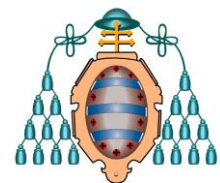

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO MÚSCULO INVASIVOS

Investigación en Cirugía y
Especialidades Médico-
Quirúrgicas

Raquel Sacristán González



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO MÚSCULO INVASIVOS

Investigación en Cirugía y
Especialidades Médico-
Quirúrgicas

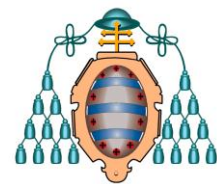
Raquel Sacristán González

Directora:

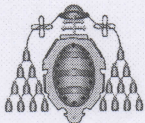
Marta Sánchez-Carbayo Martín

Director:

Jesús María Fernández Gómez



UNIVERSIDAD DE OVIEDO



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma:	Inglés:
Comparación de perfiles de metilación de genes supresores tumorales en distintos subgrupos de tumores vesicales no músculo-invasivos	Comparative methylation profiles of tumor suppressor genes in different subgroups of non-muscle invasive bladder tumors

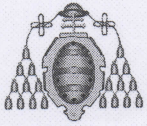
2.- Autor	
Nombre:	[REDACTED]
Raquel Sacristán González	[REDACTED]
Programa de Doctorado: Oncología Urológica	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Existen factores tanto genéticos como epigenéticos involucrados en la tumorigénesis y progresión del cáncer de vejiga. El papel de los factores epigenéticos para la diferenciación patológica y clínica de los distintos subgrupos no ha sido aún bien definida. Nuestro objetivo fue evaluar el papel del estado de metilación de 25 genes supresores de tumores (GST) para discriminar entre los distintos subtipos de tumor de vejiga no músculo-invasivo y su papel como marcador pronóstico.

MÉTODOS: Se realiza un diseño retrospectivo en muestras de tumor incluidas en parafina de 79, 81 y 91 pacientes con tumor primario no músculo invasivo Ta de bajo grado (TaBG), T1 de bajo grado (T1BG) y T1 de alto grado (T1AG) respectivamente. El estado de metilación de los 25 genes fue medido utilizando una técnica de amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación y específica de metilación (MS-MLPA), tomándose como umbrales los valores de 0.3 y 0.5. Recidiva, progresión a tumor músculo invasor y supervivencia cáncer-específica fueron analizados usando el test univariado y multivariado de Cox.

RESULTADOS: El gen más frecuentemente metilado fue el STK11, presentando un porcentaje de metilación de 98,73% en TaBG, de 98,76% en T1BG y de 93,41 en T1AG para el un índice de metilación (IM) mayor de 0.3 y de 97.5%, 93.8% y 87.9, respectivamente, para IM>0.5. La metilación de varios GST fue significativamente asociada con variables clínico-patológicas cuando los analizamos juntos y por

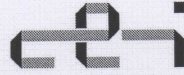


subgrupos. Para el umbral 0.3, en el análisis univariado, se obtuvo asociación con el tiempo libre de enfermedad para PAX5 ($p=0.016$), WT1 ($p=0.036$) y BRCA1 ($p=0.023$) en TaBG, para VHL ($p=0.034$), PAX6 ($p=0.043$), ATM ($p=0.009$), CHFR ($p=0.049$) y RB1 ($p=0.013$) para T1BG y para PYCARD ($p=0.027$) en T1AG. En el análisis multivariado, se obtuvieron como factores independientes de recidiva los genes PAX5 ($p=0.019$), WT1 ($p=0.042$) y BRCA1 ($p=0.023$) en TaBG, PAX6 ($p=0.044$), ATM ($p=0.004$), CHFR ($p=0.035$) y RB1 ($p=0.007$) en T1BG and PYCARD ($p=0.035$) en T1AG. No se obtuvo asociación para ningún gen con progresión ni supervivencia cáncer-específica en el estudio uni ni multivariado. Cuando se tomó como umbral un $IM>0.5$, en el análisis univariado, se obtuvo asociación con el tiempo libre de enfermedad para WT1 ($p=0.019$), GSTP1 ($p=0.034$) y BRCA1 ($p=0.031$) en TaBG, para CDKN2A ($p=0.022$), PAX6 ($p=0.026$), ATM ($p=0.002$) y RB1 ($p=0.006$) para T1BG y para PAX5A ($p=0.04$), PTEN ($p=0.017$) y PYCARD ($p=0.007$) en T1AG. En el análisis multivariado, se confirmaron los genes WT1 ($p=0.014$), GSTP1 ($p=0.034$) y BRCA1 ($p=0.034$) en TaBG, CDKN2A ($p=0.013$), PAX6 ($p=0.014$), ATM ($p=0.025$) y RB1 ($p=0.007$) para T1BG y PYCARD ($p=0.039$) en T1AG. Se asoció la metilación del PYCARD en el estudio uni ($p=0.043$) y multivariado ($p=0.043$) con la progresión en tumores de alto grado, pero no se obtuvo ningún gen relacionado con la supervivencia cáncer específica.

CONCLUSIONES: Los perfiles de metilación de GST distinguen tumores no músculo invasivos dependiendo de su fenotipo clínico-patológico. El estado de metilación de algunos de ellos se correlaciona con la evolución clínica de los pacientes en lo que se refiere a recidiva y progresión, no obteniéndose asociaciones para la supervivencia cáncer-específica. La metilación de GST puede seleccionar pacientes con tumor no músculo invasivo que puedan requerir una intervención terapéutica más agresiva.

RESUMEN (en Inglés)

Genetic and epigenetic factors are involved in tumorigenesis and bladder cancer progression. The ability of epigenetic factors to differentiate pathological and clinical subgroups is not well defined. In this work, we aimed at evaluating the role of 25 tumor suppressor genes (TSG) methylation status in patients with bladder cancer to discriminate between non-muscle invasive tumor subtypes as well as to evaluate its

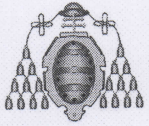


potential value as clinical outcome prognosticator.

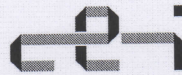
METHODS: A retrospective design included paraffin-embedded tumors of 79, 81, and 91 patients with pTaLG (Ta Low Grade), PT1LG (T1 Low Grade), and PT1HG (T1 High Grade) primary non-muscle invasive disease, respectively. The methylation status of 25 TSG was measured using a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification assay (MS-MLPA) which is effective to determine different levels of gene methylation. Recurrence, progression into muscle invasive tumors and disease-specific survival rates were analyzed using univariate and multivariate Cox tests.

RESULTS: Methylation status was significantly associated with clinicopathological variables for several TSG. For a cutoff of 0.3, PAX5 ($p=0.016$), WT1 ($p=0.036$) and BRCA1 ($p=0.023$) methylation in TaLG, VHL ($p=0.034$), PAX6 ($p=0.043$), ATM ($p=0.009$), CHFR ($p=0.049$) and RB1 ($p=0.013$) methylation in T1LG and PYCARD ($p=0.027$) methylation in T1HG, showed significant differences in univariate analysis of time to recurrence. Multivariate study indicated that PAX5 ($p=0.019$), WT1 ($p=0.042$) and BRCA1 ($p=0.023$) methylations were independent predictors of recurrence in TaLG as well as PAX6 ($p=0.044$), ATM ($p=0.004$), CHFR ($p=0.035$) and RB1 ($p=0.007$) methylation in T1LG and PYCARD ($p=0.035$) methylation in T1HG. For a cutoff value of 0.5, WT1 ($p=0.019$), GSTP1 ($p=0.034$) and BRCA1 ($p=0.031$) methylations in TaLG; CDKN2A ($p=0.022$), PAX6 ($p=0.026$), ATM ($p=0.002$) as well as RB1 ($p=0.006$) methylations in T1LG and PAX5A ($p=0.04$), PTEN ($p=0.017$) or PYCARD ($p=0.007$) methylations in T1HG, demonstrated statistical differences in univariate analysis of time to recurrence. In multivariate study, WT1 ($p=0.014$), GSTP1 ($p=0.034$) and BRCA1 ($p=0.034$) methylations in TaBG, as well as CDKN2A ($p=0.013$), PAX6 ($p=0.014$), ATM ($p=0.025$) and RB1 ($p=0.007$) methylations in T1BG or PYCARD ($p=0.039$) in T1AG showed significant differences in univariate analysis of time to recurrence. Using 0.5 as cutoff value, PYCARD methylation was found to be an independent factor of progression in T1HG tumors both in univariate and multivariate analysis. No significant results were obtained for TSG methylation when progression or disease-specific survival were studied neither in univariate nor in multivariate analyses.

CONCLUSIONES: The methylation status of our TSGs panel significantly distinguished different risk groups of non muscle invasive bladder tumors classified according to their clinicopathological characteristics. Moreover, the methylation status was found to differentiate the clinical outcome of patients in our series. These results



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica
y Nuevas Titulaciones



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

suggest that the methylation status might be considered a potential new biomarker of risk prediction in bladder cancer.

SR. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRURGICAS

Agradecimientos

A mis padres, por su apoyo incondicional. Ellos me han dado todas las oportunidades a su alcance para conseguir las metas que me he propuesto, teniendo el mérito de cada uno de mis logros.

A mi hermana Sonia, a mi cuñado Marcos y a mi sobrino Martín, por estar ahí, animándome e intentando siempre sacarme una sonrisa.

A Julio, por entender lo importante que era este trabajo para mí. Por su comprensión y paciencia, sobre todo en la recta final.

A todos mis compañeros de los Servicios de Urología de Oviedo y Gijón, por enseñarme muchas de las cosas que sé, por compartir largas horas de guardia y trabajo, alentándome a seguir adelante.

A mis directores, Jesús y Marta, por guiarme en este proyecto.

Al Servicio de Anatomía Patológica por enseñarme un poco más de su especialidad.

A los miembros del CNIO por su labor en el procesado de las muestras.

1.5.2. Cistectomía Radical	37
1.6. Estadificación	38
1.6.1. RTU y re-RTU	38
1.6.2. Pruebas adicionales de Extensión	38
1.6.2.1. Tomografía Computerizada (TC)	39
1.6.2.2. Resonancia Magnética (RM)	39
1.6.2.3. PET-TC con Inyección de L-metil-11C-metionina	39
1.7. Terapia Endovesical	39
1.7.1. Mitomicina C (MMC)	39
1.7.2. Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)	40
1.8. Predicción de Recidiva y Progresión en Tumores Ta/T1: Factores Pronósticos	41
1.8.1. Factores Pronósticos Clínico-Patológicos	44
1.8.1.1. Recidiva	44
1.8.1.2. Progresión	44
1.8.2. Factores Anatómico-Patológicos	45
1.8.2.1. Subestadificación	45
1.8.2.2. Infiltración Linfovascular	46
1.8.2.3. Presencia de Áreas Micropapilares	46
1.8.2.4. Afectación de Uretra Prostática	46
1.9. Establecimiento de Grupos de Riesgo	46
1.10. Control y Seguimiento	47
2. ALTERACIONES MOLECULARES ASOCIADAS AL CÁNCER DE VEJIGA. HIPERMETILACIÓN DEL ADN	47
2.1. Hipermetilación en el Contexto de otras Alteraciones Epigenéticas	49
2.2. Tipos de Metilación	49
2.2.1. Metilación de Islas CpG	49
2.2.2. Metilación de Secuencias no CpG	51
2.3. Mecanismos de Metilación: El papel de los DNMTs	52
2.4. Factores Epigenéticos que Contribuyen a la Tumorigénesis y Progresión del Cáncer Vesical	53
2.5. Vías Biológicas de Genes Frecuentemente Metilados en Cáncer de Vejiga	55
2.6. Aplicación Traslacional de los Análisis de Metilación como Fuente de Biomarcadores de Cáncer de Vejiga	56

2.7. Detección del Cáncer de Vejiga	57
2.8. Pronóstico	58
2.9. Farmacoepigenética y Tratamiento con Demetiladores	59
2.10. Relevancia de Tecnologías de Alto Rendimiento como Aceleradores del Descubrimiento de Eventos Epigenéticos en el Cáncer de Vejiga	60
2.11. Consideraciones Finales	62
3. GENES SELECCIONADOS	63
3.1. TP73	63
3.2. MSH6	64
3.3. VHL	64
3.4. RARB	64
3.5. ESR1	65
3.6. CDKN2A	66
3.7. PAX5A	67
3.8 PTEN	67
3.9 MGMT	68
3.10. PAX6	68
3.11. WT1	69
3.12. CD44	69
3.13. GSTP1	70
3.14. ATM	70
3.15. IGSF4	71
3.16. CHFR	71
3.17. BRCA2	72
3.18. RB1	72
3.19. THBS1	73
3.20. PYCARD	73
3.21. CDH13	74
3.22. TP53	75
3.23. BRCA1	75
3.24. STK11	76
3.25. GATA5	76
3.26. Tabla Resumen de las Vías de Actuación de cada uno de los Genes	77

HIPÓTESIS	79
OBJETIVOS	83
MATERIAL Y MÉTODOS	87
1. PACIENTES	89
1.1. Criterios de Selección de los Casos a Estudio	89
1.2. Estudio Clínico de los Pacientes	89
1.3. Estudio Histológico	91
1.4. Tratamiento Endovesical	93
1.5. Seguimiento	94
2. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE SELECCIONADA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA SERIE TOTAL Y POR SUBGRUPOS	94
2.1. Estadio y Grado Tumoral	94
2.2. Características Demográficas	96
2.3. Características Epidemiológicas	98
2.4. Motivo de Diagnóstico	99
2.5. <i>Cis</i> Asociado	100
2.6. Tamaño Tumoral	100
2.7. Multifocalidad	101
2.8. Terapia Adyuvante	102
3. ANÁLISIS DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES	103
3.1. Extracción de ADN de las Muestras de Parafina	103
3.1.1. Proceso de Desparafinización	104
3.1.2. Procedimiento Inicial para la Extracción del ADN	105
3.2. Proceso de Metilación. Amplificación Múltiple de Sondas Dependientes de Ligación y Específica de Metilación (MS-MLPA)	107
3.2.1. Descripción General del Método	107
3.2.2. Descripción Detallada del Ensayo MS-MLPA	108
3.2.2.1. Desnaturalización del ADN e Hibridación con las <i>SALSA-Probes</i>	109
3.2.2.2. Ligación y Digestión	109
3.2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	110

3.2.2.4. Electroforesis Capilar para la Separación de los Productos de PCR	112
3.2.3. Análisis e Interpretación de los Datos	112
4. ESTUDIO ESTADÍSTICO	114
RESULTADOS	117
1. ESTUDIO DE METILACIÓN DE GENES	119
1.1. Porcentajes de metilación	119
1.2. Asociación entre el porcentaje de metilación y los subgrupos de tumores	120
2. ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	123
2.1. Metilación mayor de 0.3	123
2.1.1. Tumores TaBG	128
2.1.2. Tumores T1BG	128
2.1.3. Tumores T1AG	129
2.1.4. Serie global	129
2.2. Metilación mayor de 0.5	131
2.2.1. Tumores TaBG	136
2.2.2. Tumores T1BG	136
2.2.3. Tumores T1AG	137
2.2.4. Serie global	137
2.3. Comparación de ambos índices de metilación	139
3. EVOLUCIÓN	140
3.1. Tumores TaBG	142
3.1.1. Tiempo Libre de Enfermedad	142
3.2. Tumores T1BG	145
3.2.1. Tiempo Libre de Enfermedad	145
3.3. Tumores T1AG	148
3.3.1. Tiempo Libre de Enfermedad	148
3.3.2. Tiempo hasta la Progresión	151
3.3.3. Supervivencia Cáncer Específica	152
3.4. Serie global	153
3.4.1. Tiempo Libre de Enfermedad	153
3.4.2. Tiempo hasta la Progresión	157

3.4.3. Supervivencia Cáncer Específica	160
3.5. Resumen del Análisis de Supervivencia	161
3.6. Valores Predictivos Positivos (VPPs) y Negativos (VPNs)	162
3.6.1. Tumores TaBG	163
3.6.2. Tumores T1BG	164
3.6.3. Tumores T1AG	165
3.6.4. Serie global	167
DISCUSIÓN	169
1. CARACTERÍSTICAS Y LIMITACIONES DE NUESTRA SERIE	171
2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO DE METILACIÓN	174
3. ASOCIACIONES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	175
3.1. Estadio, Grado y Presencia de <i>Cis</i>	177
3.2. Edad, Sexo, Tamaño y Multifocalidad	179
3.3. Estudios de Supervivencia	182
3.3.1. Tumores TaBG	182
3.3.2. Tumores T1BG	183
3.3.3. Tumores T1AG	184
4. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS	186
4.1. Tumores TaBG	186
4.2. Tumores T1BG	188
4.3. Tumores T1AG	191
4.4. Interpretación Biológica	192
CONCLUSIONES	195
BIBLIOGRAFÍA	199

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Alto Grado
APAF1	Apoptotic Protein activating Factor 1
APC	Adenomatous poliposis coli
ARN	Ácido Ribonucleico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BG	Bajo grado
BMNs	Biopsias Múltiples Normalizadas
BRCA1	Breast Cancer-Early Onset 1
BRCA2	Breast Cancer- Early Onset 2
BTA test	Bladder Tumor Antigen Test
C	Citosina
CAGE1	Cancer Antigen 1
CASP8	Caspase 8
CCND	Cyclin D
CCT	Carcinoma de Células Transicionales
CD44	CD44 molecule o Cell Surface Glycoprotein 44
CD99	CD99 molecule o Cell Surface Glycoprotein 99
CDH1	Cadherin 1 o E-cadherina
CDH13	Cadherin 13 ó H-cadherina
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B
CHFR	Check Point with Forkhead and Ring Fingers Domain
<i>Cis</i>	Carcinoma <i>in situ</i>
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
COL1A2	Alpha 2 type 1 collagen
COX2	Cytochrome C Oxidase Subunit 2
CpG	Dinucleótido Citosina fosfato Guanina
CUETO	Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico

DAPK	Death Associated Protein Kinase
DBC1	Deleted in Breast Cancer 1
DNMTs	ADN metiltransferasas
DR3	Death Receptor 3
DR6	Death Receptor 6
DRC	Decoy Receptor Lacking Death Domains 1
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ESR1	Estrogen receptor 1
G	Guanina
GATA5	GATA binding protein 5
GSTP1	Glutathione S-Transferase Pi 1
H-E	Hematoxilina-Eosina
HIC1	Hypermethylated in cáncer 1
5-hmc	5 hidroximetilcitosina
ICAM1	Intracellular Adhesion Molecule 1
IGSF4	Inmunoglobulin Superfamily, member
IM	Índice de metilación
ITU	Infección del Tracto Urinario Inferior
KISS1	Kiss1
LAM	Laminin
5-mc	5-metilcitosina
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLH1	MutL Homolog 1
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMC	Mitomicina C
MSH6	MutS Homolog 6
MS-MLPA	Methylation Specific- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSP	Methylation Specific PCR
MYO	Myopodin
NUPBPM	Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial de malignidad
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAX5	Paired Box 5A
PAX6	Paired Box 6
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMF1	Polyamine Modulated Factor 1

PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PYCARD	PYD and CARD Domain Containing
RAR β 2	Retinoic Acid Receptor Beta 2
RASSF1A	Rass Association Domain Family Member 1
RB/Rb	Retinoblastoma
rpm	Revoluciones por minuto
RTU	Resección Transuretral de vejiga
RUNX3	Runt related transcription factor 3
S100A	Calcium Binding Protein
SFRP1	Secreted Frizzled-Related 1
SFRP2	Secreted Frizzled-Related 2
SFRP4	Secreted Frizzled-Related 4
SFRP5	Secreted Frizzled-Related 5
SOX9	Sry-Related-Hmg Box
STUI	Síntomas del Tracto Urinario Inferior
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
TET1	Dioxigenasa tetmetil-citosina 1
TET2	Dioxigenasa tetmetil-citosina 2
TET3	Dioxigenasa tetmetil-citosina 3
THBS1	Thrombospondin 1
TIMP3	Metalloproteinase Inhibitor 3
TLE	Tiempo Libre de Enfermedad
TMI	Tumores Músculo-Infiltrantes
TNMI	Tumores No Músculo-Infiltrantes
TP53	Tumor Protein p53 o Tumor Suppressor p53
TP73	Tumor Protein p73 o Tumor Suppressor p73
TUS	Tracto Urinario Superior
UICC	International Union Against Cancer
VHL	Von Hippel Lindau
VIM	Vimentin
VPP	Valor Predictivo Positivo
VPN	Valor Predictivo Negativo
WIF1	Wnt Inhibitory Factor 1
WT1	Wilms Tumor 1

Introducción

COMPARACIÓN DE PERFILES DE
METILACIÓN DE GENES SUPRESORES
TUMORALES EN DISTINTOS SUBGRUPOS
DE TUMORES VESICALES NO MÚSCULO
INVASIVOS

Raquel Sacristán González

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los tumores uroteliales no músculo invasivos (TNMI), tradicionalmente conocidos como “cáncer vesical superficial”, representan un 70-85% de todos los tumores de vejiga^{1,2}. Comprenden un grupo heterogéneo tanto en histopatología, morfología como en comportamiento clínico^{3,4} y a pesar de haberse estudiado múltiples características del tumor, el riesgo de recidiva, progresión a enfermedad músculo invasiva y respuesta a terapias específicas tras la resección transuretral (RTU) no puede ser claramente establecido en la actualidad⁵. Esto hace que sea necesario realizar un estrecho seguimiento de los pacientes con citologías, estudios de imagen y pruebas invasivas, como la cistoscopia⁶, que hace que sea uno de los procesos malignos que mayor número de recursos socio-sanitarios emplea^{7,8}. Así, el cáncer vesical, de manera global, es el quinto tumor más caro y la neoplasia con mayor coste por paciente².

En consecuencia, son necesarias nuevas herramientas no sólo diagnósticas y de seguimiento sino también pronósticas, lo suficientemente fiables como para facilitar un control eficiente de la enfermedad. Dado que la historia natural del cáncer de vejiga se caracteriza por diferentes etapas que parecen tener un sustrato molecular y una traducción en grupos de riesgo de recidiva y progresión⁵ se han estudiado diversos marcadores moleculares con el fin de reflejar la biología y agresividad tumoral y, en consecuencia, que sean útiles en el seguimiento y manejo clínico de los pacientes. Sin embargo, aún no se ha conseguido obtener ninguno con la suficiente fiabilidad como para que sea incorporado a la práctica diaria⁹⁻¹².

1.1. Epidemiología del Cáncer

El cáncer, como enfermedad global, es un problema de salud pública tanto en Estados Unidos (EEUU) como en gran cantidad de países. Actualmente, una de cada tres mujeres y uno de cada dos hombres en EEUU desarrollará un tumor a lo largo de su

vida, habiéndose observado un aumento progresivo en la prevalencia debido al aumento en la edad de la población y de la esperanza de vida¹³.

Se estima que, en 2012, en América existirán 13.7 millones de personas con historia de cáncer, sin incluir los carcinomas *in situ* (excepto los de vejiga), ni tampoco los tumores basocelulares y espinocelulares de la piel. El cáncer de vejiga constiuye el 4º tumor más frecuente en el varón (7%) por detrás del de próstata, pulmón y colon y recto, mientras que en mujeres no se encuentra entre los 10 tumores con mayor incidencia^{13,14} [Figura 1].

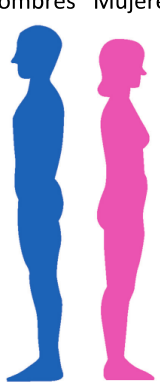
CASOS NUEVOS ESTIMADOS						
			Hombres	Mujeres		
Próstata	241.740	29%		Mama	226.870	29%
Pulmón y bronquios	116.470	14%		Pulmón y Bronquios	109.690	14%
Colon y recto	73.420	9%		Colon y recto	70.040	9%
Vejiga	55.600	7%		Endometrio	47.130	6%
Melanoma	44.250	5%		Tiroides	43.210	5%
Riñón y pelvis renal	40.250	5%		Melanoma	32.000	4%
Linfoma no Hodgkin	38.160	4%		Linfoma no Hodgkin	31.970	4%
Cavidad oral y faringe	28.540	3%		Riñón y pelvis renal	24.520	3%
Leucemia	26.830	3%		Ovario	22.280	3%
Páncreas	22.090	3%		Páncreas	21.830	3%
Todas las localizaciones	848.170	100%		Todas las localizaciones	790.740	100%

Figura 1. Se muestran los 10 tumores con incidencia más alta en ambos sexos¹⁴

Por otro lado, es la principal causa de muerte en países industrializados y la segunda en aquellos en vías de desarrollo. Esto se debe tanto al aumento en la edad de la población como a la adopción de estilos de vida asociados al cáncer como son el hábito tabáquico, la escasa actividad física y la dieta¹⁵. En 2008, se estima que la mortalidad por cáncer fue de 7.6 millones, de los cuales el 64% se produjo en países con un alto nivel económico¹⁵. El cáncer de vejiga es la 8ª causa de muerte en varones (3%) detrás del de pulmón, próstata, colon y recto, páncreas, hígado y vías biliares, leucemia y esófago, no estando tampoco entre las 10 causas principales de muerte en mujeres¹⁴ [Figura 2].


MUERTES ESTIMADAS							
		Hombres		Mujeres			
Pulmón y bronquios	87.750	29%		Pulmón y Bronquios	72.590	26%	
Próstata	28.170	9%		Mama	39.510	14%	
Colon y recto	26.470	9%		Colon y recto	25.220	9%	
Páncreas	18.850	6%		Páncreas	18.540	7%	
Hígado y vía biliar	13.980	5%		Ovario	15.500	6%	
Leucemia	13.500	4%		Leucemia	10.040	4%	
Esófago	12.040	4%		Linfoma no Hodgkin	8.620	3%	
Vejiga	10.510	3%		Endometrio	8.010	3%	
Linfoma no Hodgkin	10.320	3%		Hígado y vía biliar	6.570	2%	
Riñón y pelvis renal	8.650	3%		Cerebro	5.980	2%	
Todas las localizaciones	301.820	100%		Todas las localizaciones	275.370	100%	

Figura 2. Se muestran los 10 tumores con mortalidad más alta en ambos sexos¹⁴

1.1.1. Incidencia y Prevalencia del Cáncer Vesical

El cáncer de vejiga es el tumor maligno más frecuente del tracto urinario⁶ y se estima que en todo el mundo se han producido 386.300 nuevos casos en 2008¹⁵. La incidencia es 10.1/100.000 habitantes en hombres y 2.5/100.000 habitantes en mujeres^{6,15,16} y varía de unos países a otros, siendo mayor en los desarrollados. Parte de esta variabilidad puede ser artificial por diferencias en la definición de la enfermedad y en los registros de cáncer vesical ya que unos incluyen tumores no invasivos como la neoplasia urotelial de bajo potencial de malignidad, el carcinoma *in situ* o *cis* o tumores en estadio Ta, mientras que otros sólo recogen aquellos tumores invasivos ($\geq T1$). No obstante, en general, se considera que los factores de riesgo de tumor son los principales responsables de estas diferencias¹⁶. De este modo, los rangos más altos se localizan en el sur y oeste de Europa, norte de África y norte de América y los más bajos en Oceanía y África Central^{2,15,16} [Figuras 3 y 4].

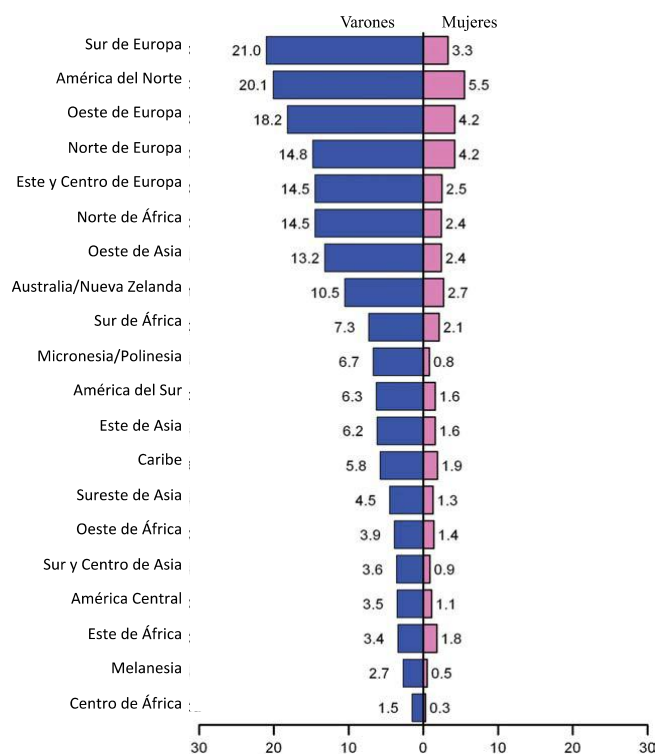


Figura 3. Incidencia de cáncer de vejiga ajustada por edad por 100.000 habitantes según sexo y áreas geográficas¹⁵

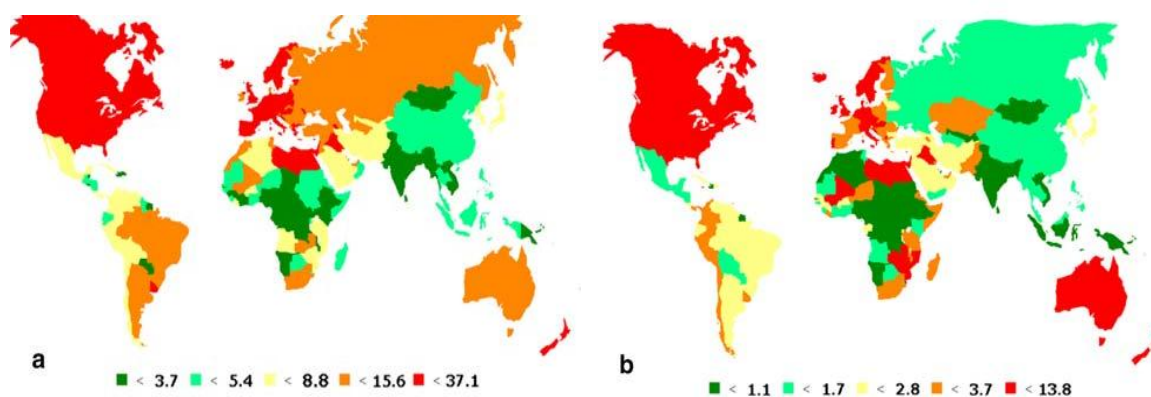


Figura 4. Incidencia ajustada por edad por 100.00 habitantes en hombres (a) y mujeres (b)¹⁶

Si se analiza únicamente la población europea, se observa que la incidencia más alta se localiza en el oeste (23.6 en hombres y 5.4 en mujeres) y en el sur (27.1 en hombres y 4.1 en mujeres), seguido de las regiones del norte (16.9 en hombres y 4.9 en mujeres) y localizándose la más baja en los países del este (14.7 en hombres y 2.2 en mujeres). La proporción calculada entre varones y mujeres (3.8:1.0) es similar a la que se observa en el resto del mundo⁶.

La media de edad al diagnóstico es de 73 años en varones y 74 en mujeres^{14,15}. Según el National Cancer Data Base (NCDB) el 0,1% se diagnostica antes de los 20 años, el 9,4% entre los 20 y 54 años; el 18,4% entre los 55 y 64 años; el 27,4% entre los 65 y 74 años y el 44,7% en mayores de 75 años¹⁷. Por otra parte, la incidencia por razas demuestra una mayor tendencia del tumor a producirse en la blanca, seguida de la negra, hispana, asiática y, por último, en los indios americanos¹⁷.

Cuando se analiza el riesgo de desarrollar un tumor vesical (incluido el estadio Ta), tanto en la población estadounidense como en la del oeste de Europa, la probabilidad entre los varones blancos es mayor del 4% (1 de cada 25), mientras que en las mujeres es de 1,2% (1 de cada 80) y aumenta con la edad. Así, los varones tienen un riesgo de 0,45 y 2,81% a los 60 y 80 años respectivamente, mientras que el de las mujeres es de 0,14 y 0,82% a las mismas edades¹⁶ [Figura 5].

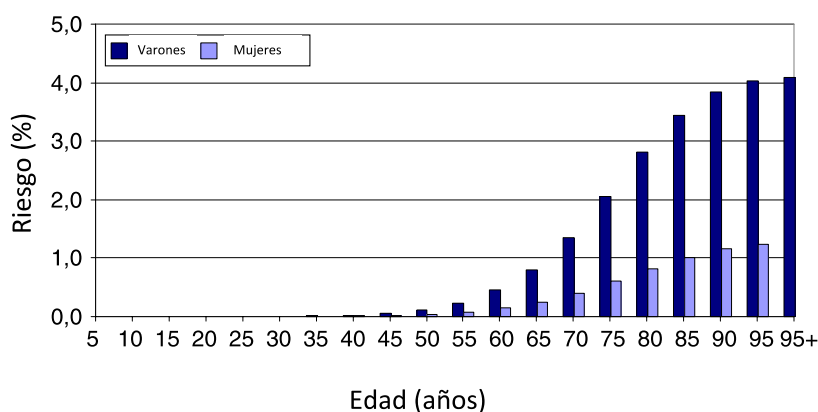


Figura 5. Riesgo de desarrollar cáncer de vejiga asociado con la edad¹⁶

La prevalencia global estimada a 5 años es de 1.110.265 (860.299 varones y 249.966 mujeres). A nivel mundial, la más elevada se localiza entre los varones egipcios a pesar de la importante disminución de los tumores relacionados con la *schistosomiasis*, lo cual, probablemente, se deba a un aumento de los tumores inducidos por el tabaco¹⁵.

1.1.2. Mortalidad por Cáncer de Vejiga

Se estima que en todo el mundo se han producido 150.200 muertes por cáncer de vejiga en 2008¹⁵, siendo los varones egipcios los que presentan las tasas más elevadas

(16.3 por 100.000 habitantes), dos veces más altas que en Europa (8.3 en España) y cuatro que en EEUU (3.79), frente a África Central y Oceanía donde se registran las menores tasas de fallecimiento por este tumor^{2,15}.

Se ha visto que en EEUU la mortalidad se ha mantenido estable en varones y ha disminuido en mujeres desde 1997 hasta 2006. Sin embargo, en Europa se han observado descensos en la mayoría de países desde los años noventa debido, en parte, a la reducción de la exposición laboral a determinados agentes considerados factores de riesgo en el desarrollo del tumor vesical¹⁵.

