1), son los llamados tumores vesicales no músculo-invasivos (TVNMI). Estos tumores presentan una tasa de supervivencia a 5 años del 95% cuando se encuentran confinados en la mucosa, presentando altas

tasas de recurrencia, pero menores tasas de progresión. Sin embargo, cuando estos tumores invaden la lamina propia (T1) presentan altas tasas de recurrencia y un peor pronóstico. El 20% de los pacientes presentan tumores con invasión de la capa muscular (estadio T2-T4) y son llamados tumores vesicales músculo-invasivos (TVMI) presentando altas tasas de mortalidad cáncer específica y el 5% son tumores metastáticos en el momento del diagnóstico (19) (figura 2). La clasificación TNM (tumor, ganglios y metástasis) de los tumores malignos es el método más utilizado para clasificar el grado de diseminación del cáncer. La clasificación TNM 2009 aprobada por la Unión International Contra el Cancer (UICC) ha sido revisada en 2017 (tabla 1) sin presentar ningún cambio en los tumores de vejiga.

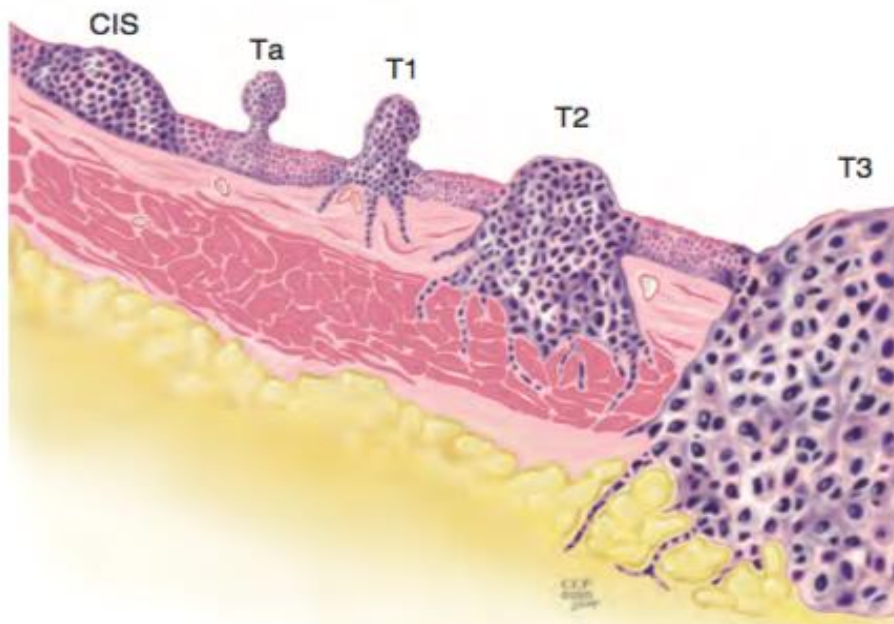


Figura 2. Esquema tumor vesical en según el grado de invasión de las capas de la vejiga(20)

Tabla 1. TNM 2017, cáncer de vejiga (4)

T. Tumor primario	
Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Ausencia de tumor
Ta	Tumor papilar que afecta a la mucosa
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> , lesión plana
T1	Tumor que invade lámina propia
T2	Tumor que invade la muscular propia
	T2a <i>Tumor que invade la capa muscular superficial (capa interna)</i>
	T2b <i>Tumor que invade la capa muscular profunda (capa externa)</i>
T3	Tumor que invade el tejido perivesical
	T3a <i>Microscópicamente</i>
	T3b <i>Macroscópicamente (masa extravesical)</i>
T4	El tumor invade cualquiera de las siguientes estructuras: próstata, utero, vagina, pared de la pelvis o pared abdominal
	T4a <i>El tumor invade la próstata (invasión estroma), el útero o la vagina</i>
	T4b <i>El tumor invade la pared de la pelvis o la pared abdominal</i>

N Ganglios linfáticos regionales	
Nx	No se pueden evaluar lo ganglios linfáticos
N0	Ausencia de metástasis en ganglio linfáticos
N1	Metástasis en un ganglio linfático de la pelvis verdadera (hipogástrico, obturador, iliaco externo, presacro)
N2	Metástasis múltiples en pelvis verdadera (hipogástrico, obturador, iliaco externo, presacro)
N3	Metástasis en ganglios de la cadena iliaca primitiva

M Metástasis a distancia	
Mx	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
M0	Ausencia metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

1.4.1 Estadío

El elemento más importante en la estadificación patológica del tumor vesical es la profundidad de la invasión de la pared.

La séptima versión de la clasificación TNM de la UICC (Unión International Contra el Cáncer) que está actualmente en uso, no

establece la subestadificación de los T1, pero se recomienda, si es posible, determinar si la invasión se encuentra por encima o por debajo de la *muscularis mucosae*, ya que podrían existir diferencias en cuanto al pronóstico.

1.4.2 Grado histológico

Es el grado de diferenciación celular. Tiene una gran importancia en los tumores que no infiltran la muscular propia, ya que marca una gran diferencia en cuanto a riesgo de recidiva, riesgo de progresión y como factor pronóstico en los tumores confinados a la mucosa y a la submucosa.

1.4.2.1 Tumores vesicales no músculo-invasivos

Actualmente coexisten la clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) de 1973 y de 2004 (tabla 2).

En la clasificación de la OMS de 1973 las células se diferencian en grado 1 como bien diferenciadas, grado 2 como moderadamente diferenciadas y grado 3 como pobremente diferenciadas.

En la clasificación de la OMS de 2004 se clasifican sólo en dos, bajo grado y alto grado.

Tabla 2. Clasificación OMS 1973 y 2004(4).

Clasificación de la OMS de 1973	
Grado 1	Bien diferenciado
Grado 2	Moderadamente diferenciado
Grado 3	Pobrementemente diferenciado
Clasificación de la OMS 2004	
Papiloma urotelial	
Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno NUPBPM	
Carcinoma urotelial papilar de bajo grado	
Carcinoma urotelial papilar de alto grado	

Se han descrito factores patológicos adversos en el tumor vesical no músculo-invasivo. La presencia de invasión linfovascular, variante micropapilar, variante en nidos, variante sarcomatoide y variante escamosa han sido relacionados con un comportamiento más agresivo.

El carcinoma *in situ*, clínicamente se caracteriza por ser, lesiones planas (tabla 3), hiperémicas, aterciopeladas y, por definición, son de alto grado histológico (21). Se clasifican en:

- Primario: CIS aislado sin lesiones papilares concomitantes ni antecedentes de CIS previo.
- Secundario: CIS detectado en el seguimiento de un tumor vesical sin antecedentes previos de CIS.
- Concurrente: CIS concomitante con un tumor papilar.
- Recurrente: CIS aislado después de una respuesta efectiva a la terapia intravesical.

Tabla 3. Clasificación lesiones planas(4).

Lesiones planas. OMS 2004
Hiperplasia (lesión plana sin atipia, sin aspecto papilar)
Atipia reactiva (lesión plana sin atipia)
Atipia de significado incierto
Displasia urotelial
Carcinoma <i>in situ</i> (siempre de alto grado)

Los tumores vesicales no músculo-invasivos son entidades muy heterogéneas, de modo que para establecer un adecuado pronóstico no es suficiente clasificar a los pacientes en grado y estadio, por lo que se han creado clasificaciones en base al riesgo de recidiva y progresión. Esto permite establecer mejor el tipo tratamiento y de seguimiento que precisa cada paciente.

La asociación europea de urología distribuye en tres grupos de riesgo este tipo de tumores (tabla 4).

Tabla 4. Grupos de riesgo de la Asociación Europea de Urología(4).

Grupos de riesgo	Características
Bajo riesgo	Primario, único, Ta, <3cm, G1 (bajo grado)
Riesgo intermedio	Tumores que no se adecuan en las categorías de bajo riesgo y alto riesgo
Alto riesgo	Cualquiera de los siguientes: -T1 -G3 (alto grado) - CIS -Ta bajo grado, múltiple, recurrente y mayor de 3cm (deben cumplirse todos los requisitos)

La EORTC (European Organization of Research and Treatment of Cancer) Genito-Urinary Cancer Group ha creado unas tablas para estimar el riesgo de recidiva y progresión a 1 y 5 años (22). Estas tablas tienen en cuenta los seis factores clínicos y patológicos más importantes como son el número de tumores, el diámetro de tumor, el tiempo hasta la primera recidiva, el estadio, si existe CIS concurrente y el grado histológico del tumor. No deben utilizarse para calcular el riesgo individual de pacientes con CIS primario ni en pacientes tratados con BCG (bacilo de Calmette-Guérin) ya que no

los tienen en cuenta en su estudio y sobreestimarían el riesgo de estos pacientes. Para calcular el riesgo de recidiva y progresión en pacientes tratados con BCG se utilizarán las tablas del grupo español CUETO (Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico), que tienen en cuenta a pacientes tratados con esta terapia intravesical (23). Este grupo tiene en cuenta en sus cálculos, siete factores pronósticos como son la edad del paciente, el sexo, el tiempo hasta la primera recidiva, el número de tumores, el estadio, presencia de CIS concurrente y el grado tumoral.

1.4.2.2 Tumores vesicales músculo-invasivos

Los tumores vesicales músculo-invasivos son tumores uroteliales de alto grado (grado 2 o 3 según la clasificación de la OMS de 1973). Por ello el grado histológico no aporta valor pronóstico. Algunas formas morfológicas pueden ser útiles a la hora de predecir el pronóstico y tomar decisiones en cuanto al tratamiento.

Las variantes histológicas de los tumores vesicales músculo-invasivos(24) son:

1. Carcinoma urotelial (más del 90% de los casos).
2. Carcinoma urotelial con diferenciación parcial escamosa o glandular.
3. Carcinoma urotelial micropapilar.
4. Carcinoma anidado.
5. Carcinoma urotelial con diferenciación trofoblástica.
6. Carcinoma de células pequeñas.
7. Carcinoma de células fusiformes.

1.5 Evaluación diagnóstica

1.5.1 Antecedentes personales

Nos dará información sobre factores de riesgo que nos puedan hacer sospechar esta patología.

1.5.2 Síntomas

La hematuria monosintomática (microscópica o macroscópica) es el síntoma cardinal. Cuando es macroscópica suele ser total y con coágulos, en algunos casos episódica con periodos libres de sangrado.

Cuando se asocia a síndrome miccional (frecuencia, urgencia y disuria) es fácil confundirla con otras patologías urológicas como infecciones urinarias, vejiga hiperactiva, síntomas del tracto urinario inferior o patología litiásica (litiasis uréter distal o vesical). En estos casos debemos sospechar la presencia de un CIS, ya que estos tumores cursan con clínica de llenado vesical y hematuria.

El dolor, como síntoma en los tumores vesicales no músculo-invasivos, es raro. Su localización en fosa renal puede ser debido a crecimiento del tumor en trigono con obstrucción de la vía urinaria superior.

En los tumores vesicales músculo-invasivos es más frecuente el dolor pélvico y los síntomas producidos por la obstrucción de la vía

urinaria superior cuando se encuentran en estadios avanzados.

1.5.3 Exploración

En los tumores vesicales no músculo-invasivos la exploración suele ser anodina.

En el caso de sospechar un tumor vesical músculo-invasivo el tacto bimanual del recto y la vagina nos puede ayudar a identificar una masa pélvica palpable o de adherencia a otros órganos en tumores avanzados. Debe realizarse antes y después de una RTU (resección transuretral).

1.5.4 Pruebas de imagen

Para evaluar el riesgo que tiene un paciente de presentar un tumor vesical se utiliza la combinación de varios métodos, ya que ninguno tiene, por separado, una sensibilidad del 100%.

1.5.4.1 *Ecografía transabdominal*

Es la primera técnica que suele emplearse en la valoración del tracto urinario. Su carácter no invasivo y libre de radiación, además de prescindir de contraste, hace que sea la primera aproximación diagnóstica al paciente con hematuria. Permite detectar lesiones endoluminales, uropatía obstructiva y masas renales, pero tiene limitaciones en el diagnóstico de los tumores vesicales de pequeño tamaño (5mm) y algunos tumores localizados en la cara anterior (25). Tampoco es capaz de detectar lesiones planas como el CIS, los

coágulos pueden dar lugar a falsos positivos y es una técnica operador dependiente. Presenta menor sensibilidad que la cistoscopia (“gold standard” del diagnóstico del tumor vesical) (26)(27).

1.5.4.2 Tomografía computarizada

Es el método de imagen de elección para el estudio del tracto urinario. Se debe realizar sin y con contraste intravenoso, añadiendo una fase más tardía para valorar la vía urinaria superior, y si es posible con reconstrucción de imágenes. En fase excretora, las lesiones se ven como defectos de repleción en la vía urinaria y en vejiga, no presentan hiperdensidad en las placas sin contraste. Está indicado para estadificación en los tumores músculo-invasivos y en los no músculo-invasivos para descartar tumores de vía urinaria superior cuando los tumores vesicales son múltiples y se localizan en trigono y uretra prostática. La tomografía no diferencia correctamente la profundidad de invasión (mucosa frente a lámina propia o muscular), aunque sí discrimina la invasión de la grasa u órganos vecinos. La sensibilidad de esta prueba para identificar afectación macroscópica ganglionar es baja (48-87%).

Para detectar tumores vesicales presentaría una gran sensibilidad y especificidad asociada a la cistoscopia flexible, pero supondría un coste elevado. Tiene una buena sensibilidad por separado al igual que la cistoscopia flexible, pero tiene una especificidad más baja que esta, lo que supondría un mayor número de cistoscopias en quirófano. Para mejorar la sensibilidad de la TC urografía se debe realizar una buena técnica retardada para que el contraste rellene

bien toda la vejiga (28).