En nuestro país, según el registro del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, en 2009 se produjeron 4.722 muertes (3.844 varones y 878 mujeres) con una edad media de 77.4 años. Cuando se compara la tasa de mortalidad por cáncer en nuestro país frente al resto de la Unión Europea se observa que es ligeramente inferior, con un total de 243.2 casos/100.000 habitantes, frente a 250. Cantabria, Soria, Cádiz, Guadalajara, Álava y Huelva son las provincias con una mayor tasa de mortalidad ajustada¹⁸ [Figura 6].

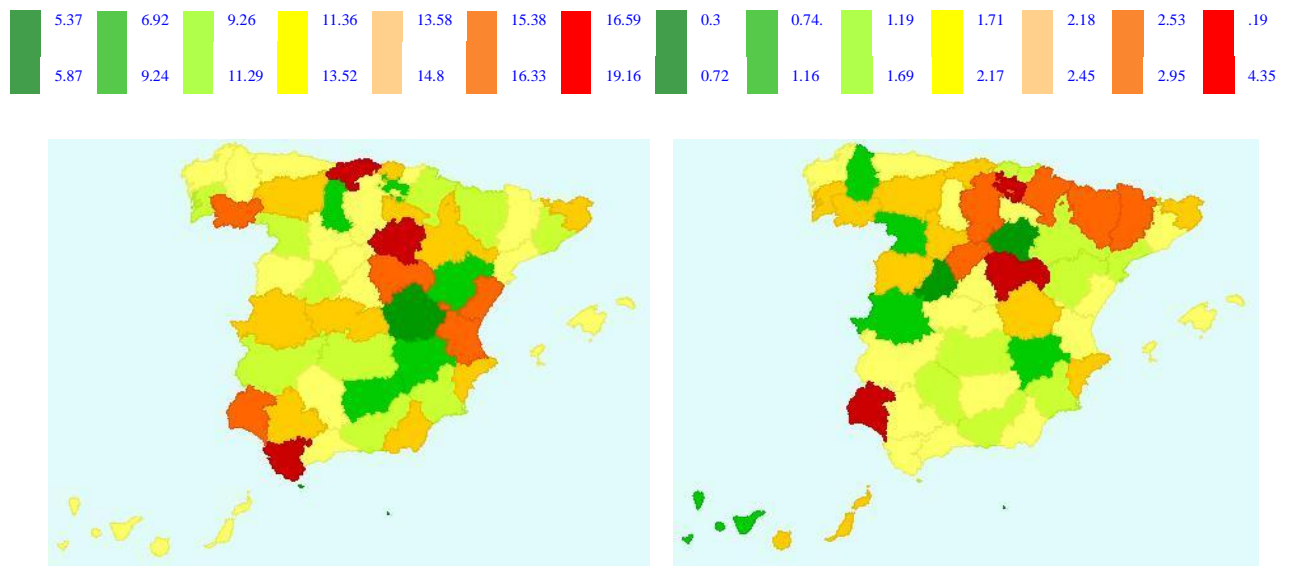


Figura 6. Tasa de mortalidad por cáncer de vejiga ajustada a la población europea/100.000 habitantes en el sexo masculino (izquierda) y femenino (derecha)¹⁸

Al contrario que la mayoría de procesos malignos, el cáncer de vejiga es raramente un hallazgo incidental de necropsia, lo cual implica que la enfermedad se diagnostica en algún momento antes de la muerte del paciente^{19,20}.

1.2. Etiología del Cáncer de Vejiga

El cáncer de vejiga esta causado por alteraciones genéticas y factores de riesgo externos que incluyen la exposición a carcinógenos, factores nutricionales, ingesta hídrica, alcohol, inflamación, infección, quimioterapia, radiaciones y posiblemente edulcorantes artificiales^{2,21}.

1.2.1. Factores genéticos

La alta incidencia de cáncer de vejiga en varones de raza blanca comparada con varones afro-americanos, además de por factores ambientales, puede deberse a una susceptibilidad distinta de ambas poblaciones a los diferentes carcinógenos. En relación a esto, se ha visto que existen varios polimorfismos, como el NAT2 acetilador lento, que parecen estar relacionados con dicha susceptibilidad y podrían explicar estas diferencias raciales^{2,22}.

1.2.2. Factores Ambientales

1.2.2.1. Tabaco

Aproximadamente la mitad de tumores del tracto urinario en hombres y un tercio en mujeres pueden ser atribuidos al tabaco, con un período de latencia de hasta 20 años, habiéndose publicado un riesgo menor con los cigarrillos *light*^{23,24}.

Se trata del agente más relacionado con la carcinogénesis vesical y se asocia directamente con el número de cigarrillos, tipo de tabaco, duración del hábito y grado de inhalación del humo^{23,25}. El cese del hábito tabáquico es beneficioso aunque los ex-fumadores siguen presentando un riesgo más elevado de desarrollar un tumor en el tracto urinario que los no fumadores. No obstante, es importante el tiempo transcurrido desde el cese del consumo, de tal manera que cuando es de 10 años o menos el riesgo es más alto que cuando es mayor entre los varones. En el caso del sexo femenino, la reducción del riesgo parece ser aún mayor en la primera década, aunque son escasos los estudios que analizan ambos sexos por separado²³.

La edad a la que se comienza a fumar también es importante. Así, cuando el inicio es a edades tempranas (por debajo de los 20 años) existe un riesgo más alto comparado con aquellas personas que empezaron a edades más tardías²³.

Parece que el riesgo de desarrollar este tumor está relacionado con el gran número de agentes químicos presentes en el tabaco. Se ha observado, en modelos animales, que varias nitrosaminas pueden producir cáncer de vejiga y que los alquilantes pueden inducir tumores en ratones. Así, la 2-naftalina y el 4-aminobifenil son los principales carcinógenos identificados, siendo comunes entre el tabaco y algunas exposiciones laborales²³.

1.2.2.2. Exposición Ocupacional

Son varias las ocupaciones que se han asociado a un mayor riesgo de cáncer vesical, observándose una elevada incidencia entre trabajadores empleados en la manufactura de aminas aromáticas, tintes del pelo, colorantes, caucho, pintura o alquitrán y en la industria del aluminio, hierro, cuero... Todo esto justifica la tendencia de las zonas industrializadas a presentar una mayor incidencia y prevalencia de esta enfermedad^{2,26}.

1.2.2.3. Hábitos Dietéticos

La mayoría de nutrientes y otros metabolitos son excretados en orina y el contacto prolongado con el urotelio, principalmente en la vejiga, hace que la dieta juegue un importante papel en la formación de neoplasias. Han sido muchos los alimentos que se han relacionado con este tumor, como los edulcorantes artificiales, la cafeína, el alcohol o las grasas²⁷. Sin embargo, una ingesta hídrica abundante y una dieta rica en vegetales, frutas, carotenos y vitamina A parece disminuir el riesgo de padecer un cáncer de vejiga. De esta manera, se considera que la dieta Mediterránea se asocia a un menor riesgo^{1,27}.

No obstante, en general, los datos epidemiológicos son muy limitados para permitir una comprensión definida del papel de los hábitos dietéticos y de cómo pueden influir los alimentos en la carcinogénesis vesical²⁸.

1.2.2.4. Infección por *Schistosoma haematobium*

En aquellos lugares donde el cáncer de vejiga se asocia con infecciones crónicas la histología más habitual es el carcinoma escamoso y el *Schistosoma haematobium* es el germen que más se ha relacionado con este tipo de tumores, siendo un factor de riesgo reconocido en el cáncer de vejiga. No obstante, también se han observado tumores de estirpe urotelial asociados a este parásito¹.

1.2.2.5. Otros

El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) incluye como posibles factores de riesgo de cáncer de vejiga otros agentes infecciosos, destacando el VIH, el virus del papiloma humano o el *Helicobacter pylori*²⁹, las radiaciones, como los campos magnéticos, la energía nuclear, el radón o las radiaciones derivadas de exploraciones médicas, la escasa actividad física asociada a obesidad y sobrepeso, algunos tratamientos como los anticonceptivos o la sustitución hormonal y agentes quimioterápicos como la ciclofosfamida^{2,29}.

1.3. Clasificación Anatómo-Patológica del Cáncer de Vejiga

Aproximadamente el 90% de los cánceres de vejiga son carcinomas de células transicionales (CCT) y presentan, a diferencia del urotelio normal [Figura 7], un número elevado de capas de células epiteliales con plegamientos papilares de la mucosa, pérdida de la polaridad celular, maduración anormal de las células desde las capas basales hasta las superficiales, aumento del cociente núcleo-citoplasma, nucleólos prominentes, agrupamiento de la cromatina y aumento del número de mitosis^{1,19}. Además, pueden presentar varios patrones de crecimiento tumoral destacando el papilar, sésil, mixto e intraepitelial plano o carcinoma *in situ* (Cis). No obstante, en el momento del diagnóstico, entre un 75-85% de los casos se presentan como tumores no músculo invasivos en estadio Ta (carcinoma papilar no invasivo), Cis o T1 (tumor que invade el tejido conectivo pero no la capa muscular)^{2,6}.

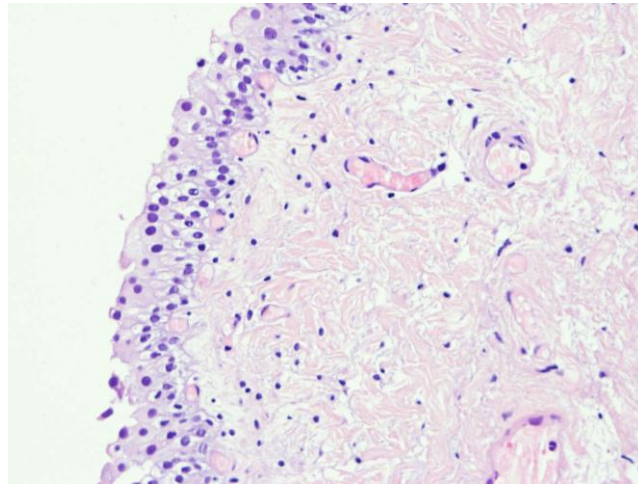


Figura 7. Imagen microscópica de un urotelio normal

El urotelio tiene un gran potencial metaplásico, por lo que los tumores transicionales pueden presentar elementos de células fusiformes, escamosas o propias del adenocarcinoma, sin pertenecer exactamente a estas estirpes tumorales¹⁹. No obstante, entre un 2-7% de los tumores vesicales son adenocarcinomas o carcinomas escamosos puros y con una frecuencia mucho menor podemos encontrar tumores indiferenciados, carcinoides, carcinosarcomas, melanomas o tumores no epiteliales como el feocromocitoma o linfomas³⁰.

Por su parte, el *Cis* es un tipo de tumor que presenta un epitelio plano, anaplásico y con rasgos evidentes de malignidad³¹ [Figura 8]. Puede presentarse cerca de una lesión exofítica y en un número menor de casos puede ser independiente, uni o multifocal, en ausencia de otras lesiones macroscópicas. Su historia natural es variable, pero habitualmente progresa hacia una enfermedad invasiva. Además, se ha visto que los tumores que presentan *Cis* asociado son más susceptibles de presentar recidivas e invasión muscular que los que no^{6,30}.

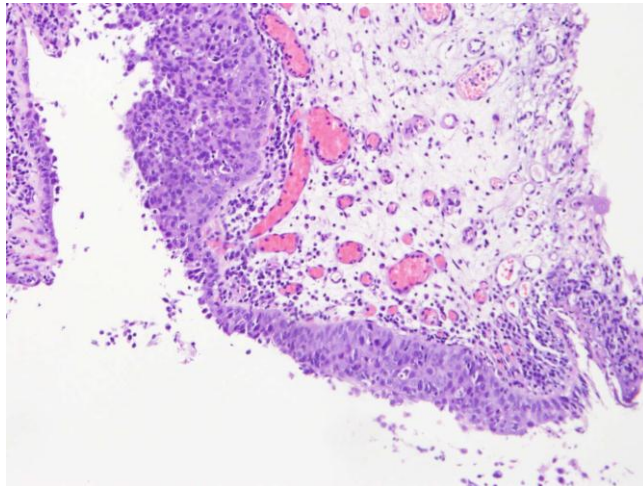


Figura 8. Imagen anatomo-patológico de un Carcinoma in situ

Debido a que los tumores vesicales presentan diversas formas y variantes es necesario utilizar sistemas de clasificación. Los más frecuentemente utilizados se basan en el grado y el estadio, al ser los factores con más influencia en la evolución de este tumor.

1.3.1. Estadio Tumoral

Han existido varias clasificaciones de los tumores vesicales en función del estadio.

- Jewet y Strong, en 1944, presentaron la primera clasificación utilizada³²:
 - A: Afectación de la submucosa
 - B: Afectación de la capa muscular
 - C: Afectación perivesical

- Más tarde fue modificado por Marshall (1952)³⁰:
 - 0: Afectación limitada a la mucosa o *Cis*
 - A1: Invasión de la lámina propia
 - A2: Invasión de la *muscularis mucosae*
 - B1: Invasión de la muscular propia
 - B2: Invasión del músculo profundo
 - C: Invasión de la grasa perivesical o peritoneo

- D1: Invasión de órganos contiguos

En 2002, la Asociación Internacional Contra el Cáncer (UICC) y el Comité Americano de Cáncer (AJCC) desarrollaron una clasificación de las neoplasias basada en el tumor, los ganglios y las metástasis denominada TNM, que ha sido ampliamente aceptada. Esta versión ha sido actualizada en 2009, sin sufrir cambios dentro de los tumores de vejiga³³ [Figura 9 y Tabla 1].

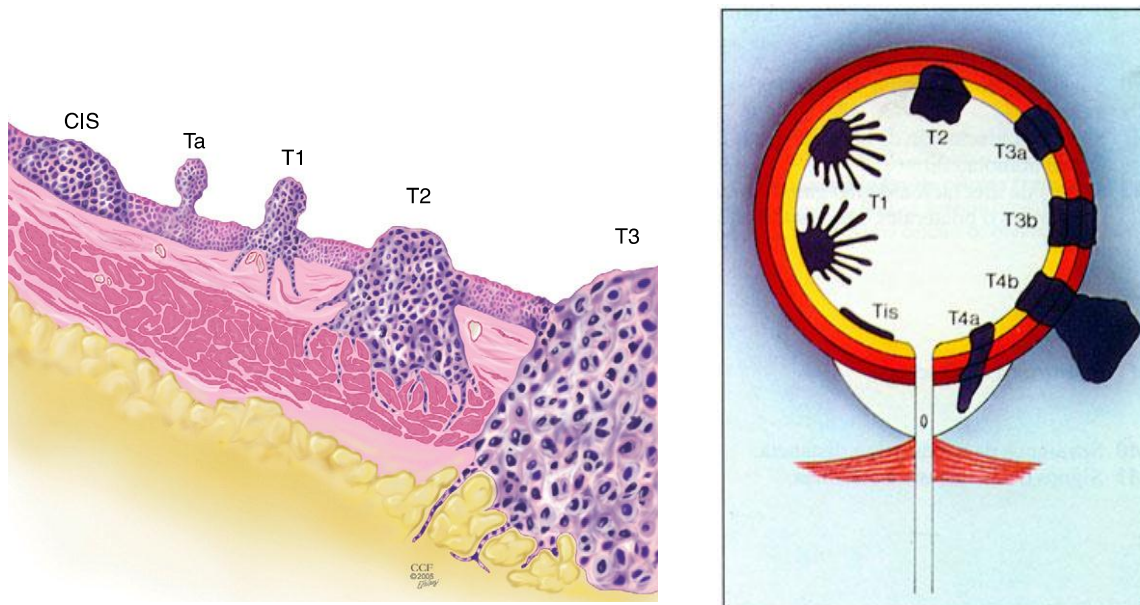


Figura 9. Representación gráfica de los distintos estadios T del tumor de vejiga^{34,35}

CLASIFICACIÓN TNM
T – TUMOR PRIMARIO
Tx: no se puede evaluar el tumor primario
T0: ausencia de datos del tumor primario
Ta: carcinoma papilar no invasor
Cis: carcinoma <i>in situ</i> (tumor plano)
T1: el tumor invade el tejido conjuntivo
T2: el tumor invade el músculo detrusor <ul style="list-style-type: none"> • T2a: el tumor invade el músculo superficial (mitad interna) • T2b: el tumor invade el músculo profundo (mitad externa)
T3: el tumor invade el tejido perivesical <ul style="list-style-type: none"> • T3a: microscópicamente • T3b: macroscópicamente (masa extravesical)
T4: el tumor invade cualquiera de las estructuras siguientes: próstata, útero, vagina, pared de la pelvis, pared abdominal <ul style="list-style-type: none"> • T4a: el tumor invade la próstata, el útero o la vagina • T4b: el tumor invade la pared de la pelvis o la pared abdominal
N – GANGLIOS LINFÁTICOS
Nx: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0: ausencia de metástasis ganglionares regionales
N1: metástasis en un sólo ganglio linfático en la pelvis verdadera (hipogástricos, obturadores, ilíacos externos o presacros)
N2: metástasis en varios ganglios linfáticos en la pelvis verdadera (hipogástricos, obturadores, ilíacos externos o presacros)
N3: metástasis en uno o varios ganglios linfáticos ilíacos comunes
M – METÁSTASIS A DISTANCIA
M0: ausencia de metástasis a distancia
M1: metástasis a distancia

Tabla 1. Clasificación TNM de 2009 del cáncer de vejiga³³

1.3.2. Grado Tumoral

Por su parte, inicialmente se empleó la clasificación del grado tumoral publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1973. Sin embargo, en 1998, fue propuesta una nueva clasificación de TNMI por la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) y por la misma OMS que ha sido publicada en 2004. Su principal contribución respecto a la previa fue una descripción histológica detallada de los distintos grados utilizando específicamente criterios citológicos y estructurales y aportando una mayor reproducibilidad. En ella, se incluyen lesiones planas (hiperplasia urotelial, atípia urotelial reactiva, atípia de significado incierto, displasia y *Cis*). Entre los TNMI papilares se incluyen los carcinomas uroteliales de bajo grado (BG) y alto grado (AG) y la neoplasia urotelial papilar de bajo potencial de malignidad (NUPBPM), que aunque tiene un riesgo despreciable de progresar, no es completamente benigna y puede recidivar³⁶ [Figura 10 y Tabla 2].

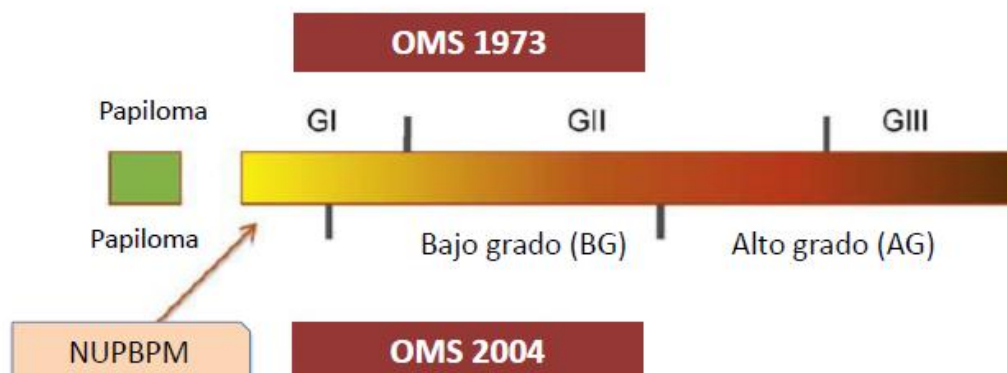


Figura 10. Comparación del sistema de gradación de la OMS de 1973 y 2004. Los carcinomas grado 1 de la clasificación de 1973 son reclasificados como NUPBPM (neoplasia urotelial papilar de bajo potencial de malignidad) y algunos de los carcinomas de bajo grado. De manera similar, los carcinomas grado 2 son reclasificados como tumores de bajo o alto grado. Todos los tumores de grado 3 fueron clasificados según la OMS 2004 como carcinomas de alto grado³⁷

CLASIFICACIÓN OMS 1973
PAPILOMA UROTELIAL
Grado 1: bien diferenciado
Grado 2: moderadamente diferenciado
Grado 3: pobremente diferenciado

CLASIFICACIÓN OMS 2004
LESIONES PLANAS
Hiperplasia: lesión plana sin atípia ni aspecto papilar
Atípia reactiva: lesión plana con atípia
Atípia de significado incierto
Displasia urotelial
Carcinoma <i>in situ</i>
LESIONES PAPILARES
Papiloma urotelial: lesión completamente benigna
Papiloma urotelial papilar de bajo potencial de malignidad (NUPBPM)
Carcinoma papilar urotelial de bajo grado
Carcinoma papilar urotelial de alto grado

Tabla 2. Comparación de la clasificación según el grado tumoral de la OMS de 1973 y la actualización de 2004³⁶

A pesar de todo esto, se debe tener en cuenta que la mejor estadificación patológica de un tumor se realiza a partir de la pieza de cistectomía (parcial o total), ya que el material obtenido en la RTU presenta limitaciones técnicas, tanto por las irregularidades de la muestra, su posible coagulación y daño del tejido durante la cirugía y el hecho de que la *muscularis mucosae* puede presentar un grosor variable que dé lugar a una difícil interpretación de su infiltración. Por ello, como se verá más adelante, en determinadas ocasiones está recomendado realizar una re-RTUv con el fin de mejorar estas limitaciones^{6,37}.

1.4. Diagnóstico y Seguimiento

El síntoma más frecuente del cáncer de vejiga es la hematuria indolora, que puede ser macro o microscópica, definiéndose ésta última, según la Asociación Americana de Urología (AAU), como la presencia de 3 o más glóbulos rojos por campo de gran

aumento en 2 ó 3 análisis de orina. Menos comúnmente, la única manifestación clínica es la disuria, similar a cuando existe una infección de orina de vías bajas (ITU), con aumento de frecuencia y urgencia miccional, lo cual suele asociarse más frecuentemente a la presencia de carcinoma *in situ*³⁸. Otros síntomas incluyen la disminución de la capacidad vesical, la obstrucción al tracto de salida y clínica general de astenia, anorexia y pérdida de peso [Tabla 3]. También puede existir dolor, causado por distintas razones^{38,39} [Tabla 4].

SÍNTOMAS CLÍNICOS MÁS FRECUENTES DEL CÁNCER DE VEJIGA (%)	
Hematuria	77-87
Hematuria durante tratamiento anticoagulante	4.5
Dolor vesical	4-21
Disuria	7.5-10
Polaquiritia	4-5
Pérdida de peso	<1
Metástasis	<1

Tabla 3. Síntomas clínicos más frecuentes en el cáncer de vejiga³⁸

CAUSAS DE DOLOR EN PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA
Infección urinaria secundaria
Disminución de la capacidad vesical
Obstrucción del tracto de salida
Necrosis del tumor
Presencia de carcinoma <i>in situ</i>

Tabla 4. Causas de disuria, polaquiuria, urgencia y/o dolor más habituales en el cáncer de vejiga³⁸

Ante la existencia de uno o varios de estos síntomas, se ha de plantear el cáncer de vejiga entre los posibles diagnósticos diferenciales, dado que una rápida identificación es fundamental para llegar a instaurar un tratamiento temprano y así mejorar el pronóstico de los pacientes. Por otro lado, se debe realizar una exploración física que incluya palpación abdominal e inguinal, tacto rectal o vaginal y palpación de la uretra a todo paciente en el que se sospeche la presencia de un tumor vesical aunque, en general, suele ser anodina⁶.

La mayoría de técnicas de las que se dispone en la actualidad para el diagnóstico de TNMI se usan para el diagnóstico y sobre todo para el seguimiento del tumor, debiendo diferenciarse entre las pruebas rutinarias y los estudios de extensión.

1.4.1. Pruebas Diagnósticas Habituales

Los pacientes que han presentado un episodio de hematuria deberían ser sometidos a una evaluación urológica completa que incluya, además de la historia clínica y la exploración física, cistoscopia, citología de orina y una valoración del tracto urinario superior (TUS)³⁹.

1.4.1.1. Cistoscopia

El principal test diagnóstico del cáncer de vejiga es la cistoscopia y biopsia de la lesión. La cistoscopia con luz blanca es considerada el “*patrón oro*” y la técnica flexible es tan fiable como la rígida. Sin embargo, se trata de una prueba invasiva con la morbilidad que esto conlleva. Tiene una sensibilidad y especificidad altas para los tumores papilares, pero es relativamente baja en el diagnóstico del *Cis*. En este sentido, la cistoscopia fotodinámica, empleando una porfirina como el hexaminolevulinato que se acumula en el tejido tumoral y emite fluorescencia roja cuando se ilumina con una luz dentro del espectro de 375 a 445 nanómetros (luz azul), puede mejorar la detección de lesiones de pequeño tamaño o de carcinoma *in situ*, aumentando la sensibilidad de un 72.7% a un 96.9% en esos casos^{19,40} [Figura 11].

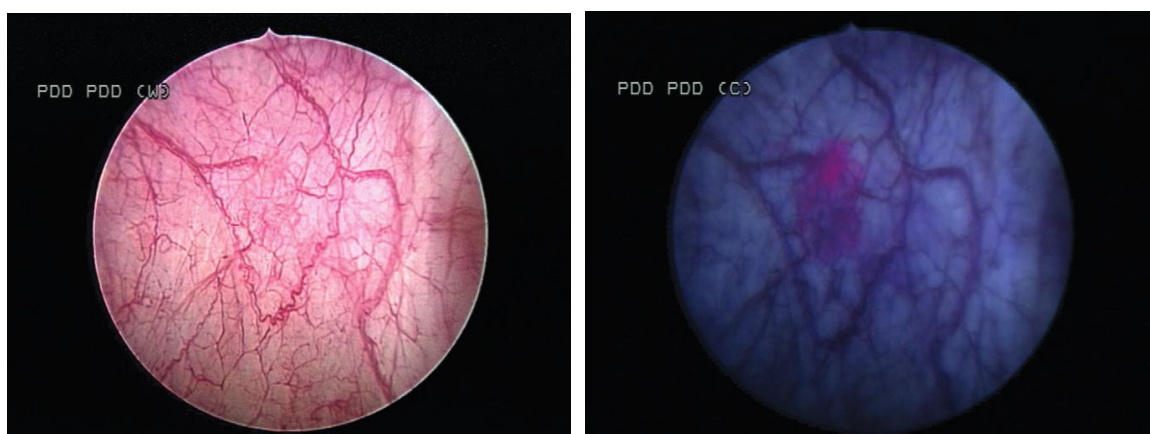


Figura 11. Comparación de hallazgos de cistoscopia con luz blanca y azul. A la izquierda mucosa de aspecto normal que al visualizarse con luz azul, a la derecha, presenta una zona hipercaptante y, por tanto, sospechosa de malignidad, que habría que reseca endoscópicamente³⁴

Se trata de una prueba que, además de valorar la capacidad vesical, permite hacer una exhaustiva descripción del tumor en lo que se refiere a su localización, tamaño, morfología y número. El aspecto macroscópico de las neoformaciones puede variar en relación con el estadio o grado, así los tumores de bajo grado, suelen aparecer en forma de papilas finas y mucosa circundante normal, mientras que a medida que aumenta el estadio o grado, el aspecto de la papila cambia, se hace más corta, mamelonada y su base de implantación es más amplia. Por el contrario, el *Cis* se muestra como una lesión plana, hiperémica y con aspecto aterciopelado⁴¹.

Por otra parte, es la mejor prueba de la que se dispone para el control de la enfermedad, pero se trata de un método invasivo que puede provocar morbilidad como ITUs y disconfort, a pesar de la instrumentación flexible existente^{1,6,7}.

En los últimos años se ha desarrollado la tomografía computerizada multidetector con reconstrucción multiplanar que permite la realización de una cistoscopia virtual, pudiendo estar indicada en aquellos pacientes en los que la cistoscopia convencional está contraindicada por alguna razón, es difícil de realizar o tenga una interpretación dudosa, aunque, en general, no se utiliza⁴².

Si existe una alta sospecha de tumor ante otra prueba realizada (ecografía, citología...) la cistoscopia ambulatoria resulta innecesaria y puede programarse al paciente directamente para una exploración y resección transuretral en quirófano¹⁹.

1.4.1.2. Citología de Orina

Papanicolau y Marshal fueron los primeros autores en aplicar el examen citológico en el sedimento de orina en 1940s con el fin de buscar células cancerosas exfoliadas⁹. Se trata de una técnica no invasiva adecuada para el cribado, diagnóstico y seguimiento del CCT⁴³ pero puede indicar la existencia de un tumor urotelial en cualquier lugar del tracto urinario, desde los cálices renales a la uretra, y no sólo en vejiga⁶. De este modo, su positividad implica la necesidad de realizar pruebas de imagen de la vía superior además de biopsias múltiples normalizadas (BMNs) en vejiga para descartar la existencia de *Cis*³⁹.

No es un test de laboratorio sino una interpretación patológica de las características morfológicas de las células, por lo que es observador dependiente^{1,6}.

Puede ser recogida durante la cistoscopia o por micción espontánea y su principal característica es su alta especificidad. Así, cuando es positiva sugiere la existencia de malignidad, incluso ante cistoscopia y pruebas de imagen normales¹. No obstante, existen otras lesiones distintas al cáncer que pueden provocar exfoliación de células transicionales, como son las litiasis, las infecciones o el uso de determinados contrastes radiológicos, por lo que pueden existir falsos positivos. Por otra parte, estas células pueden mostrar variaciones en tamaño y forma y presentar cambios degenerativos en el núcleo y en el citoplasma que pueden confundirse con alteraciones tumorales^{1,43}.

Sus limitaciones en el diagnóstico de neoplasia se deben, fundamentalmente, al aspecto normal de las células procedentes de tumores bien diferenciados y a que éstas presentan una cohesión intercelular más firme que hace que no se desprendan tan fácilmente, haciendo que la sensibilidad sea baja para los tumores de bajo grado⁶. Sin embargo, siempre se le ha adjudicado una sensibilidad alta en tumores de alto grado y/o *Cis*, que se ha puesto en duda en publicaciones recientes, descendiendo de un 90 a un 60%¹.

Debido a las limitaciones de esta prueba se han estudiado diversos marcadores moleculares en orina, como el NMP22, inmunocyt, UroVysion o el BTA-test. Aunque algunos han sido empleados en la clínica, ninguno ha sido aceptado como un procedimiento diagnóstico de rutina debido, sobre todo, a una especificidad muy reducida a pesar de tener, en general, una mayor sensibilidad que la citología⁶.

1.4.1.3. Pruebas Radiológicas

1.4.1.3.1. Ecografía

Actualmente se considera la prueba inicial de diagnóstico por imagen ante la sospecha de un tumor vesical dado su bajo coste, que no precisa medios de contraste y a que evita la irradiación del paciente. Tiene una tasa de falsos positivos y negativos cercana al 20%, fundamentalmente por sus limitaciones para la detección de lesiones pequeñas, planas, en localizaciones de difícil valoración como la cara anterior y al requerimiento de una buena repleción vesical, además de la dificultad técnica que existe en personas obesas o con cicatrices en la pared abdominal⁶.

1.4.1.3.2. Urografía Intravenosa Simple (UIV)

No se trata de una prueba inicial en todos los pacientes. Se utiliza principalmente para detectar defectos de repleción en el TUS así como hidronefrosis, aunque también puede detectar tumores vesicales grandes. Actualmente, está en duda la necesidad de realizar esta prueba de manera sistemática una vez que se diagnostica un tumor vesical, excepto si está localizado en trígono, dada la baja incidencia de hallazgos relevantes⁶.

1.4.1.3.3. Urografía por Tomografía Computerizada (TC) Multidetector

Algunos autores la consideran la modalidad de imagen de elección tanto para el diagnóstico como para la estadificación del cáncer de vías superiores y de vejiga al presentar una mayor exactitud diagnóstica que la UIV, aunque con el inconveniente de una mayor irradiación⁴⁴.

1.5. Tratamiento Quirúrgico

1.5.1. Resección Transuretral de Vejiga (RTU)

El pilar básico del tratamiento del TNMI es la resección transuretral³⁷. La cirugía endoscópica debe ser completa, eliminando todos los tumores visibles presentes en la vejiga, tomar una muestra de la base del tumor para asegurar la representación muscular y realizar biopsias de todas las áreas sospechosas para verificar la existencia o no de *Cis*. Por todo ello, se lleva a cabo con tres finalidades: diagnóstica, de estadificación y gradación y terapéutica^{37,45}.

La modalidad de resección depende del tamaño de la lesión. Los tumores pequeños (menores de 1 cm) se pueden resecar en bloque de modo que la pieza contenga el tumor completo más una parte de la pared vesical subyacente. Algunos expertos consideran que no se requiere una resección profunda en las lesiones pequeñas de grado aparentemente bajo, con antecedentes de un tumor TaG1. Los tumores más grandes deben researse por separado, en fracciones que comprendan la parte exofítica del tumor, la pared de la vejiga subyacente con el músculo detrusor y los bordes de la zona de resección, que se han de remitir al servicio de Anatomía Patológica de manera

independiente, con el fin de obtener un diagnóstico correcto^{6,46}. Se debe intentar evitar la cauterización excesiva del tumor ya que puede artefactar las muestras, dificultando su correcta valoración anatómo-patológica⁴⁷.

Habitualmente no se recomienda practicar biopsias de mucosa de aspecto normal, las denominadas biopsias múltiples normalizadas. La probabilidad de detectar un *Cis*, especialmente en los tumores de bajo riesgo, es limitada (menos del 2%) y la elección del tratamiento intravesical adyuvante no está determinada por el resultado de dichas biopsias. En la actualidad, se recomienda su realización sólo ante citologías positivas o cuando el tumor exofítico no tenga un aspecto papilar. Sin embargo, cuando se observan zonas anormales de urotelio es recomendable tomar siempre biopsia fría o con asa de resección⁶.

1.5.2. Cistectomía Radical

La cistectomía inmediata puede ser una opción terapéutica en pacientes con tumor sin invasión muscular que presenten un alto riesgo de progresión (T1AG, tumores de alto grado con *Cis* concomitante o múltiples tumores de alto grado recurrentes). Por otra parte, también debe ser planteada en aquellos casos en los que la terapia con BCG haya fracasado⁶.