1.5.4.3 Urografía intravenosa

Era la técnica de elección para diagnosticar los tumores de urotelio, pero con la disponibilidad de la tomografía computarizada ha caído en desuso. Las lesiones se ven como defectos de repleción irregular y se puede objetivar la hidronefrosis cuando hay obstrucción de vía urinaria superior. Esta técnica cada vez es menos utilizada frente a la TC urografía ya que ambas tienen irradiación y utilizan contraste, pero la TC da más información sobre el resto de estructuras abdomino-pélvicas, no solo de la vía urinaria.

1.5.4.4 Cistoscopia

Es la técnica de referencia para el diagnóstico del tumor vesical y base del seguimiento. Desde el desarrollo de los cistoscopios flexibles es una prueba que se realiza de forma ambulatoria con la introducción de lubricante anestésico intrauretral. Además, la cistoscopia flexible es bien tolerada y a pesar de ser una técnica invasiva presenta un baja tasa de complicaciones (29). Es importante seguir siempre la misma sistemática para visualizar bien toda la vejiga. En el informe se debe describir el número de tumores, su aspecto, la localización, condición de la mucosa que rodea al tumor y estado de los orificios ureterales así como el color de la orina que sale a través de ellos. Sin embargo, su eficacia se ve reducida en ocasiones por una mala visualización debida a procesos inflamatorios o de sangrado, además, algunas lesiones uroteliales planas tales como las displasias severas y los carcinomas *in situ* pueden ser difíciles de diferenciar del tejido sano. En ese caso los

pacientes requerirían de la realización de una cistoscopia en quirófano con biopsia de la lesión para descartar patología tumoral.

1.5.5 Citología y marcadores urinarios

La citología permite el estudio de las células descamadas del epitelio del tracto urinario; es una prueba de gran utilidad en el diagnóstico y seguimiento de los tumores uroteliales. Las células tumorales con menor grado de diferenciación pierden sus mecanismos de adhesión con el urotelio normal, por lo que es más probable su descamación. Núcleos voluminosos e hipercromáticos, nucléolos visibles, pleomorfismo, citoplasma escaso y alteración de la relación núcleo-citoplasma son las características citológicas de las células tumorales al microscopio. La orina recogida de la primera micción del día no es adecuada para el estudio citológico, ya que el pH urinario favorece la lisis celular, por lo que se recomienda la segunda orina de la mañana.

La citología de orina es una técnica subjetiva y los resultados pueden verse alterados por litiasis, infecciones, instilaciones previas, poca celularidad en la muestra. Tiene una alta sensibilidad para el diagnóstico de tumores de alto grado (hasta el 84%) pero muy baja en tumores de bajo grado (16%)(30). La sensibilidad en la detección de CIS es del 28-100%. La especificidad, en manos expertas, supera el 90% (31), de tal forma que una citología positiva puede indicar la presencia de un tumor urotelial en cualquier localización del tracto urinario, pero sin embargo una citología negativa no descarta la presencia de tumor.

Esta baja sensibilidad de la citología ha motivado la investigación de marcadores tumorales urinarios, consistentes en la identificación de proteínas expresadas por las células tumorales, antígenos celulares y alteraciones cromosómicas relacionadas con el cáncer vesical (32). Es importante destacar que actualmente ninguno de estos marcadores posee la sensibilidad necesaria para sustituir a la citología urinaria, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento, y que su uso clínico rutinario no está recomendado.

Tabla 5. Resumen de los marcadores urinarios más establecidos(33).

Marcadores urinarios	Sensibilidad global (%)	Especificidad global (%)	Sensibilidad para tumores de alto grado (%)
UroVysion	30-86	63-95	66-70
Análisis de microsatélites	58-92	73-100	90-92
Inmunocitología	52-100	63-79	62-92

1.5.5.1 UroVysion

Las alteraciones cromosómicas que originan el cáncer vesical pueden ser detectadas mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). El test multicolor UroVysion, detecta aneuploidías de los cromosomas 3, 7, 17 y deleciones del gen ubicado en el locus 9p21.

Su sensibilidad en la detección del tumor vesical varía entre 69-87% y su especificidad entre 89-96%. Al igual que la citología, mejora sus tasas de detección en tumores de alto grado y CIS (34).

1.5.5.2 Análisis de microsatélites

Los microsatélites son unidades repetidas de hasta seis nucleótidos de ADN no codificante, únicos para cada individuo. Las alteraciones de microsatélites observadas en las células tumorales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se correlacionan con malignidad, siendo la sensibilidad y especificidad de hasta 92% y 100%, respectivamente. Su uso ha sido propuesto como alternativa a la cistoscopia en el seguimiento de TVNMI, aunque se precisa de estudios de coste-efectividad (35).

1.5.5.3 Inmunocitología

ImmunoCyt es una prueba cuya base es la detección mediante anticuerpos fluorescentes monoclonales del antígeno carcinoembrionario y dos glucoproteínas localizadas en las células tumorales de origen urotelial. Se requiere la evaluación de por lo menos 500 células epiteliales, siendo la presencia de una célula fluorescente considerada como positiva. La sensibilidad y especificidad oscila entre 80% y 70%, respectivamente.

1.5.5.4 Otros marcadores

Algunos biomarcadores que están buscando su sitio entre el arsenal diagnóstico del tumor vesical son: antígeno del tumor vesical (BTA), proteína de matriz nuclear 22 (NPM), citoqueratinas, BLCA 4 y BLCA 1 (proteínas de la matriz nuclear) y ácido hialurónico. Se precisan

estudios adicionales para determinar la forma óptima de integrarlos a los métodos habituales que poseemos en la actualidad (36).

Ciertas conclusiones pueden ser extraídas de todos estos test:

-Sensibilidad más alta a costa de una baja especificidad comparada a la citología de orina.

-La presencia de patologías benignas y de instilaciones intravesicales pueden alterar los resultados de estos tests.

-Los requerimientos de sensibilidad y especificidad de estos tests dependen del contexto clínico del paciente (detección precoz, diagnóstico, seguimiento).

-Los falsos positivos en los test, UroVysion y el análisis de microsatélites, pueden ser debidos a enfermedad oculta ya que detectan recurrencia precoz y progresión temprana.

1.6 Manejo

A los pacientes diagnosticados de tumor vesical o con dudas diagnósticas se les realizará una cistoscopia en quirófano y una resección transuretral (biopsia) de las lesiones vesicales que se encuentren. En el caso de que se trate de tumores vesicales no músculo-invasivos esta cirugía será tanto diagnóstica como terapéutica. Posteriormente, según el grupo de riesgo al que pertenezcan, llevarán tratamientos endovesicales y un determinado protocolo de seguimiento. El 50% de estos tumores recurren en los

primeros 5 años y hasta un 30% progresan a tumores músculo-invasivos. Esta alta tasa de recurrencia es la que origina que el tumor vesical sea el que presenta la tasa más alta de coste de tratamiento por vida y persona de todos los cánceres (37).

En los pacientes con tumor vesical músculo-invasivo(38) la resección transuretral será diagnóstica pero solo será terapéutica en un pequeño grupo de pacientes. El tratamiento con intención curativa es la cirugía radical (cistectomía radical y linfadenectomía ilio-obturatriz bilateral) asociada o no a quimioterapia. En caso de tumores en estadios más avanzados se tomarán diferentes medidas en función del estado basal del paciente. Los TVMI tienen mal pronóstico con una supervivencia a 5 años del 60%.

El desafío, por lo tanto, es mejorar la detección y predecir las recurrencias del cáncer de vejiga utilizando técnicas no invasivas. En este sentido, la disponibilidad de marcadores tumorales en orina representa una alternativa útil, debido al contacto directo de la orina con el tumor y la facilidad de obtención de la muestra. Hasta la fecha, ninguno de los marcadores tumorales diagnósticos evaluados, tiene suficiente sensibilidad y/o especificidad para ser utilizado en la práctica clínica diaria. Asimismo, es necesario el descubrimiento de nuevos marcadores tumorales pronósticos que nos permitan distinguir los casos indolentes de aquellos potencialmente mortales, de tal forma que podamos personalizar los tratamientos (39).

2. Introducción: microARNs

2.1 Historia

Entre los nuevos marcadores que se están estudiando se encuentran los micro-ARNs, también denominados miARN o miR. Son pequeñas moléculas de ARN no codificante que regulan procesos celulares. Esta regulación se produce mediante la inhibición de la traducción o degradación de ARN mensajero (ARNm).

En 1993 se identificó el primer miR en *Caenorhabditis elegans*. Se denominó lin-4 y se demostró que actuaba disminuyendo el nivel proteico de LIN-14, controlando su desarrollo post-embriionario (40).

Hasta que en el año 2000, Pasqualli *et al.* demostraron que let-7 estaba muy conservado en un amplio rango de especies, desde moscas hasta humanos, se pensaba que este nivel de regulación era exclusivo de nemátodos (41).

Doench y Sharp, usando análisis mutacional, encontraron que los ocho primeros nucleótidos en la región 5' del miARN, son los responsables de la especificidad y actividad. Reciben el nombre de "semilla" y es la parte que impulsa la interacción con el ARNm diana. Este descubrimiento constituyó la base de predicción de las dianas de miARNs (42).

2.2 Biogénesis

La mayor parte de los miARNs se producen mediante la ruta canónica, que es la más conocida. Se ha descrito otras nuevas, algunas de ellas independientes de las enzimas Drosha y Dicer, que

son clave en la maduración de estas moléculas.

2.2.1 Ruta canónica

Los microARNs están constituidos por ARN de cadena simple de entre 19-25 nucleótidos originados a partir de la transcripción de genes endógenos por los mismos sistemas que actúan en la generación de ARNm (RNA polimerasa II). Los genes que codifican miARNs son mucho más largos que los miARNs procesados maduros; los miARNs se transcriben inicialmente como transcritos primarios o pri-miARN (*primary miRNA transcript*) con una caperuza en 5' y una cola de poli-adeninas (poli-A) en 3'. Los pri-miARNs poseen un tronco de doble hélice, de alrededor de 30 pares de bases, una horquilla terminal y dos extremos de cadena simple (43). Se procesan en el núcleo celular eliminando los extremos de la cadena simple y quedando en estructuras cortas de horquilla de entre 70-90 nucleótidos conocidas como pre-miRNAs (precursor miARN) (44). En animales este procesamiento se realiza por un complejo proteico llamado Microprocesador, que consta de la enzima Drosha ARNasa (ribonucleasa) II y DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8 gene*) la proteína de unión de unión a la doble cadena de ARN (43). Estos pre-miARNs son luego procesados a miARNs maduros en el citoplasma mediante la interacción con la Dicer, una ARNasa III, generando un dúplex maduro de miARN (ds-miARN). Este se une a la proteína Argonauta (AGO2 en mamíferos), que es el efector de RISC (Complejo silenciador inducido por ARN, *RNA-induced silencing complex* en inglés) separa el dúplex seleccionando una

hebra guía y degradando la otra hebra, lo que proporcionará un miARN maduro (45). El miARN maduro se une a la región 3'UTR del ARNm diana y, dependiendo de su complementariedad, induce 3 tipos de efectos alternativos: a) inhibición de la traducción (síntesis ribosomal de proteínas); b) degradación del ARNm o c) secuestro de los ARNm en cuerpos citoplasmáticos que inactivan a los mismos (44).

2.2.2 miRtrons

Los miRtrons son un subtipo de microARNs generados en los intrones de genes codificantes de proteínas mediante *splicing* e independientes de la Drosha pero dependientes de la Dicer (46). El pre-miARN que se forma a través de esta ruta está fosforilado en el extremo 5' al igual que los de la ruta canónica, con lo que el procesamiento posterior continúa a través de esta. En los humanos existen dos miRtrons que no proceden del *splicing* (miR-1225 y miR-1228), se denominan simtrons (splicing-independiente miRtrons) (47).

2.2.3 snoARNs

Son pequeños ARNs nucleolares y producen pre-miARNs independientemente del Microprocesador (48). Son ARNs de cadena larga, están muy conservados evolutivamente. Su transformación a miARNs requiere actividad Dicer pero es independiente de Drosha (49).

2.2.4 Endo-siARNs

Son pequeños ARNs derivados, de doble cadena, largos y endógenos (49). Existen 3 mecanismos diferentes de formación: transcripción de repeticiones invertidas que producen una horquilla de ARN dúplex por la acción de Dicer; transcripción de fragmentos cortos de ambas hebras de ADN genómico y transcripción de dos *loci* genómicos produciendo fragmentos de ARN que hibridan para formar un ARN dúplex de doble cadena.

2.2.5 Pre-tARNs

Estos pri-miARNs no necesitan a la enzima Drosha, se procesan mediante la Z-rARNasa, que segmenta el extremo 3' del tARN para liberar las horquillas de pre-miARN, que luego son procesadas por el Dicer (49).

2.3 Mecanismo de acción

Se estima que en el genoma humano hay una gran cantidad de miARNs codificados y que cada uno de ellos puede actuar en más de un ARNm y que un ARNm puede tener más de un miARN que lo inhiba. Los miARNs maduros reconocen su diana mediante emparejamiento de bases entre el ARNm y la “semilla” del miARN. Esta es la parte más conservada y se encuentra en las posiciones 2 a 9 del extremo 5' del miARN, que se une a la región 3' UTR del

ARNm diana (42). A pesar de la importancia de la región semilla hay otras regiones que contribuyen a una unión eficaz, además algunos de los sitios diana de los miARNs validos no tienen apareamiento completo con la semilla y se pueden aparear la región central del miARN (50).

Dependiendo del miARN, el ARNm y el contexto celular, la interacción puede llevar a una represión de la traducción, degradación del ARNm o una mezcla de ambos procesos.

La mayoría de los ARNs diana identificados están regulados mediante la degradación del ARNm, sin embargo en células diferenciadas la regulación predominante de los miRs es inhibir la traducción, que es un mecanismo inmediato, transitorio y reversible, más adaptado a contrarrestar el estrés ambiental (51).