Así, la cistectomía precoz en TNMI es la opción terapéutica con una tasa más alta de curación, que permitirá, además, el tratamiento de aquellos tumores que son infraestadiados tras la RTU. Por otra parte, se debe tener en cuenta que aproximadamente el 18% de los T1 presentan adenopatías positivas que se extirparán durante la cirugía radical y por último evita la necesidad de nuevas terapias endovesicales, simplificando el seguimiento de los pacientes⁴⁷. No obstante, tiene un riesgo de mortalidad y morbilidad perioperatoria de un 1-6% y 30% respectivamente y puede provocar una disminución en la calidad de vida por alteraciones en las esferas sexual, digestiva y genitourinaria, pudiendo considerarse en ocasiones un sobretratamiento ya que hasta en el 50% de casos un tratamiento conservador con BCG es suficiente en los tumores de alto riesgo⁴⁷.

1.6. Estadificación

1.6.1. RTU y re-RTU

El objetivo de la RTU en los TNMI consiste no sólo en extirpar las lesiones existentes sino en establecer el diagnóstico correcto, con una definición anatómo-patológica adecuada que permita la estadificación del tumor. Esto es necesario para establecer el riesgo de recidiva y progresión, en base al cual se aplicará un esquema de seguimiento y tratamiento adyuvante concreto^{6,37}. Por ello, la resección debe ser completa e incluir capa muscular propia.

Se ha demostrado existencia de tumores residuales después de la RTU inicial de TNMI, que oscila entre 33-53% en T1⁴⁷. Por otra parte, existe riesgo de infraestadificación generalmente por ausencia de músculo detrusor en las muestras (50-70% de los casos), aunque también puede ocurrir en pacientes que sí tengan representación muscular en los fragmentos analizados (20-30%)^{1,6,37,47}. Por todo ello, en la actualidad, ha de valorarse una segunda RTU cuando la resección inicial haya sido incompleta, por ejemplo, en tumores múltiples o muy grandes y cuando no se evidencie muscular propia en las muestras remitidas a Anatomía Patológica, pero también ante tumores primarios de alto grado y en T1^{1,37}. Además, parece que también puede existir una mejor respuesta a BCG tras la re-RTU³⁷.

Su realización se recomienda al cabo de 4-6 semanas de la RTU inicial, debiendo incluir la resección del foco tumoral primario^{6,47}. Se ha observado una supervivencia libre de enfermedad a 3 años de un 69% en pacientes con re-RTU frente a un 37 % sin ella⁴⁷.

1.6.2. Pruebas adicionales de Extensión

El principal estudio que nos va a dar la extensión local del tumor es la RTU, de tal modo que ante un tumor sospechoso de invasión de la capa muscular o tras la confirmación anatómo-patológica está indicado realizar estudios de extensión con el fin de realizar una adecuada estadificación del tumor con vistas a plantear un tratamiento posterior.

1.6.2.1. Tomografía Computerizada (TC)

Presenta una elevada exactitud diagnóstica ya que aporta, a diferencia de otras pruebas, información sobre la extensión del tumor, afectación de grasa perivesical, presencia de adenopatías y de metástasis a distancia. No obstante, tiende a la infraestadificación en aproximadamente un 36% de los casos^{44,48}. Su principal indicación es tras el diagnóstico de tumores invasivos, aunque está empezando a establecerse como la prueba de elección del estudio de la vía urinaria superior⁴⁹.

1.6.2.2. Resonancia Magnética (RM)

Tiene una resolución para tejidos blandos superior a la de la TC, pero una peor resolución espacial y su sensibilidad para diferenciar tumores T1-2 de los que se encuentran en estadios más avanzados es elevada. Desde el punto de vista del diagnóstico, no supera a las técnicas endoscópicas ni a la tomografía computerizada, pero su exactitud para la estadificación del tumor primario oscila entre el 73-96%, un 10-33% más que la TC^{44,50}.

1.6.2.3. PET-TC con inyección de L-metil-11C-metionina

En el diagnóstico del cancer de vejiga no es superior al TC ni a la RM y no detecta tumores menores de 1 cm. Su utilización sistemática en la estadificación ganglionar tampoco está establecida^{44,51}.

1.7. Terapia Endovesical

Una vez realizada la RTUv se plantea el empleo de terapia endovesical según las características de mayor o menor riesgo de recidiva y progresión establecidas a partir de los factores pronósticos que se comentarán más adelante. En la actualidad los dos más utilizados son la quimioterapia endovesical con mitomicina C (MMC) y la inmunoterapia, también intravesical, con bacilo de Calmette-Guérin (BCG).

1.7.1. Mitomicina C (MMC)

La mitomicina C es un agente alquilante que inhibe la síntesis de ADN y, actualmente, es el quimioterápico más empleado en el tratamiento adyuvante de los

TNMI. Generalmente se realiza una instilación semanal durante 6-8 semanas con una dosis que puede oscilar entre 20 y 60 mg, siendo la de 40 mg la más utilizada. Existen varios meta-análisis que han estudiado su influencia sobre la recidiva y progresión de los TNMI, observando que puede llegar a producir una reducción de las recidivas en un 38%, aunque el porcentaje de progresión es mayor que cuando se realiza tratamiento con BCG^{34,37,52}.

En los casos con un riesgo bajo de recidiva tumoral una única instilación en el postoperatorio inmediato con MMC disminuye el riesgo de recidiva y puede considerarse el tratamiento de referencia⁶. En otros casos, sin embargo, esta pauta es un tratamiento incompleto ya que la probabilidad de recidiva o progresión es elevada⁵³. No obstante, en la actualidad no está claramente establecida la duración y frecuencia con que se deben administrar las instilaciones con quimioterapia endovesical, aunque se recomienda que no deben superar el año⁵⁴.

1.7.2. Bacilo de Calmette- Guérin (BCG)

La BCG es una micobacteria atenuada, inicialmente desarrollada como una vacuna para la tuberculosis, que ha demostrado una actividad antitumoral en el cáncer de vejiga. Inicialmente la pauta de administración era percutánea, para posteriormente establecerse como instilaciones vesicales³⁴. Existen 6 cepas: Connaught, Tice, Armand Frapier, Pasteur, Tokyo y RIVM que proceden todas ellas de una cepa común. Debe reconstituirse con 50ml de suero salino, introducirse a través de una sonda, siempre y cuando la colocación de la misma no haya sido traumática, y mantenerse dentro de la vejiga al menos 2 horas. El inicio del tratamiento ha de ser tras la re-epitelización vesical, que se estima se produce entre 2-4 semanas después de la RTU, debiendo realizarse un urinocultivo tras la instilación para controlar y evitar las posibilidades de una afectación sistémica por BCG^{34,55}.

Se trata del tratamiento de elección en los pacientes considerados de alto riesgo de progresión, principalmente T1AG y/o *Cis*, ya que se ha observado que la previene o al menos la retrasa⁵⁶. Aunque existen modificaciones, las instilaciones en la fase de inducción se administran clásicamente en base a la pauta empírica de 6 semanas introducida por Morales hace unos 30 años⁶. Sin embargo, a fin de obtener una eficacia

óptima, es necesario realizar una pauta de mantenimiento. Existen múltiples opciones, desde un total de 10 instilaciones administradas durante 18 semanas, hasta 30 durante 3 años⁵⁵. No obstante, aunque en un meta-análisis de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC) no se ha podido determinar la pauta más eficaz⁵⁶, a tenor del grado de respuesta inmunitaria intravesical, se piensa que tres instilaciones semanales consecutivas logran una respuesta máxima⁶ y lo que sí parece claro es que se necesita al menos 1 año para observar la superioridad de la BCG sobre la MMC en cuanto a prevención de recidiva o progresión^{57,58,59}.

1.8. Predicción de Recidivas y Pogresión en Tumores Ta/T1: Factores Pronósticos

Los TNMI presentan una historia natural caracterizada por su tendencia a recurrir como tumor superficial (50-70%) y a progresar a una enfermedad músculo invasiva (T2 o más) (10-30%)^{3,60}.

Con el fin de predecir el riesgo individual de recidiva y progresión, a corto y largo plazo, se ha elaborado un sistema de puntuación basado en las características clínico-patológicas que, hasta la actualidad, se consideran más importantes (estadio, grado, *Cis* asociado, multifocalidad, tamaño y frecuencia de recidiva). Para ello se utilizó la base de datos de la EORTC, con 2.596 pacientes, y las tablas resultantes han sido incluidas en las guías europeas clínicas del cáncer de vejiga⁶¹ [Tabla 5]. Recientemente el grupo CUETO (Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico) ha publicado unas nuevas tablas, que incluyen además la edad y el sexo, basadas en el estudio de 1.062 pacientes que habían recibido tratamiento con BCG, ya que la serie anterior no incluía ningún caso que presentase únicamente *Cis*, menos de la cuarta parte habían recibido terapia endovesical inmediata tras la cirugía y ninguno de los pacientes de alto riesgo había sido tratado con pauta de mantenimiento con BCG. Por ello, se ha observado que las primeras sobreestiman los riesgos tanto de recidiva como de progresión en aquellos pacientes con tumores de alto riesgo que han recibido tratamiento adyuvante tras la RTU^{62,63} [Tabla 6].

FACTOR		RECIDIVA	PROGRESIÓN
NÚMERO DE TUMORES	Único	0	0
	2-7	3	3
	≥ 8	6	3
DIÁMETRO DEL TUMOR	< 3	0	0
	≥ 3	3	3
FRECUENCIA DE RECIDIVA	Tumor primario	0	0
	≤ 1 recidiva/año	2	2
	> 1 recidiva/año	4	2
CATEGORÍA T	Ta	0	0
	T1	1	4
CIS ASOCIADO	No	0	0
	Si	1	6
GRADO (OMS 1973)	G1	0	0
	G2	1	6
	G3	2	5
PUNTUACIÓN TOTAL		0-17	0-23

PUNTUACIÓN DE RECIDIVA	PROBABILIDAD DE RECIDIVA AL CABO DE 1 AÑO		PROBABILIDAD DE RECIDIVA AL CABO DE 5 AÑOS		GRUPO DE RIESGO DE RECIDIVA *
	%	IC del 95%	%	IC del 95%	
0	15	(10-19)	31	(24-37)	Riesgo bajo
1-4	24	(21-26)	46	(42-49)	Riesgo intermedio
5-9	38	(35-41)	62	(58-65)	Riesgo alto

PUNTUACIÓN DE PROGRESIÓN	PROBABILIDAD DE PROGRESIÓN AL CABO DE 1 AÑO		PROBABILIDAD DE PROGRESIÓN AL CABO DE 5 AÑOS		GRUPO DE RIESGO DE PROGRESIÓN*
	%	IC del 95%	%	IC del 95%	
0	0.2	(0-0.7)	0.8	(0-1.7)	Riesgo bajo
2-6	1	(0.4-1.6)	6	(5-8)	Riesgo intermedio
7-13	5	(4-7)	17	(14-20)	Riesgo alto
14-23	17	(10-24)	45	(35-55)	

Tabla 5. Sistema de puntuación de las tablas de la EORTC y riesgo de recidiva y progresión según la puntuación obtenida. (*) Existen calculadoras electrónicas para ambas⁶¹

FACTOR		RECIDIVA	PROGRESIÓN
SEXO	Masculino	0	0
	Femenino	3	0
EDAD	< 60	0	0
	60-70	1	0
	> 70	2	2
TUMOR RECIDIVANTE	No	0	0
	Si	4	2
NÚMERO DE TUMORES	< 3	0	0
	≥ 3	2	1
CATEGORÍA T	Ta	0	0
	T1	0	2
CIS ASOCIADO	No	0	0
	Si	2	1
GRADO (OMS 1973)	G1	0	0
	G2	1	2
	G3	3	6
PUNTUACIÓN TOTAL		0-16	0-14

PUNTUACIÓN DE RECIDIVA	PROBABILIDAD DE RECIDIVA AL CABO DE 1 AÑO		PROBABILIDAD DE RECIDIVA AL CABO DE 2 AÑOS		PROBABILIDAD DE RECIDIVA AL CABO DE 5 AÑOS	
	%	IC del 95%	%	IC del 95%	%	IC del 95%
0-4	8.24	(5.91-10.57)	12.6	(9.76-15.44)	20.98	(17.33-24.63)
5-6	12.07	(7.95-16.19)	22.28	(16.93-27.63)	35.57	(29.18-41.96)
7-9	25.36	(19.56-31.16)	39.61	(32.93-46.29)	47.65	(40.55-54.75)
≥10	41.79	(28.05-55.53)	52.55	(38.48-66.62)	67.61	(53.67-81.55)

PUNTUACIÓN DE PROGRESIÓN	PROBABILIDAD DE PROGRESIÓN AL CABO DE 1 AÑO		PROBABILIDAD DE PROGRESIÓN AL CABO DE 2 AÑOS		PROBABILIDAD DE PROGRESIÓN AL CABO DE 5 AÑOS	
	%	IC del 95%	%	IC del 95%	%	IC del 95%
0-4	1.17	(0.15-2.19)	2.16	(0.77-3.55)	3.76	(1.9-5.62)
5-6	3	(0.82-5.18)	4.97	(2.34-7.6)	11.69	(7.57-15.81)
7-9	5.55	(2.73-8.37)	11.95	(7.93-15.97)	21.26	(15.85-26.67)
≥10	13.97	(6.64-21.3)	24.81	(15.6-34.02)	33.57	(23.06-44.08)

Tabla 6. Sistema de puntuación de las tablas del grupo CUETO y riesgo de recidiva y progresión según la puntuación obtenida⁶²

En la actualidad, las tablas de la EORTC representan el método aconsejado para discriminar los riesgos de recidiva y progresión de los TNMI, siendo una buena herramienta para determinar el tratamiento y seguimiento de los pacientes tras la RTUv. En base a esto, su valor pronóstico debería ser ajustado según el tratamiento recibido con el fin de mejorar el valor predictivo positivo (VPP), como se ha observado en pacientes de alto riesgo tratados con BCG en las tablas del grupo CUETO⁶⁴.

1.8.1. Factores Pronósticos Clínico-Patológicos

1.8.1.1. Recidiva

La tasa de recidiva de los TNMI varía entre un 15-70% en el primer año⁶¹, de ahí la importancia de establecer factores que nos puedan predecir la aparición de este evento. Dentro de los clínico-patológicos la multifocalidad y el tamaño tumoral han sido considerados en múltiples estudios como los más importantes, teniendo un gran peso en las tablas de la EORTC^{37,61}.

En aquellos pacientes tratados con BCG se ha visto que el sexo femenino, la multiplicidad, la presencia de *Cis* y la historia previa de tumores vesicales pueden ser considerados factores pronósticos de recidiva^{37,63}.

1.8.1.2. Progresión

La progresión a tumor músculo-invasivo (TMI) es mucho menos frecuente que la recidiva pero puede llegar a oscilar, según las tablas de la EORTC, entre menos del 1% y un 45%. Se considera que los factores pronósticos más importantes son el estadio T1, el alto grado y la presencia de *Cis*⁶¹. No obstante, se ha visto que estas tablas presentan el inconveniente de que la mayoría de pacientes fueron tratados con regímenes intravesicales antiguos, sabiéndose en la actualidad que el uso de una instilación inmediata con MMC después de la RTU, la re-RTU y el uso de mantenimiento en la terapia con BCG pueden reducir la progresión⁶¹.

Por otra parte, en el subgrupo de pacientes con alto riesgo de progresión tratados con BCG se consideran como factores indicadores el estadio y grado del tumor primario y la recidiva en la primera cistoscopia realizada tras la RTU^{37,63}.

1.8.2. Factores Anatómo-Patológicos

Dadas las limitaciones de los factores tradicionales vistos con anterioridad, se han estudiado diversos factores histológicos en muestras de tejido tumoral obtenidas tanto de RTU como de piezas de cistectomía, que intentan mejorar la predicción del pronóstico.

1.8.2.1. Subestadificación

Los tumores T1 se caracterizan por presentar un pronóstico heterogéneo³, por lo que se ha establecido un sistema de subestadiaje basado en la profundidad de invasión de la lámina propia, dividiéndose inicialmente en 3 subestadios: T1a, T1b y T1c [Figura 12].

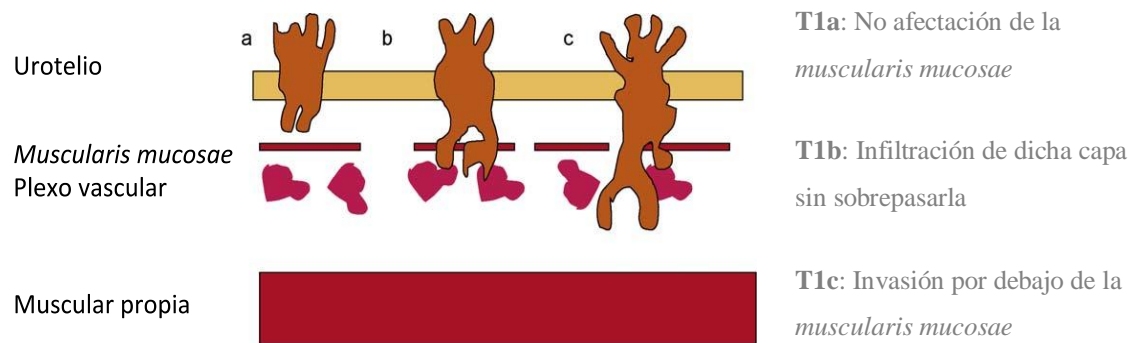


Figura 12. Subestadificación antigua de tumores T1 en base a la profundidad de invasión de la lámina propia. T1a: no afecta la *muscularis mucosae*, T1b: infiltración de dicha capa pero sin sobrepasarla y T1c: invasión por debajo de la *muscularis mucosae*³⁷

Se ha observado que los subtipos T1b y T1c tienen un comportamiento similar, asociándose ambos a una progresión mayor, que puede ser debida a un aumento de la permeación linfática, y a una tasa menor de supervivencia^{1,37}. Por ello, en la actualidad, la subestadificación se realiza únicamente según el tumor invada o no la *muscularis mucosae*^{1,6,37,65,66}:

- T1a: invasión de la lámina propia sin llegar a la *muscularis mucosae* (6.7-11% riesgo de progresión)
- T1b (antiguo T1b+T1c): infiltración de la *muscularis mucosae* (29-55% riesgo de progresión)

1.8.2.2. Infiltración Linfovascular

La afectación del tejido linfovascular ha sido reconocida como un factor pronóstico desfavorable dentro de los tumores T1⁶.

1.8.2.3. Presencia de Áreas Micropapilares

La detección de la variante micropapilar del carcinoma urotelial se ha relacionado con un peor pronóstico, asociándose a una tasa de progresión a TMI de casi el 70% y a una elevada tendencia a metastatizar a pesar del tratamiento. La terapia intravesical con BCG parece inefectiva, por lo que en ocasiones se recomienda una cistectomía precoz^{1,6,67}.

1.8.2.4. Afectación de Uretra Prostática

En un 3% de los TNMI existe afectación de la uretra prostática⁶⁸. Por tanto, está indicada la realización de una biopsia con asa de resección del área precolicular ante citologías positivas, con una sensibilidad y especificidad mayores del 90% para el diagnóstico¹. Aunque se desconoce el riesgo exacto de presentar esta alteración, parece ser mayor cuando el tumor está localizado en el trigono o en el cuello de la vejiga, en presencia de *Cis* y en caso de tumores múltiples⁶.

La enfermedad no invasiva a este nivel se asocia a un mejor pronóstico en relación a cuando existe una invasión del estroma prostático, en cuyo caso el tumor pasa a clasificarse como T4¹.

1.9. Establecimiento de Grupos de Riesgo

Por tanto, la determinación de los riesgos evolutivos individualizados del cáncer de vejiga es ocasionalmente compleja, sobre todo en pacientes con factores pronósticos sugestivos de alto riesgo de recidiva y progresión, en los que un tratamiento agresivo precoz pudiera estar indicado. Esto se debe a las limitaciones relativas de la estadificación clínica de la RTU de tumores que quizá sean realmente músculo invasivos. Aunque tanto las tablas de la EORTC como las del grupo CUETO pueden

predecir qué pacientes no progresarán (valor predictivo negativo ó VPN > 90%) no siempre consiguen identificar qué pacientes sí lo harán (VPP < 25%)⁶⁴.

1.10 Control y Seguimiento

En función de los factores pronósticos y de los grupos de riesgo que se han establecido hasta el momento, se han planteado diferentes esquemas de control y seguimiento. Los tumores T1 tienen una tasa de evolución a TMI mayor que los Ta y se ha visto que uno de los principales predictores de progresión y mortalidad es la enfermedad de alto grado. Así, dentro de los TNMI, la combinación T1AG presenta un peor pronóstico, causando la muerte hasta en un 25% de los pacientes².

En la actualidad existen protocolos de seguimiento basados fundamentalmente en los grupos de riesgo obtenidos a partir de las tablas de la EORTC, definidos en base a las características clínicas y anatómo-patológicas del tumor tras la cirugía endoscópica⁶.

Según las Guías Europeas de Práctica Clínica, se debe realizar una cistoscopia y una citología urinaria (tres si son por micción) 3 meses después de la RTU. En los tumores con bajo riesgo de recidiva y progresión (principalmente los TaBG), en caso de ser negativas, se aconseja efectuar la siguiente revisión a los 9 meses y, posteriormente, una vez al año durante 5 años. Por el contrario, si existe alto riesgo de progresión (como es el caso de los T1AG) las siguientes cistoscopias y citologías se repetirán cada 3 meses durante los dos primeros años, cada 4 meses el tercer año, luego cada 6 meses hasta los 5 años y anualmente a partir de entonces. Además, se recomienda una exploración de las vías urinarias superiores una vez al año. En el caso de un riesgo intermedio de progresión (sobre todo T1BG) se aplican esquemas de seguimiento intermedios, adaptados a factores personales y subjetivos⁶.

2. ALTERACIONES MOLECULARES ASOCIADAS AL CÁNCER DE VEJIGA. HIPERMETILACIÓN DE ADN

La homeostasis celular es mantenida por un equilibrio entre la división durante el ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis. En el cáncer, en cambio, se produce un

crecimiento anormal de las células respecto al tejido normal, que persiste tras el cese del evento inicial que produjo la transformación, siendo su base fundamental la combinación de alteraciones genéticas (somáticas y heredables) y epigenéticas⁶⁰.

La etiopatogenia del cáncer es caracterizada por su naturaleza múltiple y gran cantidad de agentes biológicos, químicos y físicos han sido identificados como iniciadores y promotores de la tumorigénesis. Sin embargo, parece que existe una base molecular común, basada en una inestabilidad genética, que causa trastornos somáticos preneoplásicos y, en último término, el desarrollo de células tumorales. Son muchas las vías implicadas en la carcinogénesis que están siendo estudiadas como potenciales marcadores del tumor⁶⁹. Por un lado existen mutaciones somáticas, que son la anomalía más frecuente en el cáncer en humanos, y en líneas germinales, que se asocian con síndromes familiares. También se han descrito deleciones e inserciones⁷⁰. Además, eventos a nivel epigenético, como la metilación del promotor de múltiples genes, son considerados importantes en la tumorigénesis y progresión del tumor⁶⁰.

En concreto, en el cáncer vesical, alteraciones en las vías de los genes supresores de tumor p53 y Rb están bien documentadas, siendo las más frecuentes la mutación en los exones 5 a 11 de p53 y la pérdida de función de pRb, que se identifican en aproximadamente el 60% de las líneas celulares de cáncer de vejiga que han sido estudiadas^{60,71}. No obstante, el estudio del componente epigenético en TNMI está mejorando nuestra comprensión sobre su biología y comportamiento clínico⁷². En lo que se refiere a la metilación del ADN, generalmente las células tumorales muestran una hipometilación de todo el genoma y una hipermetilación de las islas CpG de las regiones promotoras de ciertos genes, siendo la modificación epigenética más ampliamente descrita. De esta forma, genes frecuentemente metilados están involucrados en mecanismos moleculares implicados en el cáncer como son el ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la invasión, entre otros. Por otra parte, se está estudiando la potencial aplicación de los perfiles de metilación descritos hasta el momento como biomarcadores de esta neoplasia. No obstante, el estudio epigenómico del cáncer de vejiga no ha hecho más que comenzar.

2.1. Hipermetilación en el Contexto de otras Alteraciones Epigenéticas

Las alteraciones a nivel epigenético son consideradas una característica común de gran cantidad de enfermedades como las neoplasias, incluyendo el cáncer de vejiga⁷²⁻⁷⁵. Pueden ser definidas como cambios moleculares estables en el fenotipo de una célula que se heredan mediante las divisiones de las células somáticas y, en ocasiones, también a través de la línea germinal, pero que no implican cambios en la secuencia del ADN^{8,76,77}. Todos ellos pueden manifestarse como alteraciones globales en la estructura de la cromatina y como cambios específicos en regiones promotoras, afectando a la transcripción de los genes asociados⁷²⁻⁷⁵. Los fenómenos epigenéticos más importantes están mediados por varios mecanismos moleculares entre los que se encuentran la modificación de histonas, la remodelación nucleosómica y el silenciamiento asociado a ARN, pero es la hipermetilación del ADN la que se encuentra más frecuentemente en el genoma humano y la que más se ha estudiado en relación a la carcinogénesis⁷⁷.

2.2. Tipos de Metilación

La metilación del ADN ocurre predominantemente en el contexto de los dinucleótidos Citosina fosfato Guanina (CpG), aunque en el genoma humano también se puede producir una metilación de secuencias no CpG.

2.2.1. Metilación de Islas CpG

La metilación del ADN tiene lugar habitualmente en el carbono 5 de las citosinas localizadas a nivel del dinucleótido CpG, por unión covalente de grupos metilo en una reacción mediada por enzimas pertenecientes a la familia de las ADN-metiltransferasa (DNMT)⁷⁸. Esos dinucleótidos CpG tienden a agruparse en regiones denominadas islas CpG, definidas como regiones de más de 200 bases con un contenido Guanina+Citosina (G+C) de al menos el 50% y una *ratio* de observación de dinucleótidos CpG de al menos 0.6. El genoma humano contiene unas 29.000 islas CpG presentes fundamentalmente en los promotores de los genes, concretamente, en aproximadamente el 60 % de ellos^{73-77,79}. Generalmente se encuentran no metiladas en células normales, aunque algunas de ellas (alrededor de un 6%) se metilan de manera específica en función del tejido, bien durante el desarrollo temprano o bien durante la diferenciación

tisular, sobre todo en zonas repetitivas, a las que se les ha atribuido un papel relevante en el control de la actividad genética y en la arquitectura nuclear, evitando traslocaciones, interrupciones genéticas y, en definitiva, la inestabilidad cromosómica^{73,77,80}.

En términos de metilación de dinucleótidos CpG del ADN, las células tumorales muestran un genoma ampliamente hipometilado y una hipermetilación específica de islas CpG de determinadas regiones promotoras⁷³. Así, estos dos procesos se producen de forma simultánea en las células neoplásicas y ambos patrones de hiper e hipometilación pueden diferir en la carcinogénesis y en la progresión tumoral⁷²⁻⁷⁵.

Por otra parte, puede producirse una hipometilación del ADN en algunas secuencias genómicas, provocando inestabilidad con una mayor tasa de reordenamientos cromosómicos y una mayor probabilidad de translocaciones. Por otra parte, la hipometilación aberrante del ADN también puede relacionarse con la activación de algunos proto-oncogenes y conducir a la pérdida de la impresión genómica⁷⁴. Por tanto, la metilación del ADN es necesaria para proteger la integridad cromosómica ya que la mayoría de islas CpG permanecen inmodificables durante el desarrollo y diferenciación de los tejidos⁷⁷. Además, la metilación de islas CpG se produce de manera natural durante los fenómenos de desarrollo, como es el caso de la inactivación del cromosoma X⁷³.

En general, la hipermetilación de islas CpG está asociada con el silenciamiento de genes, lo cual se produce por varios mecanismos. Por un lado, el ADN metilado puede favorecer el reclutamiento de proteínas con dominios ligantes de islas CpG metiladas (MBD: methyl-CpG-Binding Domain), que a su vez permiten la unión de modificadores de histonas y complejos remodeladores de cromatina a los sitios de metilación⁸⁰. Por otro, puede también inhibir directamente la transcripción evitando el reclutamiento de proteínas de unión al ADN desde sus lugares diana. Por el contrario, las islas CpG no metiladas pueden generar una estructura de cromatina favorable para la expresión de genes⁷⁷.

Recientemente se han descrito modificaciones por fenómenos de metilación en regiones de menor densidad de CpG que se encuentran en las proximidades de las islas (aproximadamente a 2kb) y su metilación está íntimamente asociada con la inactivación

transcripcional de genes. Se cree que la mayor parte de la metilación de ADN específico de tejido ocurre en ese lugar y no en las islas CpG. Estas zonas diferencialmente metiladas pueden ser importantes en la diferenciación de tejidos específicos y se ha visto que son comunes entre humanos y ratones. Además, el 70% de las regiones metiladas de manera diferencial en la reprogramación están asociadas con estas zonas de menos densidad de islas CpG⁷⁷.

Por último, la metilación del ADN está menos frecuentemente asociada a activación transcripcional. La metilación en los exones es común en los genes de expresión ubicua y se correlaciona con la expresión de los mismos. Se ha propuesto que esto podría estar asociado a la eficiencia de elongación y con la prevención de inicios de transcripción erróneos⁷.

2.2.2. Metilación de Secuencias no CpG

Existen otros lugares de metilación que han sido menos estudiados tanto en el cáncer en general, como en los tumores vesicales en concreto. Aunque en mamíferos la metilación del ADN ocurre fundamentalmente en dinucleótidos CpG, la metilación no-CpG ha sido recientemente descrita en humanos en sitios CHG y CHH, donde H es adenina, citosina o timina. La metilación de CHG y CHH ha sido observada en células madre y parece que está aumentada en los exones, correlacionándose directamente con la expresión génica. Casi una cuarta parte de todo el ADN metilado de las células madre embrionarias ocurre en el contexto de lugares no CpG. Sin embargo, estos mecanismos de metilación aún no están definidos⁷⁷.

Además de la modificación de la 5-metilcitosina, se ha descrito la de la 5-hidroximetil 2'-deoxycitocina. La 5-metilcitosina (5-mC) pueden convertirse en 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) por el 2-oxoglutarato y por oxigenasas hierro dependiente tales como las dioxigenasas TET-metilcitosina (TET1, TET2 y TET3). La 5 hidroximetil-2'-deoxicidina se ha descrito en células de Purkinje (constituyendo el 0.6% del total de nucleótidos), pero no se ha observado su presencia en líneas celulares tumorales^{72,74,77}.

Esta nueva modificación del ADN está siendo estudiada para determinar sus posibles implicaciones en la regulación epigenética tanto de las células normales como

de las neoplásicas. En el cáncer de vejiga estos fenómenos no se han descrito hasta el momento.

Por tanto, esta revisión se centrará en la hipermetilación de islas CpG y, más concretamente, en la que se produce en la región promotora de genes críticos para el desarrollo del cáncer vesical, analizando sus potenciales aplicaciones clínicas como biomarcador tumoral.

2.3. Mecanismo de Metilación: El papel de los DNMTs

Como se ha visto, la metilación del ADN generalmente tiene lugar en la posición 5' del anillo del nucleósido de citosina en los dinucleótidos CpG y su consecuencia es el silenciamiento de los genes y la no codificación de esa región genómica. La metilación del ADN está mediada por la familia de enzimas DNMT que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil metionina al ADN. Se han descrito cinco miembros de esa familia: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, pero solamente DNMT1, DNMT3a y DNMT3b poseen actividad metiltransferasa⁷⁷.

Los miembros catalíticos de la familia DNMT pueden clasificarse según estén implicados en las metilaciones de mantenimiento (DNMT1) o *de novo* (DNMT3a y DNMT3b):

- DNMT1 mantiene los patrones de metilación existentes durante la replicación del ADN. Tiene una preferencia 30-40 veces mayor por el ADN hemimetilado generado durante la replicación semi-conservadora del ADN, pero también tiene una actividad DNMT *de novo*. Es la DNMT más abundante en las células y es transcrita principalmente durante la fase S del ciclo celular⁸¹.
- DNMT3a y DNMT3b son las enzimas que catalizan la metilación *de novo* de nucleótidos CpG previamente no metilados, siendo responsables de establecer el patrón de metilación durante el desarrollo embrionario⁷³.

La disrupción de los mecanismos epigenéticos puede provocar una expresión aberrante de los genes y dar lugar a diversas características tumorales, bien por

mutación, deleción o alteración de cualquiera de sus componentes. De hecho, estas “epimutaciones” a veces representan el segundo evento para la iniciación de la carcinogénesis según postula la *teoría de Hudson en dos golpes*, ya que puede silenciar el alelo que se mantiene activo tras producirse una mutación de un gen supresor de tumor⁷⁵. Sin embargo, son limitados los estudios que han analizado la relación entre los patrones de metilación observados en cáncer de vejiga y la expresión proteica⁸¹.

La alteración en la metilación del ADN en células tumorales ha sido recientemente apoyada por el hallazgo de mutaciones somáticas en DNMT3a en leucemia aguda mieloide. También se han observado mutaciones homocigotas nulas y deleciones cromosómicas que afectan el locus TET2 en varias neoplasias mieloides, por tanto la alteración de la conversión de 5-mC a 5-hmC podría estar también relacionada con el cáncer. Queda por dilucidar si las mutaciones que afectan a los mecanismos DNMTs o TETs están presentes y son relevantes en el cáncer de vejiga pudiendo ser utilizadas como dianas terapéuticas en el futuro⁷⁷.

Además, es importante tener en cuenta que el silenciamiento genético producido como consecuencia de la hipermetilación CpG implica la modificación tanto del código genético como del código de las histonas. Concretamente, cuando una DNMT cataliza la metilación de la posición cinco del anillo de la citosina dentro de una isla CpG localizada en la región promotora de un gen, usando S-adenosilmetionina como molécula donante, también se producen cambios en la composición de la cromatina alrededor de la isla, que impiden el acceso de las proteínas reguladoras necesarias para la transcripción. Así, la estructura de la cromatina se modifica durante el silenciamiento de genes alterando la acetilación, fosforilación, metilación y/o ubiquinización de las histonas⁷²⁻⁷⁵.

2.4. Factores Epigenéticos que Contribuyen a la Tumorigénesis y Progresión del Cáncer de Vejiga

El cáncer de vejiga es una enfermedad en la que se encuentran implicados múltiples factores ambientales y se produce por acumulación de alteraciones moleculares del ADN, ARN y proteínas, entre otros. Estas alteraciones moleculares producen una proliferación celular descontrolada, una disregulación del ciclo celular,

una disminución de la muerte celular o apoptosis, un bloqueo en la diferenciación y una tendencia a invasión que favorece potencialmente la aparición de metástasis^{60,69}. Por tanto, es evidente que la epigenética juega un importante papel en la regulación de la expresión de muchos genes críticos que participan en esas vías biológicas. Las alteraciones epigenéticas específicas que se producen como parte de la interferencia entre estas vías determinarán también el comportamiento biológico del tumor, incluyendo su capacidad de crecer, recidivar, progresar y metastatizar.

Al igual que sucede en otras neoplasias humanas, el cáncer de vejiga muestra una regulación epigenética aberrante. Concretamente, las alteraciones que más se han caracterizado en este tumor son los cambios globales en la metilación del ADN, la modificación alterada de las histonas y los patrones de mRNAs^{69,70,72,74,82-84}. Debido a que las características epigenéticas, tales como la hipometilación global del ADN y la hipermetilación promotor-específica son frecuentemente observadas en tumores benignos y en estadios neoplásicos iniciales, se hace evidente que la disregulación epigenética puede considerarse uno de los principales procesos desencadenantes de la transformación neoplásica, junto con las mutaciones en los genes supresores de tumores y/o en los protooncogenes y la inestabilidad genómica⁷⁷. Sin embargo, aún no se ha caracterizado en qué momento del curso de la enfermedad son adquiridas (al inicio y/o en la progresión)⁷⁷.

El cáncer de vejiga es una neoplasia con gran variabilidad y complejidad tanto a nivel histológico, clínico como molecular^{3,77}. Son muchos los genes que se han observado epigenéticamente desactivados por hipermetilación de su promotor, incluyendo genes supresores de tumor y genes claves relacionados con las principales vías descritas para este tumor, como el CDKN2A y la E-cadherina, entre otros. De este modo, los perfiles de metilación de ADN deben integrarse con los análisis histológicos, transcripcionales y proteicos. Sin embargo, a pesar de los avances realizados aún es necesario incorporar las alteraciones epigenéticas a la complejidad de los eventos genéticos y proteicos a fin de mejorar el conocimiento de la enfermedad y la interpretación de los distintos fenotipos, así como el posible desarrollo de biomarcadores y terapias dirigidas⁷⁷.

2.5. Vías Biológicas de Genes Frecuentemente Metilados en Cáncer de Vejiga

El evento epigenético más frecuentemente estudiado en los tumores de vejiga es la hipermetilación de islas CpG de las regiones promotoras, frecuentemente asociadas con un silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumor y de otros genes relacionados con el cáncer^{60,70}.

Los genes supresores de tumor pueden llevar a cabo su función a través de uno o varios mecanismos incluyendo regulación del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis, invasión, diferenciación fundamentalmente [Tabla 7].

Mecanismos	Gen	Frecuencia de Metilación en Tumor	Nº de tumores de vejiga estudiados (rango)	Valor pronóstico en tejido tumoral
CICLO CELULAR	P16-INK4A/CDKN2A	0-73%	15-344	Sí
	P14-ARF	0-61.8%	15-127	Sí
	CCND2	21.1-72%	25-96	No
	RB1	0-27.5%	31-91	Sí
	P15-INK2B-CDKN2B	7.1-24%	24-104	No
	PAX5A	12.9-68.2%	31-91	No
	PAX6	0-23%	27-91	Sí
	CHFR	0-18.7%	31-91	No
REPARACIÓN DEL ADN	MGMT	0-67%	15-344	No
	GSTP1	0-47%	15-344	Sí
	MLH1	0-79.2%	25-344	Sí
	APC	17.6-73%	15-344	Sí
	ATM	0-40.7%	25-91	No
	MSH6	29-81.3%	31-91	Sí
	COX2	3.6-75.2%	55-105	No
	BRCA1	71-72.5%	31-91	No
	BRCA2	3.2-56%	31-91	No
TP53	12.9-46.2%	31-91	No	
APOPTOSIS	DAPK	0-100%	24-344	Sí
	CASP8	3.6%	103-110	No
	DR3	98.1%	105	No
	DR6	6.7%	105	No
	DRC1	22%	64	No
	DRC2	27%	64	No
	APAF1	70.8-100%	34-110	Sí
	BCL2	38.2-62.3%	34-125	No
	PYCARD	3-28.6%	31-344	Sí
	RASSF1A	22.5-67%	15-344	Sí

Mecanismos	Gen	Frecuencia de Metilación en Tumor	Nº de tumores de vejiga estudiados (rango)	Valor pronóstico en tejido tumoral
INVASIÓN	TIMP3	2.9-93%	15-105	Sí
	LAM	11-45%	128-344	Sí
	CDH1	2.9-100%	15-344	Sí
	COL1A2	62.7%	67	No
	ICAM1	89.5%	105	No
	VIM	96%	50	No
	CD44	9.7-38.5%	31-91	No
	CD99	31.7%	82	No
SEÑALIZACIÓN DEL WNT	KISS1	83.1%	804	Sí
	SFRP1	17-75.9%	24-355	Sí
	SFRP2	32.4-63%	54-355	Sí
	SFRP4	3-38.9%	54-355	Sí
	SFRP5	20-87%	20-355	Sí
OTROS GENES SUPRESORES DE TUMORES	WIF1	1-66.7%	34-96	Sí
	RUNX3	3.6-73%	46-342	Sí
	MYO	68.7-86.9%	46-466	Sí
	PTEN	0-31.9%	34-91	No
	HIC1	21.9-100%	25-96	No
	VHL	4-31.9%	31-91	No
	WT1	58.2%	37-91	Sí
	DBCCR1	52%	69	No
DIFERENCIACIÓN	IGSF4	0-61.5%	31-91	No
	DBC1	12-69%	26-105	No
	S100A	NA	32	No
	SOX9	56.4-70%	10-110	Sí
	PMF1	77.6-88.1%	32-406	Sí
	CAGE1	52.7-81.1%	16-55	No
	ESR1	16.1-79.4%	31-91	Sí
	RARB	2.1-93%	15-344	Sí

Tabla 7. Genes más frecuentemente estudiados en cáncer de vejiga agrupados según su función principal. Se expresa su utilidad como factor pronóstico (“sí” implica que se demostró en análisis de supervivencia, “no” implica que fue estudiado pero no se obtuvo correlación con los resultados clínicos)⁷⁷

2.6. Aplicación Traslacional de los Análisis de Metilación como Fuente de Biomarcadores de Cáncer de Vejiga

Los análisis de los patrones de metilación de los candidatos en cáncer de vejiga son relevantes no sólo para determinar si la metilación es frecuente en el tejido vesical humano, sino también para evaluar los pasos críticos a lo largo de la progresión de la enfermedad en los que se produce la metilación y las interacciones involucradas en

estos procesos. Además, es importante traducir esta información para su empleo como potenciales marcadores tumorales en el manejo clínico de los pacientes con esta enfermedad.

Inicialmente, se realizan análisis en muestras de tejido, que tienen como objetivo describir la prevalencia de metilación en el tumor y, posteriormente, evaluar su utilidad para la estratificación tumoral o como factores pronósticos. Cuando el método analítico de metilación muestra una fiabilidad, sensibilidad y especificidad suficiente con baja cantidad de células tumorales, esto puede ser optimizado y testado en orina con un propósito diagnóstico⁷⁷. Por tanto, los avances en el conocimiento de las alteraciones epigenéticas del cáncer vesical incluyen no sólo la caracterización biológica de las alteraciones de metilación, sino su aplicación como biomarcadores^{8,77}.

En definitiva, en la actualidad, las tres principales áreas en las que este evento parece presentar un beneficio son la detección del cáncer, la estadificación del tumor y el pronóstico clínico. Además, se ha comenzado a plantear su uso en la predicción de respuesta a tratamiento, un campo conocido como farmacoepigénica⁷⁷.

2.7. Detección del Cáncer de Vejiga

La metilación aberrante del ADN que tiene lugar en los tumores de vejiga se ha observado principalmente por medio de análisis de genes con diferentes mecanismos específicos de supresión tumoral^{69,70,83,84}. El estudio de las distintas etapas del tumor, desde la tumorigénesis a la progresión, incluyendo muestras de urotelio normal, ha puesto de manifiesto la existencia de perfiles de metilación que pueden caracterizar los distintos subgrupos del cáncer de vejiga. El potencial diagnóstico de este evento como biomarcador en la práctica diaria está centrado en que los eventos aberrantes de metilación están ausentes en células del urotelio normal y en el desarrollo de técnicas que proporcionen información fiable, sensible y rápida. Por ello, los avances en las tecnologías que permiten acoplar el proceso de modificación con bisulfito del ADN y la PCR de metilación están siendo claves en el desarrollo de métodos moleculares que puedan ser incluidos en los laboratorios clínicos⁷⁷.

Las islas CpG hipermetiladas han sido usadas como herramienta para la detección de células tumorales no sólo en muestras de tejido sino también en fluidos biológicos

como el suero^{4,85} o la orina, como técnicas no invasivas. Los estudios iniciales han tratado de evaluar si el análisis del metaloma urinario puede ser empleado para el diagnóstico del tumor. La mayoría de genes estudiados con un potencial papel en el diagnóstico de la enfermedad presentan una precisión superior al 65%, destacando el CDKN2A⁸⁶⁻⁸⁸, GSTP1^{9,87}, BRCA1^{87,89} y RARB^{9,87,90-92} entre otros. Inicialmente, los estudios fueron realizados por una PCR específica para metilación (MSP) en las modalidades cuali y cuantitativa^{9,90,91,93,94}, pero en la actualidad también son factibles análisis multiparamétricos como la técnica de amplificación múltiple de sondas dependientes de ligando específica de metilación (MS-MLPA)^{8,87,88}, los métodos cuantitativos de RT-PCR o los CpG arrays de fabricación a la carta o comerciales⁷⁷. Además, estas técnicas también permiten la detección de eventos epigenéticos cáncer específicos en la orina de pacientes con tumor de vejiga al tratarse de un material de fácil recogida para un diagnóstico no invasivo. Por todo ello, el desarrollo de métodos de detección de mínimas cantidades de ADN metilado de forma aberrante es fundamental para ampliar sus aplicaciones y para que puedan ser incorporadas en la práctica clínica rutinaria en un futuro próximo^{77,95}.

Por otro lado, se ha demostrado que la metilación de las regiones promotoras de genes supresores tumorales puede ocurrir precozmente en la tumorigénesis⁷⁰. De este modo, la presencia de islas CpG metiladas no es necesariamente indicativa de tumor invasivo ya que pueden estar presentes en lesiones premalignas o precursoras de tumor⁹⁶. Estos hallazgos tienen un importante papel en la detección precoz del cáncer, especialmente en personas con riesgo genético hereditario o expuestas a carcinógenos ambientales.

2.8. Pronóstico

Una de las características que se buscan en los biomarcadores moleculares es que tengan la capacidad de diferenciar la evolución de lesiones morfológica e histológicamente idénticas y que permitan distinguir los tumores que tendrán un comportamiento más agresivo de los que lo presentarán más indolente. Un aumento del número de eventos individuales de metilación en un único loci de un gen es indicativo de resultados diferenciales entre pacientes con cáncer de vejiga. Los métodos que permiten el análisis de la hipermetilación de genes de manera independiente está

mostrando capacidad para diferenciar el pronóstico entre pacientes con cáncer de vejiga. Entre los genes más frecuentemente estudiados, se ha observado que la hipermetilación del CDKN2A⁹⁷⁻⁹⁹, DPAK, RASSF1A, CDH1^{7,97,98,100}, SFRPs, RUNX3 o la miopodina¹⁰¹, entre otros, se relaciona con un peor pronóstico según los resultados obtenidos sobre muestras de tejido tumoral [Tabla 7]. Además, algunos de ellos se ha visto que pueden tener un valor predictivo de recidiva, progresión y muerte cáncer específica en tumores de alto riesgo T1AG, como es el caso de la miopodina de manera individual¹⁰¹ o como combinación de varios genes⁸⁶.

En definitiva, el aumento progresivo en el número de estudios de metilación del ADN está siendo orientado a identificar no sólo candidatos individuales sino también perfiles epigenéticos en el cáncer de vejiga. Con las técnicas epigenómicas se están descubriendo grupos de genes con utilidad pronóstica. Es importante destacar que los estudios de metilación también pueden analizar el ADN extraído de tejido incluido en parafina y no sólo en material congelado⁸⁶. Así, marcadores individuales con gran potencial de aplicabilidad clínica en relación a la recidiva, progresión o supervivencia, podrían no sólo ser identificados sino desarrollados a partir de este tipo de material clínico^{95,102}. No obstante, son necesarios más estudios, con un mayor número de muestras, multicéntricos y prospectivos, para validar la gran cantidad de genes candidatos^{95,96}.

2.9. Farmacoepigenética y Tratamiento con Demetiladores

A pesar de la falta de terapias dirigidas en el cáncer de vejiga, los patrones de hipermetilación de genes concretos han mostrado ser capaces de predecir la respuesta a tratamientos específicos, lo que se conoce como farmacoepigenética. Es el caso de la miopodina que predice la respuesta de tumores T1G3 a la BCG¹⁰¹. Por otra parte, el perfil de metilación de paneles de varios genes supresores de tumor también ha sido útil en la predicción de respuesta a la terapia intravesical con inmunoterapia en TNMI en tejido en parafina⁸⁶.

Se espera que en un futuro no muy lejano se desarrollen candidatos epigenéticos que puedan ser aplicados como predictores farmacoepigenéticos de respuesta a cisplatino en tumores músculo invasivos⁷⁷.

Por otro lado, la metilación aberrante de las islas CpG es un proceso reversible, que convierte a este evento en una posible diana terapéutica con demetiladores de ADN para así reactivar los genes silenciados¹⁰³.

La 5-Azacitidine (5-Aza-CR) y su análogo deoxy-5'-aza-2'-deoxicitidine (5-Aza-CdR) son dos de los inhibidores de la metilación del ADN más caracterizados. Ambos llevan a cabo su función formando uniones covalentes con los DNMTs, lo cual provoca su inactivación funcional¹⁰⁴. La administración de estos agentes de demetilación a bajas dosis ha mostrado una actividad antitumoral por lo que la US Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado su uso como tratamiento de elección en enfermedades preleucémicas y síndromes mielodisplásicos¹⁰⁵ y también en la anemia de células falciformes¹⁰⁶. No obstante, son sustancias tóxicas y químicamente inestables, lo cual dificulta su uso clínico, haciendo necesaria la búsqueda de inhibidores más efectivos, estables y que sean menos nocivos¹⁰⁴. También se ha estudiado el uso de análogos de la citidina, como la zebularina, siendo la primera droga demetilante que permite revertir la silenciamiento epigenético de los genes afectados mediante una administración oral^{103,104}.

A pesar de todo ello, uno de los principales problemas de las terapias epigenéticas de las que se dispone en la actualidad es una lenta remetilación y la posible reaparición de silenciamiento tras el tratamiento¹⁰⁷, por lo que no son utilizados en la práctica clínica hoy en día.

2.10. Relevancia de Tecnologías de Alto Rendimiento como Aceleradoras del Descubrimiento de Eventos Epigenéticos en el Cáncer de Vejiga

El estudio de la metilación del promotor de los genes en el cáncer de vejiga ha sufrido un rápido avance debido a dos valiosos descubrimientos. Por un lado la demostración de que un importante gen supresor tumoral, el CDKN2A, que codifica el INK4A (también denominado p16) y el ARF (conocido como p14), estaba silenciado en muchos tipos de cáncer a través de la metilación aberrante de su promotor, incluido el de vejiga, y por otro, el desarrollo de ensayos de PCR específicos de metilación (MS-PCR) que permiten una rápida detección de la metilación de los genes a través de una amplificación selectiva de alelos metilados en un promotor específico^{77,108}.

La detección en el laboratorio del estado de metilación epigenética presenta una serie de ventajas entre las que destaca que es un evento que se produce a nivel del ADN, evitando la complejidad del manejo del ARN, y que se produce en zonas concretas a diferencia de las mutaciones o deleciones que pueden tener lugar a cualquier nivel⁷. Además, presenta una alta especificidad incluso ante la presencia de un exceso de ADN no metilado, por lo que se requiere un escaso número de células tumorales para su detección^{77,109}. Los estudios iniciales para la evaluación de genes candidatos hipermetilados en el cáncer de vejiga utilizaban una PCR específica de metilación cualitativa o cuantitativa (MSP o MS-PCR) después de un tratamiento con bisulfito del ADN genómico^{90,109-111}. Desde el punto de vista metodológico, el análisis inicial de genes candidatos individuales en la caracterización del metiloma del cáncer de vejiga está siendo complementado con pruebas multiparamétricas. Así, la llegada de tecnologías de alto rendimiento ha acelerado y mejorado la calidad de los estudios, usando cantidades mínimas de ADN y permitiendo una mejor descripción de las vías de la tumorigénesis^{60,69}. Pueden así analizarse perfiles epigenéticos característicos de los distintos tipos de tumor e identificar las vías moleculares que puedan ser la base de un comportamiento particular, biológico o clínico^{60,69}.

Son varios los grupos que han estudiado alteraciones epigenéticas en muestras relacionadas con cáncer de vejiga^{95,96}. Además, se han comenzado a establecer perfiles de metilación diferentes entre pacientes sanos y enfermos, mostrando una prometedora capacidad de diferenciar subtipos de tumor y ayudar en la comprensión de los mecanismos de la carcinogénesis y la progresión^{95,96,102}. Por otra parte, se requieren análisis de validación usando estrategias *in vitro* con exposición de las células a nuevas drogas demetiladoras y usar series independientes de muestras⁷⁷. Varios estudios epidemiológicos han asociado los perfiles de metilación a distintas variables etiológicas y han planteado el potencial papel de la metilación como factor de riesgo. Debido a la gran cantidad de información nueva que se está obteniendo, se están desarrollando tecnologías multiparamétricas para poder evaluar paneles de genes en un elevado número de muestras y evaluarlas con relación a determinados objetivos clínicos. Los resultados de los perfiles de metilación obtenidos por este tipo de técnicas son prometedores tras observarse asociaciones con variables clínico-patológicas del tumor^{95,96,102}.

En este contexto, la técnica de amplificación de sondas ligando-dependiente múltiple específica de metilación (MS-MLPA) se ha aplicado recientemente a tejidos de cáncer de vejiga y a muestras de orina, mostrándose como un método sencillo y fiable para la detección de cambios en el estado de metilación de entre 20 y 40 genes diferentes en un solo procedimiento⁸⁶⁻⁸⁸. Los estudios iniciales que han utilizado esta técnica en cáncer de vejiga analizaron varios paneles de genes supresores tumorales, mostrando su utilidad para la estratificación tumoral^{8,86-88}, el diagnóstico^{8,87,88} e incluso para predecir la respuesta al tratamiento con BCG⁸⁶. No obstante, se necesitan más estudios con un mayor número de pacientes y una mayor variedad de subtipos de tumores para trasladar la identificación de estos candidatos moleculares epigenéticos a su empleo como biomarcadores diagnósticos o predictivos de respuesta terapéutica. El principal desafío es optimizar la detección de estos biomarcadores en muestras obtenidas de una manera no invasiva y con una cantidad de material genético limitado. También se requieren estudios multiparamétricos y multiinstitucionales para la selección y la validación de las combinaciones de genes más adecuadas. Todas estas estrategias mejoran finalmente el manejo clínico global de los pacientes con cáncer de vejiga desde la detección precoz o la estratificación, hasta la predicción del pronóstico clínico⁷⁷.

2.11. Consideraciones finales

Por todo lo comentado, la hipermetilación es una alteración frecuente que provoca el silenciamiento de genes claves relacionados con el cáncer que actualmente está siendo descrito en tumores de vejiga. Estos cambios de metilación tienen un importante papel reconocido en la tumorigénesis y en la progresión neoplásica, debido a que afecta a importantes vías moleculares que participan en estos procesos. La detección de estas alteraciones puede orientar en la detección y seguimiento de la evolución clínica de los pacientes con esta neoplasia. Los perfiles de metilación detectados en muestras de tejido pueden permitir no sólo la estratificación del tumor, sino también predecir el pronóstico de la evolución clínica empleando la recidiva, progresión, supervivencia cáncer específica y global como objetivos finales. El contacto directo de la orina con los tumores de vejiga permite la evaluación no invasiva de la metilación, pudiendo ayudar en el diagnóstico precoz de la enfermedad, el seguimiento y la evaluación del riesgo de desarrollar la enfermedad en un futuro cercano. Sin embargo, la caracterización

epigenómica del cáncer de vejiga no ha hecho más que empezar. Los estudios sobre los perfiles de metilación permitirán un mejor conocimiento de su biología e identificarán los perfiles que guarden mejor correlación con el comportamiento clínico.

3. GENES SELECCIONADOS

3.1. TP73 (p73): *tumor protein p73*

Función. Este gen codifica un miembro de la familia p53, siendo un factor de transcripción involucrado en el desarrollo celular y en la respuesta al estrés. Al igual que a p53, se le atribuye una actividad antiproliferativa y pro-apoptótica^{112,113}.

Metilación en cáncer de vejiga. Se trata de un gen escasamente estudiado. Su frecuencia de metilación en muestras de tejido tumoral ha sido escasa, oscilando entre un 0¹¹⁴ y un 6.45 %⁸⁷ en series globales. No obstante, al analizar distintos subgrupos de TNMI, se ve que varía desde un 11.1% en TaBG⁸⁷ a un 37.4% en T1G3⁸⁶. Además se ha relacionado con una buena respuesta de los tumores uroteliales no músculo-invasivos de alto grado a la terapia endovesical con BCG, ya que se ha relacionado con una progresión más tardía respecto a aquellos pacientes que no lo presentan metilado⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se ha encontrado metilado en linfomas asociándose a una menor supervivencia¹¹⁵.

3.2. MSH6 (GTBP, HSAP, HNPCC5): *mutS homolog 6*

Función. La proteína que codifica este gen forma parte de un complejo de reconocimiento necesario para el intercambio de ADP y ATP, con un papel en la reparación del ADN⁷⁷.

Metilación en cáncer de vejiga. Se ha observado que hasta un 30% de las muestras de tejido de tumores de vejiga lo pueden presentar metilado⁸⁷. Dentro de los TNMI existen estudios que han publicado una frecuencia de metilación de aproximadamente un 30% para TaBG⁸⁷, muy baja para los T1BG^{87,116}, pero que puede

variar de entre un 25⁸⁷ y un 80% en T1G3. Por otra parte, se ha asociado a tumores grandes⁸⁶ y con un papel predictivo de respuesta a BCG, ya que su metilación puede estar relacionada con un mayor tiempo hasta la progresión en los T1G3 tratados con inmunoterapia⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se ha observado en neoplasias de mama, no observándose esta alteración en muestras de tejido sano¹¹⁷.

3.3. **VHL** (RCA1, VHL1, pVHL y HRCA1): *gen supresor de tumores von Hippel-Lindau*

Función. Codifica una proteína implicada en la degradación del factor inducible por hipoxia (HIF), que es un factor de transcripción con un importante papel en la regulación de la expresión del gen mediada por oxígeno. Forma un complejo trimolecular estable con dos subunidades de transcripción (Elongin SIII) necesario para inhibir el proceso de replicación de la RNA polimerasa II.

Metilación en cáncer de vejiga. Se ha observado una frecuencia de metilación en muestras de tumor que oscila entre el 4¹¹⁶ y el 13%⁸⁷. Dentro de los TNMI, se ha observado más frecuentemente metilado entre los tumores TaG1 (hasta un 44.4%)⁸⁷ que en T1G3 (0-22.2%)^{86,87,116}. En los estudios realizados en tejido sano no se ha observado esta alteración epigenética¹¹⁶. Se ha descrito asociación con bajo grado al estudiar muestras de tumores⁸⁷, además de con un tamaño mayor en el subgrupo de T1AG⁸⁶. Además, se ha observado una mayor metilación en muestras de tejido de tumores recidivantes que en primarios¹¹⁶.

Metilación en otros tumores. Es un gen que se encuentra íntimamente relacionado con procesos neoplásicos de riñón^{7,94} observándose metilado en líneas celulares tumorales renales¹¹⁸.

3.4. **RARB** (HAP, RRB2, NR1B2 y MGC97363): *receptor del ácido retinoico beta*

Función. Este gen codifica al receptor *beta* del ácido retinoico, miembro de la superfamilia de reguladores nucleares de transcripción de receptores de hormonas

tiroideas y esteroideas. Este receptor se localiza en el citoplasma y en los compartimentos subnucleares. Se une el ácido retinoico, forma biológicamente activa de la vitamina A, que regula la señalización celular en la embriogénesis, el crecimiento y la diferenciación celular. Por tanto, presenta una actividad supresora de tumor debido a su efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis, estando también implicado en la diferenciación celular^{77,90,91}.

Metilación en cáncer de vejiga. Está frecuentemente metilado en tumores del tracto urinario superior⁹⁷. En series globales de tejido, se han visto frecuencias de metilación distintas, desde un 2.1⁷ a un 93%⁹, mientras que dentro del subgrupo de TNMI las variaciones son menores, oscilando entre el 20-30% en tumores Ta^{10,87} y el 30-55% en T1^{87,92}. También se han realizado análisis en muestras de tejido sano, en general en grupos con un limitado número de casos, presentando una metilación del 0^{7,98}-50%¹⁰. Cuando se estudia en orina ha demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico^{9,70}. Se ha asociado a tumores de alto grado^{10,92}, de estadios más altos^{12,92,97} y, dentro de los tumores de alto grado, con un tamaño mayor⁸⁶. En cuanto a la relación con factores pronósticos, se ha descrito un menor riesgo de progresión⁹⁷ y una mayor supervivencia en tumores T1⁹⁷. Cabe destacar que la hipermetilación de este gen se ha asociado a una mayor incidencia de tumores del tracto urinario superior sincrónicos, una mayor afectación ganglionar⁷⁰ y, cuando se observa en muestras de *Cis*, a una mayor progresión y muerte⁹⁸. Por otra parte, se han observado metilaciones asociadas del RAB23 con hipermetilación del p16, DAPK y RASSF1A¹⁰.

Metilación en otros tumores. Ha sido identificada en carcinomas hepatocelulares en relación a hepatitis B, cáncer de mama⁹⁰, de próstata¹¹⁹ y en tejido tumoral pulmonar⁹⁰. También se ha observado en tejido adyacente aparentemente sano⁹⁰, por lo que se considera que puede relacionarse con cambios premalignos. También se ha asociado a otras neoplasias como la de cérvix¹⁰⁰.

3.5. **ESR1** (ER, ESR, Era, ESRA, NR3A1 y KFZp686N23123)

Función. Este gen codifica el receptor de estrógeno tipo 1, el cual actúa como factor de transcripción, y está implicado en la diferenciación celular⁷⁷. Está compuesto

de varios dominios importantes para la unión hormonal, la unión al ADN y la activación de la transcripción y se localiza en el núcleo.

Metilación en cáncer de vejiga. Existen escasos datos sobre su metilación en el tumor vesical, con una frecuencia de metilación de un 16% en series globales⁸⁷, similar a la obtenida en muestras de tumores Ta (10%)⁸⁷ y T1 (11%)⁸⁷. Por otra parte, se ha observado una posible asociación con un mayor tiempo libre hasta la progresión en tumores T1G3 tratados con BCG, por lo que podría tener un papel en la predicción de respuesta a tratamiento⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se ha descrito en neoplasias de origen ginecológico, habiéndose encontrado asociación a mayor progresión en el cáncer de mama masculino¹¹⁷ y con un mayor crecimiento en el fibroadenoma gigante¹²⁰.

3.6. CDKN2A (ARF, MLM, P14, P16, P19, CMM2, INK4, MTS1, TP16, CDK4I, CDKN2, INK4A, MTS-1, P14ARF, P19ARF, P16INK4, P16INK4A y P16-INK4A): *inhibidor 2A ciclin-kinasa dependiente*

Función. Codifica el INK4A (también denominado p16) y el ARF (conocido como p14). Se trata de un gen que inhibe las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 e interactúa con la ciclina D1, estimulando la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S^{77,90,121}. Por tanto, es considerado un gen supresor de tumores cuya inactivación tiene un importante papel en la carcinogénesis⁹⁰.

Metilación en cáncer de vejiga. Su frecuencia de metilación en series que incluyen tumores músculo-invasivos es variable, desde un 0⁸⁷ a un 94%¹²². En líneas generales, se ha asociado a tumores con un perfil de agresividad mayor (de estadio más alto⁸⁵, más grandes⁸⁶ y con mayor tendencia a recidivar⁸⁵ y progresar^{97,98}). En orina de pacientes con tumor de vejiga, ha demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico⁷⁰.

Metilación en otros tumores. Se ha observado metilado en gran cantidad de tumores como el de mama, piel, pulmón o del tracto gastrointestinal, asociándose en general a una supervivencia menor^{85,100,123}.

3.7. **PAX5A** (BSAP): *paired box 5*

Función. La familia de genes PAX se compone de un conjunto de factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo celular temprano (embriogénesis) por lo que la alteración en su expresión se cree que contribuye a la transformación neoplásica. En concreto, el PAX5 está implicado en el control del ciclo celular, modulando la apoptosis a través de la vía p53^{8,77,86,87,124}.

Metilación en cáncer de vejiga. El estudio de su posible implicación en la carcinogénesis de vejiga es muy limitado. Se ha observado una frecuencia global de metilación de casi un 13%⁸⁷, siendo muy baja en tumores no músculo invasivos de bajo grado⁸⁷. No se han obtenido asociaciones con ningún factor clínico-patológico del tumor ni con la evolución de la enfermedad^{86,87}.

Metilación en otros tumores. Se ha observado hipermetilado en muestras de tumor de mama, siendo infrecuente este evento en tejido sano¹¹⁷ y también se ha relacionado con la hepatocarcinogénesis¹²⁴.

3.8. **PTEN** (BZS, DEC, GLM2, MHAM, TEP1 ,MMAC1, PTEN1, 10q23del y MGC11227): *phosphatase and tensin homolog*

Función. La proteína que codifica es una fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa. A diferencia de la mayoría de las fosfatasas de la proteína tirosina, ésta desfosforila, sobre todo, sustratos fosfoinosítidos, regulando negativamente los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, por lo que funciona como un gen supresor de tumores a través de la regulación negativa de la vía de señalización AKT/PI3K/mTOR¹²⁵.

Metilación en cáncer de vejiga. Se ha discutido su papel en el tumor vesical, al encontrarse frecuencias de metilación muy bajas que no superan el 7% en tumores no músculo-invasivos¹²⁶. Sin embargo, series recientes han encontrado una asociación con tumores de alto grado en muestras de orina⁸⁷ y con un tamaño más grande en muestras de tejido dentro del subgrupo de T1AG⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se trata de un gen que se ha observado metilado en algunos tumores como el glioma infantil (50% de los tumores grado I y prácticamente todos los grado II)¹²⁷.

3.9. **MGMT**: *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*

Función. Es un gen relacionado con TP53 en su papel en la reparación del ADN, habiéndose observado que protege a las células del efecto carcinogénico de múltiples sustancias, como los agentes alquilantes⁷⁷.

Metilación en cáncer de vejiga. Distintos autores han descrito que este evento epigenético es relativamente infrecuente en el tejido tumoral^{10,12,87,90,118}. Sin embargo, en un análisis en muestras de orina de pacientes se ha observado hipermetilado en un 50% de los casos⁹. En general, no se han encontrado asociaciones con características clínico-patológicas^{7,10,12,97}, aunque existen estudios que relacionan su metilación con pacientes jóvenes¹²⁸ y con el grado⁸⁷ en muestras de tumor y con el estadio^{9,87} en orina. No se ha asociado con recidiva, progresión ni supervivencia de la enfermedad^{9,10,12,116}.

Metilación en otros tumores. Se ha observado que su promotor está frecuentemente metilado en múltiples tumores primarios^{77,99,118} como el linfoma, cáncer de colon, pulmón, mama, cabeza y cuello y cerebrales^{116,118,120}. Tumores que presentan una inactivación transcripcional del gen habitualmente presentan también mutaciones de *k-ras*, por lo que se piensa que su hipermetilación puede favorecerlas^{99,118}.

3.10. **PAX6** (AN, AN2, MGDA, WAGR, D11S812E y MGC17209): *paired box 6*

Función. Se considera un gen implicado en el control del ciclo celular y se ha visto implicado en diversas funciones como la diferenciación estromal, la proliferación celular y la apoptosis^{77,86,87,129,130,131}. Se expresa en el sistema nervioso y ocular en desarrollo y es necesaria para la correcta función endocrina del páncreas¹²⁹.

Metilación en cáncer de vejiga. Ha sido identificada en tumores y lesiones premalignas^{129,131}. Se ha descrito una frecuencia de metilación global entre un 0⁸⁷ y un 23%¹²⁹, aunque en una serie de 91 T1G3 se elevó a un 67%⁸⁶. Se ha asociado a un menor tiempo libre de enfermedad en TNMI de alto grado⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Al igual que el PAX5, se ha observado metilado en muestras de tumor de mama, pero es infrecuente en tejido sano¹¹⁷.

3.11. WT1 (GUD, AWT1, WAGR, WT33, NPHS4, WIT-2 y EWS-WT1): *tumor de Wilms 1*

Función. Este gen codifica un factor de transcripción con un papel esencial en el desarrollo normal del sistema urogenital. Se han descrito múltiples variantes y se considera que presenta una función miscelánea.

Metilación en cáncer de vejiga. Se trata de un gen escasamente estudiado en esta enfermedad, cuya frecuencia de metilación oscila entre un 38.7% en series con tumores de todos los estadios y grados⁸⁷ y un 75% en T1G3⁸⁶, siendo en torno al 33% en TaBG⁸⁷ y al 60% en T1BG⁸⁷. Se ha asociado al estadio T1⁸⁷ y en los tumores de alto grado a multifocalidad⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se ha estudiado su implicación en la carcinogénesis de diversos tumores, como el cáncer ductal de mama¹¹⁷ o el fibroadenoma gigante¹²⁰, asociándose en este último a un mayor crecimiento del tumor. También se ha observado como un posible factor pronóstico en otros tumores como el adenocarcinoma de ovario de célula pequeña¹³².