2.4 microARNs circulantes

Los miARNs se producen dentro de la célula pero también se pueden encontrar en el entorno extracelular, sobre todo suero, plasma y orina (52). Esta transferencia al torrente sanguíneo ocurre en órganos con importante vascularización y su cantidad varía en función de las condiciones patogénicas. El significado biológico de estos miARNs no se ha determinado todavía. Los miARNs circulantes han mostrado su estabilidad, siendo resistentes a dosis altas de RNAsas, a ciclos de congelación y descongelación y a fluctuaciones en el pH. Esto es debido a su pequeño tamaño.

2.5 Funciones biológicas e implicación en la transformación maligna

Las evidencias experimentales han demostrado, que los miARNs participan en procesos que regulan el desarrollo embrionario y tisular (especialmente hematopoyesis y desarrollo neural), la apoptosis, proliferación y diferenciación celular. Adicionalmente, se ha evidenciado el hecho de que una fracción significativa de genes de miRs mapean en regiones cromosómicas frecuentemente alteradas en diversos tipos de cánceres humanos (53). Esto llevó a la idea de su posible participación en la iniciación y progresión del cáncer. Su participación como nuevos oncogenes o supresores tumorales ha sido demostrada en linfomas, cáncer colorrectal y mamario, cáncer pulmonar y tumores del sistema nervioso central, entre otros (54).

Se han descrito cerca de 2000 miARNs humanos implicados en la patogenia de distintas enfermedades y tienen el potencial de regular entre el 20-30% de los genes humanos(55).

Estudios recientes han permitido conocer perfiles de expresión global de los miRs en líneas celulares, tejidos de cáncer de vejiga y en la orina excretada, creando perfiles con una buena sensibilidad, especificidad y área bajo la curva(56)(57).

Los cambios en la expresión de algunos miARNs se han asociado con el estadio y el grado tumoral, y con el pronóstico en los tumores de vejiga (58). Sin embargo, la utilidad de los miARNs como herramienta de diagnóstico en el cáncer de vejiga es todavía escasa (59). Por todo ello, el estudio de miARNs en muestras no invasivas

abre un papel esperanzador en el diagnóstico precoz del cáncer de vejiga.

3. Hipótesis del estudio y objetivos

3.1 Hipótesis del estudio

En este trabajo planteamos la hipótesis de que existe una firma de miARNs característica de los pacientes con tumor vesical con valor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

3.2 Objetivos

Objetivo primario: demostrar que el aislamiento y análisis de miARNs en orina y suero es una prueba con una buena capacidad diagnóstica para la detección de tumor vesical.

Objetivos secundarios:

- Demostrar diferencias en los miARNs de pacientes con TVNMI y pacientes con TVMI.
- Demostrar la utilidad de los miARNs como marcadores de recidiva o progresión en el seguimiento del tumor vesical no músculo-invasivo.
- Demostrar diferencias en los miARNs entre los distintos grupos de riesgo en los pacientes con TVNMI.
- Demostrar la utilidad de los miARNs como marcadores pronósticos en los tumores vesicales músculo-invasivos.

4. Material y método

4.1 Pacientes

Estudio prospectivo realizado entre mayo de 2013 y julio de 2016. Consta de un grupo de casos compuesto por 70 pacientes diagnosticados de tumor vesical y un grupo de 30 controles formado por voluntarios sanos y voluntarios con patología urológica no oncológica, ni inflamatoria, ni infecciosa.

A) Criterios de inclusión:

1. pacientes mayores de 18 años;
2. diagnosticados de tumor vesical primario en el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Estos pacientes habían sido diagnosticados por ecografía, cistoscopia o TC;
3. pendientes de realizar una resección transuretral de tumor vesical primario
4. posibilidad de realizar posteriormente un seguimiento de la enfermedad.

B) Criterios de exclusión:

1. Pacientes con otra patología oncológica activa en el momento la inclusión en el estudio o durante el seguimiento.
2. Pacientes con patología infecciosa o inflamatoria tanto en el grupo de casos como en el de controles.

3. Incapacidad para entender y firmar el consentimiento informado.

4.2 Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia (CEIm-HCUV) y todos los pacientes y controles firmaron el correspondiente consentimiento informado.

4.3 Muestras biológicas

El día que tenía lugar la resección transuretral (RTU) de tumor vesical, previa a la misma, se les pedía a los pacientes que recogieran una muestra de orina por micción espontánea. En el momento de la canalización de la vía periférica para el acto anestésico, se les extraía una muestra de suero en un tubo de gelosa de 8,5 ml.

A los controles que requerían intervención quirúrgica por patología urológica benigna, se les realizaba el procedimiento de obtención de muestras biológicas como a los casos. A aquellos que no precisaban intervención quirúrgica, se les extraía la muestra necesaria en las consultas externas en el mismo momento en que se realizaba la extracción sanguínea para su seguimiento y se recogía la muestra de orina por micción espontánea.

En los casos en que la histología era de tumor no músculo-invasivo, la recogida de muestras de orina para seguimiento se realizaba mediante micción espontánea el día de la cistoscopia de control en consultas externas.

El esquema de seguimiento fue el siguiente:

-Grupo de bajo riesgo: control con cistoscopia a los 3, 9 y 15 meses de la RTU y posteriormente anual.

-Grupo de riesgo intermedio: control con cistoscopia a los 3, 9 y 15 meses de la RTU, cada 6 meses los dos primeros años y control anual posterior.

-Grupo de alto riesgo: control con cistoscopia cada 3 meses los dos primeros años, cada 6 meses el tercero y el cuarto y posteriormente anual.

En el caso de que estos pacientes presentaran durante el seguimiento una recidiva de tumor vesical, se les practicaba otra RTU, iniciándose un nuevo protocolo de seguimiento en función de las características del nuevo tumor. En caso de que el primario fuera de mayor riesgo que la recidiva, se continuaba con el seguimiento previo.

Los pacientes diagnosticados de tumor vesical musculo-invasivo ya tratados eran seguidos en las consultas cada 3 o 6 meses. Las muestras se tomaban de sangre periférica una semana antes de la consulta, aprovechando la punción para su análisis de seguimiento.

A los pacientes diagnosticados de TVMI y tratados con resección transuretral como tratamiento de preservación vesical, se les

realizaba recogida de orina por micción espontánea y extracción de muestra de sangre el día de la consulta de seguimiento.

A los pacientes diagnosticados de tumor vesical músculo-invasivo metastásico no se les realizaba extracción sanguínea de seguimiento.

4.4 Extracción de miARNs

4.4.1 Extracción de micro-ARNs a partir de orina

Se utilizó el procedimiento descrito por Mengual L. y colaboradores (60). De cada individuo participante en el estudio se recogió inmediatamente antes de la cirugía y a los tiempos indicados tras la cirugía, 10 ml de orina, la cual se mezcló con 400 µl de 0.5 M EDTA pH 8.0 y se centrifugó a 1.000 x g durante 10 minutos a 4°C para obtener el sedimento urinario. Los sedimentos se almacenaron a –80°C hasta que se realizó la extracción de los microARNs utilizando para ello el TRIZOL Reagent (Life Technologies) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

4.4.2 Extracción de miARNs a partir de suero

Se utilizó el procedimiento descrito por Sanders I. y colaboradores (61). De cada uno de los individuos participantes en el estudio se recogieron, inmediatamente antes de la cirugía y a los tiempos indicados tras la cirugía, 8,5 ml de sangre venosa en tubos con gelosa. La separación del suero se realizó por centrifugación a 800 x

g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero obtenido fue centrifugado una segunda vez a 10.000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier célula contaminante, tras lo cual se almacenó a – 80°C hasta la extracción de los microARNs la cual se realizó a partir de 700 µl de suero utilizando TRIZOL LS Reagent (Life Technologies) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

La concentración y pureza de los microARNs extraídos se realizó mediante espectrofotometría (NanoDrop 1000A), midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm.

4.5 Amplificación mediante RT-PCR cuantitativa del ARN

4.5.1 Reacción de retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción (RT) se realizó con 10 ng de los micro-ARN purificados utilizando el “TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit” (Life Technologies, Part Number: 4366596), según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Las condiciones de la reacción RT fueron; una incubación inicial a 16 °C durante 30 minutos, seguido de una incubación a 42 °C durante 30 minutos y una incubación final a 85 °C durante 5 minutos.

4.5.2 Determinación de la expresión de micro-ARNs

Los niveles de los diferentes microARNs se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el sistema ABI Prism 7900 HT

Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Para la amplificación de los micro-RNAs se utilizaron los ensayos específicos prediseñados por Life Technologies (TaqMan Small RNA Assays), junto con la 2 x TaqMan Universal PCR Master Mix II; no UNG (Life Technologies, Part Number 4324018) y 1.33 µl del cADN generado en la reacción RT en un volumen de reacción final de 20 µl. Las condiciones de PCR fueron 10 minutos a 95 °C para la activación de la Taq polimerasa, seguida de 40 ciclos de dos etapas (15 seg a 95 °C, 1 min a 60 °C).

4.5.3 Análisis de los resultados

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software SDS 2.4 y Enterprise (Applied Biosystems). El punto de corte (threshold) y la línea basal que se utilizarán para obtener los Cts necesarios para los cálculos se determinarán de forma automática por el propio software. La determinación de la expresión relativa de los microARNs en cada una de las muestras se realizará utilizando el método de comparación de las Cts ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (62).

4.6 Selección de microARNs

En orina se determinaron los siguientes miARNs según el procedimiento descrito anteriormente: miR-187; miR-18a; miR-25; miR-142-3p miR-140-5p; miR-204; miR-92a; miR-125b. Para normalizar los resultados utilizamos los miR-103 y miR-30c (63).

En suero se determinaron los siguientes miARNs según el procedimiento descrito anteriormente: miR-200b; miR-92; miR-33. Para normalizar los resultados utilizamos los miR-SNORD43 (64).

4.7 Recogida de datos

Se creó una base de datos en la que se registraron los datos demográficos de los casos y controles como la fecha de nacimiento, el género, los antecedentes personales como historia de hipertensión arterial, diabetes, hábito tabáquico, profesión, los antecedentes oncológicos previos y la medicación concomitante. Se recogieron datos relacionados con las características de los tumores que presentaban los casos, como la fecha de diagnóstico, la fecha de intervención, resultado de la citología de orina (positiva, dudosa o negativa), número de tumores, tamaño tumoral, aspecto, estadio anatomopatológico, grado histológico (OMS de 1973 y OMS de 2004), si habían llevado tratamiento con instilación intravesical de mitomicina C en postoperatorio inmediato, si habían llevado pauta de mitomicina C en consultas externas o pauta con instalaciones de Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) atenuado. También fueron recogidos datos del seguimiento de los pacientes: fechas de los seguimientos en consultas, presencia o no de recidiva y sus características, progresión o no de enfermedad y tipo de la misma y fecha del éxitus en los casos que se produjo.

4.8 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 20.

4.8.1 Casos y controles

A) Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables para los dos grupos.

Para la variable cuantitativa edad, que se comportaba de forma normal, se calculó la media y su desviación estándar y mediante el método de la T de student se analizó si existían diferencias entre los dos grupos. El resto de variables cuantitativas a analizar comprendían la expresión de los diferentes miARNs, los cuales no se comportaban como variables normales, por lo que para la comparación de medias se utilizaron pruebas no paramétricas (test U de Mann Whitney).

El análisis descriptivo de las variables cualitativas se realizó mediante tablas de contingencia, comparando los grupos mediante el test Chi Cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher, en caso de que alguno de los recuadros tuviera un valor inferior a 5.

B) Con la intención de encontrar diferencias entre los grupos se transformaron los diferentes microARNs (que eran variables cuantitativas), en variables dicotómicas, siendo 0 los que no expresaban ese miARN y 1 los que si lo expresaban. Se realizaron tablas de contingencia para valorar si había diferencias entre los

grupos y para ello utilizamos el test Chi Cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher.

C) De nuevo con la intención de encontrar diferencias entre los grupos, realizamos las curvas ROC para los distintos miARNs y seleccionamos el mejor punto de cada miARN para crear una nueva variable dicotómica. Se dividieron en 0, desde el valor 0 hasta el punto seleccionado en la curva ROC, y 1, los valores superiores al punto seleccionado en cada curva, convirtiendo cada miARN en otra variable dicotómica. Realizamos tablas de contingencia para valorar si había diferencias entre los grupos con los tests mencionados anteriormente.

D) Finalmente, seleccionamos únicamente aquellos casos y controles en los que había expresión de miARN y realizamos estudios comparativos mediante el test de la U de Mann-Whitney.

4.8.2 Tumores vesicales no músculo-invasivos y músculo-invasivos

Se seleccionaron solo los casos y se dividieron en dos grupos según estadio local en tumores músculo-invasivos y tumores no músculo-invasivos. Con ello se buscaba encontrar diferencias en la firma de los miARNs.

A) Se realizó un análisis descriptivo entre los distintos grupos para las variables cuantitativas y las cualitativas. Para ver si había diferencias entre los grupos con las distintas variables, se realizaron las pruebas estadísticas mencionadas anteriormente, comparación

de medias con t de Student y como prueba no paramétrica el test U de Mann Whitney y tablas de contingencia, utilizando el Test Chi Cuadrado de Pearson y el Test exacto de Fisher.

B) Estudiamos como variables dicotómicas los diferentes miARNs y realizamos tablas de contingencia para compararlas.

C) Utilizamos las variables de miARNs creadas con las curvas ROC y realizamos nuevas tablas de contingencia para ver si obteníamos diferencias entre los pacientes.

D) Seleccionamos solo los casos que tuvieran expresión de cada miARN por encima de 0 y realizamos el análisis diferencial con pruebas no paramétricas para ver si obteníamos diferencias.