3.12. CD44 (IN, LHR, MC56, MDU2, MDU3, MIC4, Pgp1, CDW44, CSPG8, HCELL, HUTCH-I, ECMR-III y MGC10468): *CD44 molecule (Indian blood group)*

Función. La proteína codificada por este gen es una glicoproteína de superficie celular implicada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración⁷⁷. Igualmente se trata de un receptor para el ácido hialurónico y también puede interactuar con otros ligandos, como la osteopontina, colágeno y metaloproteinasas de matriz. Esta proteína participa en una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo la activación de linfocitos, hematopoyesis y la metástasis tumoral.

Metilación en cáncer de vejiga. Son limitadas las publicaciones acerca de su posible implicación en la carcinogénesis vesical, con una escasa frecuencia en las series

globales (<10%)⁸⁷, aunque dentro de los TNMI es mayor en los T1 (22%) que en los Ta (0%)⁸⁷. No se han obtenido asociaciones con ningún factor clínico-patológico del tumor ni con la evolución del mismo^{86,87}.

Metilación en otros tumores. Junto con otros genes se ha observado alterado en el fibroadenoma gigante de mama, relacionándose con un mayor crecimiento del tumor¹²⁰.

3.13. **GSTP1** (PI, DFN7, GST3, GSTP y FAEES3): *glutathione S-transferase pi 1*

Función. *Glutathione S transferasa* constituye una familia de enzimas que juegan un papel importante en la desintoxicación por catalización de muchos compuestos hidrofóbicos y electrofílicos^{114,118}. El GSTP1 está implicado en la reparación del ADN^{77,122}.

Metilación en cáncer de vejiga. Se encuentra frecuentemente metilado en cáncer de vejiga^{9,12,77,86,87,90,97,116,122,129}, frente a frecuencias bajas (0-12%) en muestras de tejido normal^{98,116} o en orina de personas sanas^{9,89}. No se han observado asociaciones con factores clínico-patológicos en estudios realizados en muestras de tumor^{12,98,129}, ni tampoco se ha encontrado relación con ningún parámetro de peor pronóstico^{12,116}.

Metilación en otros tumores. Su metilación es característica de tumores relacionados con esteroides como son los de mama, hígado y próstata^{90,117,118,133,134} y también se ha observado en colon y riñón^{7,90,116,118}.

3.14. **ATM** (AT1, ATA, ATC, ATD, ATE, ATDC, TEL1, TELO1, MGC74674 y DKFZp781A0353): *ataxia telangiectasia mutated*

Función. Actúa como regulador de una amplia variedad de proteínas, incluyendo las proteínas supresoras de tumor p53 y BRCA1, una quinasa de control CHK2, proteínas de control Rad17 y Rad9 y proteínas de reparación del ADN. Controla distintas vías de señalización del ciclo celular, necesarias para la respuesta celular al daño del ADN y para la estabilización del genoma^{77,135}.

Metilación en cáncer de vejiga. El estudio de su posible papel en el desarrollo

del cáncer vesical es muy limitado⁸⁷. En T1G3 se ha observado una frecuencia de metilación más elevada (40%) que en el resto de subgrupos de TNMI^{86,87}, habiéndose encontrado una asociación en ese tipo de tumores con multifocalidad⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Son escasos los estudios sobre la implicación de su metilación en procesos tumorales, pero se ha observado que podría utilizarse como marcador de riesgo de cáncer de mama en muestras de sangre periférica¹³⁶ y que se asocia a un peor pronóstico y menor supervivencia en el carcinoma cervical invasivo¹³⁷.

3.15. IGSF4 (CADM1, BL2, ST17, IGSF4, NECL2, RA175, TSLC1, IGSF4A, Necl-2, SYNCAM, sgIGSF, sTSLC-1, synCAM1, MGC51880, MGC149785 y DKFZp686F1789)

Función. Presenta un papel en la adhesión celular, que se ha podido demostrar en las células de Sertoli y en los mastocitos, por lo que se ha caracterizado como un gen supresor de tumores.

Metilación en cáncer de vejiga. Son escasas las publicaciones sobre su posible implicación en la carcinogénesis vesical, con una frecuencia de metilación en el grupo global de tumores y en los distintos subgrupos de los no músculo-invasivos que oscila entre un 25-40% en todos ellos^{86,87}. No se han obtenido asociaciones con ningún factor clínico-patológico ni con la evolución^{86,87}.

Metilación en otros tumores. Su silenciación por pérdida alélica o por metilación del promotor se ha relacionado con el cáncer de pulmón no célula-pequeña.

3.16. CHFR (RNF116, RNF196, FLJ10796 y FLJ33629: *checkpoint with forkhead and ring finger domains or E3 ubiquitin protein ligase*)

Función. Se trata de un gen que, en respuesta al estrés, produce un retraso de la entrada de las células en metafase, inhibiendo la separación del centrosoma. Tiene múltiples funciones de control del ciclo celular, aunque no parece relacionado con la vía p53^{77,138}.

Metilación en cáncer de vejiga. Este gen ha sido escasamente estudiado,

habiéndose descrito frecuencia de metilación baja⁸⁷. No se han encontrado asociaciones con factores clínico-patológico del tumor ni con la evolución del mismo^{86,87}.

Metilación en otros tumores. Se ha descrito metilado en varios tumores como el hepatocarcinoma, asociándose con una mayor progresión¹³⁰, el cáncer de colon¹³⁹ y el de pulmón no célula pequeña¹⁴⁰, relacionándose en ambos con recidiva y supervivencia.

3.17. BRCA2 (FAD, FACD, FAD1, GLM3, BRCC2, FANCB, FANCD, PNCA2, FANCD1 y BROVCA2): *breast cancer 2, early onset*

Función. Junto con el BRCA1 está implicado en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y en la reparación de la doble cadena del ADN⁷⁷. Se considera un gen supresor de tumores mediante mecanismos de reparación del ADN.

Metilación en cáncer de vejiga. Los estudios de BRCA2 en cáncer vesical son limitados, habiéndose descrito una baja frecuencia de metilación^{86,87}, siendo ligeramente superior en el subgrupo de T1G3 (18%). Dentro de estos, se ha asociado a tumores de mayor tamaño⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se ha observado metilado en cáncer de mama¹¹⁷.

3.18. RB1 (RB, pRb, OSRC, pp110 y p105-Rb): *gen del retinoblastoma*

Función. El gen supresor del retinoblastoma da lugar a una fosfoproteína nuclear (pRb) que actúa inhibiendo la progresión del ciclo celular a nivel G1-S y estabilizando la heterocromatina constitutiva para mantener la estructura cromosómica^{141,142}. Es un regulador crucial del ciclo celular cuya actividad está regulada por la vía CDKN2A/CCND1¹²¹.

Metilación en cáncer de vejiga. En general, no se ha observado metilación CpG o su frecuencia ha sido muy baja^{76,87,94}, aunque es más elevada en tumores invasivos de alto grado^{10,86}. Se ha observado asociación con el grado, el estadio T1 y el sexo masculino⁷⁶ y dentro de las neoplasias T1G3 se ha asociado a multifocalidad y a un mayor tiempo hasta la progresión⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Su alteración por metilación ha sido observada

también en el sarcoma osteogénico⁷⁷ y se ha presentado como un marcador de evolución para otros tumores como el glioma difuso de bajo grado¹⁴³.

3.19. **THBS1** (TSP, THBS, TSP1, TSP-1 y THBS-1): *thrombospondin 1*

Función. Codifica una subunidad de una proteína homotrimérica ligada a disulfuro que participa en múltiples procesos biológicos incluyendo angiogénesis, apoptosis y activación de la vía de señalización de TGF- β 1. Se trata de una glicoproteína de adhesión que media la unión célula-célula y la interacción célula-matriz y se puede enlazar al fibrinógeno, fibronectina, laminina, colágeno tipo V y alpha-V/beta-1 integrinas¹⁴⁴.

Metilación en cáncer de vejiga. La frecuencia de metilación en el grupo global de tumores vesicales oscila alrededor al 35%⁸⁷, siendo menor en tumores Ta (20%) que en T1 (44%) y T2 (41%)⁸⁷. Por otra parte, dentro de los T1G3 tratados con BCG, se ha asociado a un menor riesgo de progresión⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se ha observado metilado en tumores como el melanoma, en el que se ha confirmado el efecto de este evento sobre la expresión del gen o, lo que es lo mismo, su silenciamiento, determinando los niveles proteicos¹⁴⁵.

3.20. **PYCARD** (ASC, TMS, TMS1, CARD5, TMS-1 y MGC10332): *PYD and CARD domain containing*

Función. Este gen codifica una proteína adaptadora que se compone de dos dominios de interacción proteína-proteína: un dominio N-terminal pirina-PAAD-DAPIN (PYD) y un dominio C-terminal de reclutamiento de las caspasas (CARD). Los dominios de PYD y CARD son miembros de una superfamilia que media en las complejas vías de señalización en inflamación, a través de *NFk* β (Factor nuclear kappa β)^{146,147} y apoptosis a través de la activación de caspasa^{77,122}. En las células normales, esta proteína se localiza en el citoplasma, sin embargo, en las células en apoptosis, adopta una forma de agregados circulares cerca de la periferia del núcleo. Se cree un gen necesario para que p53 lleve a cabo su función¹⁴⁸.

Metilación en cáncer de vejiga. Se trata de un gen escasamente estudiado en

vejiga^{86,87}, con frecuencias de metilación en general bajas⁸⁷. No obstante, en T1G3 tratados con inmunoterapia adjuvante se ha asociado a tumores múltiples y a una tendencia a menor progresión del tumor⁸⁶.

Enfermedades relacionadas. Se ha estudiado la implicación de su metilación en la carcinogénesis de varios tumores como el de mama¹⁴⁹. Se ha observado también metilado en el neuroblastoma¹⁵⁰ y en el cáncer gástrico, en el que además se le ha relacionado un papel predictor de respuesta a quimioterapia¹⁵¹.

3.21. **CDH13** (CDHH y P105): *cadherina 13, H-cadherina (heart)*

Función. Este gen codifica un miembro de la superfamilia de las cadherinas. La proteína codificada se localiza en la superficie de la membrana celular y carece del característico dominio citoplásmico de otras cadherinas. Actúa como regulador negativo de crecimiento de los axones durante la diferenciación neuronal, protege a las células endoteliales vasculares de la apoptosis debida al estrés oxidativo y se asocia con resistencia a la aterosclerosis. Está implicada en la adhesión celular y en la inhibición del crecimiento celular por contacto, mecanismos por lo que actúa como gen supresor de tumores¹⁵².

Estudios de metilación en cáncer de vejiga. Se ha observado metilación de este gen en muestras de tumor^{86,87}, suero¹¹ y orina⁸⁹ asociándose, en general, a un grado mayor, a invasión del músculo detrusor, a tumores grandes, con afectación ganglionar y con un mayor riesgo de recidiva y muerte cáncer específica^{11,12}. En el subgrupo de tumores T1AG también se ha asociado con multifocalidad⁸⁶. Además, se ha visto que la determinación en suero podría representar un importante biomarcador de malignidad y un predictor independiente de respuesta a tratamiento¹¹. Por su parte, la detección en orina ha demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico^{70,89}. Se ha observado que la introducción de CDH13 en células tumorales puede disminuir el fenotipo invasor y la proliferación¹¹.

Metilación en otros tumores. Se ha descrito en múltiples neoplasias como las de pulmón y mama^{12,117}.

3.22. **TP53** (P53, LFS1, TRP53 y FLJ92943): *tumor protein p53*

Función. Este gen codifica la proteína p53, que responde al estrés y regula distintos genes que inducen la detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia y reparación del ADN regulando también el metabolismo celular¹⁵³.

Metilación en cáncer de vejiga. Se ha encontrado metilado entre un 12⁸⁷-25%¹²⁶ de las muestras de tumores en las series globales que incluyen tumores músculo invasivos, observándose una metilación mayor en Ta (20%) que en T1 (11%) y T2 (8%)⁸⁷. En lo que se refiere a asociaciones con factores clínico-patológicos únicamente se ha observado asociación con el tamaño en el subgrupo de tumores T1G3⁸⁶. Sin embargo, no se ha demostrado un claro papel de su silenciamiento en la evolución de estos tumores¹⁵⁴, aunque sí se ha observado una mayor frecuencia de mutaciones, principal alteración conocida de este gen, en áreas metiladas¹⁵⁵.

Metilación en otros tumores. Se trata del gen más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, sin embargo, raramente se encuentra metilado en los procesos neoplásicos⁹⁴.

3.23. **BRCA1** (IRIS, PSCP, BRCAI, BRCC1, PNCA4, RNF53, BROVCA1 y PPP1R53): *breast cancer 1, early oncot*

Función. Este gen codifica una fosfoproteína nuclear que desempeña un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la reparación del ADN⁷⁷ por lo que actúa como supresor tumoral. La proteína codificada se combina con otros supresores de tumores (sensores de daño en el ADN) y con transductores de señales para formar un gran complejo proteico conocido como el complejo BRCA1, asociado a la vigilancia del genoma. Esta proteína desempeña así un papel en la transcripción y reparación de las roturas en la doble cadena de ADN.

Metilación en cáncer de vejiga. Son varios los estudios sobre su metilación en esta enfermedad^{86,87,89,94}. Se trata de un gen que se ha encontrado frecuentemente metilado tanto en TNMI (70-90%)^{86,87}, como en músculo-invasivos⁸⁷. Por otro lado, se ha descrito también una alta especificidad en orina⁸⁷. Sin embargo, únicamente se ha asociado, en muestras de tejido, con el bajo grado⁸⁷.

Metilación en otros tumores. Se ha observado metilado en tumores de mama¹¹⁷. Además, se ha visto que implica una menor supervivencia en el cáncer de cérvix¹⁰⁰.

3.24. **STK1** (PJS, LKB1 y hLKB1): *serine/threonine kinase 11*

Función. Este gen codifica un miembro de la familia serina/treonina quinasa, implicada en la homeostasis celular, y regula la polaridad celular. Se considera que ejerce su papel como supresor tumoral mediante el control de mecanismos de invasión y metabolismo celular¹⁵⁶.

Metilación en cáncer de vejiga. Ha sido escasamente estudiada en vejiga, con frecuencias prácticamente nulas⁸⁷, excepto en una serie de T1G3 en la que estaba metilado en el 72.5% de los casos⁸⁶. No se ha observado asociación con variables clínico-patológicas ni con la evolución del tumor^{86,87}.

Metilación en otros tumores. Se ha relacionado con la carcinogénesis del tumor de pulmón. Además, su inactivación juega un importante papel en la transición de formas premalignas a neoplásicas debido a la interacción estroma/epitelio y al aumento de la invasividad¹⁵⁶.

3.25. **GATA5** (bB379O24.1): *GATA binding protein 5*

Función. Implicado en la diferenciación celular. La proteína codificada por este gen es un factor de transcripción que se une al factor nuclear-1 alfa (HNF-1 alfa) de los hepatocitos. Esta interacción es esencial para la activación del promotor de la hidrolasa intestinal de lactasa-florizina.

Metilación en cáncer de vejiga. Se trata de un gen escasamente estudiado en cáncer de vejiga. Su frecuencia de metilación en series que incluyen tumores músculo invasivos es de aproximadamente el 25%⁸⁷. Cuando se desglosan los distintos subgrupos se observa, aproximadamente, un 20% en Ta, un 33% en T1 y un 25% en T2⁸⁷. En T1G3 puede llegar, en algunas series, a un 72% y en ellos se ha asociado a multifocalidad, a un mayor tiempo libre de progresión y a una mayor supervivencia cáncer específica⁸⁶.

Metilación en otros tumores. Se ha observado metilado en neoplasias de mama¹¹⁷ y también en tumores de células claras renales, donde se ha observado que este evento se asocia a metástasis y a una menor supervivencia libre de progresión por lo que podría servir como biomarcador pronóstico¹⁵⁷.

3.4. Tabla Resumen de las Vías de Actuación de cada uno de los Genes

A continuación se presentan los genes asociados a su principal mecanismo de actuación [Tabla 8].

GEN	MECANISMOS DE ACCIÓN
TP73	Apoptosis
MSH6	Reparación del ADN
VHL	Ciclo celular
RARB	Diferenciación. Apoptosis
ESR1	Diferenciación celular
CDKN2A	Ciclo celular
PAX5A	Ciclo celular. Apoptosis
PTEN	Apoptosis
MGMT	Reparación del ADN
PAX6	Ciclo celular. Apoptosis
WT1	Ciclo celular
CD44	Invasión
GSTP1	Reparación del ADN
ATM	Reparación del ADN
IGSF4	Invasión
CHFR	Ciclo celular
BRCA2	Reparación del ADN
RB1	Ciclo celular
THBS1	Invasión. Apoptosis
PYCARD	Apoptosis
CDH13	Invasión
TP53	Ciclo celular. Apoptosis. Reparación del ADN.
BRCA1	Reparación del ADN
STK11	Invasión
GATA5	Diferenciación celular

Tabla 8. Mecanismo de acción de cada uno de los genes. Información tomada de la base de genes de pubmed¹⁵⁸ y de genecards¹⁵⁹

Hipótesis

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE
GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS
SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO
MÚSCULO INVASIVOS

Raquel Sacristán González

El estudio se plantea en base a resultados previos en los que se ha observado que un panel de genes supresores tumorales presenta un patrón de metilación diferente en el urotelio normal con respecto al carcinoma transicional de vejiga⁸⁷ y que aporta un valor pronóstico y predictivo de respuesta a BCG cuando se evalúa en pacientes T1 de alto grado⁸⁶.

Nuestra hipótesis ha consistido en asumir que si el estado de metilación de dicho panel puede ya discriminar iniciación y progresión tumoral, quizá podría diferenciar los tres principales subgrupos de enfermedad no músculo invasiva desde el punto de vista biológico y clínico (Ta de bajo grado, T1 de bajo grado y T1 de alto grado). La confirmación de esta hipótesis permitiría no sólo contribuir a la caracterización biológica de esta alteración epigenética en la enfermedad no músculo invasiva sino mejorar la estratificación de estos subgrupos desde el punto de vista histopatológico y clínico.

Objetivos

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE
GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS
SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO
MÚSCULO INVASIVOS

Raquel Sacristán González

El objetivo global de este estudio ha sido evaluar si el perfil de metilación de un panel de 25 genes supresores de tumor puede clasificar, desde un punto de vista biológico, los distintos subgrupos de tumores no músculos invasivos (Ta de bajo grado, T1 de bajo grado, T1 de alto grado). Para llegar a este objetivo principal se establecieron tres objetivos secundarios:

1. Examinar el estado de metilación de dichos genes en una serie de neoplasias primarias vesicales no músculo invasivas (Ta/T1)
2. Valorar la asociación de los perfiles de metilación con factores clínico-patológicos (estadio, grado, presencia de *Cis*, tamaño tumoral, multifocalidad, edad y sexo)
3. Evaluar si los perfiles de metilación de un panel de genes permiten predecir la evolución clínica de los pacientes con tumores no músculo invasivos, de manera conjunta y por subgrupos, en relación a recidiva, progresión y supervivencia cáncer específica.

Material y Métodos

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE
GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS
SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO
MÚSCULO INVASIVOS

Raquel Sacristán González

1. PACIENTES

En nuestro estudio se incluyeron inicialmente 345 pacientes con carcinoma primario de células transicionales de vejiga (CCT) no músculo-invasivo que habían sido tratados en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) de Oviedo y en el Servicio de Urología del Hospital Fundación de Jove de Gijón, entre los años 1989 y 2009.

1.1. Criterios de Selección de los Casos a Estudio

Se realizó una división en grupos según el estadio (Ta/T1) y el grado del tumor (BG/AG). De este modo, subdividimos nuestro estudio en tres grupos: Ta de bajo grado (TaBG), T1 de bajo grado (T1BG) y T1 de alto grado (T1AG).

Finalmente se seleccionaron 251 casos, excluyéndose aquellos que:

- No tenían historia clínica completa (n=45)
- No presentaban suficiente material del tumor primario en el bloque de parafina (n =49)
- Algunos pacientes se perdieron durante el estudio (n=5), pero finalmente se incluyeron en el análisis dado el largo periodo de seguimiento

1.2. Estudio Clínico de los Pacientes

Los datos fueron extraídos de la base de pacientes con tumor vesical de la consulta Uro-Oncológica de los Servicio de Urología del HUCA (n=299) y del Hospital Fundación de Jove (n=46). Se recogieron aquellos que habían sido intervenidos entre los años 1989 y 2009 dado que se buscaba tener una serie seleccionada, con subgrupos homogéneos, que presentasen una historia completa y que hubiesen finalizado el tratamiento adyuvante en caso de que lo hubiesen necesitado (T1BG y T1AG). Se

obtuvo el bloque de parafina con mayor representación de tumor, excluyéndose los que no presentaban muestra tumoral suficiente.

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes seleccionados para el estudio y se recogieron los datos según un protocolo establecido previamente. Sólo se incluyeron aquellos que tenían la siguiente información completa:

- Filiación del paciente
- Sexo
- Hospital de origen
- Número de historia
- Número de biopsia asignado en el servicio de Anatomía Patológica
- Fecha de nacimiento
- Hábito tabáquico
- Antecedentes personales de interés (diagnóstico de otros tumores, patología cardiopulmonar asociada, insuficiencia renal o hepática, enfermedades metabólicas)
- Fecha de diagnóstico
- Edad al diagnóstico
- Motivo de diagnóstico
- Presencia de citologías previas
- Biopsias Múltiples Normalizadas (BMNs) y número asignado en Anatomía Patológica
- Número de tumores
- Tamaño del tumor o de la masa tumoral en caso de multifocalidad
- Localización del tumor
- Aspecto del tumor (sólido, plano o papilar)
- Afectación del tracto urinario superior y lado afecto
- Grado de invasión local según la clasificación TNM de 2009 [\[Tabla 1\]](#)
- Grado de diferenciación tumoral. Se utilizó la clasificación de 2004 de la OMS. Debido a que existían muestras de tumor previas a esta fecha cuya división estaba basada en la clasificación de la OMS de 1973, se realizó una

reevaluación de todos los tumores G2, reclasificándolos como bajo o alto grado [Tabla 2]

- Presencia de *Cis* asociado
- Tratamiento del tumor primario
- Tratamiento adyuvante y dosis del mismo
- Tratamiento de mantenimiento
- Tiempo, en meses, hasta la 1ª recidiva
- Progresión a tumor músculo-invasor en primera recidiva
- Localización, tamaño y tratamiento de la 1ª recidiva
- Estadio y grado tumoral de la 1ª recidiva
- Tiempo, en meses, hasta 2ª recidiva
- Localización, tamaño y tratamiento de la 2ª recidiva
- Estadio y grado tumoral de la 2ª recidiva
- Existencia de más recidivas, cuántas y número total
- Tiempo, en meses, hasta última recidiva
- Progresión a tumor músculo-invasor a lo largo del seguimiento
- Tiempo, en meses, hasta la progresión desde el diagnóstico inicial
- Tratamiento de la progresión
- Estadio tumoral (T, N, M) de la progresión
- Estado actual y tiempo de seguimiento total desde el diagnóstico inicial
- Se realizaron actualizaciones de la base de datos durante el tiempo que duró el procesado y análisis de las muestras

1.3. Estudio Histológico

El grupo estudiado consistió en 251 muestras de tumores primarios recogidas de pacientes sometidos a cirugía endoscópica y que habían sido incluidas en parafina para su estudio histológico habitual. Fueron obtenidas de forma anónima y tratadas siguiendo las normas legales y éticas exigidas para muestras de origen humano.

La modalidad de resección se realizó en función del tamaño de la lesión de acuerdo con las líneas guía del cáncer vesical. Los tumores pequeños (menores de 1cm) se resecaron habitualmente en bloque, de modo que la pieza contenía el tumor completo

más una parte de la pared de la vejiga subyacente. Los tumores más grandes se resecaron en fracciones, por un lado la parte exofítica, por otra la pared de la vejiga subyacente a la lesión que contenía músculo detrusor y por último los bordes de la zona de resección, intentando evitar la cauterización para evitar la destrucción del tejido.

Se revisaron los informes anatómo-patológicos y las hojas de quirófano recogiendo de forma protocolizada los datos macro y microscópicos del tumor:

- *Datos macroscópicos:*
 - Número de tumores
 - Tamaño del tumor o de la masa tumoral (si se trata de un tumor multifocal)
 - Aspecto (papilar o sólido)
 - Localización (Trígono, cara posterior, cara lateral derecha, cara lateral izquierda, cúpula, cara anterior, cuello, uretra prostática, múltiples)
- *Datos microscópicos:*
 - Tipo histológico del tumor, diferenciando entre carcinoma urotelial y adenocarcinoma o carcinoma epidermoide (estos últimos casos fueron todos descartados inicialmente)
 - Grado de invasión local según la clasificación TNM de 2009³³ [Figura 13]
 - Grado de diferenciación tumoral: bajo grado y alto grado. Se utilizó la clasificación de 2004 de la OMS reevaluándose todos los tumores G2³⁶ [Figura 13]
 - En tumores de alto grado, presencia de adenopatías (N) en TC
 - Definición de grupos de riesgo. Para ello se siguió la clasificación de la IBCG (International Bladder Cancer Group), basada en la revisión de las guías de la Asociación Europea de Urología, la FICBT (First International Consultation on Bladder Tumours), la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) y la AUA (American Urological Association)¹⁶⁰, que son prácticamente superponibles a la clasificación utilizada actualmente, basada en las tablas de la EORTC⁶¹.

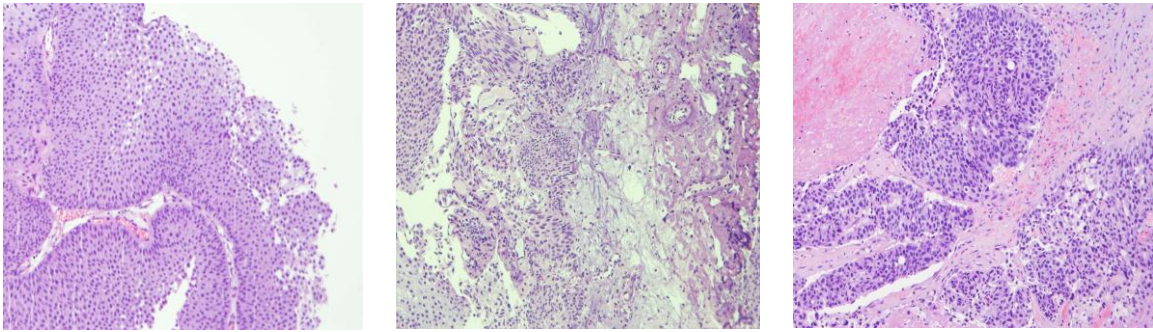


Figura 13. Imagen al microscopio de una muestra de tumor TaBG (izquierda), T1BG (centro) y T1AG (derecha)

Dado que se trata de un estudio retrospectivo con muestras recogidas entre 1989 y 2009, no se realizó re-RTU, recomendada en las guías actuales, ya que no era una práctica habitual en los años en los que se realizó la selección de pacientes. No obstante, como hemos citado previamente, uno de los criterios de selección de los casos objeto de estudio fue que se observara la presencia de músculo detrusor en los fragmentos de RTU.

La realización de BMNs, incluyendo la de la uretra prostática, se indicó de acuerdo a las líneas guía de cáncer no músculo-invasivo de la Asociación Europea de Urología, que han sido actualizadas sin cambios en los últimos años respecto a este punto⁶. Así, se obtuvieron cuando existieron dudas de la posible asociación de un *Cis*, bien por la existencia de imágenes sospechosas durante la cistoscopia o por la presencia de citologías positivas, así como ante tumores de aspecto no papilar y/o alteraciones en la uretra prostática sugestivas de neoplasia.

1.4. Tratamiento Endovesical

Los pacientes con tumores vesicales no músculo-infiltrantes (Ta/T1) presentan distintos riesgos de recidiva y progresión, por lo que según sus características clínicas e histológicas se indicó terapia endovesical en los casos en que era necesario:

- TaBG: Debido al bajo riesgo de recidiva y progresión, no se les administró ningún tratamiento adyuvante tras la cirugía endoscópica
- T1BG: Se trata de pacientes, en general, con riesgo de recidiva para los que no existe una pauta estandarizada de tratamiento adyuvante como sucede en los otros grupos. A todos ellos se les administraron 6 instilaciones

quincenales con MMC 40 mg durante 6 meses. En 50 casos se asoció además una pauta de inducción de una instilación semanal 6 semanas

- T1AG: Presentan riesgo elevado de progresión por lo que todos ellos recibieron instilaciones con BCG (Connaught 81mg) con una pauta de inducción de 6 instilaciones semanales y un mantenimiento corto de 6 instilaciones quincenales durante 6 meses. En 16 casos, bien por una mala tolerancia o por contraindicaciones relativas, se disminuyó la dosis de BCG (en 12 se administró Connaught 27 mg y en 4 Connaught 54mg)

1.5. Seguimiento

El seguimiento de los pacientes se realizó con cistoscopia y citología de orina, con una frecuencia y duración establecidas según el riesgo de recidiva y progresión⁶.

Se revisaron las historias clínicas, tanto los ingresos como los controles ambulatorios, recogiendo la evolución de los pacientes. Se valoró la presencia o no de recidivas, sus fechas, el número total y si eran o no a enfermedad músculo-invasiva, también los fallecimientos y sus causas (por tumor vesical o no), si los pacientes en el momento del éxitus presentaban recidiva o no (ninguno de los fallecidos por otra enfermedad presentaba tumor vesical en el momento de la defunción) y la situación clínica en la última revisión de los pacientes vivos (con o sin tumor).

2. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE SELECCIONADA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA SERIE TOTAL Y POR SUBGRUPOS

2.1. Estadio y Grado Tumoral

Tras evaluar todas las muestras anatómo-patológicas, 172 tumores fueron estadificados clínicamente tras la RTU completa como T1 (68.5%) y 79 como Ta (31.5%) [Figura 14]. En lo que respecta al grado, según la clasificación de la OMS de 1973, existían 149 casos de bajo grado-G1 (59.3%), 87 de alto grado-G3 (34.7%) y 15

de grado intermedio-G2 (6.0%) [Figura 15]. Dentro de estos últimos, adaptándonos a la clasificación de la OMS de 2004, 4 se consideraron de alto grado y 11 de bajo grado [Figura 16].

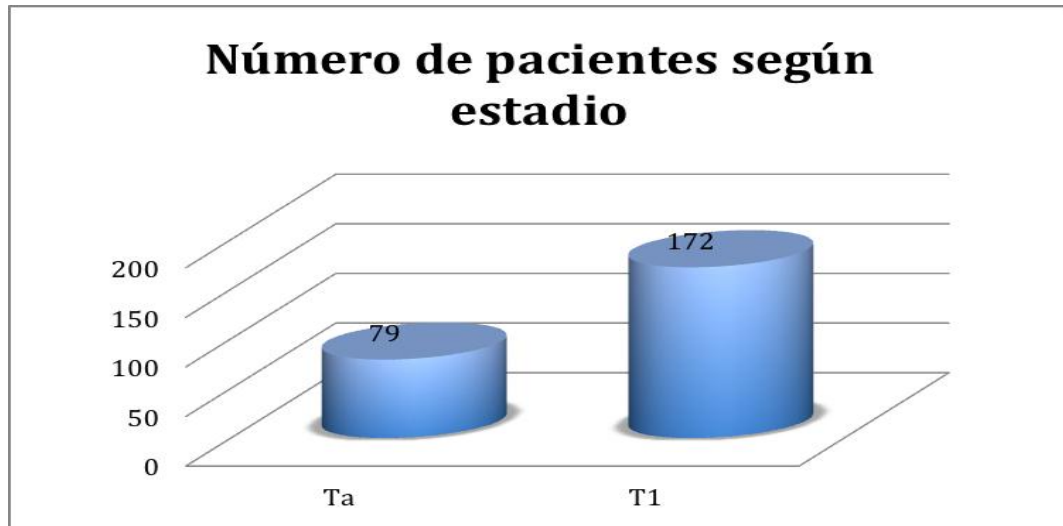


Figura 14. Distribución de pacientes por estadio

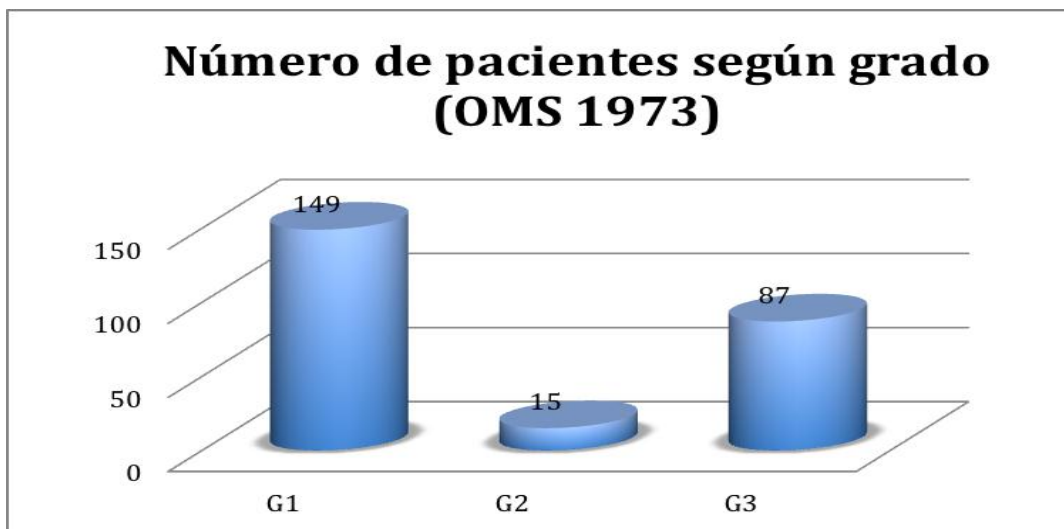


Figura 15. Distribución de pacientes por grado según la clasificación de la OMS de 1973

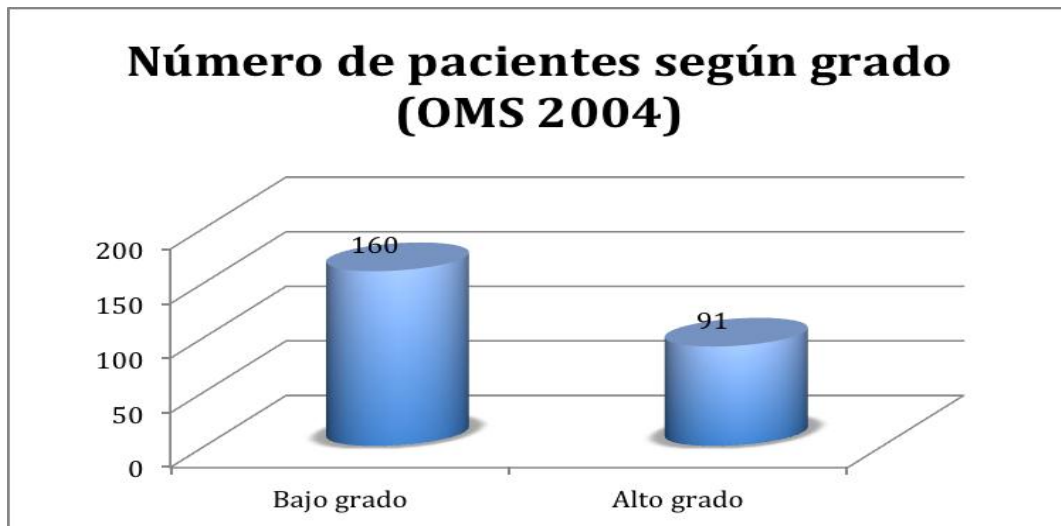


Figura 16. Distribución de pacientes por grado según la clasificación de la OMS de 2004

Reagrupando estadio y grado obtenemos los 3 grupos a estudio: 79 TaBG (31.5%), 81 T1BG (32.3%) y 91 T1AG (36.2%), que serán los grupos que finalmente se analizarán, junto con el global de la serie [Figura 17].

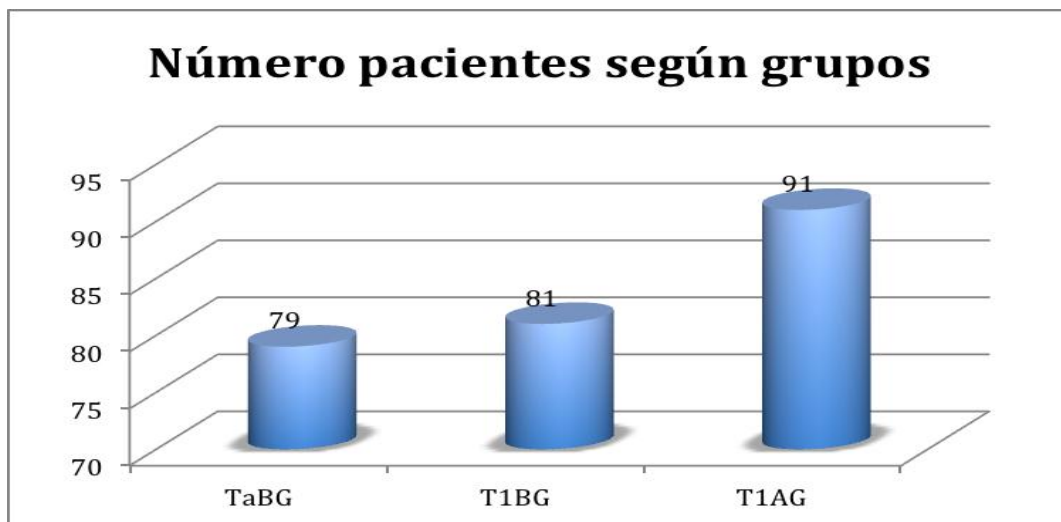


Figura 17. Distribución de pacientes por subgrupos

2.2. Características Demográficas

Analizando la serie global de 251 pacientes se observó que la distribución por sexos era de 213 varones (84.9%) y 38 mujeres (15.1%) (5.6:1). En el momento del diagnóstico la edad media fue de 68.2, con una desviación estándar de 11.0 años y con un rango comprendido entre 28 y 93 años.

En el análisis por grupos se observó la misma tendencia de tal manera que [Figuras 18 y 19]:

- En el grupo de TaBG la edad media fue de 68.7 ± 10.7 años (41.0-93.0), con 64 varones (81.0%) y 15 mujeres (19.0%) (4.3:1)
- En los T1BG, la edad media fue de 67.5 ± 11.4 años (35.0-93.0), con 66 hombres (81.5%) y 15 mujeres (18.5%) (4.4:1)
- En los T1AG la edad media fue de 68.2 ± 10.9 años (28.0-90.0), con 83 varones (91.2%) y 8 mujeres (8.8%) (10.4:1)

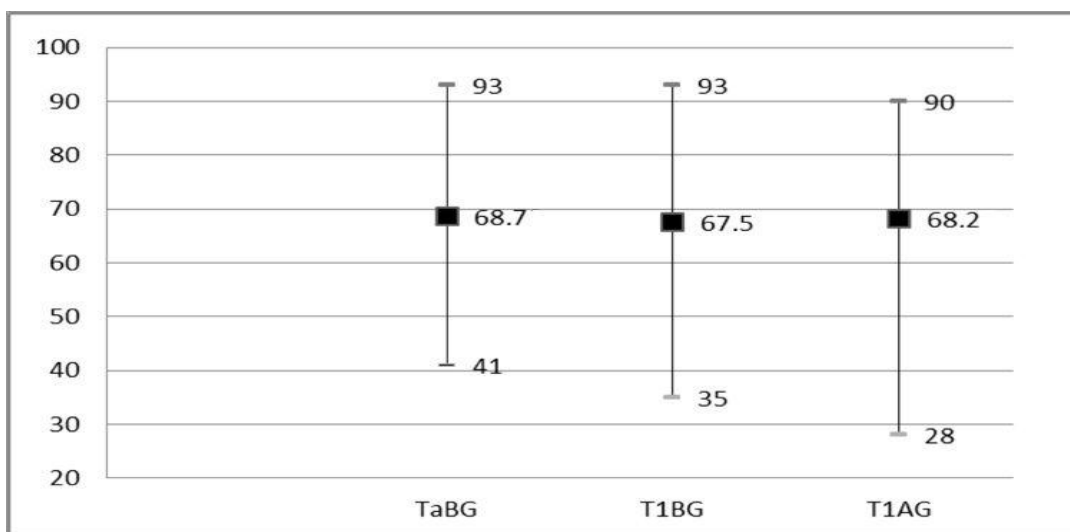


Figura 18. Edad media al diagnóstico según los grupos de riesgo

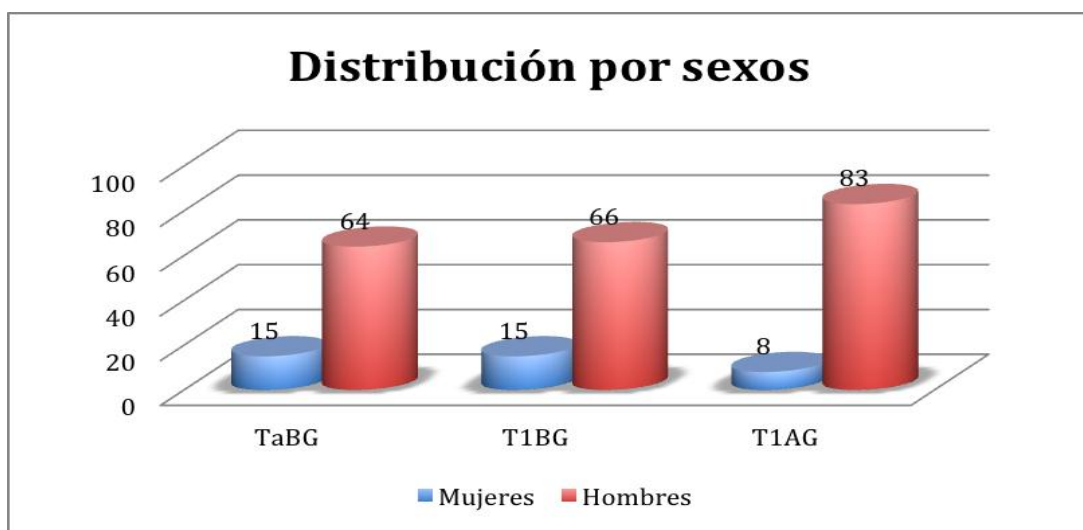


Figura 19. Distribución del sexo según los grupos de riesgo

En el estudio estadístico se observó una asociación clínico-patológica significativa entre sexo masculino y alto grado ($p=0.024$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sexo y estadio ($p=0.167$)

2.3. Características Epidemiológicas

Se evaluó el hábito tabáquico observando que 109 pacientes (43.4%) eran fumadores y 23 (9.2%) lo habían dejado en los últimos 10 años. A continuación se puede observar la distribución por grupos [Figura 20].

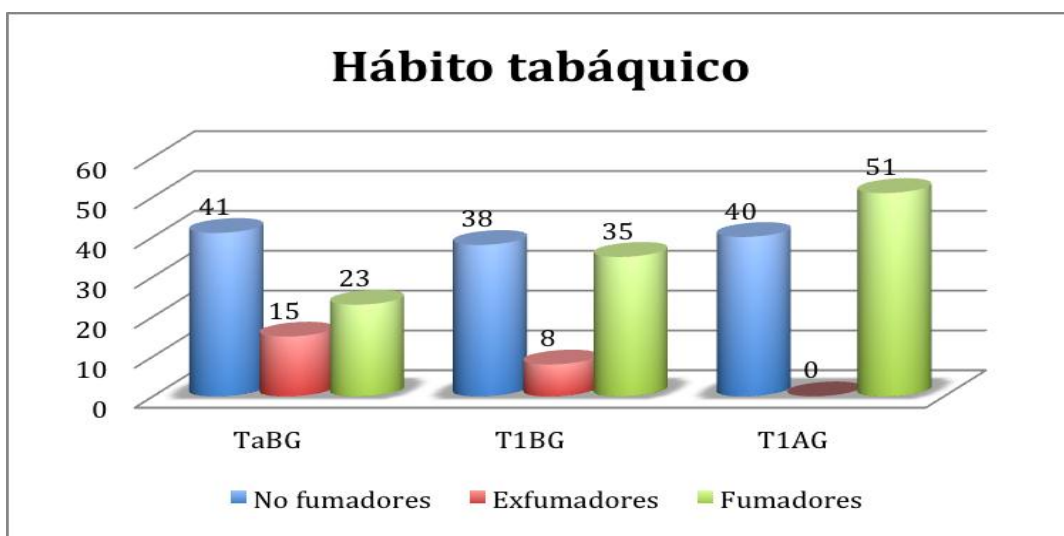


Figura 20. Distribución del hábito tabáquico por grupos

Por otro lado, 29 pacientes (11.6%) tuvieron otros tumores. 14 de ellos lo presentaban como antecedente personal y 15 a lo largo del seguimiento. De ellos, 10 pacientes presentaron un cáncer de próstata, 6 como antecedente y 4 diagnosticados en el seguimiento, y 9 de pulmón, 3 como antecedente y 6 en el seguimiento, confirmándose en 5 de ellos que no eran metástasis del tumor vesical, sino tumores primarios. Entre los diez restantes destacaron los tumores de laringe y tracto gastrointestinal [Figura 21].

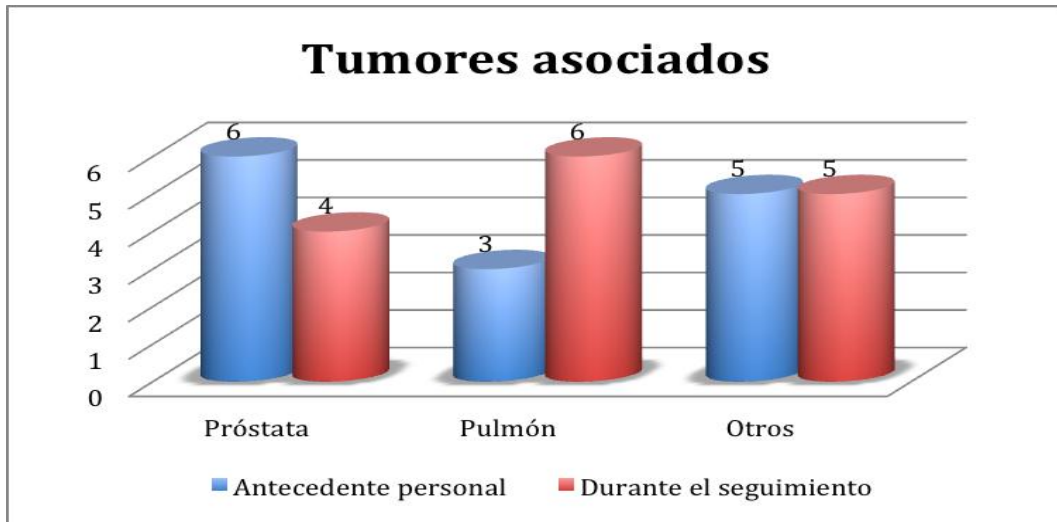


Figura 21. Tumores asociados más frecuentemente

2.4. Motivo de Diagnóstico

La manifestación más frecuente a través de la que se llegó a un diagnóstico de cáncer de vejiga fue la hematuria (83.8%). En un 85.0% se trataba de macrohematuria y en un 15.0% de microhematuria. En 20 casos (8.0%) se presentó como manifestación de clínica miccional y en los 20 restantes el diagnóstico se realizó por estudios de imagen realizados por otra causa como infecciones de orina, cólicos renales, estudio de hipertensión... [Figura 22].

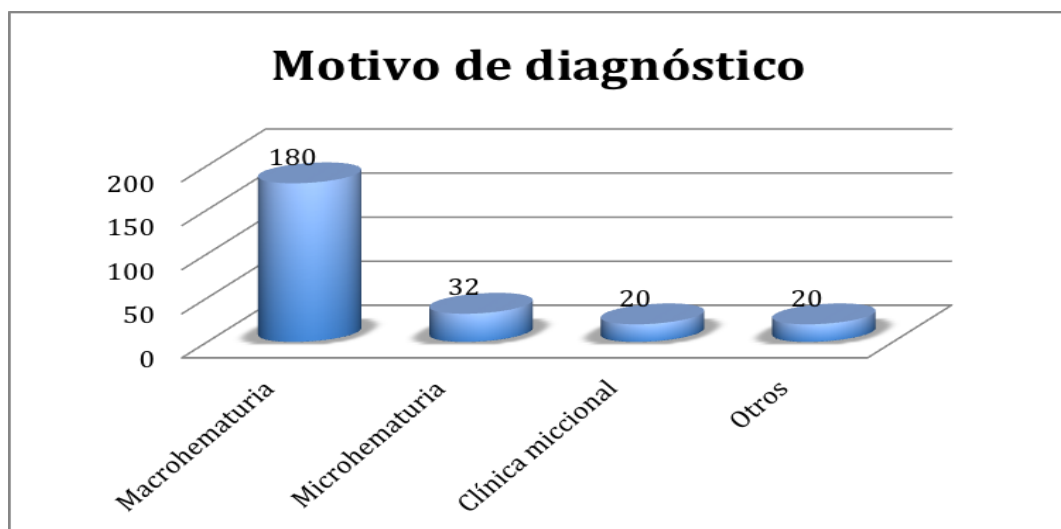


Figura 22. Causas más frecuentes de diagnóstico de cáncer de vejiga

2.5. Cis Asociado

En 101 pacientes se obtuvieron BMNs en el mismo acto quirúrgico que la resección del tumor primario. Se indicaron en casos con anomalías en el urotelio, citologías positivas y/o tumores no papilares. De ellas, 64 (63.4%) fueron realizadas en T1 y 37 en Ta (36.6%) y respecto al grado, 61 en tumores de bajo grado (60.4%) y 40 (39.6%) en alto grado.

Una de las características anatómo-patológicas que se analizaron en base a esas BMNs fue la presencia o no de *Cis* asociado al tumor primario. Dentro de los T1AG se observó que en 28 casos existía carcinoma *in situ* concomitante.

2.6. Tamaño Tumoral

Cuando se recogieron los datos de las historias se valoró el tamaño del tumor o de la masa tumoral en caso de existir multifocalidad, considerando como punto de corte los 3 cm.

En la serie total, se observó que 177 pacientes (70.5%) habían presentado un tumor menor de 3 cm y que en 74 (29.5%) era mayor o igual de 3 cm. Al analizar cada uno de los subgrupos [\[Figura 23\]](#):

- TaBG: 67 casos (84.8%) presentaban tumores menores de 3cm, frente a los 12 restantes (15.2%) que eran ≥ 3 cm
- T1BG: 55 pacientes (67.9%) presentaron un tamaño inferior a 3 cm y en 26 (32.1%) el tumor era mayor
- T1AG: 55 casos (60.4%) presentaron un tamaño <3 cm, mientras que en los 36 restantes (39.6%) era ≥ 3 cm

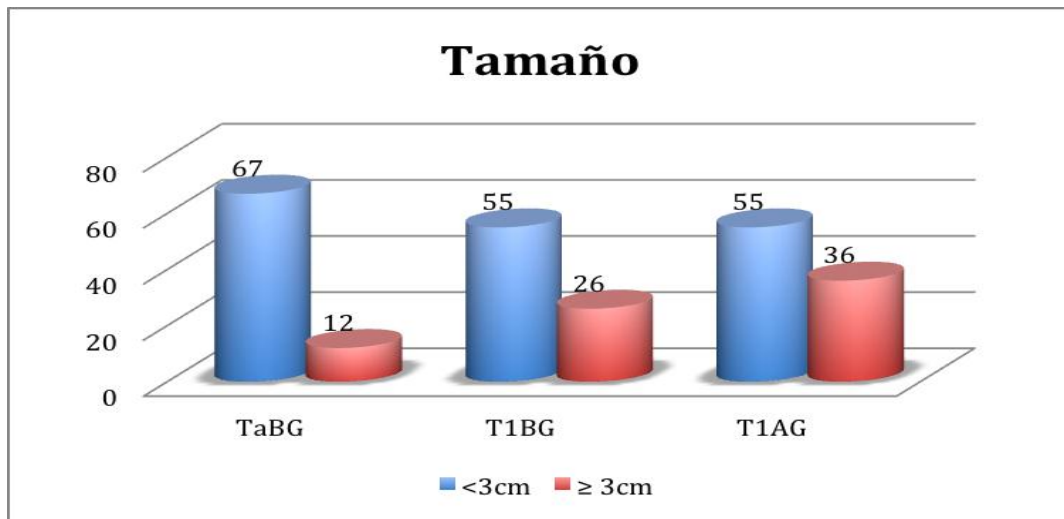


Figura 23. Distribución de los tumores por tamaño según sean menores o mayores de 3 cm en cada uno de los subgrupos (Los T1AG fueron significativamente más grandes, $p=0.002$)

Se encontró asociación significativa entre tamaño y estadio. Los T1 tienden a un tamaño mayor de 3 cm frente a los Ta ($p<0.001$). También se observó que los tumores de alto grado tendían a presentar tamaños mayores ($p<0.001$).

2.7. Multifocalidad

En todos los pacientes de nuestra serie se hizo una descripción macroscópica de la lesión registrándose el número de tumores. Se observó que 161 casos (64.1%) presentaban un único tumor, mientras que los 90 restantes (35.9%) presentaban al menos dos.

En la subdivisión por grupos se observó que [Figura 24]:

- De los 79 pacientes con TaBG, 60 tenían un tumor único (76.0%) y 19 (24.0%) un tumor múltiple
- Dentro de los T1BG, el 63.0% presentaron sólo un tumor ($n=51$) frente al 37.0% restante que presentaba 2 o más neoformaciones ($n=30$)
- En el caso de los T1AG, 50 pacientes tenían un único tumor (55.0%) y 41 al menos dos (45.0%)

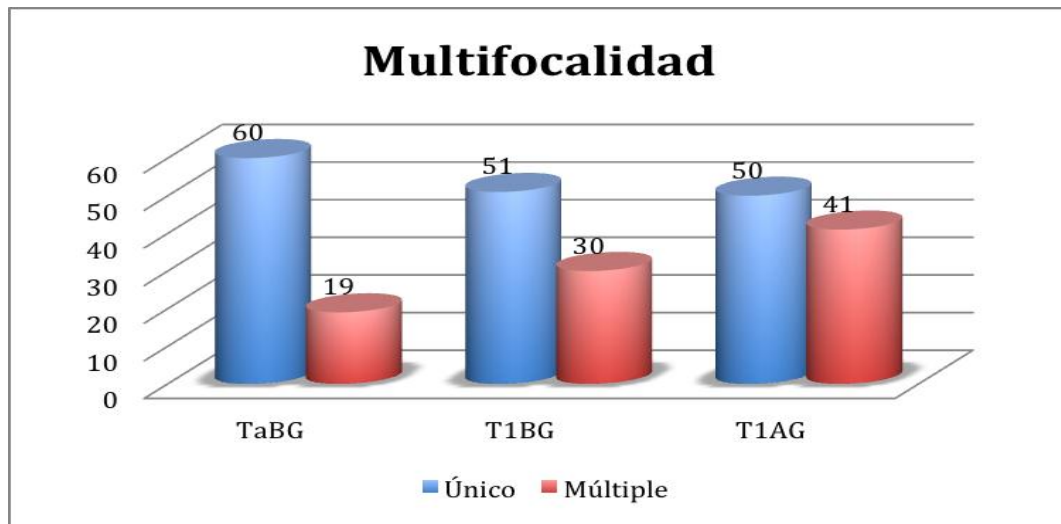


Figura 24. Distribución de los tumores según fuesen únicos o múltiples en cada uno de los subgrupos (Los T1AG presentaron una mayor tendencia a la multifocalidad, $p=0.017$)

Los tumores Ta presentaron una mayor multifocalidad ($p=0.006$). También hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al grado, con una mayor tendencia de los tumores de alto grado a la presencia de al menos dos neoformaciones ($p=0.017$). No se observó asociación significativa entre tamaño y multifocalidad ($p=0.38$).

2.8. Terapia Adyuvante

Siguiendo el protocolo de las guías europeas, el tratamiento adyuvante administrado varió en función del estadio y el grado tumoral. De este modo:

- En los TaBG no se utilizó en ningún caso terapia adyuvante
- En los T1BG la terapia adyuvante utilizada fue la MMC a dosis de 40 mg y se empleó en el 100% de los pacientes de manera inmediata postoperatoria y/o diferida. La pauta diferida administrada en 50 casos (61.7%) fue una inducción de 6 semanas, seguida de mantenimiento durante 6 meses. En el resto no se emplearon las primeras 6 instilaciones semanales iniciales tal como se realiza en la actualidad
- En el caso de los tumores de alto grado, T1AG, se empleó BCG en el 100% de los pacientes, en 75 de ellos (82.4%) se empleó la dosis plena de 81 mg y en los 16 restantes (17.6%) se utilizaron dosis menores bien por contraindicaciones relativas o por mala tolerancia

En la tabla descrita a continuación [Tabla 9] se presenta, de forma resumida, la distribución de los pacientes, en cada uno de los subgrupos y en la serie global, en función de las variables clínico-patológicas más significativas.

		TUMORES TaBG n (%)	TUMORES T1BG n (%)	TUMORES T1AG n (%)	SERIE GLOBAL n (%)
SEXO	Varones	64 (81.0)	66 (81.5)	83 (91.2)	213 (84.9)
	Mujeres	15 (19.0)	15 (18.55)	8 (8.8)	38 (15.1)
EDAD	< 65 años	25 (31.6)	28 (24.6)	27 (29.7)	80 (31.9)
	≥ 65 años	54 (68.4)	53 (64.4)	64 (70.3)	171 (68.1)
CIS ASOCIADO	No	79 (100)	81 (100)	65 (69.2)	223 (88.8)
	Si	0 (0.0)	0 (0.0)	28 (39.6)	28 (11.2)
TAMAÑO	< 3 cm	67 (84.8)	55 (67.9)	55 (60.4)	177 (70.5)
	≥ 3 cm	12 (15.2)	26 (32.1)	36 (39.6)	74 (29.5)
FOCALIDAD	Único	60 (76.0)	51 (63.0)	50 (55.0)	161 (64.1)
	Múltiple	19 (24.0)	30 (37.0)	41 (45.0)	90 (35.9)

Tabla 9. Distribución de características clínico-patológicas en cada uno de los subgrupos y en la serie global

3. ANÁLISIS DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES

Este proceso, junto al análisis del estado de metilación, fue llevado a cabo en el Departamento de Marcadores Tumoraes del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid.

3.1. Extracción de ADN de las Muestras de Parafina

El ADN genómico procedente del tejido tumoral resecado se extrajo siguiendo el método habitual (Qiagen, Valencia, CA). Se realizó una microdissección de las muestras de tumor incluidas en parafina y posteriormente se realizó una tinción con hematoxilina-eosina (H-E) para confirmar el diagnóstico y marcar la zona tumoral, con el fin de evitar zonas necróticas y tejido sano peritumoral. Cuando el contenido estimado de células neoplásicas fue mayor del 75% las secciones correspondientes de tejido fueron procesadas¹⁰². Posteriormente fueron digeridas con proteinasa K (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) durante la noche previa a la extracción del ADN. Para determinar la concentración y pureza de las muestras de ADN se tomaron alícuotas de 1 µl cada una. La concentración y pureza del ADN de las muestras de tumor se determinó

con un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop® Technologies, Wilmington, DE, USA de Wilmington, EEUU). La calidad del ADN se evaluó sobre la base de 260/280 *ratios* de absorbancias.

3.1.1. Proceso de Desparafinización

En una primera fase, previa a la extracción de ADN, se llevó a cabo un proceso de desparafinización de las muestras de tumor^{86,87} que se detalla a continuación.

1. Corte de bloques de parafina

- Procedimiento de corte
 - Enfriamiento del bloque sobre placa fría
 - Corte en micrótopo a 5 μ
 - 2-3 cortes en portaobjetos normales (extremo translúcido)
 - 1 corte en porta (o portaobjeto) para tinción con H-E (extremo azul)
 - Calentamiento de los cortes en agua a 42°
 - Colocación en los portas
- De cada bloque de parafina se realizaron 11 cortes con el micrótopo
 - 10 se colocan en portaobjetos normales (extremo translúcido)
 - 1 se coloca en portaobjetos para H-E (extremo azul)

2. Colocación de portas en el carro

- 4 de los 10 portas fueron destinados a la extracción del ADN (los 6 restantes fueron destinados para extracción de ARN para otros estudios en paralelo)
 - Se colocan por parejas no enfrentadas (exponiendo la parafina hacia fuera)
 - Se coloca cada pareja en cada ranura del carro
- 1 de esos portas fue destinado para la tinción con H-E
 - Se coloca un porta por ranura

3. Calentamiento del carro en estufa a 60° durante al menos 45´

4. Baños

- Baño corto (de transporte) de xilol hasta la cadena de baños
- 3 baños de 15´en xilol
- 3 baños de 5´en etanol al 100%
- 3 baños de 5´en etanol al 95%
- 3 baños de 5´en agua destilada
- 1 baño durante tiempo indefinido en PBS al 1x (tampón fosfato)

3.1.2. Procedimiento Inicial para la Extracción del ADN

Tras los baños del carro descritos y a partir de la inmersión del mismo en PBS al 1x, se realizaron los siguientes pasos.

1. Raspar el porta con una hoja de bisturí, introduciendo el material de todos los portaobjetos en un tubo de *ependorf* para cada paciente
2. Añadir 50 µl de PBS al 1x
3. Centrifugar a 13.200 rpm durante 10´a 4°C
4. Desechar el sobrenadante
5. Añadir 180 µl de *buffer ATL* (*buffer* de lisis) y 50 µl de proteinasa-K
6. Introducir todos los tubos de *ependorf* en el *thermomixer* a 1200 rpm a 56°C durante toda la noche
7. Sacar las muestras del *thermomixer*
8. Meter las muestras en la centrifugadora hasta que se alcance la velocidad máxima (13.200 rpm) para que de este modo las gotas producidas por condensación localizadas en la tapa superior del tubo de *ependorf* caigan (paso conocido como “*spin*”)
9. Añadir 300 µl de *buffer ATL* (*buffer* de lisis) a cada uno de los tubos de *ependorf* y pipetear dentro del volumen para mezclar
10. Añadir 50 µl de etanol
11. Agitar la muestra en el *vortex* o agitadora, también denominado como “*vortear*”
12. Añadir 1 µl de RNA-carrier por muestra
13. Centrifugar a máxima rpm 1´
 - Tras este procedimiento, se obtiene el pellet (lo que se ha digerido) y el sobrenadante (que contiene el ADN)

14. Transferir el volumen del sobrenadante a las columnas (tubos de mayor tamaño que contienen 2 partes separables: el filtro, donde se retiene el ADN, y un tubo colector sin tapa)
15. Centrifugar a 8.000 rpm 1´
 - En este paso el contenido líquido pasa por el filtro mientras que el ADN queda retenido en él
16. Colocar nuevos tubos colectores, tirando los previos con lo filtrado y manteniéndose el filtro que contiene el ADN
17. Añadir 500 µl de *buffer AW2* (*buffer* de lavado)
 - Se deben añadir previamente 30 ml de etanol al 100% al *buffer AW2*
18. Centrifugar a 8.000 rpm 1´
19. Colocar un nuevo tubo colector manteniendo el filtro
20. Centrifugar a 13.200 rpm 3´ (proceso de secado)
21. Desechar el tubo colector con el líquido resultante del secado y meter el filtro en un tubo de *ependorf* marcado con el número identificativo del paciente
 - En este momento se inicia el proceso de elución o separación del ADN del filtro para trasladarlo a un volumen
22. Añadir al filtro, dentro del *ependorf*, 22 µl de agua Braun® (agua estéril para inyectables)
23. Dejar reposar 5´
24. Centrifugar a 13.200 rpm 1´
25. Retirar el filtro del tubo *ependorf*
26. Reservar en hielo (1ª elución)
27. Se colocan los filtros en tubos nuevos de *ependorf* y se añaden 17 µl de agua Braun® (las siguientes eluciones se hacen siempre con 17 µl)
28. Dejar reposar 5´
29. Centrifugar a 13.200 rpm 1´
30. Retirar el filtro del tubo *ependorf*
31. Reservar en hielo (2ª elución)
32. Se evalúan los volúmenes de la 1ª y 2ª elución con el *nanodrop*
33. Si la cantidad de ADN determinada está entre 90-100 ng/µl se realizará una nueva elución
34. Congelar las muestras hasta su utilización a -20° C

3.2. Proceso de Metilación. Amplificación Múltiple de Sondas Dependiente de Ligación y Específica de Metilación (MS-MLPA)

Una vez obtenido el ADN de las muestras en tejido parafinado, el procedimiento experimental se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MS-MLPA, MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) con el fin de detectar la metilación aberrante de 25 genes supresores de tumor¹⁶¹. Los genes estudiados fueron [Tabla 10]:

TP73	CDKN2A	WT1	CHFR	CDH13
MSH6	PAX5A	CD44	BRCA2	TP53
VHL	PTEN	GSTP1	RB1*	BRCA1
RARB	MGMT*	ATM	THBS1	STK11
ESR1	PAX6	IGSF4	PYCARD	GATA5

Tabla 10. Panel de genes supresores de tumor estudiados en cada paciente. (*) Utilización de 2 sondas que detectan 2 islas CpG diferentes del promotor

3.2.1. Descripción General del Método

El protocolo MS-MLPA se inició con la desnaturalización del ADN, para lo que se realizó una dilución de 200 ng de ADN en tampón TE. Posteriormente se añadió el grupo de sondas específicas para cada uno de los genes, que hibridaron durante una noche. A partir de este momento, el producto de reacción se dividió en 2, una de las fracciones se procesó sin digerir por el enzima de restricción (HhaI) para usarse como referencia (fracción no digerida), mientras que la otra se procesó con digestión de las sondas según el estado de metilación del ADN (fracción digerida). En la fracción no digerida de las muestras se añadió una mezcla de ligación (*Mix Ligase-65*) para ligar las sondas, mientras que en la segunda mitad la ligación se combinó con digestión por medio de la enzima HhaI (*Mix Ligase-Digestion*), de tal modo que ésta digirió los híbridos sonda-ADN no metilado pero no los híbridos sonda-ADN metilado ya que la metilación en la región promotora no permite el acceso de la enzima. A continuación, se realizó una técnica de PCR con 10 µl de cada uno de los productos obtenidos en ambas reacciones utilizando un termociclador (MJ Research Inc., Waltham, MA, EEUU) con 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Las sondas que fueron digeridas por no presentar metilación del ADN no fueron amplificadas mediante PCR, en cambio, las

sondas no digeridas por estar metilado el ADN sí se pudieron amplificar por esta técnica. Los productos de esta reacción fueron desnaturalizados con formamida desionizada y separados por electroforesis capilar en el secuenciador capilar ABI 3700 (Applied Biosystems) [Figura 25].

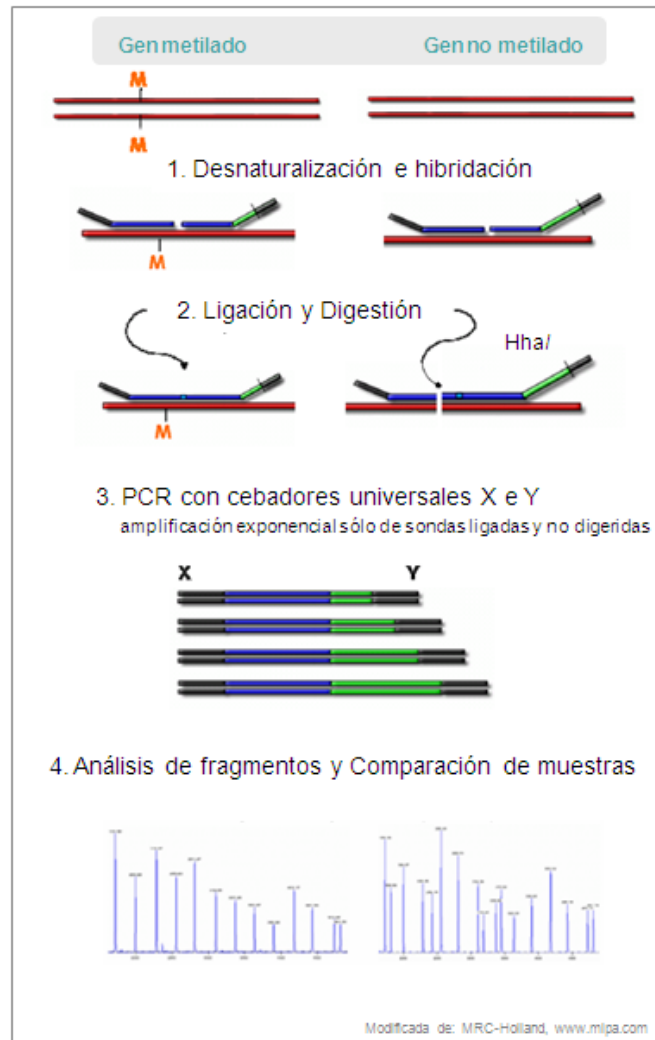


Figura 25. Esquema general de MS-MLPA¹⁶¹

3.2.2. Descripción Detallada del Ensayo MS-MLPA

A partir de los tubos *ependorf* obtenidos durante el proceso de extracción del ADN y teniendo en cuenta la cantidad de ADN de la que se parte, medida en el *nanodrop*, se desarrolla el procedimiento de laboratorio del MS-MLPA como se detalla a continuación.