4.8.3 Tumores vesicales no músculo-invasivos: grupos de riesgo

Se seleccionaron los pacientes con tumores vesicales no músculo-invasivos y se agruparon según el grupo de riesgo al que pertenecían(4) quedando de la siguiente forma:

-Bajo riesgo: estadio Ta, tumor único, tamaño <3cm y bajo grado.

-Alto riesgo: estadio T1 o CIS o alto grado (G3).

-Riesgo intermedio: tumores con diferentes características a las especificadas en los dos grupos anteriores.

A) Se realizó un análisis descriptivo entre los tres grupos y se realizó un análisis univariante mediante la prueba de Kruskal Wallis como

prueba no paramétrica para las variables cuantitativas y una tabla de contingencia para las cualitativas utilizando el Chi Cuadrado de Pearson o el test Exacto de Fisher en caso de que hubiera algún valor inferior a 5.

B) Realizamos el mismo análisis que se ha explicado anteriormente con las variables dicotómicas de los diferentes microARNs.

C) También con las variables dicotómicas creadas con las curvas ROC.

D) Se seleccionaron los casos de tumor vesical no músculo-invasivo que presentaran expresión de miARNs por encima de 0 y se realizó el análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para encontrar diferencias entre los grupos.

4.8.4 Tumores vesicales músculo-invasivos

Se seleccionaron los casos con tumor vesical músculo-invasivo y se comparó la expresión de los distintos microARNs en base a la mortalidad cáncer específica. Esto se analizó con el test U de Mann Whitney, para muestras independientes no paramétricas.

5. Resultados

5.1 Casos y controles

A) Se recogieron muestras de 98 individuos, 69 casos y 29 controles. Dos de los casos fueron excluidos del estudio: uno de ellos fue diagnosticado de un tumor de vía urinaria superior tras la cirugía y el otro fue diagnosticado de una neoplasia de colon a los dos meses del diagnóstico de tumor vesical. De modo que finalmente se estudiaron los resultados de 67 casos y 29 controles.

La media de edad del grupo control fue de 68,27 años desviación típica (DT) 12,31 y la de los casos de 69,29 años (DT 12,8), sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas (p 0,718) entre los grupos al comparar medias con el análisis T Student. En la tabla 6 se observan los resultados de las variables descriptivas estudiadas como género y comorbilidades (diabetes, hipertensión arterial, dislipemia, hábito tabáquico, hábito enólico y profesión de riesgo), comprobándose la homogeneidad de ambos grupos.

Tabla 6. Comparación de variables demográficas cualitativas entre el grupo de casos y controles.

		Control N (%)	Caso N (%)	p
Genero	Hombre	19 (27,9)	49 (72,1)	0,452 ¹
	Mujer	10 (35,7)	18 (64,3)	
Diabetes	No	17 (24,6)	52 (75,4)	0,057 ¹
	Si	12(44,4)	15 (55,6)	

Hipertensión arterial	No	16 (34)	31 (66)	0,423 ¹
	Si	13 (26,5)	36 (73,5)	
Dislipemia	No	13 (24,5)	40 (75,5)	0,178 ¹
	Si	16 (37,2)	27 (62,8)	
Tabaquismo	No	9 (33,3)	18 (66,7)	0,405 ¹
	Si	8 (22,2)	28 (77,8)	
	Exfumador	12 (36,4)	21 (63,6)	
Ingesta alcohol	No	28 (32,2)	59 (67,8)	0,19 ¹
	Si	1 (11,1)	8 (88,9)	
Profesión riesgo	No	28 (29,5)	67 (70,5)	0,302 ²
	Si	1 (100)	0 (0)	

1: Chi cuadrado. 2: Test exacto de Fischer

En la tabla 7 se muestran los resultados de la comparación de los distintos miARNs analizados entre ambos grupos (suero miR-200b 103, miR-200b 191, miR-33 103, miR-33 191, miR-92 103, miR-92 191; orina miR-187, 142 y 140).

Tabla 7. Comparación de los distintos miARNs entre grupo de casos y controles.

		N	Rango promedio	Sig.asintót.* (bilateral)
Primario suero miR-200b (103)	Control	29	52,97	0,267
	Caso	67	46,57	
Primario suero miR-200b (191)	Control	29	54,62	0,128
	Caso	67	45,85	
Primario suero miR-33 (103)	Control	29	47,67	0,874
	Caso	67	48,86	
Primario suero miR-33 (191)	Control	29	49,72	0,776
	Caso	67	47,97	
Primario suero miR-92 (103)	Control	29	45,59	0,499
	Caso	67	49,76	
Primario suero miR-92 (191)	Control	29	44,72	0,382
	Caso	67	50,13	
Primario orina miR-187	Control	29	44,14	0,238
	Caso	67	50,39	

		N	Rango promedio	Sig.asintót.* (bilateral)
Primario orina miR-142	Control	29	42,31	0,094
	Caso	67	51,18	
Primario orina miR-140	Control	29	46,28	0,531
	Caso	67	49,46	

*U de Mann Whitney.

El único miARN que presentaba diferencias entre ambos grupos con tendencia a la significación era el miR-142 extraído en orina con una p de 0,094. No se encontraron diferencias entre el grupo de casos y el grupo control con el resto de miARNs.

B) Transformamos los diferentes miARNs en variables dicotómicas, siendo 0 los que no expresaban ese miARNs y 1 los que sí lo expresaban. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tablas de contingencia entre los dos grupos (tabla 8).

Tabla 8. Tabla de contingencia con los diferentes miARNs como variables dicotómicas.

		Casos N (%)	Controles N (%)	p
Primario suero miR-200b (103)	0	13 (26,5)	36 (73,5)	0,423

	1	16 (34)	31 (66)	
Primario suero miR-200b (191)	0	13 (26,5)	36 (73,5)	0,423
	1	16 (34)	31 (66)	
Primario suero miR-33 (103)	0	5 (25)	15 (75)	0,569
	1	24 (31,6)	52 (68,4)	
Primario suero miR-33 (191)	0	5 (25)	15 (75)	0,569
	1	24 (31,6)	52 (68,4)	
Primario suero miR-92 (103)	0	4 (28,5)	10 (71,4)	0,579*
	1	25 (30,5)	57 (69,5)	
Primario suero miR-92 (191)	0	4 (40)	6 (60)	0,476*
	1	25 (29,1)	61 (70,9)	
Primario orina miR-187	0	22 (35,5)	40 (64,5)	0,128
	1	7 (20,6)	27 (79,4)	
Primario orina miR-142	0	22 (35,5)	40 (64,5)	0,128
	1	7 (20,6)	27 (79,4)	
Primario orina miR-140	0	22 (33,3)	44 (67,7)	0,323
	1	7 (23,3)	23 (76,7)	

*Test exacto de Fisher

C) En cuanto a las variables dicotómicas en función de las curvas ROC, al realizar las tablas de contingencia (tabla 9) se evidenció una tendencia a la significación en la prueba de Chi Cuadrado para el

microARN en suero 200b (103) con $p=0,077$ y para el 200b (191) con $p=0,056$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el resto de microARNs.

Tabla 9. Tabla de contingencia con los diferentes miARNs como variable dicotómica en función de su mejor punto en la curva COR entre los grupos de casos y controles.

		Control N (%)	Caso N (%)	p*
Primario suero miR-200b (103)	0	13 (23,2)	43 (76,8)	0,077
	1	16 (40)	24 (60)	
Primario suero miR-200b (191)	0	13 (22,8)	44 (77,2)	0,056
	1	16 (55,2)	23 (69,8)	
Primario suero miR-33 (103)	0	13 (27,7)	34 (72,3)	0,594
	1	16 (32,7)	33 (67,3)	
Primario suero miR-33 (191)	0	10 (22,2)	35 (77,8)	0,109
	1	19 (37,3)	32 (62,7)	
Primario suero miR-92 (103)	0	17 (31,5)	37 (62,7)	0,758
	1	12 (28,6)	30 (71,4)	
Primario orina miR-142	0	23 (31,9)	49 (68,1)	0,521

		Control N (%)	Caso N (%)	p*
	1	6 (25)	18 (75)	
Primario orina miR-140	0	23 (31,1)	51 (68,9)	0,733
	1	6 (27,3)	16 (72,7)	

*Chi cuadrado de Pearson

D) El último análisis que realizamos para ver si había diferencias en miARNs entre casos y controles, fue seleccionar solo los que tenían una expresión de cada miR >0. Para el miR en suero 200b (191) quedaban 16 controles y 31 casos y al hacer un análisis con pruebas no paramétricas (U de Mann Whitney) sí que se evidenciaban diferencias estadísticamente significativas con $p=0,041$ (tabla 10). Este miARN se encuentra infraexpresado en el grupo de casos con respecto al grupo control.

Tabla 10. Comparación casos y controles con los microARN con expresión.

		N	Rango promedio	Sig. asintot.* (bilateral)
Primario suero miR-200b (191)	Control	16	29,69	0,041
	Caso	31	21,06	

*U Mann Whitney.

5.2 Tumores no músculo-invasivos (TVNMI) y tumores músculo-invasivos (TVMI)

A) Al seleccionar los casos nos quedamos con 67 individuos. En el grupo de TVNMI teníamos 45 pacientes con una media de edad de 67,84 años (DT 13,37) y en el grupo de TVMI teníamos 22 casos con una media de edad de 72,27 años (DT 11,22), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al realizar la comparación de medias (p 0,432). En cuanto al resto de variables estudiadas como el género y las comorbilidades, los resultados se encuentran en la tabla 11, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La variable profesión de riesgo no se estudió porque ninguno de los casos tenía profesión de riesgo. Sí que se encontraron diferencias entre los grupos en cuanto a la mortalidad cáncer específica, siendo esta más elevada en el grupo de pacientes con TVMI, lo que es característico de estos tumores, ya que son más agresivos y presentan una mortalidad asociada más elevada.

Tabla 11. Comparación de variables cualitativas entre los grupos de TVMI y TVNMI.

		TVNMI N(%)	TVMI N(%)	p
Genero	Hombre	33 (67,3)	16 (32,7)	0,958
	Mujer	12 (66,7)	6 (33,3)	

		TVNMI N(%)	TVMI N(%)	p
Diabetes	No	37 (71,2)	15 (28,8)	0,195
	Si	8 (53,3)	7 (46,7)	
Hipertensión arterial	No	22 (71)	9 (29)	0,538
	Si	23 (69,9)	13 (36,1)	
Dislipemia	No	30 (75)	10 (25)	0,096
	Si	15 (55,6)	12 (44,4)	
Tabaco	No	12 (66,7)	6 (33,3)	0,419
	Si	21 (75)	7 (25)	
	Ex fumador	12 (57,1)	9 (49,9)	
Alcohol	No	38 (64,4)	21 (35,6)	0,186*
	Si	7 (87,5)	1 (12,5)	
Éxito	No	34 (81)	8 (19)	0,002
	Si	11 (44)	14 (56)	

Chi cuadrado de Pearson y *Test exacto de Fisher.

Al igual que en el apartado anterior realizamos un análisis con pruebas no paramétricas para ver si había diferencias entre la expresión de los diferentes miARNs y los distintos tipos tumorales. Como se observa en la tabla 12, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación en orina de miR-187 (p 0,020) y el miR-142 (p 0,002) y con tendencia a la significación el miR-140 (p 0,098). Los tres miARNs se encontraban más expresados en la orina de los pacientes con TVNMI.

Tabla 12. Comparación de los distintos miARNs entre los grupos de casos.

		N	Rango promedio	Sig.asint. (bilateral)*
Primario suero miR-200b (103)	TVNMI	45	33,21	0,606
	TVMI	22	35,62	
Primario suero miR-200b (191)	TVNMI	45	33,86	0,925
	TVMI	22	34,30	
Primario suero miR-33 (103)	TVNMI	45	33,78	0,893
	TVMI	22	34,45	
Primario suero miR-33 (191)	TVNMI	45	33,94	0,973
	TVMI	22	34,11	

		N	Rango promedio	Sig.asint. (bilateral)*
Primario suero miR-92 (103)	TVNMI	45	33,81	0,909
	TVMI	22	34,39	
Primario suero miR-92 (191)	TVNMI	45	33,22	0,640
	TVMI	22	35,59	
Primario orina miR-187	TVNMI	45	37,42	0,02
	TVMI	22	27,00	
Primario orina miR-142	TVNMI	45	38,54	0,002
	TVMI	22	24,70	
Primario orina miR-140	TVNMI	45	36,33	0,098
	TVMI	22	29,23	

*U de Mann Whitney.

B) Transformamos los diferentes miARNs en variables dicotómicas, el valor 0 para las que no expresaban y el valor 1 para el resto. Realizamos una tabla de contingencia para valorar diferencias y de nuevo se observaba una sobreexpresión de miR-187 en los tumores superficiales con una p 0,016 (Tabla 13). Lo mismo ocurría con el miR-142 en orina con p 0,003 y había una tendencia con el miR-140 en orina con una p de 0,061 (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación de frecuencias en cuanto a expresión o no expresión de los miARNs 187, 142 y 140 en orina.

Tabla de contingencia					
		Estadio			
		TVNMI N (%)	TVMI N (%)	Total N (%)	Sig. exacta (bilateral)*
Primario orina miR-187	0 No expresa	22 (55)	18 (45)	40 (100)	0,016
	1 Expresa	23 (85,2)	4 (13,8)	27(100)	
Primario orina miR-142	0 No expresa	21 (52,5)	19 (47,5)	40 (100)	0,003
	1 Expresa	24 (88,9)	3 (11,1)	27 (100)	
Primario orina miR-140	0 No expresa	26 (59,1)	18 (40,9)	40 (100)	0,061
	1 Expresa	19 (82,6)	4 (17,5)	27 (100)	

*Test exacto de Fisher

- C) Elegimos los miARNs como variables dicotómicas en función de las curvas ROC pero no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis con tablas de contingencia.
- D) Seleccionamos los casos cuyos miARNs fueran mayores de 0. Pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tumores superficiales y tumores infiltrantes.

5.3 Grupos de riesgo en tumores vesicales no músculo-invasivos

A) El total de pacientes con tumores vesicales no músculo-invasivos era de 45. De ellos 16 pacientes eran de bajo riesgo con una media de edad de 64,73 años (DT 17,29); el grupo de riesgo intermedio lo conformaban 8 pacientes con una edad media de 65,54 años (DT 10,15) y en el grupo de alto riesgo había 21 paciente con una media de edad de 71,09 años (DT 10,61). No había diferencias entre los grupos en ninguna de las comorbilidades anteriormente citadas.

Al realizar un análisis con pruebas no paramétricas (tabla 14) para valorar si había diferencias entre los distintos grupos de riesgo y la expresión de los diferentes miARNs, no se obtuvo ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 14. Comparación de los diferentes miARNs entre los tres grupos de riesgo.

	Grupos de riesgo	N	Rango promedio	P*
Primario suero miR-200b (103)	Bajo riesgo	16	23,06	0,926
	Riesgo intermedio	8	24,38	
	Alto riesgo	21	22,43	
Primario suero miR-200b (191)	Bajo riesgo	16	23,38	0,922
	Riesgo intermedio	8	24,13	

	Grupos de riesgo	N	Rango promedio	P*
	Alto riesgo	21	22,29	
Primario suero miR-33 (103)	Bajo riesgo	16	23,75	0,604
	Riesgo intermedio	8	26,38	
	Alto riesgo	21	21,14	
Primario suero miR-33 (191)	Bajo riesgo	16	24,06	0,591
	Riesgo intermedio	8	26,13	
	Alto riesgo	21	21,00	
Primario suero miR-92 (103)	Bajo riesgo	16	25,69	0,521
	Riesgo intermedio	8	19,50	
	Alto riesgo	21	22,29	
Primario suero miR-92 (191)	Bajo riesgo	16	25,22	0,390
	Riesgo intermedio	8	17,50	
	Alto riesgo	21	23,40	
Primario orina miR-187	Bajo riesgo	16	23,53	0,491
	Riesgo intermedio	8	27,06	

	Grupos de riesgo	N	Rango promedio	P*
	Alto riesgo	21	21,05	
Primario orina miR-142	Bajo riesgo	16	21,38	0,344
	Riesgo intermedio	8	19,00	
	Alto riesgo	21	25,76	
Primario orina miR-140	Bajo riesgo	16	18,30	0,129
	Riesgo intermedio	8	27,06	
	Alto riesgo	21	25,02	

*Kruskal Wallis

B) Utilizamos una vez más las variables dicotómicas de miARNs y realizamos unas tablas de contingencia para ver si se encontraban diferencias entre los distintos grupos de riesgo (tabla 15). No se obtuvieron diferencias con el Test Exacto de Fisher.

Tabla 15. Comparación entre grupos de riesgo y miARNs como variables dicotómicas.

		Grupos de riesgo			p*
		Bajo N (%)	Intermedio N (%)	Alto N (%)	
Primario suero miR-200b	0	9 (36)	4 (16)	12 (48)	0,940

	1	7 (35)	4 (20)	9 (45)	
Primario suero miR-33	0	2 (22,2)	3 (33,3)	4 (44,4)	0,378
	1	14 (38,9)	5 (13,3)	17 (47,2)	
Primario suero miR-92	0	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,9)	0,733
	1	14 (36,8)	6 (15,8)	18 (47,4)	
Primario orina miR-187	0	7 (31,8)	3 (13,6)	12 (54,5)	0,559
	1	9 (39,1)	5 (21,7)	9 (39,1)	
Primario orina miR-142	0	8 (38,1)	4 (19)	9 (42,9)	0,891
	1	8 (33,3)	4 (16,7)	12 (50)	
Primario orina miR-140	0	12 (46,2)	3 (11,5)	11 (42,3)	0,162
	1	4 (21,1)	5 (26,3)	10 (52,6)	

*Test exacto de Fisher.

C) Realizamos una tabla de contingencia para ver si había diferencias entre variables dicotómicas creadas con las curvas ROC y los diferentes grupos de riesgo. Utilizamos el test exacto de Fisher y no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas (tabla 16).

Tabla 16. Comparación entre grupos de riesgo y miARNs en funciones de sus curvas ROC.

		Grupos de riesgo			p*
		Bajo N (%)	Intermedio N (%)	Alto N (%)	
Primario suero miR-200b	0	10 (34,5)	5 (17,2)	14 (48,3)	0,790

	1	6 (37,5)	3 (18,8)	7 (43,8)	
Primario suero miR-33	0	8 (32)	3 (12)	14 (56)	0,312
	1	8 (40)	5 (25)	7 (35)	
Primario suero miR-92	0	5 (21,7)	5 (21,7)	13 (56,5)	0,136
	1	11 (50)	3 (13,6)	8 (36,4)	
Primario orina miR-187	0	9 (33,3)	3 (11,1)	15 (55,6)	0,231
	1	7 (38,9)	5 (27,8)	6 (33,3)	
Primario orina miR-142	0	11 (37,9)	7 (24,1)	11 (37,9)	0,165
	1	5 (31,2)	1 (6,2)	10 (62,5)	
Primario orina miR-140	0	14 (43,8)	6 (18,8)	12 (37,5)	0,113
	1	2 (15,4)	2 (15,4)	9 (69,2)	

*Test exacto de Fisher

D) Al seleccionar sólo los casos de tumor vesical no músculo-invasivo que presentaran niveles de cada miARN por encima de 0, obtuvimos que si que existían diferencias estadísticamente significativas para los grupos de riesgo y el miR en suero 33 (103) con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una p 0,026.

También se obtuvieron diferencias con el miR-33 (191) con p 0,031 y el miR-142 en orina con p 0,038 (tabla 17).

Tabla 17. Comparación de los diferentes miARNs con expresión y los diferentes grupos de riesgo.

	Grupo riesgo	N	Rango promedio	Kruskal-Wallis	p
Primario suero miR-33 (103)	Bajo riesgo	14	17,43	7,318	0,026
	Riesgo intermedio	5	30,20		
	Alto riesgo	17	15,94		
Primario suero miR-33 (191)	Bajo riesgo	14	17,79	6,964	0,031
	Riesgo intermedio	5	29,80		
	Alto riesgo	17	15,76		
Primario orina miR-142	Bajo riesgo	8	10,76	6,537	0,038
	Riesgo intermedio	4	6		
	Alto riesgo	12	15,83		

E) No se pudo estudiar el efecto de los diferentes miARNs en recidiva y progresión en función de los grupos de riesgo, ya que el número de pacientes que recidivó y progresó era muy bajo y esto hacía que la N de cada grupo fuera aun más pequeña y no valorable para su estudio comparativo.

5.4 Tumores vesicales músculo-invasivos

De los 16 pacientes con tumor vesical infiltrante que habían fallecido, 2 éxitos no tenían relación con el tumor y 14 si la tenían. Al realizar la comparación con los distintos miARNs y la variable muerte relacionada con la enfermedad (tabla 18), no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, aunque hay que tener en cuenta que los grupos que se comparan son muy pequeños.

Tabla 18. Comparación de los diferentes miARNs y la mortalidad cáncer específica.

	Muerte relacionada	N	Rango promedio	p*
Primario suero miR-200b (103)	No	2	9,00	0,523
	Si	12	7,25	
Primario suero miR-200b (191)	No	2	9,00	0,523
	Si	12	7,25	
Primario suero miR-33 (103)	No	2	12,00	0,097
	Si	12	6,75	
Primario suero miR-33 (191)	No	2	10,5	0,267
	Si	12	7,00	
Primario suero miR-92 (103)	No	2	10,5	0,271

Resultados

	Muerte relacionada	N	Rango promedio	p*
	Si	12	7,00	
Primario suero miR-92 (191)	No	2	7,25	0,927
	Si	12	7,54	
Primario orina miR-187	No	2	6,50	0,549
	Si	12	7,67	
Primario orina miR-142	No	2	7,00	0,683
	Si	12	7,58	
Primario orina miR-140	No	2	6,50	0,549
	Si	12	7,67	

*Kruskal Wallis

6. Discusión

Los miARNs ofrecen la esperanza de comprender mejor los mecanismos moleculares que se producen en la génesis y progresión de los tumores vesicales y tienen el potencial de ser utilizados como biomarcadores en los fluidos corporales. El análisis de microARNs, aumenta su aceptación como marcadores de diagnóstico, pronóstico y predicción ya que es posible su recolección para estudio durante el muestreo de orina y sangre rutinarios.

El objetivo principal de nuestro estudio era valorar si los diferentes miARNs analizados en sangre y orina nos permitían detectar diferencias entre el grupo de casos y el grupo control, es decir, si había diferencias entre ambos grupos, de modo que los miARNs nos sirvieran como prueba diagnóstica de detección de tumor vesical.

6.1 microARNs en suero

Los grupos de casos y controles en nuestro estudio eran homogéneos en cuanto a edad y características demográficas, por lo tanto, eran comparables.

No se encontraron diferencias de expresión de los diferentes miARNs entre los dos grupos, solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con el miR-200b (103) que se encontraba infraexpresado en el grupo de casos, si realizábamos una selección y analizábamos sólo los individuos en los que hubiera una expresión de miARNs mayor a 0.

En cuanto al miR-200b detectado en plasma, se ha objetivado su importancia en una gran cantidad de artículos científicos, aunque existe variabilidad en cuanto a su utilidad de unos trabajos a otros.

En el artículo publicado por Adam *et al* (64), que fue uno de los que nos ayudó a seleccionar los microARNs en suero de nuestro estudio, se observó que varios miARNs como miR-541, miR-200b, miR-566, miR-487 y miR-148b se encontraban sobreexpresados en el plasma de pacientes con tumor vesical y otros como el miR-25, miR-92a, miR-92b, miR302 y miR-33b se encontraban sobreexpresados en el grupo control.

En nuestro estudio por el contrario el miR-200b aparece infraexpresado en el grupo de casos. También se observó en el trabajo anteriormente citado que el miR-200b se encontraba sobreexpresado en el grupo de pacientes con TVMI y los miR-92 y 33 tenían una correlación inversa con los casos de estadios avanzados, datos que no han sido representados en los resultados de nuestro estudio, ya que no se han encontrado diferencias con los miR-92 y 33 en suero entre los controles y los casos.

En una revisión sistemática y metaanálisis publicada por Xie *et al* en el año 2017(65) se estudió el valor del miR-200 en suero, que junto con otros miARNs (miR-21, miR-143, miR-155, miR-214 y miR-222) habían sido analizados en más de un artículo científico y concluía que su sobreexpresión no se asociaba a una peor supervivencia libre de recurrencia. Sin embargo, en el estudio de Pignot *et al*.(66) se informó que un nivel elevado de miR-200 se asociaba a una supervivencia global más corta. Pero hay que tener en cuenta que el

estudio fue pequeño (n = 72), tenía un poder limitado, podía conducir a un resultado prematuro y el análisis no se ajustó para otras variables asociadas (covariables) que también podrían afectar el resultado de supervivencia. Por lo tanto, se necesitan más estudios prospectivos multicéntricos con seguimiento a gran escala y a largo plazo para obtener una conclusión más persuasiva. En nuestro trabajo el miR-200 no tenía asociación con la mortalidad cáncer específica.

También se ha visto en el trabajo de Shindo y su grupo (67) que la regulación a la baja de miR-200b está asociada con la resistencia a cisplatino en cáncer de vejiga. De modo que el silenciamiento epigenético de miR-200b puede ser un marcador de resistencia a este quimioterápico.

En cuanto a miR-92 analizado en el trabajo publicado en 2016 por Motawi *et al.* (68) se mostró una expresión desregulada en plasma de miR-92a, miR-100 y miR-143 en pacientes con tumor vesical, en comparación con controles sanos, lo que sugería un papel importante de estos miARNs supresores de tumores en la carcinogénesis de vejiga. Aunque el tumor vesical representa una entidad heterogénea con un potencial maligno significativo, uno de los principales hallazgos de ese estudio fue que miR-92a y miR-100 alterados se regulaban negativamente de la misma manera en las dos formas de tumor de vejiga, independientemente de la etapa patológica, lo que sugiere que estas desregulaciones podrían ser eventos relativamente tempranos de la carcinogénesis vesical. Estos resultados corroboraban los reportados por Catto *et al* (69) que encontraron que la expresión alterada de miARNs era un suceso

temprano en la oncogénesis vesical, antes del inicio de la invasión muscular.

En otro estudio realizado por Pignot *et al.* (70) en células tumorales de vejiga, el miR-92a estaba infraexpresado en tejido de TVNMI, pero normalmente se expresaba o sobreexpresaba en tejido de TVMI. Se obtuvo que el miR-92 se correlacionaba inversamente con la etapa clínica avanzada (como ya se ha mencionado previamente), y se ha predicho que miR-92a afecta a los genes que están involucrados en la regulación del citoesqueleto de actina y la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (71). Ambos procesos son bien conocidos por estar asociados con el cáncer.

En nuestro trabajo no se obtuvieron hallazgos estadísticamente significativos que implicaran al miR-92 detectado en suero.

El miR-33 estudiado en el artículo anteriormente citado de Adam (64), se ha asociado recientemente con macrófagos, que son componentes clave del estroma tumoral que se sabe que promueven la progresión y destrucción del tumor según su fenotipo(72)(73)(74). Es posible que ciertas respuestas inmunológicas adaptativas o innatas pueden ser las fuentes plasmáticas de algunos miARNs, como miR-92b y miR-33b, y liberarlos a la circulación sistémica como parte de un mecanismo homeostático. En este escenario, los eventos iniciadores, como el inicio de la malignidad, pueden activar respuestas inmunes, incluidos subconjuntos de células T asociadas con la regulación negativa de miR-92b y miR-33b. Esta "teoría de la inmunovigilancia", propuesta por primera vez por Paul Ehrlich a principios del siglo XX y desarrollada posteriormente en la década de

1970, actualmente incluye el concepto de inmunoedición del tumor, que se cree que continúa durante el desarrollo de este. Se cree que tanto la inmunidad innata como la adaptativa están involucradas en la biología del tumor, y ambas pueden promover la progresión y mediar en la destrucción del mismo.