3.2.2.1. Desnaturalización del ADN e Hibridación con las SALSA-probes

Se debe extraer una cantidad calculada según la concentración de ADN de cada muestra, teniendo en cuenta que son necesarios 200 ng de ADN para iniciar el protocolo MS-MLPA. El cálculo se obtiene a partir de una relación directa.

- Ejemplo: la muestra obtenida del bloque de parafina “A”, según el *nanodrop*, contiene y ng/ μ l de ADN. Si 1 μ l tiene y ng de ADN, para alcanzar 200 ng, necesito X . Por lo que:

$$X=200 \cdot 1/y$$

Posteriormente se realizan una serie de pasos desarrollados a continuación:

1. Igualar el volumen de todos los tubos *ependorf* añadiendo *buffer TE* (10mmol/L Tris-HCl, pH 8.2 y 1mmol/L de EDTA, pH 8.0) hasta alcanzar 5 μ l en todas las muestras
2. Calentar en termociclador durante 10´a 98°C
3. Enfriar a 25°C
4. Añadir el grupo de sondas específicas de cada gen:
 - 1,5 μ l de la sonda *SALSA Probe-mix* (secuencias de ADN) [Tabla 11]
 - 1,5 μ l de *buffer MLPA*
5. Incubar 1´a 95°C
6. Incubar 16 horas a 60°C
 - Serían suficientes 12 horas para la hibridación pero se recomienda mantener la mezcla durante 16-18 horas

3.2.2.2. Ligación y Digestión

1. Preparar mezclas o “*mixes*”: *Mix Ligase-65* y *Mix Ligase-Digestion*
2. Sacar las muestras del centrifugador y dejar a temperatura ambiente
3. Añadir 10 μ l de agua Braun® y 3 μ l de Ligase-buffer A (sin efecto lítico)
4. Extraer 10 μ l y transferirlos a otros tubos *ependorf*
5. Incubar en el termociclador los tubos *ependorf* a 49°C al menos 1´

6. Estando a 49°C, agregar:
 - 10 µl de *Mix Ligase-65* a los tubos *ependorf* A (fracción no digerida)
 - 10 µl de *Mix Ligase-Digestión* a los tubos *ependorf* B (fracción digerida)
7. Incubar a ambos grupos de tubos *ependorf* (A y B) a 49°C durante 30´
8. Calentar a 98°C 5´
9. Enfriar a 4°C
10. Estos productos pueden ser congelados durante una semana a -4°C. Para periodos más largos congelar a -20°C.

3.2.2.3. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

1. Precalentar termociclador a 72°C
2. En tubos de *ependorf* nuevos, añadir a cada muestra
 - 5 µl de la reacción *MLPA-Ligation* (A) o de la reacción *Ligation-Digestion* (B)
 - 2 µl de *SALSA PCR R-buffer*
 - 13 µl de agua
3. Colocar los tubos sobre hielo
4. Preparar el *Polimerase-mix* (incluye los *primers*)
5. Añadir 5µl *Polimerase-mix* a cada tubo en un ambiente sin luz, dada la fotosensibilidad del *mix*
6. Programar en el termociclador el siguiente esquema
 - 35 ciclos de 95°C 30´´, 60°C 30´´y 72°C 60´´
 - 72°C 20´
 - 4°C modo *hold*
7. Mantener a 4°C y guardar para su envío al departamento de genómica

	Longitud (nt)	Sonda salsa MLPA	Localización cromosómica	Secuencia parcial con el lugar de restricción del enzima HhaI
TP73	238	01684-L01264	1p36.3	GGAGTTGGATCGGCCCTGGG- ACTTGGCGCTCGCGAGAGGCTGGAGCGGCCAGAG
MSH6	328	01250-L00798	2p16	CGGCTGTCGGTATGTCGCGACAG – AGCACCTGTACAGCTTCTTCCCAAGTCTCCGCGCTGA
VHL	265	03818-L03850	3p25.3	CGGACGGAGAAGTGGACGAGGCCGAGG- TAGGCGCGGAGGAGGCAGGCGTCAAGAGTACGG
RARB	453	04046-L02172	3p24.2	GGCGGGAGCGAGCGGGCGCA- GGCGGAACACCGTTTTTCAAGCTAAGCCGCCGCAAA
ESR1	301	02746-L02173	6q25.1	GCTCGCTGTCGGCGGGACAT- GCGCTGCGTCGCTCTAACCTCGGGCTGTGCTCTTT
CDKN2A	427	01530-L00955	9p21	GCAGGTTCTTGGTGACCTCCGGA- TTCGGCGCGCTGCGGCCCGCCGCGAGTGAG
PAX5A	208	03750-L03210	9p13	GCGCTCGTCTAAGCAGCGGGTT- TGACATGGAGATGTCACAGGCCCGCGCACAGCGCAG
PTEN	373	03638-L17142	10q23.3	CCTGTAAGCTGGAAGGGACGAAGTGGTGTAAATGATA - TGTGCATATTTATACATCGGGGCAATTTTAAAGGCAC AAGAGGC
MGMT	191	05670-L05146	10q26	GGCAAATAAGGCACAGAGCTCA- GGCGGAAGCTGGGAAGCGCGCCCGGCTGTGAC
MGMT-2	346	13716-L15582	10q26	CTCGGAGCCGAGGACCTGAGAAAAGCAA- GAGAGCGCGCGGGGGCGGGCCGGG
PAX6	409	03749-L03209	11p13	GGAGCATCAATCGGCTGGCGCG- AGGCCCCGCGCTGCTTTGCATAAAGCAATTTTTG
WT1	247	02755-L02204	11p13	GGAGGGTTGTGCCACACCGGCCAGCT- GAGAGCGCGTGTGGGTGAAGAGGAGGGTGTCTC
CD44	462	04500-L02761	11p13	GGAGAAGAAAGCCAGTGCGTCTCT- GGGCGCAGGGGCCAGTGGGCTCGGAGGCACAGG
GSTP1	273	02747-L02174	11q13	GGCAGGCTGCGCTCACC GCGCTT- GGCATCTCCCGGGCTCCAGCAAATTTTCTTTG
ATM	160	03023-L02413	11q22-q23	GCGGAGACCGCTGATACTGGAT- GCGCATGGGCATACCGTGCTCTGCGGCTGCTTGGC
IGSF4	364	03816-L17141	11q23.2	CTCCGCTCCAGCGCATGTCA- TTAGCATCTCATTAGCTGTCCGCTCGGGCTC
CHFR	292	02737-L02164	12q24.33	CGAGAGTAGGCGCGTGAGG- GCGCTCGGCCATCTTTGATCCTGACCAGGCGACTTC
BRCA2	148	02285-L01776	13q12.3	CGGTTAGTGGTGGTGTAGTGGTT- GGGACGAGCGCGTCTTCCGAGTCCAGTCCAGCG
RB1	319	02734-L02161	13q14.2	CAAGGAGGAGAGTGGCGCTC- CCGCCGAGGGTGCACTAGCCAGATATTCCTGCG
RB1-2	472	04502-L02199	13q14.2	GGATGCCTCCTGGAAGCGCGCTGG- ACCCACGCCAGGTTTCCAGTTAATTCTCATGAC
THBS1	355	01678-L17140	15q15	CCGCCGCCATTGGCCGGAGG- AATCCCAGGAATGCGAGCGCCCTTTAAAA
PYCARD	398	02252-L01737	16p11.2	CCAAGCTGGTCACTTCTACCTGGAGACCT- ACGGCGCCGAGCTCACCGCTAACGTGCTGCG
CDH13	219	02257-L01742	16q23.3	CGTGATGAATGAAAACGCCGCC- GGGCGCTTCTAGTCGGACAAAATGCAGCCGAG
TP53	168	02374-L02530	17p13.1	CACGGTGGCTCTAGACTTTTGAGAAGCTCAA- ACTTTTAGCGCCAGTCTTGAGCACATGGGAGGGGA
BRCA1	140	03296-L01269	17q21	CCCTTGGTTTCCGTGGCAACGGA- AAAGCGGGGAATTACAGATAAATTAAGTGCAGAC
STK11	382	06783-L17143	19p13.3	GTGGATGGGCGGCCGAGGA- AGACTGCGCTCGGCCGTTCATACTTGTCCGTGGG
GATA5	434	03752-L06199	16q23.3	CCTTGGCGACAAGGACGACG- ACACGGGGCGGCCAGCGCGGAGCCCGACCACTG

Tabla 11. Características de las sondas utilizadas en el estudio de metilación. El lugar de restricción del enzima HhaI aparece marcado en gris¹⁶¹

3.2.2.4. Electroforesis Capilar para la Separación de los Productos de PCR

La cantidad de reacción de PCR necesaria para el análisis depende del instrumento utilizado y de la química fluorescente de los primers.

1. Mezclar en *strips Applied Biosystems*

- 0.75 μl de producto de PCR
- 0.75 μl de agua
- 0.5 μl *standard* interno
- 13.5 *HiDi formamide*

Enviar las muestras a genómica para su desnaturalización

3.2.3. Análisis e Interpretación de los Datos

Los fragmentos se analizan con el programa *Peak Scanner v1.0* (Applied Biosystems), que identifica los productos de amplificación (según metilación) y los valores correspondientes al tamaño máximo de los picos en pares de bases (pb) [Figura 26].

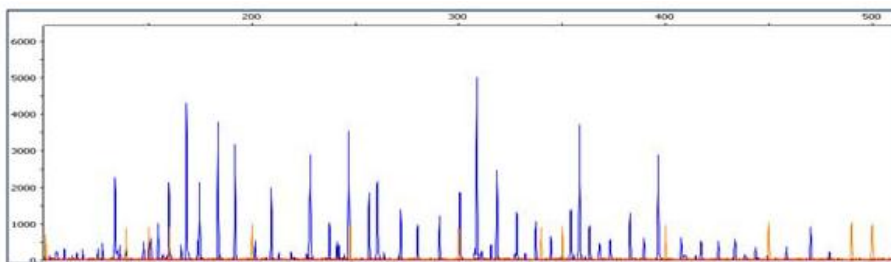


Figura 26. Análisis de los fragmentos con *Peak Scanner*¹⁶¹

El análisis de datos se realizó mediante la exportación de las áreas de los picos a otro programa analítico, el *Coffalyser V8* (MRC-Holland), basado en Excel, que compara los pares de muestras sin digerir y las digeridas según el grado de metilación [Figura 27].

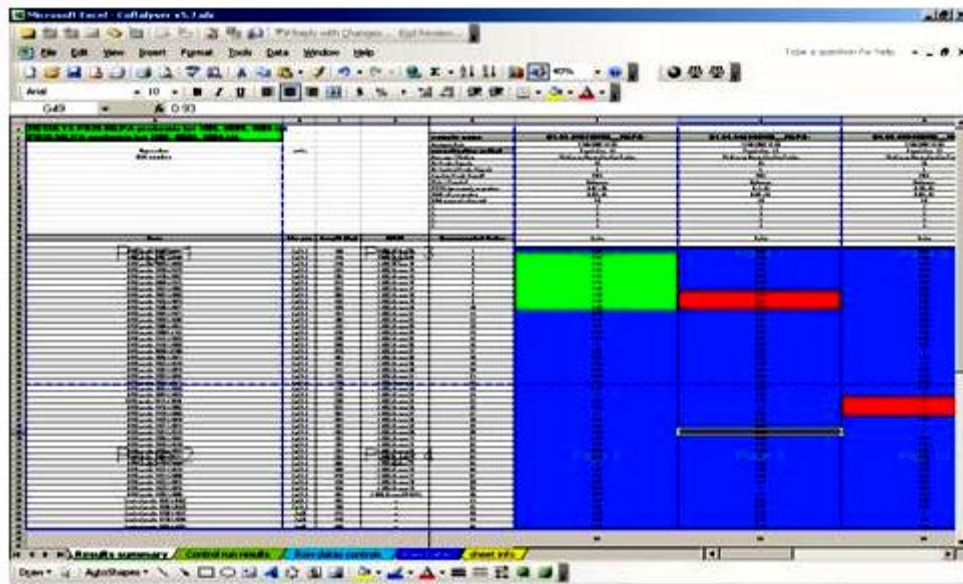


Figura 27. Normalización y análisis de datos con Coffalyser¹⁶¹

A partir de los valores relativos de los picos de la fracción digerida y los de la no digerida, se obtiene un índice de metilación (IM) para cada muestra y gen analizados. Cuando el IM calculado fue igual o mayor a 0.3, se consideró que el gen estudiado estaba metilado de forma aberrante. Este valor indica que al menos un 30% del ADN analizado está metilado.

Los índices de metilación fueron interpretados como:

- Ausencia de hipermetilación (IM: 0-0.29)
- Hipermetilación leve (IM: 0.30-0.49)
- Hipermetilación moderada (IM: 0.50-0.69)
- Hipermetilación intensa (IM > 0.70)

Con el fin de evaluar la influencia del punto de corte elegido se reanalizaron los datos considerando que cada gen estudiado estaba metilado de forma aberrante cuando el IM era igual o mayor a 0.5, lo cual indica que al menos un 50% del ADN analizado estaba metilado.

Dos de los 25 genes, MGMT y RB1, estuvieron representados por 2 sondas, las cuales reconocen 2 islas CpG distintas del promotor. Para estos genes, los índices se calcularon de forma independiente para cada una de ellas.

4. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa PASW Statistics 17 (SPSS Statistics 17) y R, versión 2.9.1 y se fijó el nivel de significación en $p < 0.05$.

Se recogieron variables referidas a las características clínico-patológicas de la serie, destacando la edad y el sexo de los pacientes, el hábito tabáquico, la asociación o no de *Cis*, el tamaño tumoral y su multifocalidad. En lo que respecta a la evolución se valoró la recidiva y progresión y las características de las mismas: estadio T, grado, tamaño, número de tumores y número de recidivas superficiales.

Respecto a la metilación, se estudió si los genes estaban metilados o no (presencia o ausencia de metilación) en el tumor primario, para una *ratio* calculada mayor o igual a 0.3 y a 0.5.

Las variables cuantitativas se expresaron como media \pm desviación estándar, indicando su rango, o bien como mediana (percentil 50) en los casos pertinentes (tiempo libre de enfermedad, tiempo hasta la progresión y supervivencia cáncer-específica).

Las asociaciones entre los índices de metilación detectados por MS-MLPA y las variables clínico-patológicas se evaluaron con las pruebas no paramétricas Wilcoxon-Mann-Whitney y Kruskal-Wallis al no tener una distribución normal.

La influencia de la metilación de cada uno de los genes en la evolución clínica se evaluó teniendo en cuenta el tiempo libre de enfermedad, tiempo hasta la progresión (invasión de muscular propia) y supervivencia cáncer específica. Se calcularon los valores predictivos de la presencia de metilación de cada gen con relación a su tendencia a recidivar, progresar y fallecer por la enfermedad tomando como punto de corte la presencia de estos eventos a los 12 y 24 meses.

Dado el elevado número de pacientes que fallecieron por otras causas ($n=61$), de los cuales 33 murieron sin eventos, el impacto de la metilación en la evolución clínica se analizó considerándose éstos últimos como riesgos competitivos. Por ello, las pruebas estadísticas empleadas para estimar el impacto de los factores clínicos e histopatológicos junto con la metilación en cada uno de los eventos de evolución a estudio (recidiva, progresión y supervivencia cáncer específica) fueron los test de Cox

univariado y multivariado. Para su representación gráfica, por la misma razón, se emplearon curvas de incidencia acumulada⁶¹.

Resultados

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE
GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS
SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO
MÚSCULO INVASIVOS

Raquel Sacristán González

1. ESTUDIO DE METILACIÓN DE GENES

Se analizó el porcentaje de pacientes que presentaban cada uno de los genes metilados tanto para el umbral 0.3 [Tabla 12] como para 0.5 [Tabla 13] en cada uno de los subgrupos y en la serie global, determinando en qué genes existían diferencias significativas entre los tres subgrupos y cuáles presentaban una frecuencia de metilación mayor del 30%.

1.1 Porcentajes de Metilación

En general, la proporción de metilación fue mayor (>30%) tanto al estudiar la serie completa como cada uno de los subgrupos en RARB, MGMT-2, CD44, GSTP1, PYCARD, CDH13, BRCA1, STK11 y GATA5 para ambos niveles de metilación y en MSH6, PTEN, WT1 y TP53 para 0.3 [Tablas 12 y 13].

Globalmente, RARB, MGMT-2 y GATA5 se encontraron metilados en gran parte de los casos (>60%) para un $IM > 0.3$, al igual que sucedía con STK11 para los dos umbrales. En los tumores TaBG los genes más frecuentemente metilados fueron MGMT-2, CD44, GSTP1 sólo para un $IM > 0.3$, mientras que RARB, PYCARD, STK11 y GATA5 lo estaban para ambos umbrales. En los T1BG los genes que se encontraron hipermetilados en más del 60% de pacientes para un $IM > 0.3$ fueron RARB, MGMT-2, CD44, PYCARD y GATA5 y STK11 para ambos umbrales. Finalmente, en los tumores T1AG, los genes más frecuentemente metilados fueron el MGMT2 para un $IM > 0.3$ y el STK11 para ambos umbrales [Tablas 12 y 13].

Sin embargo, se observó que el porcentaje de pacientes que presentaban metilado el TP73, VHL, CDKN2A, PTEN, PAX6, ATM, CHFR, RB1, RB1-2 y THBS1 era bajo (< 10%) cuando se analizaron los genes para un índice de metilación mayor de 0.3 en prácticamente todos los grupos. Cuando se aumentaba el umbral a 0.5 se obtuvieron los mismo resultados con porcentajes bajos también para ESR1 y MGMT [Tablas 12 y 13].

1.2 Asociación entre el Porcentaje de Metilación y los Subgrupos de Tumores

Se relacionaron los porcentajes de metilación con los subgrupos de tumores (TaBG vs T1BG vs T1AG) en aquellos casos con una proporción de metilación superior al 30% para que los resultados no se vieran influenciados por un escaso número de casos metilados [Tablas 12 y 13]. De esta manera las asociaciones estadísticamente significativas fueron las siguientes:

- Se observó que el gen RARB ($p < 0,001$) se presentaba metilado para ambos umbrales en menor proporción en el grupo de T1AG respecto a TaBG y T1BG, del mismo modo que sucedía para CD44 ($p < 0,001$) y GSTP1 ($p < 0,001$), lo que implica una hipometilación relativa de estos genes en tumores de alto grado respecto a bajo grado.
- Por otra parte se vió que el CDH13 presentaba un porcentaje de metilación estadísticamente menor entre los TaBG respecto a los T1BG y T1AG para un $IM > 0.5$ ($p = 0.01$), lo que implica un estado de hipermetilación relativa en tumores T1 respecto a Ta.
- Finalmente se observó que los genes PYCARD ($p < 0.001$) para $IM > 0.3$ y 0.5 y TP53 ($p < 0.001$) y GATA5 ($p < 0.001$) para 0.5 presentaban porcentajes de metilación que iban descendiendo de una manera significativa desde TaBG a T1AG, lo que señala una hipometilación gradual en relación al riesgo.

IM > 0.3	TaBG (n=79) Nº pacientes metilados (%)	T1BG (n=81) Nº pacientes metilados (%)	T1AG (n=91) Nº pacientes metilados (%)	Global (n=251) Nº pacientes metilados (%)
TP73	4 (5.1)	12 (14.8)	8 (8.8)	24 (9.5)
MSH6	32 (40.5)	39 (48.2)	44 (48.4)	115 (45.8)
VHL	6 (7.6)	5 (6.2)	7 (7.7)	18 (7.2)
RARB	57 (72.1)	63 (77.8)	38 (41.8)	158 (63.0)
ESR1	18 (22.8)	19 (23.5)	13 (14.3)	50 (19.9)
CDKN2A	4 (5.1)	8 (9.9)	2 (2.2)	14 (5.6)
PAX5A	19 (24.1)	32 (39.5)	34 (37.4)	85 (33.9)
PTEN	5 (6.3)	15 (18.5)	5 (5.5)	20 (8.0)
MGMT	11 (13.9)	21 (25.9)	11 (12.1)	43 (17.1)
MGMT-2	51 (64.6)	53 (65.4)	58 (63.7)	162 (64.5)
PAX6	4 (5.1)	10 (12.3)	8 (8.8)	22 (8.8)
WT1	43 (54.4)	41 (50.6)	42 (46.2)	126 (50.2)
CD44	55 (69.6)	59 (72.8)	25 (27.5)	139 (55.4)
GSTP1	49 (62.2)	45 (55.6)	18 (19.8)	112 (44.6)
ATM	7 (8.9)	11 (13.6)	6 (6.6)	24 (9.6)
IGSF4	7 (8.9)	20 (24.7)	29 (31.9)	56 (22.3)
CHFR	2 (2.5)	9 (11.1)	1 (1.1)	12 (4.8)
BRCA2	11 (13.9)	19 (23.5)	24 (26.4)	54 (21.5)
RB1	4 (5.1)	7 (8.6)	3 (3.3)	14 (5.6)
RB1-2	2 (2.5)	8 (9.9)	5 (5.5)	15 (6.0)
THBS1	5 (6.3)	6 (7.4)	11 (12.1)	22 (8.8)
PYCARD	62 (78.5)	58 (71.6)	11 (12.1)	131 (52.2)
CDH13	29 (36.7)	39 (48.2)	48 (52.8)	116 (46.2)
TP53	39 (49.4)	29 (35.8)	19 (21.9)	87 (34.7)
BRCA1	40 (50.6)	34 (42.0)	41 (45.1)	115 (45.8)
STK11	78 (98.7)	80 (98.8)	85 (93.4)	243 (96.8)
GATA5	61 (77.2)	58 (71.6)	39 (42.9)	158 (63.0)

Tabla 12. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes para un índice de metilación >0.3. En amarillo se destacan aquellos genes que presentan diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los distintos subgrupos. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30% en la serie global

IM > 0.5	TaBG (n=79) Nº pacientes metilados (%)	T1BG (n=81) Nº pacientes metilados (%)	T1AG (n=91) Nº pacientes metilados (%)	Global (n=251) Nº pacientes metilados (%)
TP73	0 (0.0)	1 (1.2)	5 (5.5)	6 (2.4)
MSH6	14 (17.7)	16 (19.8)	15 (16.5)	45 (17.9)
VHL	3 (3.8)	2 (2.5)	0 (0.0)	5 (2.0)
RARB	49 (62.0)	46 (56.8)	26 (28.6)	121 (48.2)
ESR1	5 (6.3)	8 (9.9)	4 (4.4)	17 (6.8)
CDKN2A	3 (3.8)	3 (3.7)	0 (0.0)	6 (2.4)
PAX5A	5 (6.3)	14 (17.3)	19 (20.9)	38 (15.1)
PTEN	1 (1.3)	9 (11.1)	1 (1.1)	11 (4.4)
MGMT	4 (5.1)	14 (17.3)	5 (5.5)	23 (9.2)
MGMT-2	44 (55.7)	46 (56.8)	50 (54.9)	140 (55.8)
PAX6	2 (2.5)	6 (7.4)	6 (6.6)	14 (5.6)
WT1	25 (31.6)	21 (25.9)	24 (26.4)	70 (27.9)
CD44	45 (57.0)	42 (51.9)	19 (20.9)	106 (42.2)
GSTP1	41 (51.9)	39 (48.2)	12 (13.2)	92 (36.7)
ATM	4 (5.1)	8 (9.9)	3 (3.3)	15 (6.0)
IGSF4	6 (7.6)	11 (13.6)	11 (12.1)	28 (11.2)
CHFR	0 (0.0)	5 (6.2)	1 (1.1)	6 (2.4)
BRCA2	6 (7.6)	11 (13.6)	13 (14.3)	30 (12.0)
RB1	1 (1.3)	2 (2.5)	2 (2.2)	5 (2.0)
RB1-2	2 (2.5)	3 (3.7)	3 (3.3)	8 (3.2)
THBS1	2 (2.5)	4 (4.9)	6 (6.6)	12 (4.8)
PYCARD	57 (72.2)	45 (55.6)	6 (6.6)	108 (43.0)
CDH13	14 (17.7)	29 (35.8)	34 (37.4)	77 (30.7)
TP53	32 (40.5)	23 (28.4)	12 (13.2)	67 (26.7)
BRCA1	31 (39.2)	28 (34.6)	31 (34.1)	90 (35.9)
STK11	77 (97.5)	76 (93.8)	80 (87.9)	233 (92.8)
GATA5	56 (70.9)	46 (56.8)	20 (22.0)	122 (48.6)

Tabla 13. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes para un índice de metilación >0.5. En amarillo se destacan aquellos genes que presentan diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los distintos subgrupos. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30% en la serie global

2. ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Son varias las características clínico-patológicas que habitualmente se tienen en cuenta en los estudios de cáncer de vejiga. Así, una vez que se dispuso del índice de metilación se procedió al análisis de las posibles asociaciones existentes en cada uno de los subgrupos y en la serie global. El análisis se dividió en dos, uno para cada uno de los umbrales de metilación establecidos (0.3 y 0.5). Dado que los resultados son muy abundantes, únicamente se comentarán en los siguientes apartados los que presentaron una asociación estadísticamente significativa.

2.1 Metilación Mayor de 0.3

Inicialmente se valoró el porcentaje de metilación para el sexo masculino y femenino, la edad, estableciendo como punto de corte los 65 años, la presencia o no de *Cis* asociado, el tamaño según el tumor fuese menor o mayor de 3 cm y la multifocalidad según fuesen únicos o múltiples [Tabla 14]. En una primera parte, se realizó de manera independiente para el grupo de tumores TaBG [Tabla 15], T1BG [Tabla 16] y T1AG [Tabla 17] y posteriormente para el grupo global [Tabla 18]. En base a estos datos se realizó un análisis estadístico con el fin de identificar las posibles asociaciones existentes.

VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	
Edad	< 65 años
	≥ 65 años
Sexo	Varón
	Mujer
<i>Cis</i> asociado	No
	Si
Tamaño	< 3 cm
	≥ 3 cm
Multifocalidad	Tumor único
	≥ 2 tumores

Tabla 14. Descripción de variables clínico-patológicas analizadas

TaBG IM > 0.3	Metilación global n=79 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=25	n=54	n=64	n=15	n=0	n=79	n=67	n=12	n=60	n=19
TP73	4 (5.1)	1 (4.0)	3 (5.6)	3 (4.7)	1 (6.7)	0 (0.0)	4 (5.1)	4 (6.0)	0 (0.0)	3 (5.0)	1 (5.3)
MSH6	32 (40.5)	11 (44.0)	21 (38.9)	23 (35.9)	9 (60.0)	0 (0.0)	32 (40.5)	26 (38.8)	6 (50.0)	26 (43.3)	6 (31.6)
VHL	6 (7.6)	1 (4.0)	5 (9.3)	4 (6.3)	2 (13.3)	0 (0.0)	6 (7.6)	4 (6.0)	2 (16.7)	4 (6.7)	2 (10.5)
RARB	57 (72.2)	21 (84.0)	36 (66.7)	46 (71.9)	11 (73.3)	0 (0.0)	57 (72.2)	50 (74.6)	7 (58.3)	42 (70.0)	15 (79.0)
ESR1	18 (22.8)	5 (20.0)	13 (24.1)	15 (23.4)	3 (20.0)	0 (0.0)	18 (22.8)	17 (25.4)	1 (8.3)	12 (20.0)	6 (31.6)
CDKN2A	4 (5.1)	1 (4.0)	3 (5.6)	3 (4.7)	1 (6.7)	0 (0.0)	4 (5.1)	4 (6.0)	0 (0.0)	2 (3.3)	2 (10.5)
PAX5A	19 (24.1)	1 (4.0)	18 (33.3)	15 (23.4)	4 (26.7)	0 (0.0)	19 (2.1)	15 (22.4)	4 (33.3)	12 (20.0)	7 (36.8)
PTEN	5 (6.3)	1 (4.0)	4 (7.4)	4 (6.3)	1 (6.7)	0 (0.0)	5 (6.3)	4 (6.0)	1 (8.3)	4 (6.7)	1 (5.3)
MGMT	11 (13.9)	2 (8.0)	9 (16.7)	9 (14.1)	2 (13.3)	0 (0.0)	11 (13.9)	9 (13.4)	2 (16.7)	9 (15.0)	2 (10.5)
MGMT-2	51 (64.6)	19 (76.0)	32 (59.3)	42 (65.6)	9 (60.0)	0 (0.0)	51 (64.6)	46 (68.7)	5 (41.7)	35 (58.3)	16 (84.2)
PAX6	4 (5.1)	2 (8.0)	2 (3.7)	4 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (5.1)	3 (4.5)	1 (8.3)	2 (3.3)	2 (10.5)
WT1	43 (54.4)	12 (48.0)	31 (57.4)	33 (51.6)	10 (66.7)	0 (0.0)	43 (54.4)	34 (50.8)	9 (75.0)	32 (53.3)	11 (57.9)
CD44	55 (69.6)	19 (76.0)	36 (66.7)	44 (68.8)	11 (73.3)	0 (0.0)	55 (69.6)	47 (70.2)	8 (66.7)	41 (68.3)	14 (73.7)
GSTP1	49 (62.0)	16 (64.0)	33 (61.1)	40 (62.5)	9 (60.0)	0 (0.0)	49 (62.0)	42 (62.7)	7 (58.3)	35 (58.3)	14 (73.7)
ATM	7 (8.9)	0 (0.0)	7 (12.7)	5 (7.8)	2 (13.3)	0 (0.0)	7 (8.9)	6 (9.0)	1 (8.3)	4 (6.7)	3 (15.8)
IGSF4	7 (8.9)	2 (8.0)	5 (9.3)	6 (9.4)	2 (13.3)	0 (0.0)	7 (8.9)	6 (9.0)	1 (8.3)	5 (8.3)	2 (10.5)
CHFR	2 (2.5)	0 (0.0)	2 (3.7)	2 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.5)	1 (1.5)	1 (8.3)	1 (1.7)	1 (5.3)
BRCA2	11 (13.9)	3 (12.0)	8 (14.8)	8 (12.5)	3 (20.0)	0 (0.0)	11 (13.9)	9 (13.4)	2 (16.7)	6 (10.0)	5 (26.3)
RB1	4 (5.1)	0 (0.0)	4 (7.4)	3 (4.7)	1 (6.7)	0 (0.0)	4 (5.1)	2 (3.0)	2 (16.7)	3 (5.0)	1 (5.3)
RB1-2	2 (2.5)	1 (4.0)	1 (1.9)	2 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.5)	1 (1.5)	1 (8.3)	2 (3.3)	0 (0.0)
THBS1	5 (6.3)	0 (0.0)	5 (9.3)	5 (7.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (6.3)	4 (6.0)	1 (8.3)	2 (3.3)	3 (15.8)
PYCARD	62 (78.5)	21 (84.0)	41 (75.9)	51 (79.7)	11 (73.3)	0 (0.0)	62 (7.5)	54 (80.6)	8 (66.7)	46 (76.7)	16 (84.2)
CDH13	29 (36.7)	7 (28.0)	22 (40.7)	26 (40.6)	3 (20.0)	0 (0.0)	29 (36.7)	25 (37.3)	4 (33.3)	22 (36.7)	7 (36.8)
TP53	39 (49.4)	9 (36.0)	30 (55.6)	31 (48.4)	8 (53.3)	0 (0.0)	39 (49.4)	33 (49.3)	6 (50.0)	28 (46.7)	11 (57.9)
BRCA1	40 (50.6)	14 (56.0)	26 (48.2)	33 (51.6)	7 (46.7)	0 (0.0)	40 (50.6)	34 (50.8)	6 (50.0)	32 (53.3)	8 (42.1)
STK11	78 (98.7)	25 (100)	53 (98.2)	63 (98.4)	15 (100)	0 (0.0)	78 (98.7)	66 (98.5)	12 (100)	60 (100)	18 (94.7)
GATA5	61 (77.2)	18 (72.0)	43 (79.6)	47 (73.4)	14 (93.3)	0 (0.0)	61 (77.2)	50 (74.6)	11 (91.7)	43 (71.7)	18 (94.7)

Tabla 15. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en el grupo TaBG para un umbral de metilación de 0.3. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