En nuestro trabajo la única diferencia que se obtuvo con el miR-33 en suero fue al evaluar los grupos de riesgo de pacientes con TVNMI, donde se veía que los pacientes del grupo de riesgo intermedio presentaban una sobreexpresión en suero de este miARN, pero no hemos encontrado en la literatura una posible explicación a este resultado y no podemos corroborar que tenga relevancia clínica. Si estuviera sobreexpresado en pacientes de alto riesgo nos podría ayudar a planificar un tratamiento postoperatorio más rápido, pero el hecho de que se encuentren diferencias en los pacientes de riesgo intermedio no nos aportaría mayor beneficio clínico.

Los miARNs analizados en el estudio de Adam y en otros estudios, eran extraídos de plasma y los estudiados en nuestro trabajo eran extraídos de suero, lo que sugiere que puede haber diferencias en los resultados, ya que en muestras de suero y plasma, las diferentes variables en los sistemas de extracción de sangre (coagulación nativa versus coagulación mejorada con diferentes aditivos para suero), el tiempo de demora entre la recolección y la centrifugación bajo diferentes condiciones de velocidad y temperaturas, pueden conducir a resultados diferentes. Por lo tanto, para comparar los datos de diferentes estudios, se requiere una documentación exacta de estas variables preanalíticas(75)(76)(77).

6.2 microARNs en orina

Para el tumor vesical, la orina, es el fluido corporal más apropiado para el análisis debido a su recolección simple. Está en contacto permanente con el órgano afectado y por lo tanto puede reflejar el estado de la enfermedad a medida que los tumores secretan marcadores a la misma(78). Los exosomas pueden atravesar la membrana basal y transportar los miARNs a la orina. Es posible investigar las muestras de orina nativas no centrifugadas y sus fracciones, como el sobrenadante y el sedimento después de la centrifugación (79). La orina se puede analizar en tres "fracciones": como orina nativa no centrifugada, como sedimento de orina y sobrenadante después de la centrifugación, y como una preparación de exosoma del sobrenadante. Los miRs son detectables en todas las fracciones y pueden obtenerse de varias fuentes. La orina completa puede contener varios tipos de células, como linfocitos, leucocitos, glóbulos rojos, células uroteliales normales, células tumorales o células tubulares renales. Los resultados obtenidos de los sedimentos de orina también están fuertemente influenciados por esta composición celular urinaria. El tiempo de contacto directo con la vejiga urinaria, los hábitos de bebida de los pacientes, la función renal y la diuresis determinan la composición de la orina. Estos problemas aún no se han investigado sistemáticamente para el análisis de miRs urinarios en pacientes con tumor vesical.

En nuestro estudio se extrajeron los microARNs del sedimento urinario tras centrifugación de 10 mL de orina con 400 μ l de 0.5 mL EDTA pH 8.0.

No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de casos y el de controles con los diferentes miARNs. De modo que los diferentes miRs en orina de nuestro estudio no nos ayudan a distinguir entre casos y controles.

Muchos estudios han investigado el rendimiento diagnóstico de los miARNs en orina de pacientes con tumor vesical. Hanke *et al* (59) fueron los primeros en publicar diferencias en la expresión en orina de miR-126 y miR-182 en pacientes con tumor vesical. El grupo de Mengual *et al* realizó un perfil general de expresión de miARNs utilizando una matriz de miARNs. Perfilaron 754 miRs diferentes utilizando las matrices TaqMan (63). Seleccionaron 22 miARNs del set de validación y posteriormente identificaron unos 6 miARNs como firma diagnóstica con sensibilidad en la detección de tumor vesical del 84,8% y especificidad del 86,5% (área bajo la curva del 92%). Estos 6 miARNs que seleccionaron fueron el miR-25, miR-18a, miR-187, miR-204, miR-142-3p y miR-140-5p. En este trabajo se obtuvo que los tres primeros se encontraban sobreexpresados en pacientes con tumor vesical y los tres últimos se encontraban infraexpresados. También se encontraron diferencias en la expresión de miARNs en pacientes con TVNMI de alto y bajo grado pero no entre TVMI y TVNMI. En otro trabajo publicado por el mismo grupo español(80), decidieron analizar si los 6 miARNs podían utilizarse como biomarcadores con valor predictivo en el pronóstico de los TVNMI. Se analizaron 210 orinas de pacientes con TVNMI y finalmente el miR-187-3p y el miR-25-3p no se analizaron porque en más de un 30% de las muestras no se expresaban. El miR-142 no tuvo significación estadística en el análisis multivariante y los miARNs que

se obtuvieron como factores pronósticos independientes de progresión tumoral fueron el miR-140-5p y el miR-92-3p. Este grupo, posteriormente diseñó un trabajo de validación de estos y otros miARNs en un set de diagnóstico (81) y realizó un estudio prospectivo, independiente y multicéntrico para valorar la utilidad diagnóstica del set (82) demostrando una precisión diagnóstica igual o superior al gold estándar actual (cistoscopia combinada con citología). Además, demostró una mayor sensibilidad que la citología, manteniendo su especificidad. En consecuencia, esta firma de miARNs cumple con los requisitos para su consideración como prueba molecular aplicable a la práctica clínica en el manejo del tumor vesical.

El miR-187-5p está sobrerregulado en tejido de tumor vesical y líneas celulares de cáncer de vejiga según el trabajo de Li y colaboradores (83). Los pacientes con menor expresión de miR-187-5p tenían menor riesgo de recidiva. La regulación positiva de miR-187-5p promueve la proliferación y movilidad celular e inhibe la apoptosis de las células 5637 y UM-UC-3, mientras que la regulación negativa de miR-187-5p revierte estos efectos. Demostraron que el oncogén miR-187-5p está asociado con la proliferación celular, la migración, la invasión, la apoptosis y un mayor riesgo de recurrencia en el cáncer de vejiga.

El miR-142-3p disminuye la proliferación, migración e invasión de las células de tumor vesical por medio de la vía Rac1(84).

Según los resultados de los estudios del grupo de Yamada (85) el miR-140-5p actúa como un miR antitumoral en tumor vesical. Se ha

visto que la expresión de PLOD1 (procolageno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 1) está directamente regulado por el miR-140-5p y en las células de tumor vesical se ha observado una expresión aberrante de PLOD1 y se vió en el análisis multivariante que su expresión era un factor pronóstico independiente en tumor vesical.

En nuestro trabajo uno de los objetivos secundarios era valorar si los miARNs analizados se asociaban con el riesgo de recidiva y progresión, pero el número de pacientes que recidivaron fue muy bajo, sólo quince, y el número de estos pacientes que progresaron fue aún menor, sólo cinco. Para analizar la recidiva y la progresión debíamos agruparlos por grupos de riesgo quedando muy pocos casos en cada grupo para su análisis. Por esto no se pudo realizar este análisis.

En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-187, el miR-142 y el miR-140 en orina para distinguir entre casos y controles, pero sí entre el grupo de pacientes con TVNMI y TVMI, habiendo una sobreexpresión de estos miARNs en la orina de los pacientes con TVNMI. Podemos decir que hemos encontrado diferencias entre ambos grupos, pero con el número de pacientes que presentamos en cada grupo, no podemos concluir que tengamos una firma miARNs que nos permita distinguir entre ambos grupos. Si estos resultados se confirmaran, aportarían una información clínica relevante, ya que no es sólo importante diagnosticar un tumor vesical, diagnosticar un TVMI a la menor brevedad, nos permitiría agilizar el proceso diagnóstico y terapéutico de estos pacientes que como hemos mencionado anteriormente tienen peor pronóstico.

Esto mismo se estudió en el trabajo de Jiang y colaboradores (86). Se buscaban biomarcadores no invasivos, en este caso en suero, para predecir el riesgo de TVMI y poder acelerar la terapia adecuada y reducir la morbilidad y el costo. Se llevó a cabo un análisis de miARNs de todo el genoma mediante secuenciación masiva seguido de dos fases de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real PCR (RT-qPCR), se realizaron ensayos en suero de 207 pacientes con TVMI, 285 pacientes con TVNMI y 193 controles. Desarrollaron un panel de cuatro miARNs (miR-422a-3p, miR-486-3p, miR-103a-3p y miR-27a-3p) para la predicción de TVMI con un área bajo la curva del 89,4%, siendo esta significativamente mayor que los de grado y citología urinaria (ambos $p < 0,05$). Además, se demostró que los pacientes con TVMI con niveles bajos de miR-486-3p y miR-103a-3p tenían una peor supervivencia global y estos miARNs se asociaban independientemente con esta.

Otro trabajo publicado por el grupo de Wszolek (87) estudió las diferencias en miARNs de líneas celulares de TVNMI y TVMI para encontrar una firma que permitiera entre ellos. La prueba diagnóstica, basada en los tres miARNs más discriminatorios en su panel (miR-200c, miR-141 y miR-30b), mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96.2%. Tal panel de miARNs puede tener potencial de identificar tumores vesicales invasivos mal clasificados en la evaluación patológica de muestras de biopsia de vejiga, por ejemplo, cuando la muscular propia no está representada.

Volviendo al objetivo principal de nuestro estudio, otros grupos como el de Miah y colaboradores (88) han estudiado firmas de miARNs en orina para la detección de tumor vesical. Descubrieron que los

miARNs son estables dentro de las células urinarias a pesar del manejo no adecuado y detectaron una expresión diferencial en 10 miARNs de pacientes con cáncer y controles (miARNs 15a / 15b / 24-1 / 27b / 100 / 135b / 203/ 212 / 328 / 1224).

Individualmente, miR-1224-3p es el que tuvo el mejor rendimiento con especificidad, valores predictivos positivos y negativos y una concordancia del 83%, 83%, 75% y 77%, respectivamente. La combinación de miRs-135b / 15b / 1224-3p detectó cáncer de vejiga con una alta sensibilidad (94,1%), especificidad suficiente (51%) y fue correcta en el 86% de los pacientes (concordancia). El estudio concluyó que el uso de este panel de miARNs en pacientes con hematuria habría encontrado el 94% de tumores vesicales y habría reducido en un 26% la realización de cistoscopias, sin embargo, hubiera dejado sin diagnóstico un 3% de TVMI (2 casos), un número nada despreciable teniendo en cuenta que los TVMI son los más agresivos y los que más se benefician de un diagnóstico precoz, ya que están asociados a una tasa de mortalidad muy elevada.

El grupo de Urquidi (89), estudió un modelo de 25 miRs capaz de predecir la presencia de tumor vesical con alta sensibilidad (87%) manteniendo una especificidad óptima (100%). Estos valores se comparan muy favorablemente con los de la cistoscopia y la citología urinaria. La restricción de los modelos de predicción a 15 y 10 microARNs resultó en una pérdida de rendimiento, pero incluso un modelo de 10 miARNs alcanzó una sensibilidad del 84% y una especificidad del 87% (área bajo la curva 90,2%). También reveló varios miRs (miR-140-5p, miR-199a-3p, miR-93, miR-652, miR-1305, miR -224, miR-96, miR-766) que contribuyeron consistentemente en

todos los modelos. Algunos de estos miARNs se repiten en otros trabajos como el miR-140-5p que es uno de los que estudiamos en nuestro trabajo.

El grupo de Hofbauer (90) analizó la expresión de 384 miARNs diferentes en 16 muestras de orina de pacientes con tumor vesical y controles utilizando una matriz de microARNs humano basado en tecnología Taqman TM. La firma identificada se validó posteriormente en una cohorte independiente de 202 muestras de orina de pacientes con tumor vesical y controles con hematuria microscópica. El análisis identificó un grupo de 6 miARNs (let-7c, miR-135a, miR-135b, miR-148a, miR-204, miR-345) que distinguían a los casos de los controles con un área bajo la curva de 88.3 %.

7. Fortalezas y limitaciones del estudio

Fortalezas y limitaciones del estudio

7.1 Fortalezas del estudio

Una de las mayores fortalezas de nuestro estudio es que los grupos estudiados eran homogéneos, no había diferencias en edad, género y comorbilidades, de modo que eran grupos comparables con pocos factores de confusión que pudieran influir en el análisis de los resultados.

Tanto la selección de casos y controles como la toma de muestras y el seguimiento se hizo por el mismo grupo de personas y de forma muy estricta, de modo que pensamos que a este nivel no hubo variaciones que pueden suponer una variabilidad a la hora de recolectar las muestras o analizarlas.

7.2 Limitaciones del estudio

Se trata de un trabajo con un número limitado de individuos y esto puede haber supuesto que no encontremos diferencias estadísticamente significativas.

Otra de las limitaciones de nuestro trabajo es la heterogeneidad de tumores que había en la cohorte de pacientes. Hay una variedad muy amplia de tumores vesicales con diferentes características, agresividad y pronóstico. Esta puede ser la causa de que no se haya encontrado una firma de miARNs para el diagnóstico de tumor vesical en este trabajo. Esto también ocasionaba que al agruparlos quedara

una N muy pequeña en cada uno de los grupos, limitando los resultados estadísticos.

8. Conclusiones

1. En nuestro trabajo no hemos obtenido una firma de miARNs que nos permita distinguir entre pacientes con tumor vesical e individuos sanos. De modo que no hemos podido corroborar el objetivo primario. No hemos conseguido aislar en los miARNs analizados en suero y orina una buena firma con capacidad diagnóstica de tumor vesical.
2. Hemos encontrado diferencias entre los miARNs de orina de los pacientes con tumores vesicales no musculo-invasivos y pacientes con tumores vesicales músculo-invasivos.
3. No hemos podido demostrar la utilidad de los miARNs como marcadores de recidiva o progresión en el seguimiento del tumor vesical no músculo-invasivo.
4. No hemos encontrado diferencias en los miARNs entre los distintos grupos de riesgo en los pacientes con TVNMI.
5. No hemos podido demostrar la utilidad de los miARNs como marcadores pronósticos en los tumores vesicales músculo-invasivos.

9. Bibliografía

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Cancer TD-... J of, 2018 undefined. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. Elsevier [Internet]. [cited 2020 Apr 7]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804918309559>
2. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. medical sciences Epidemiology of Bladder Cancer. 2020;1–12.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.
4. Compérat E, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, Van Rhijn BWG, Rouprêt M, et al. Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and CIS) EAU Guidelines. Eur Urol [Internet]. 2019;1–48. Available from: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Non-muscle-invasive-Bladder-Cancer-TaT1-CIS-2018.pdf>
5. Miñana B, Cózar JM, Palou J, Unda Urzaiz M, Medina-Lopez RA, Subirá Ríos J, et al. Bladder cancer in Spain 2011: Population based study. J Urol [Internet]. 2014 Feb [cited 2020 Apr 7];191(2):323–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994371>
6. Chavan S, Bray F, Lortet-Tieulent J, Goodman M, Jemal A.

- International variations in bladder cancer incidence and mortality [Internet]. Vol. 66, *European Urology*. Elsevier; 2014 [cited 2020 Apr 7]. p. 59–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451595>
7. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. Vol. 71, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 96–108.
 8. Bosetti C, Bertuccio P, Chatenoud L, Negri E, La Vecchia C, Levi F. Trends in mortality from urologic cancers in Europe, 1970-2008. *Eur Urol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2020 Apr 7];60(1):1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497988>
 9. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2011 Aug 17 [cited 2020 Apr 7];306(7):737–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846855>
 10. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*. 2000;86(2):289–94.
 11. Reulen RC, Kellen E, Buntinx F, Brinkman M, Zeegers MP. A meta-analysis on the association between bladder cancer and occupation. In: *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2008. p. 64–78.

12. Colt JS, Friesen MC, Stewart PA, Donguk P, Johnson A, Schwenn M, et al. A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2020 Jul 4];71(10):667–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25201311/>
13. Harling M, Schablon A, Schedlbauer G, Dulon M, Nienhaus A. Bladder cancer among hairdressers: A meta-analysis [Internet]. Vol. 67, *Occupational and Environmental Medicine*. 2010 [cited 2020 Apr 7]. p. 351–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20447989>
14. Pesch B, Gawrych K, Rabstein S, Weiss T, Casjens S, Rihs HP, et al. N-acetyltransferase 2 phenotype, occupation, and bladder cancer risk: Results from the EPIC cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2013 Nov [cited 2020 Apr 7];22(11):2056–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092628>
15. Zelefsky MJ, Housman DM, Pei X, Alicikus Z, Magsanoc JM, Dauer LT, et al. Incidence of secondary cancer development after high-dose intensity-modulated radiotherapy and image-guided brachytherapy for the treatment of localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Jul 1;83(3):953–9.
16. Murta-Nascimento C, Silverman DT, Kogevinas M, García-Closas M, Rothman N, Tardón A, et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: Do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer*

- Epidemiol Biomarkers Prev. 2007 Aug 1;16(8):1595–600.
17. Zamora-Ros R, Sacerdote C, Ricceri F, Weiderpass E, Roswall N, Buckland G, et al. Flavonoid and lignan intake in relation to bladder cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Cancer* [Internet]. 2014 Oct 28 [cited 2020 Apr 7];111(9):1870–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121955>
 18. Network A, Wein A, Kavoussi L, Novick A. Cáncer de vejiga. 2015 [cited 2021 Apr 22]; Available from: https://jamanetwork.com/journals/jama/articlepdf/2467556/jpg150039_es-us.pdf
 19. American Cancer Society. Overview: bladder cancer. http://www.cancer.org/docroot/CRI/CRI_2_1x.asp?dt=44. -
Buscar con Google [Internet]. [cited 2020 Apr 8]. Available from: https://www.google.com/search?q=American+Cancer+Society.+Overview%3A+bladder+cancer.+http%3A%2F%2Fwww.cancer.org%2Fdocroot%2FCRI%2FCRI_2_1x.asp%3Fdt%3D44.&rlz=1C5CHFA_enES857ES857&oq=American+Cancer+Society.+Overview%3A+bladder+cancer.+http%3A%2F%2Fwww.cancer.org%2Fdocroot%2FCRI%2FCRI_2_1x.asp%3Fdt%3D44.&aqs=chrome..69i57.1214j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8
 20. Campbell-Walsh Urology, 11th Edition (4 Volumes Set).pdf.
 21. Casey RG, Catto JWF, Cheng L, Cookson MS, Herr H, Shariat S, et al. Diagnosis and management of urothelial carcinoma in situ of the lower urinary tract: A systematic review [Internet]. Vol.

- 67, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2015 [cited 2020 Jul 4]. p. 876–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25466937/>
22. Sylvester RJ, Van Der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. 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(3):466–77.
 23. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, et al. Predicting Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Recurrence and Progression in Patients Treated With Bacillus Calmette-Guerin: The CUETO Scoring Model. *J Urol*. 2009 Nov;182(5):2195–203.
 24. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93–105.
 25. Ozden E, Turgut AT, Turkolmez K, Resorlu B, Safak M. Effect of Bladder Carcinoma Location on Detection Rates by Ultrasonography and Computed Tomography. *Urology* [Internet]. 2007 May [cited 2020 Apr 8];69(5):889–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482928>
 26. Ahmed FO, Hamdan HZ, Abdelgalil HB, Sharfi AA. A comparison between transabdominal ultrasonographic and cystourethroscopy findings in adult Sudanese patients

- presenting with haematuria. *Int Urol Nephrol* [Internet]. 2015 Feb [cited 2020 Apr 8];47(2):223–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374263>
27. Stamatiou K, Papadoliopoulos I, Dahanis S, Zafiropoulos G, Polizois K. The accuracy of ultrasonography in the diagnosis of superficial bladder tumors in patients presenting with hematuria. *Ann Saudi Med* [Internet]. 2009 [cited 2020 Apr 8];29(2):134–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318748>
 28. Blick CGT, Nazir SA, Mallett S, Turney BW, Onwu NN, Roberts ISD, et al. Evaluation of diagnostic strategies for bladder cancer using computed tomography (CT) urography, flexible cystoscopy and voided urine cytology: Results for 778 patients from a hospital haematuria clinic. *BJU Int*. 2012 Jul;110(1):84–94.
 29. Herr HW. The risk of urinary tract infection after flexible cystoscopy in patients with bladder tumor who did not receive prophylactic antibiotics. *J Urol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2020 Apr 8];193(2):548–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25046618>
 30. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2020 Apr 8];33(2):66.e25-66.e31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037483>

31. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. In: *Urology*. 2005. p. 35–63.
32. Parker J, Spiess PE. Current and emerging bladder cancer urinary biomarkers. Vol. 11, *TheScientificWorldJournal*. 2011. p. 1103–12.
33. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Compérat E, Kaasinen E, Palou J, et al. EAU Guidelines on Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2017;1–45.
34. Gudjónsson S, Isfoss BL, Hansson K, Domanski AM, Warenholt J, Soller W, et al. The Value of the UroVysion® Assay for Surveillance of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2008 Aug;54(2):402–8.
35. De Bekker-Grob EW, Van Der Aa MNM, Zwarthoff EC, Eijkemans MJC, Van Rhijn BW, Van Der Kwast TH, et al. Non-muscle-invasive bladder cancer surveillance for which cystoscopy is partly replaced by microsatellite analysis of urine: A cost-effective alternative? *BJU Int* [Internet]. 2009 Jul [cited 2020 Jul 4];104(1):41–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19500328/>
36. Lopez-Beltran A, Cheng L, Gevaert T, Blanca A, Cimadamore A, Santoni M, et al. Current and emerging bladder cancer biomarkers with an emphasis on urine biomarkers [Internet]. Vol. 20, *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Taylor and Francis

- Ltd; 2020 [cited 2020 Jul 5]. p. 231–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31795775/>
37. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: What are the benefits and costs? *World J Urol.* 2009;27(3):295–300.
 38. Witjes JA, Bruins M, Cathomas R, Compérat E, Cowan NC, Gakis G, et al. EAU Guidelines on and Metastatic Bladder Cancer. 2019;
 39. Sánchez-Carbayo M, Cordon-Cardó C. Molecular Alterations Associated With Bladder Cancer Progression. *Semin Oncol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2020 Apr 8];34(2):75–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382791>
 40. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2020 Jul 3];75(5):843–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8252621/>
 41. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* [Internet]. 2000 Nov 2 [cited 2020 Jul 3];408(6808):86–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11081512/>
 42. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2020 Jul 3];18(5):504–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15014042/>

43. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions [Internet]. Vol. 17, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2016 [cited 2020 Jul 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27754357/>
44. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. MiRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants [Internet]. Vol. 31, Trends in Genetics. Elsevier Ltd; 2015 [cited 2020 Jul 3]. p. 613–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26453491/>
45. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell [Internet]. 2003 Oct 17 [cited 2020 Jul 3];115(2):209–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14567918/>
46. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature [Internet]. 2007 Jul 7 [cited 2020 Jul 3];448(7149):83–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17589500/>
47. Pong SK, Gullerova M. Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes – Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins. Vol. 592, FEBS Letters. Wiley Blackwell; 2018. p. 2973–86.
48. Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, et al. A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. Mol Cell [Internet]. 2008 Nov 21 [cited 2020 Jul

- 3];32(4):519–28. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19026782/>
49. Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: Non-canonical pathways for microRNA production [Internet]. Vol. 284, Molecular Genetics and Genomics. Mol Genet Genomics; 2010 [cited 2020 Jul 3]. p. 95–103. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20596726/>
50. Li C, Xiong Q, Zhang J, Ge F, Bi LJ. Quantitative proteomic strategies for the identification of microRNA targets. Vol. 9, Expert Review of Proteomics. 2012. p. 549–59.
51. Jin HY, Xiao C. MicroRNA mechanisms of action: What have we learned from mice? [Internet]. Vol. 6, Frontiers in Genetics. Frontiers Media S.A.; 2015 [cited 2020 Jul 3]. p. 328. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4644800/>
52. Machado MT, Navega S, Dias F, de Sousa MJC, Teixeira AL, Medeiros R. microRNAs for peripheral blood fraction identification: Origin, pathways and forensic relevance. Life Sci [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2020 Jul 3];143:98–104. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320515300576>
53. Zhang B, Pan X, Anderson TA. MicroRNA: A new player in stem cells. J Cell Physiol [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2020 Apr 8];209(2):266–9. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.20713>

54. Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical Applications for microRNAs in Cancer. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2013 Jan [cited 2020 Jul 5];93(1):98–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23212103/>
55. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Vol. 116, *Cell*. Cell Press; 2004. p. 281–97.
56. Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P, et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2007 Sep [cited 2020 Apr 8];25(5):387–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826655>
57. Mbeutcha A, Lucca I, Mathieu R, Lotan Y, Shariat SF. Current Status of Urinary Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer [Internet]. Vol. 43, *Urologic Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2016 [cited 2020 Apr 8]. p. 47–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26614028>
58. Snowdon J, Boag S, Feilotter H, Izard J, Siemens DR. A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *J Can Urol Assoc* [Internet]. 2013 Feb [cited 2020 Jul 5];7(2):28–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22630336/>
59. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, 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 Semin Orig Investig* [Internet]. 2010

- Nov [cited 2020 Apr 8];28(6):655–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375957>
60. Mengual L, Burset M, Marín-Aguilera M, Ribal MJ, Alcaraz A. Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays. *BMC Res Notes* [Internet]. 2008 Jun 5 [cited 2020 Apr 8];1:21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710479>
61. Sanders I, Holdenrieder S, Walgenbach-Brünagel G, von Ruecker A, Kristiansen G, Müller SC, et al. Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma. *Int J Urol* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2020 Apr 8];19(11):1017–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1442-2042.2012.03082.x>
62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
63. Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Gazquez C, Ribal MJ, Alcaraz A. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *Int J Cancer*. 2013;133(11):2631–41.
64. Adam L, Wszolek MF, Liu CG, Jing W, Diao L, Zien A, et al. Plasma microRNA profiles for bladder cancer detection. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2013;31(8):1701–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.06.010>

65. Xie Y, Ma X, Chen L, Li H, Gu L, Gao Y, et al. MicroRNAs with prognostic significance in bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. Vol. 7, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group; 2017.
66. Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, Susini A, Tozlu S, Vieillefond A, et al. MicroRNA expression profile in a large series of bladder tumors: Identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2020 Apr 8];132(11):2479–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23169479>
67. Shindo T, Niinuma T, Nishiyama N, Shinkai N, Kitajima H, Kai M, et al. Epigenetic silencing of miR-200b is associated with cisplatin resistance in bladder cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2018 May 11 [cited 2020 Apr 10];9(36):24457–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29849953>
68. Motawi TK, Rizk SM, Ibrahim TM, Ibrahim IA-R. Circulating microRNAs, miR-92a, miR-100 and miR-143, as non-invasive biomarkers for bladder cancer diagnosis. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2020 Apr 8];34(3):142–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbf.3171>
69. Catto JWF, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudzic E, et al. Distinct MicroRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8472–81.

70. Pignot G, Vieillefond A, Vacher S, Zerbib M, Debre B, Lidereau R, et al. Hedgehog pathway activation in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* [Internet]. 2012 Mar 13 [cited 2020 Apr 8];106(6):1177–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361633>
71. Papadopoulos GL, Alexiou P, Maragkakis M, Reczko M, Hatzigeorgiou AG. DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2020 Apr 8];25(15):1991–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19435746>
72. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Oct 5 [cited 2020 Apr 8];107(40):17321–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855588>
73. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity [Internet]. Vol. 18, *Current Opinion in Genetics and Development*. 2008 [cited 2020 Apr 8]. p. 11–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308558>
74. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2020 Apr 8];67(20):10019–26.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942936>
75. Armstrong DA, Green BB, Seigne JD, Schned AR, Marsit CJ. MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2015 Nov 14 [cited 2020 Apr 8];14(1):194. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26576778>
 76. Kim DJ, Linnstaedt S, Palma J, Park JC, Ntrivalas E, Kwak-Kim JYH, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2012 Jan [cited 2020 Apr 8];14(1):71–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22154918>
 77. Zheng XH, Cui C, Zhou XX, Zeng YX, Jia WH. Centrifugation: An important pre-analytic procedure that influences plasma microRNA quantification during blood processing. *Chin J Cancer* [Internet]. 2013 Dec [cited 2020 Apr 8];32(12):667–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601242>
 78. Cheng Y, Wang X, Yang J, Duan X, Yao Y, Shi X, et al. A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2020 Apr 8];53(5):668–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921780>
 79. Tölle A, Blobel CC, Jung K. Circulating miRNAs in blood and urine as diagnostic and prognostic biomarkers for bladder cancer: An update in 2017 [Internet]. Vol. 12, *Biomarkers in Medicine*. Future Medicine Ltd.; 2018 [cited 2020 Apr 8]. p. 667–

76. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896971>
80. Ingelmo-Torres M, Lozano JJ, Izquierdo L, Carrion A, Costa M, Gómez L, et al. Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for nonmuscle invasive bladder cancer. *Oncotarget*. 2017;8(11):18238–47.
81. Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Buset M, Fernández PL, et al. Validation study of a noninvasive urine test for diagnosis and prognosis assessment of bladder cancer: Evidence for improved models. *J Urol [Internet]*. 2014 Jan [cited 2020 Apr 8];191(1):261–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831312>
82. Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Palou J, Rodríguez-Faba O, et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: A prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer [Internet]*. 2016 Feb 1 [cited 2020 Apr 8];54:131–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26761785>
83. Li Z, Lin C, Zhao L, Zhou L, Pan X, Quan J, et al. Oncogene miR-187-5p is associated with cellular proliferation, migration, invasion, apoptosis and an increased risk of recurrence in bladder cancer. *Biomed Pharmacother [Internet]*. 2018 Sep 1 [cited 2020 Apr 10];105:461–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29883941>
84. Li WQ, Zhao WC, Xin J, Niu TL, Chao YF, Zhou P, et al.

- MicroRNA-142-3p suppresses cell proliferation and migration in bladder cancer via Rac1. *J Biol Regul Homeost Agents* [Internet]. 2020 Feb 28 [cited 2020 Apr 10];34(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32107907>
85. Yamada Y, Kato M, Arai T, Sanada H, Uchida A, Misono S, et al. Aberrantly expressed PLOD1 promotes cancer aggressiveness in bladder cancer: a potential prognostic marker and therapeutic target. *Mol Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 10];13(9):1898–912. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31199049>
86. Jiang X, Du L, Duan W, Wang R, Yan K, Wang L, et al. Serum microRNA expression signatures as novel noninvasive biomarkers for prediction and prognosis of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget*. 2016;7(24):36733–42.
87. Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Kenney PA, Gould JJ, Silva Neto B, LaVoie AK, et al. A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2011;29(6):794-801.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.08.024>
88. Miah S, Dudzic E, Drayton RM, Zlotta AR, Morgan SL, Rosario DJ, et al. An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(1):123–8.
89. Urquidi V, Netherton M, Gomes-Giacoia E, Serie DJ, Eckel-Passow J, Rosser CJ, et al. A microRNA biomarker panel for the non-invasive detection of bladder cancer. *Oncotarget* [Internet].

- 2016 Dec 27 [cited 2020 Apr 8];7(52):86290–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863434>
90. Hofbauer SL, de Martino M, Lucca I, Haitel A, Susani M, Shariat SF, et al. A urinary microRNA (miR) signature for diagnosis of bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2018 Dec 1;36(12):531.e1-531.e8.
91. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: A cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res [Internet]*. 2012 Mar [cited 2020 Apr 11];5(3):492–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158052>
92. Köberle V, Kakoschky B, Ibrahim AA, Schmithals C, Peveling-Oberhag J, Zeuzem S, et al. Vesicle-associated microRNAs are released from blood cells on incubation of blood samples. *Transl Res [Internet]*. 2016 Mar 1 [cited 2020 Apr 11];169:40–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26608461>
93. Tiberio P, Callari M, Angeloni V, Daidone MG, Appierto V. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *Biomed Res Int [Internet]*. 2015 [cited 2020 Apr 11];2015:731479. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874226>
94. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, et al. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLoS One [Internet]*. 2013 Jun 7 [cited 2020 Apr 11];8(6):e64795. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762257>
95. McDonald JS, Milosevic D, Reddi H V., Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem [Internet]*. 2011 Jun [cited 2020 Apr 11];57(6):833–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487102>
 96. Kim DJ, Linnstaedt S, Palma J, Park JC, Ntrivalas E, Kwak-Kim JYH, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J Mol Diagnostics [Internet]*. 2012;14(1):71–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.09.002>
 97. Wang K, Yuan Y, Cho J-H, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma. Ahuja SK, editor. *PLoS One [Internet]*. 2012 Jul 31 [cited 2020 Apr 11];7(7):e41561. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041561>
 98. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2008 Jul 29 [cited 2020 Jul 5];105(30):10513–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18663219/>
 99. Usuba W, Urabe F, Yamamoto Y, Matsuzaki J, Sasaki H, Ichikawa M, et al. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(1):408–

- 19.
100. Xie Y, Ma X, Chen L, Li H, Gu L, Gao Y, et al. MicroRNAs with prognostic significance in bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05801-3>
101. Khan J, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: Best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(5):608–21.
102. Schwarzenbach H, Da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. Vol. 61, *Clinical Chemistry*. American Association for Clinical Chemistry Inc.; 2015. p. 1333–42.
103. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK): Explanation and elaboration. *PLoS Med*. 2012 May;9(5).
104. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*. 2015 Oct 28;351.
105. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr 1;55(4):611–22.

10. Anexos

10.1 Anexo 1

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “Aislamiento y análisis de micro-ARN en cáncer de vejiga” que está siendo realizado por el Dr. Jose María Martínez Jabaloyas y la Dra. Ana Castelló Porcar, del Servicio de Urología, y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes:

El cáncer de vejiga es un tumor muy frecuente y la detección temprana del mismo es muy importante para conocer como evolucionará la enfermedad. La supervivencia puede ser muy alta cuando los tumores están localizados en la superficie de la vejiga, pero cuando estos invaden tejidos más profundos, la enfermedad es más agresiva y la probabilidad de morir por esa enfermedad es mayor. Aproximadamente el 75% de los pacientes tienen una enfermedad superficial, un 20% enfermedad que invade tejidos más profundos de la vejiga y un 5% tienen enfermedad en otros órganos cuando se detectan. Para diagnosticar estos tumores se utilizan técnicas como la cistoscopia (mirar la vejiga por dentro con un cámara) y la citología (ver si hay células de tumor en la orina), pero estas pruebas aunque son poco agresivas no siempre diagnostican el tumor.

Nuestro objetivo es mejorar la forma de diagnosticar estos tumores de forma temprana sin causar mayores molestias a los pacientes.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El objetivo de este estudio es llegar al diagnóstico de cáncer de vejiga mediante el análisis de micro-ARN en muestras de sangre y orina, de modo que la detección de este tumor se pudiera realizar de forma precoz y menos invasiva que las pruebas diagnósticas que se realizan actualmente.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio en el caso de que haya sido diagnosticado de tumor vesical o en caso de que se trate de un paciente sano, sin diagnóstico de tumor, para poder comparar los resultados de estos análisis en gente sana y enferma y poder valorar si realmente este estudio tiene utilidad.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos muestras de su sangre y orina.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda

poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se espera ninguna complicación añadida a las que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que pueden ser, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar de punción.

Se intentará realizar estas extracciones en el momento de la cirugía (cuando le vayan a poner la vía periférica) o cuando se vaya a realizar otro análisis de sangre para intentar causarle las menores molestias posibles.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el diagnóstico y seguimiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. Jose María Martínez Jabaloyas o la Dra. Ana Castelló Porcar, en el teléfono 9633862600 extensión 51240.

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de sangre y orina.

Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

Las muestras biológicas se conservarán en una colección en la Unidad Central de Investigación a cargo de uno de los investigadores colaboradores.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: Aislamiento y análisis de micro-ARN en cáncer de vejiga

Investigador principal: Jose María Martínez Jabaloyas

Servicio: Urología

Yo, _____ he sido informado por el Dr. _____, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- Comprendo que mi participación es voluntaria
- Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del

Hospital Clínico Universitario de Valencia

Sí No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

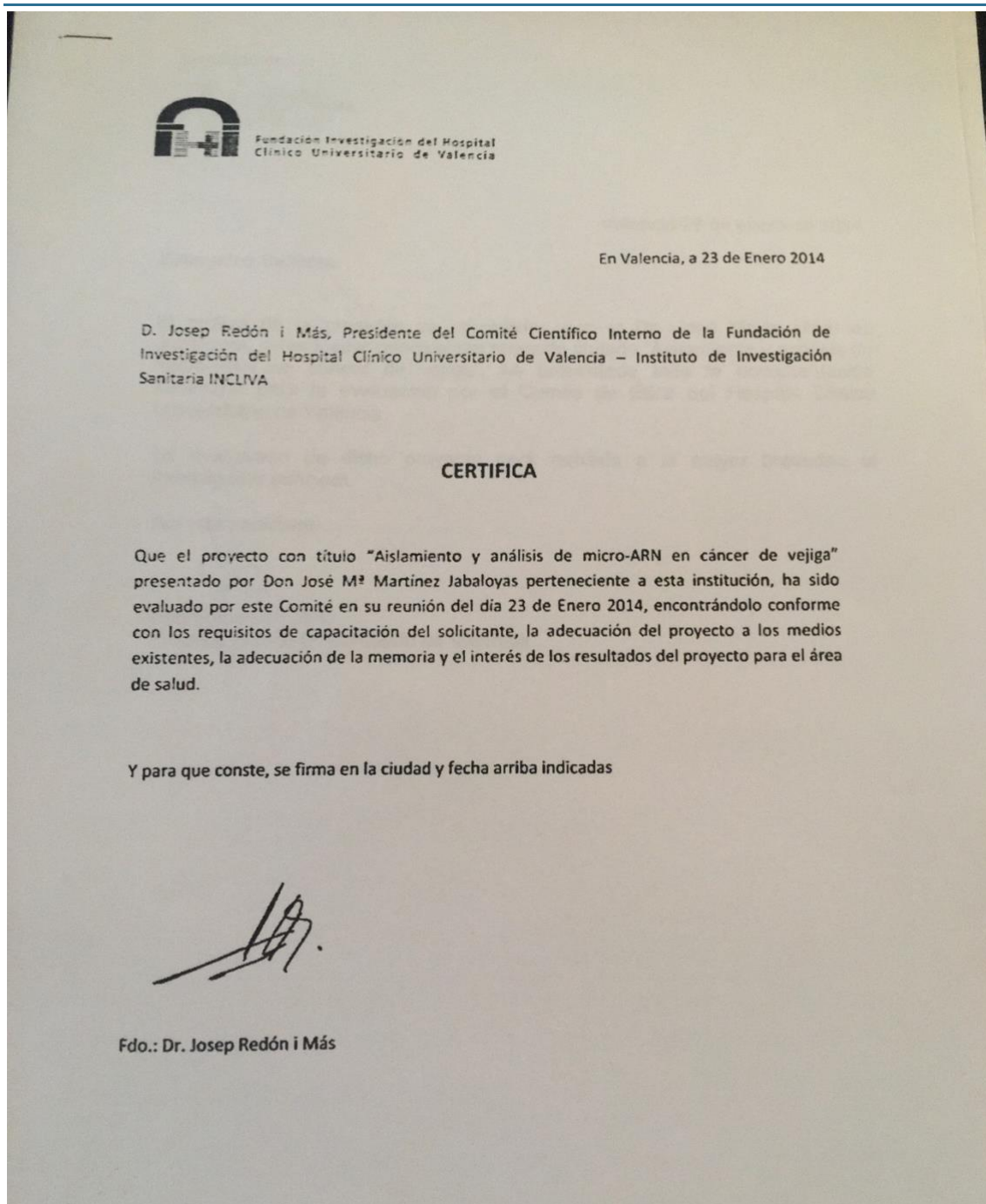
Firma del paciente:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha

10.2 Aprobación Comité Ético





**INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC
UNIVERSITARI DE VALENCIA**

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 30 de enero de 2014, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Aislamiento y análisis de micro-ARN en cáncer de vejiga.

Que será llevado a cabo en el Servicio de Urología y cuyo investigador principal es el Dr. José M^a Martínez Jabaloyas, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea) en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria.

Valencia, 30 de enero de 2014

Fdo. : Dr. D. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

En Valencia, a 06 de julio de 2020

El pasado 30 de enero de 2014 fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico de Valencia el proyecto de investigación "Aislamiento y análisis de micro-ARN en cáncer de vejiga". Dicho trabajo fue avalado y será presentado como tesis doctoral de la Sra Ana Castelló Porcar, dirigida por los Dres Francisco Dasí Fernández y José María Martínez Jabaloyas.

El proyecto es el mismo, pero su título ha cambiado por "Estudio de la utilidad clínica de los microRNAs en suero y orina de los pacientes con cáncer de vejiga".

Ante este cambio, solicitamos la nueva aprobación del Comité Ético para poder realizar los trámites de depósito de tesis.

Un cordial saludo



Ana Castelló Porcar

José María Martínez Jabaloyas

Francisco Dasí Fernández