T1BG IM > 0.3	Metilación global n=81 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=28	n=53	n=66	n=15	n=0	n=81	n=55	n=26	n=51	n=30
TP73	12 (14.8)	3 (10.7)	9 (17.0)	10 (15.2)	2 (13.3)	0 (0.0)	12 (14.8)	9 (16.4)	3 (11.5)	7 (13.7)	5 (16.7)
MSH6	39 (4.2)	11 (39.3)	28 (52.8)	30 (45.5)	9 (60.0)	0 (0.0)	39 (48.2)	27 (49.1)	12 (46.2)	22 (43.1)	17 (56.7)
VHL	5 (6.2)	1 (3.6)	4 (7.6)	5 (7.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (6.2)	3 (5.5)	2 (7.7)	2 (3.9)	3 (10.0)
RARB	63 (77.8)	21 (75.0)	42 (79.2)	55 (83.3)	8 (53.3)	0 (0.0)	63 (77.8)	41 (74.5)	22 (84.6)	39 (76.5)	24 (80.0)
ESR1	19 (23.5)	4 (14.3)	15 (28.3)	17 (25.8)	2 (13.3)	0 (0.0)	19 (23.5)	13 (23.6)	6 (23.1)	12 (23.5)	7 (23.3)
CDKN2A	8 (9.9)	1 (3.6)	7 (13.2)	7 (10.6)	1 (6.7)	0 (0.0)	8 (9.9)	5 (9.1)	3 (11.5)	5 (9.8)	3 (10.0)
PAX5A	32 (39.5)	8 (28.6)	24 (45.3)	28 (42.4)	4 (26.7)	0 (0.0)	32 (39.5)	20 (36.4)	12 (46.2)	19 (37.3)	13 (43.3)
PTEN	15 (18.5)	4 (1.3)	11 (20.8)	12 (18.2)	3 (20.0)	0 (0.0)	15 (18.5)	12 (21.8)	3 (11.5)	9 (17.7)	6 (20.0)
MGMT	21 (25.9)	5 (17.9)	16 (30.2)	18 (27.3)	3 (20.0)	0 (0.0)	21 (25.9)	13 (23.6)	8 (30.8)	11 (21.6)	10 (33.3)
MGMT-2	53 (65.4)	21 (75.0)	32 (60.4)	43 (65.2)	10 (66.7)	0 (0.0)	53 (65.4)	35 (63.6)	18 (69.2)	32 (62.7)	21 (70.0)
PAX6	10 (12.3)	0 (0.0)	10 (18.9)	10 (15.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (12.3)	6 (10.9)	4 (15.4)	7 (13.7)	3 (10.0)
WT1	41 (50.6)	10 (35.7)	31 (58.5)	35 (53.0)	6 (40.0)	0 (0.0)	41 (50.6)	29 (52.7)	12 (46.2)	26 (52.0)	15 (50.0)
CD44	59 (72.8)	21 (75.0)	38 (71.7)	52 (78.8)	7 (46.7)	0 (0.0)	59 (72.8)	37 (67.3)	22 (84.6)	38 (74.5)	21 (70.0)
GSTP1	45 (55.6)	14 (50.0)	31 (58.5)	36 (54.5)	9 (60.0)	0 (0.0)	45 (55.6)	29 (52.7)	16 (61.5)	29 (56.9)	16 (53.3)
ATM	11 (13.6)	2 (7.1)	9 (17.0)	10 (15.2)	1 (6.7)	0 (0.0)	11 (13.6)	9 (16.4)	2 (7.7)	8 (15.7)	3 (10.0)
IGSF4	20 (24.7)	8 (28.6)	12 (22.6)	16 (24.2)	4 (26.7)	0 (0.0)	20 (24.7)	14 (25.5)	6 (23.1)	12 (23.5)	8 (26.7)
CHFR	9 (11.1)	2 (7.1)	7 (13.2)	6 (9.1)	3 (20.0)	0 (0.0)	9 (11.1)	8 (14.5)	1 (3.9)	6 (11.8)	3 (10.0)
BRCA2	19 (23.5)	6 (21.4)	13 (24.5)	16 (24.2)	3 (20.0)	0 (0.0)	19 (23.5)	15 (27.3)	4 (15.4)	13 (25.5)	6 (20.0)
RB1	7 (8.6)	1 (3.6)	6 (11.3)	6 (9.1)	1 (6.7)	0 (0.0)	7 (8.6)	6 (10.9)	1 (3.9)	4 (7.8)	3 (10.0)
RB1-2	8 (9.9)	4 (14.3)	4 (7.6)	6 (9.1)	2 (13.3)	0 (0.0)	8 (9.9)	6 (10.9)	2 (7.7)	4 (7.8)	4 (13.3)
THBS1	6 (7.4)	1 (3.6)	5 (9.4)	5 (7.6)	1 (6.7)	0 (0.0)	6 (7.4)	5 (9.1)	1 (3.9)	1 (2.0)	5 (16.7)
PYCARD	58 (71.6)	19 (67.9)	39 (73.6)	51 (77.3)	7 (46.7)	0 (0.0)	58 (71.6)	35 (63.6)	23 (88.5)	34 (66.7)	24 (80.0)
CDH13	39 (48.2)	9 (32.1)	30 (56.6)	31 (47.0)	8 (53.3)	0 (0.0)	39 (48.2)	26 (47.3)	13 (50.0)	20 (39.2)	19 (63.3)
TP53	29 (35.8)	10 (35.7)	19 (35.9)	23 (34.9)	6 (40.0)	0 (0.0)	29 (35.8)	20 (36.4)	9 (34.6)	17 (33.3)	12 (40.0)
BRCA1	34 (41.8)	12 (42.9)	22 (41.5)	26 (39.4)	8 (53.3)	0 (0.0)	34 (42.0)	19 (34.5)	15 (57.7)	21 (41.2)	13 (43.3)
STK11	80 (98.8)	28 (100)	52 (98.1)	65 (98.5)	15 (100)	0 (0.0)	80 (98.8)	55 (100)	25 (96.2)	50 (98.0)	30 (100)
GATA5	58 (71.6)	21 (75.0)	37 (69.8)	51 (77.3)	7 (46.7)	0 (0.0)	58 (71.6)	36 (65.5)	22 (84.6)	36 (70.6)	22 (73.3)

Tabla 16. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en el grupo T1BG para un umbral de metilación de 0.3. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

T1AG IM > 0.3	Metilación global n=91 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=27	n=64	n=83	n=8	n=28	n=63	n=55	n=36	n=50	n=41
TP73	8 (8.8)	3 (11.1)	5 (7.3)	8 (9.6)	0 (0.0)	3 (10.7)	5 (7.9)	7 (12.7)	1 (2.8)	5 (10.0)	3 (7.3)
MSH6	44 (48.4)	11 (40.7)	33 (47.8)	41 (49.4)	3 (37.5)	11 (39.3)	33 (52.4)	27 (49.1)	17 (47.2)	24 (48.0)	20 (48.8)
VHL	7 (7.7)	2 (7.4)	5 (7.3)	6 (7.2)	1 (12.5)	4 (14.3)	3 (4.8)	6 (10.1)	1 (2.8)	1 (2.0)	6 (14.6)
RARB	38 (41.8)	11 (40.7)	27 (39.1)	35 (42.2)	3 (37.5)	12 (42.9)	26 (41.3)	26 (47.3)	12 (33.3)	20 (40.0)	18 (43.9)
ESR1	13 (14.3)	2 (7.4)	11 (15.9)	12 (14.5)	1 (12.5)	6 (21.4)	7 (11.1)	7 (12.7)	6 (16.7)	7 (14.0)	6 (14.6)
CDKN2A	2 (2.2)	0 (0.0)	2 (2.9)	1 (1.2)	1 (12.5)	1 (3.6)	1 (1.6)	1 (1.8)	1 (2.8)	0 (0.0)	2 (4.9)
PAX5A	34 (37.4)	8 (29.6)	2 (37.7)	31 (37.4)	3 (37.5)	11 (39.3)	23 (36.5)	20 (36.4)	14 (38.9)	20 (40.0)	14 (34.2)
PTEN	5 (5.5)	2 (7.4)	3 (4.3)	5 (6.0)	0 (0.0)	2 (7.1)	3 (4.8)	4 (7.3)	1 (2.8)	3 (6.0)	2 (4.9)
MGMT	11 (12.1)	4 (14.8)	7 (10.2)	10 (12.1)	1 (12.5)	4 (14.3)	7 (11.1)	9 (16.4)	2 (5.6)	4 (8.0)	7 (17.1)
MGMT-2	58 (63.7)	16 (59.3)	42 (60.9)	51 (61.4)	7 (87.5)	17 (60.7)	41 (65.1)	36 (65.5)	22 (61.1)	36 (72.0)	22 (53.7)
PAX6	8 (8.8)	1 (3.7)	7 (10.1)	7 (8.4)	1 (12.5)	1 (3.6)	7 (11.1)	3 (5.5)	5 (13.9)	6 (12.0)	2 (4.9)
WT1	42 (46.2)	12 (44.4)	30 (43.5)	36 (43.4)	6 (75.0)	10 (35.7)	32 (50.8)	20 (36.4)	22 (61.1)	25 (50.0)	17 (41.5)
CD44	25 (27.5)	8 (29.6)	17 (24.6)	24 (28.9)	1 (12.5)	7 (25.0)	18 (28.6)	14 (25.5)	11 (30.6)	17 (34.0)	8 (19.5)
GSTP1	18 (19.8)	6 (22.2)	12 (17.4)	16 (19.3)	2 (25.0)	8 (28.6)	10 (15.9)	15 (27.3)	3 (8.3)	11 (22.0)	7 (17.1)
ATM	6 (6.6)	4 (14.8)	2 (2.9)	5 (6.0)	1 (12.5)	4 (14.3)	2 (3.2)	5 (9.1)	1 (2.8)	4 (8.0)	2 (4.9)
IGSF4	29 (31.9)	9 (33.3)	20 (29.0)	26 (31.3)	3 (37.5)	8 (28.6)	21 (33.3)	19 (34.5)	10 (27.8)	13 (26.0)	16 (39.0)
CHFR	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (1.5)	1 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (2.8)	1 (2.0)	0 (0.0)
BRCA2	24 (26.4)	8 (29.6)	16 (23.2)	21 (25.3)	3 (37.5)	10 (35.7)	14 (22.2)	17 (30.9)	7 (19.4)	9 (18.0)	15 (36.6)
RB1	3 (3.3)	1 (3.7)	2 (2.9)	3 (3.6)	0 (0.0)	2 (7.1)	1 (1.6)	3 (5.5)	0 (0.0)	1 (2.0)	2 (4.9)
RB1-2	5 (5.5)	1 (3.7)	4 (5.8)	5 (6.0)	0 (0.0)	1 (3.6)	4 (6.4)	4 (7.3)	1 (2.8)	2 (4.0)	3 (7.3)
THBS1	11 (12.1)	4 (14.8)	7 (10.2)	9 (10.8)	2 (25.0)	3 (10.7)	8 (12.7)	8 (14.5)	3 (8.3)	5 (10.0)	6 (14.6)
PYCARD	11 (12.1)	5 (18.5)	6 (8.7)	9 (10.8)	2 (25.0)	4 (14.3)	7 (11.1)	10 (18.2)	1 (2.8)	6 (12.0)	5 (12.2)
CDH13	48 (52.8)	12 (44.4)	36 (52.2)	44 (53.0)	4 (50.0)	15 (53.6)	33 (52.4)	26 (47.3)	22 (61.1)	28 (56.0)	20 (48.8)
TP53	19 (21.9)	8 (29.6)	11 (15.9)	17 (20.5)	2 (25.0)	7 (25.0)	12 (19.1)	12 (21.8)	7 (19.4)	10 (20.0)	9 (22.0)
BRCA1	41 (45.1)	15 (55.6)	26 (37.7)	40 (48.2)	1 (12.5)	14 (50.0)	27 (42.9)	25 (45.5)	16 (44.4)	23 (46.0)	18 (43.9)
STK11	85 (93.4)	25 (92.6)	60 (87.0)	77 (92.8)	8 (100)	25 (89.3)	60 (5.2)	49 (89.1)	36 (100)	46 (92.0)	39 (95.1)
GATA5	39 (42.9)	13 (48.2)	26 (37.7)	33 (39.8)	6 (75.0)	11 (39.3)	28 (44.4)	24 (43.6)	15 (41.7)	22 (44.0)	17 (41.5)

Tabla 17. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en el grupo T1AG para un umbral de metilación de 0.3. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

Global IM > 0.3	Metilación global n=251 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=80	n=171	n=213	n=38	n=28	n=223	n=177	n=74	n=161	n=90
TP73	24 (9.6)	7 (8.8)	17 (9.9)	21 (9.9)	3 (7.9)	3 (10.7)	21 (9.4)	20 (11.3)	4 (5.4)	15 (9.3)	9 (10.0)
MSH6	115 (45.8)	33 (41.3)	82 (47.9)	94 (44.1)	21 (55.3)	11 (39.3)	104 (46.4)	80 (45.2)	35 (47.3)	72 (44.7)	43 (47.8)
VHL	18 (7.2)	4 (5.0)	14 (8.2)	15 (7.0)	3 (7.9)	4 (14.3)	14 (6.3)	13 (7.3)	5 (6.8)	7 (4.3)	11 (12.2)
RARB	158 (63.0)	53 (66.3)	105 (61.4)	136 (63.9)	22 (57.9)	12 (42.8)	146 (65.5)	117 (66.1)	41 (55.4)	101 (62.7)	57 (63.3)
ESR1	50 (19.9)	11 (13.8)	39 (22.8)	44 (20.7)	6 (15.8)	6 (21.4)	44 (19.7)	37 (20.9)	13 (17.6)	31 (19.3)	19 (21.1)
CDKN2A	14 (5.6)	2 (2.5)	12 (7.0)	11 (5.2)	3 (7.9)	1 (3.6)	13 (5.8)	10 (5.7)	4 (5.4)	7 (4.3)	7 (7.8)
PAX5A	85 (33.9)	17 (21.3)	68 (39.7)	74 (34.7)	11 (29.0)	11 (39.3)	74 (33.2)	55 (31.1)	30 (40.5)	51 (31.7)	34 (37.8)
PTEN	20 (8.0)	7 (8.8)	18 (10.5)	21 (9.9)	4 (10.5)	2 (7.1)	23 (10.3)	20 (11.3)	5 (6.8)	16 (9.9)	9 (10.0)
MGMT	43 (17.1)	11 (13.8)	32 (18.7)	37 (17.4)	6 (15.8)	4 (14.3)	39 (17.5)	31 (17.5)	12 (16.2)	24 (14.9)	19 (21.1)
MGMT-2	162 (64.5)	56 (70.0)	106 (62.0)	136 (63.9)	26 (68.4)	17 (60.7)	145 (65.0)	117 (66.1)	45 (60.8)	103 (64.0)	59 (65.6)
PAX6	22 (8.8)	3 (3.8)	19 (11.1)	21 (9.9)	1 (2.6)	1 (3.6)	21 (9.4)	12 (6.8)	10 (13.5)	15 (9.3)	7 (7.8)
WT1	126 (50.2)	34 (42.5)	92 (53.8)	104 (44.4)	22 (57.9)	10 (35.7)	116 (52.0)	83 (46.9)	43 (58.1)	83 (51.6)	43 (47.8)
CD44	139 (55.4)	48 (60.0)	91 (53.2)	120 (56.3)	19 (50.0)	7 (25.0)	132 (59.2)	98 (55.4)	41 (55.4)	96 (59.6)	43 (47.8)
GSTP1	112 (44.6)	36 (45.0)	76 (44.4)	92 (43.2)	20 (52.6)	8 (28.6)	104 (46.4)	86 (48.6)	26 (35.1)	75 (46.6)	37 (41.1)
ATM	24 (9.6)	6 (7.5)	18 (10.5)	20 (9.4)	4 (10.5)	4 (14.3)	20 (9.0)	20 (11.3)	4 (5.4)	16 (9.9)	8 (8.9)
IGSF4	56 (22.3)	19 (23.8)	37 (21.6)	48 (22.5)	9 (23.7)	8 (28.6)	48 (21.5)	39 (22.0)	17 (23.0)	30 (18.6)	26 (28.9)
CHFR	12 (4.8)	2 (2.5)	10 (5.8)	9 (4.2)	3 (7.9)	0 (0.0)	12 (5.4)	9 (5.1)	3 (4.1)	8 (5.0)	4 (4.4)
BRCA2	54 (21.5)	17 (21.3)	37 (21.6)	45 (21.1)	9 (23.7)	10 (35.7)	44 (19.7)	41 (23.2)	13 (17.6)	28 (17.4)	26 (28.9)
RB1	14 (5.6)	2 (2.5)	12 (7.0)	12 (5.6)	2 (5.3)	2 (7.1)	12 (5.4)	11 (6.2)	3 (4.1)	8 (5.0)	6 (6.7)
RB1-2	15 (6.0)	6 (7.5)	9 (5.3)	13 (6.1)	2 (5.3)	1 (3.6)	14 (6.3)	11 (6.2)	4 (5.4)	8 (5.0)	7 (7.8)
THBS1	22 (8.8)	5 (6.3)	17 (9.9)	19 (8.9)	3 (7.9)	3 (10.7)	19 (8.5)	17 (9.6)	5 (6.8)	8 (5.0)	14 (15.6)
PYCARD	131 (52.2)	45 (56.3)	86 (50.3)	111 (52.1)	19 (50.0)	4 (14.3)	127 (57.0)	99 (55.9)	32 (43.2)	86 (53.4)	45 (50.0)
CDH13	116 (46.2)	28 (35.0)	88 (51.4)	101 (47.4)	15 (39.5)	15 (53.6)	101 (45.3)	77 (43.5)	39 (52.7)	70 (43.5)	46 (51.1)
TP53	87 (34.7)	27 (33.8)	60 (35.1)	71 (33.3)	16 (42.1)	7 (25.0)	80 (35.9)	65 (36.7)	22 (29.7)	55 (34.2)	32 (35.6)
BRCA1	115 (45.8)	41 (51.3)	74 (43.3)	99 (46.5)	16 (42.1)	14 (50.0)	101 (45.3)	78 (44.1)	37 (50.0)	76 (47.2)	39 (43.3)
STK11	243 (96.8)	78 (97.5)	165 (96.4)	205 (96.2)	38 (100)	25 (89.3)	218 (97.8)	170 (96.0)	73 (98.7)	156 (96.9)	87 (96.7)
GATA5	158 (63.0)	52 (65.0)	106 (62.0)	131 (61.5)	27 (71.1)	11 (39.3)	147 (65.9)	110 (62.2)	48 (64.9)	101 (62.7)	57 (63.3)

Tabla 18. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en la serie completa para un umbral de metilación de 0.3. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

2.1.1 Tumores TaBG

Cuando comparamos los rangos de metilación de tumores unifocales frente a los multifocales se observó que únicamente los genes MGMT2 ($p=0.034$) y GATA5 ($p=0.03$) se asociaban de manera significativa con la multifocalidad.

Del mismo modo, la hipermetilación de PAX5A ($p=0.003$) se observó que se encontraba significativamente relacionada con la edad de tal manera que está más frecuentemente metilado en los pacientes de 65 años o más.

El resto de genes no se encontraron relacionados con ninguna de las características clínico-patológicas. A continuación se recogen las asociaciones encontradas entre la metilación y las características clínico-patológicas clásicas [Tabla 19].

ASOCIACIÓN	GEN	p
Edad	PAX5A	0.003
Multifocalidad	MGMT2	0.034
	GATA5	0.03

Tabla 19. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en el grupo TaBG para un índice de metilación >0.3

2.1.2 Tumores T1BG

En el caso de los tumores de bajo grado pero que invaden el tejido conectivo subepitelial (T1) se objetivó un mayor número de asociaciones [Tabla 20]. Cuando se compararon los porcentajes de metilación en relación a la edad se observó que los genes PAX6 ($p=0.01$) y CDH13 ($p=0.031$) se encontraban más frecuentemente metilados en los mayores de 65 años. Por otra parte, se encontró asociación estadísticamente significativa con el sexo masculino para RARB ($p=0.019$), CD44 ($p=0.017$), PYCARD ($p=0.023$) y GATA5 ($p=0.023$).

También se encontró asociación con el tamaño tumoral mayor o igual de 3 cm para BRCA1 ($p=0,042$) y con la multifocalidad para los genes RARB ($p=0.024$), THBS1 ($p=0.024$) y CDH13 ($p=0.03$).

ASOCIACIÓN	GEN	p
Edad	PAX6	0.01
	CDH13	0.031
Sexo	RARB	0.019
	CD44	0.017
	PYCARD	0.023
	GATA5	0.023
Tamaño	BRCA1	0.042
Multifocalidad	RARB	0.024
	THBS1	0.024
	CDH13	0.03

Tabla 20. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en el grupo TIBG para un índice de metilación >0.3

2.1.3 Tumores T1AG

Al analizar la posible asociación de la metilación de cada uno de los genes con el tamaño se observó que el GSTP1 ($p=0.023$) y el PYCARD ($p=0.025$) se relacionaban con tumores menores de 3cm mientras que STK11 ($p=0.042$) lo hacía con tumores mayores. Además, se encontraron asociaciones significativas cuando comparamos los índices de metilación en tumores unifocales versus multifocales. De este modo, la hipermetilación de VHL ($p=0.031$) y BRCA2 ($p=0.039$) se relacionó con tumores múltiples [Tabla 21].

ASOCIACIÓN	GEN	p
Tamaño	GSTP1	0.023
	PYCARD	0.025
	STK11	0.042
Multifocalidad	VHL	0.031
	BRCA2	0.039

Tabla 21. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en el grupo T1AG para un índice de metilación >0. En azul se reflejan los genes asociados con variables de menor agresividad (tumores menores de 3 cm)

2.1.4 Serie global

Cuando se tuvo en cuenta el total de pacientes de nuestra serie ($n=251$), además de las características clínico-patológicas valoradas en cada subgrupo (edad, sexo, presencia de *Cis*, tamaño y multifocalidad) se analizaron el grado y el estadio [Tabla 22]. De esta

manera, cuando comparamos el índice de metilación de Ta frente a T1 observamos que la hipermetilación ($IM > 0.3$) de RARB ($p=0.027$), CD44 ($p=0.002$), GSTP1 ($p < 0.001$), PYCARD ($p < 0.001$), TP53 ($p=0.001$) y GATA5 ($p=0.001$) presentó una asociación significativa con la existencia de un estadio no invasivo (Ta), mientras que la de PAX5A ($p=0.018$), IGSF4 ($p < 0.001$) y CDH13 ($p=0.028$) se asoció con un estadio T1.

Cuando se analizaron únicamente los tumores T1 (de bajo y de alto grado), se objetivó una asociación estadística con bajo grado para los genes RARB ($p < 0.001$), CDKN2A ($p=0.033$), PTEN ($p=0.007$), MGMT ($p=0.016$), CD44 ($p < 0.001$), GSTP1 ($p < 0.001$), CHFR ($p=0.005$), PYCARD ($p < 0.001$), TP53 ($p=0.022$) y GATA5 ($p < 0.001$). También se reagruparon los tumores de bajo grado en únicos y en multifocales, observándose que la hipermetilación de MGMT2 ($p=0.046$) y THBS1 ($p=0.004$) se asociaba a tumores múltiples.

En relación al grado, la hipermetilación de IGSF4 ($p=0.005$) y CHFR ($p=0.032$) se asoció a tumores de alto grado, mientras que RARB ($p < 0.001$), CD44 ($p < 0.001$), GSTP1 ($p < 0.001$), PYCARD ($p < 0.001$), TP53 ($p < 0.001$), STK11 ($p=0.028$) y GATA5 ($p < 0.001$) se asociaron a tumores de bajo grado.

Al estudiar los tumores de bajo grado por separado (Ta y T1), se advirtió una asociación estadística de la hipermetilación de TP73 ($p=0.035$), PAX5A ($p=0.027$), PTEN ($p=0.017$), MGMT ($p=0.044$), IGSF4 ($p=0.008$), CHFR ($p=0.031$) y CDH13 ($p=0.08$) con los tumores T1.

Otros factores que presentaron significación estadística con la hipermetilación de los genes fueron la ausencia de *Cis* para RARB ($p=0.018$), CD44 ($p=0.001$), PYCARD ($p < 0.001$), STK11 ($p=0.048$) y GATA5 ($p=0.006$) y el tamaño inferior a 3 cm para GSTP1 ($p=0.034$) y PYCARD ($p=0.045$).

Cuando comparamos los rangos de metilación en tumores unifocales versus multifocales, se observó que la hipermetilación de CD44 ($p=0.047$) se asociaba con tumores únicos, mientras que cuando los genes hipermetilados eran VHL ($p=0.021$), IGSF4 ($p=0.044$), BRCA2 ($p=0.034$) y THBS1 ($p=0.05$) se encontraban al menos dos neoformaciones tumorales (tumores múltiples).

ASOCIACIÓN	GEN	p
Estadio	RARB	0.027
	CD44	0.002
	PAX5A	0.018
	GSTP1	<0.001
	IGSF4	<0.001
	PYCARD	<0.001
	CDH13	0.028
	TP53	0.001
	GATA5	0.001
Grado	RARB	<0.001
	CD44	<0.001
	GSTP1	<0.001
	IGSF4	0.005
	CHFR	0.032
	PYCARD	<0.001
	TP53	<0.001
	STK11	0.028
	GATA5	<0.001
Cis asociado	RARB	0.018
	CD44	0.001
	PYCARD	<0.001
	STK11	0.048
	GATA5	0.006
Tamaño	GSTP1	0.034
	PYCARD	0.045
Multifocalidad	VHL	0.021
	CD44	0.047
	IGSF4	0.044
	BRCA2	0.034
	THBS1	0.05

Tabla 22. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en la serie global para un índice de metilación >0.3. En azul se reflejan los genes asociados con variables de menor agresividad (Ta, BG, ausencia de Cis, tamaño menor de 3 cm y tumores únicos)

2.2 Metilación Mayor de 0.5

Del mismo modo, se realizó el análisis para un IM mayor de 0.5 [Tablas 23, 24, 25 y 26].

TaBG IM > 0.5	Metilación global n=79 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=25	n=54	n=64	n=15	n=0	n=79	n=67	n=12	n=60	n=19
TP73	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
MSH6	14 (17.7)	4 (16.0)	10 (18.5)	10 (15.6)	4 (26.7)	0 (0.0)	14 (17.7)	12 (17.9)	2 (16.7)	9 (15.0)	5 (26.3)
VHL	3 (3.8)	1 (4.0)	2 (3.7)	3 (4.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.8)	2 (3.0)	1 (8.3)	2 (3.3)	1 (5.3)
RARB	49 (62.0)	17 (68.0)	32 (59.3)	40 (62.5)	9 (60.0)	0 (0.0)	49 (62.0)	44 (65.7)	5 (41.7)	34 (56.7)	15 (79.0)
ESR1	5 (6.3)	0 (0.0)	5 (9.3)	5 (7.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (6.3)	4 (6.0)	1 (8.3)	1 (1.7)	4 (21.1)
CDKN2A	3 (3.8)	1 (4.0)	2 (3.7)	3 (4.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.8)	3 (4.5)	0 (0.0)	1 (1.7)	2 (10.5)
PAX5A	5 (6.3)	0 (0.0)	5 (9.3)	4 (6.3)	1 (6.7)	0 (0.0)	5 (6.3)	4 (6.0)	1 (8.3)	2 (3.3)	3 (15.8)
PTEN	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (1.9)	0 (0.0)	1 (6.7)	0 (0.0)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (5.3)
MGMT	4 (5.1)	0 (0.0)	4 (7.4)	3 (4.7)	1 (6.7)	0 (0.0)	4 (5.1)	4 (6.0)	0 (0.0)	3 (5.0)	1 (5.3)
MGMT-2	44 (55.7)	16 (64.0)	28 (51.9)	37 (57.8)	7 (46.7)	0 (0.0)	44 (55.7)	39 (58.2)	5 (41.7)	29 (48.3)	15 (79.0)
PAX6	2 (2.5)	1 (4.0)	1 (1.9)	2 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.5)	2 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.5)
WT1	25 (31.6)	7 (28.0)	18 (33.3)	21 (32.8)	4 (26.7)	0 (0.0)	25 (31.6)	21 (31.3)	4 (33.3)	18 (30.0)	7 (36.8)
CD44	45 (57.0)	15 (60.0)	30 (55.6)	36 (56.3)	9 (60.0)	0 (0.0)	45 (57.0)	38 (56.7)	7 (58.3)	31 (51.7)	14 (73.7)
GSTP1	41 (51.9)	12 (48.0)	29 (53.7)	33 (51.6)	8 (53.3)	0 (0.0)	41 (51.9)	36 (53.7)	5 (41.7)	28 (46.7)	13 (68.4)
ATM	4 (5.1)	0 (0.0)	4 (7.4)	2 (3.1)	2 (13.3)	0 (0.0)	4 (5.1)	3 (4.5)	1 (8.3)	1 (1.7)	3 (15.8)
IGSF4	6 (7.6)	1 (4.0)	5 (9.3)	5 (7.8)	1 (6.7)	0 (0.0)	6 (7.6)	5 (7.5)	1 (8.3)	4 (6.7)	2 (10.5)
CHFR	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
BRCA2	6 (7.6)	1 (4.0)	5 (9.3)	6 (9.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (7.6)	5 (7.5)	1 (8.3)	3 (5.0)	3 (15.8)
RB1	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (1.9)	1 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (8.3)	1 (1.7)	0 (0.0)
RB1-2	2 (2.5)	1 (4.0)	1 (1.9)	2 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.5)	1 (1.5)	1 (8.3)	2 (3.3)	0 (0.0)
THBS1	2 (2.5)	0 (0.0)	2 (3.7)	2 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.5)	1 (1.5)	1 (8.3)	1 (1.7)	1 (5.3)
PYCARD	57 (72.2)	20 (80.0)	37 (68.5)	47 (73.4)	10 (66.7)	0 (0.0)	57 (72.2)	51 (76.1)	6 (50.0)	41 (68.3)	16 (84.2)
CDH13	14 (17.7)	5 (20.0)	9 (16.7)	11 (17.2)	3 (20.0)	0 (0.0)	14 (17.7)	11 (16.4)	3 (25.0)	9 (15.0)	5 (26.3)
TP53	32 (40.5)	8 (32.0)	24 (44.4)	25 (39.1)	7 (46.7)	0 (0.0)	32 (40.5)	27 (40.3)	5 (41.7)	24 (40.0)	8 (42.1)
BRCA1	31 (39.2)	9 (36.0)	22 (40.7)	26 (40.6)	5 (33.3)	0 (0.0)	31 (39.2)	26 (38.8)	5 (41.7)	24 (40.0)	7 (36.8)
STK11	77 (97.5)	25 (100)	52 (96.3)	62 (96.9)	15 (100)	0 (0.0)	77 (97.5)	65 (97.0)	12 (100)	60 (100)	17 (89.5)
GATA5	56 (70.9)	18 (72.0)	38 (70.4)	43 (67.2)	13 (86.7)	0 (0.0)	56 (70.9)	48 (71.6)	8 (66.7)	38 (63.3)	18 (94.7)

Tabla 23. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en el grupo TaBG para un umbral de metilación de 0.5. En rojo se reflejan aquellos genes que presenta una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

T1BG IM > 0.5	Metilación global n=81 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=28	n=53	n=66	n=15	n=0	n=81	n=55	N26	n=51	n=30
TP73	1 (1.2)	0 (0.0)	1 (18.9)	1 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.2)	1 (1.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.3)
MSH6	16 (19.8)	4 (14.3)	12 (22.6)	13 (19.7)	3 (20.0)	0 (0.0)	16 (19.8)	11 (20.0)	5 (19.2)	10 (19.6)	6 (20.0)
VHL	2 (2.5)	1 (3.6)	1 (18.9)	2 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.5)	1 (1.8)	1 (3.9)	0 (0.0)	2 (6.7)
RARB	46 (56.8)	14 (50.0)	32 (60.4)	39 (59.1)	7 (46.7)	0 (0.0)	46 (56.8)	27 (49.1)	19 (73.1)	28 (54.9)	18 (60.0)
ESR1	8 (9.9)	2 (7.1)	6 (11.3)	7 (10.6)	1 (6.7)	0 (0.0)	8 (9.9)	5 (9.1)	3 (11.5)	6 (11.8)	2 (6.7)
CDKN2A	3 (3.7)	0 (0.0)	3 (5.7)	3 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.7)	2 (3.6)	1 (3.9)	2 (3.9)	1 (3.3)
PAX5A	14 (17.3)	3 (10.7)	11 (20.8)	13 (19.7)	1 (6.7)	0 (0.0)	14 (17.3)	8 (14.5)	6 (23.1)	9 (17.7)	5 (16.7)
PTEN	9 (11.1)	3 (10.7)	6 (11.3)	6 (9.1)	3 (20.0)	0 (0.0)	9 (11.1)	6 (10.9)	3 (11.5)	6 (11.8)	3 (10.0)
MGMT	14 (17.3)	4 (14.3)	10 (18.9)	12 (18.2)	2 (13.3)	0 (0.0)	14 (17.3)	9 (16.4)	5 (19.2)	6 (11.8)	8 (26.7)
MGMT-2	46 (56.8)	16 (57.1)	30 (56.6)	37 (56.1)	9 (60.0)	0 (0.0)	46 (56.8)	29 (52.7)	17 (65.4)	26 (51.0)	20 (66.7)
PAX6	6 (7.4)	0 (0.0)	6 (11.3)	6 (9.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (7.4)	5 (9.1)	1 (3.9)	4 (7.8)	2 (6.7)
WT1	21 (25.9)	1 (3.6)	20 (37.7)	20 (30.3)	1 (6.7)	0 (0.0)	21 (25.9)	16 (29.1)	5 (19.2)	12 (23.5)	9 (30.0)
CD44	42 (51.9)	13 (46.4)	29 (54.7)	36 (54.5)	6 (40.0)	0 (0.0)	42 (51.9)	23 (41.8)	19 (73.1)	27 (52.9)	15 (50.0)
GSTP1	39 (48.2)	11 (39.3)	28 (52.8)	30 (45.5)	9 (60.0)	0 (0.0)	39 (48.2)	25 (45.5)	14 (53.9)	25 (49.0)	14 (46.7)
ATM	8 (9.9)	2 (7.1)	6 (11.3)	7 (10.6)	1 (6.7)	0 (0.0)	8 (9.9)	6 (10.9)	2 (7.7)	6 (11.8)	2 (6.7)
IGSF4	11 (13.6)	5 (17.9)	6 (11.3)	9 (13.6)	2 (13.3)	0 (0.0)	11 (13.6)	9 (16.4)	2 (7.7)	6 (11.8)	5 (16.7)
CHFR	5 (6.2)	0 (0.0)	5 (9.4)	3 (4.5)	2 (13.3)	0 (0.0)	5 (6.2)	5 (9.1)	0 (0.0)	3 (5.9)	2 (6.7)
BRCA2	11 (13.6)	3 (10.7)	8 (15.1)	9 (13.6)	2 (13.3)	0 (0.0)	11 (13.6)	9 (16.4)	2 (7.7)	6 (11.8)	5 (16.7)
RB1	2 (2.5)	0 (0.0)	2 (3.8)	2 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.5)	1 (1.8)	1 (3.9)	10 (19.6)	1 (3.3)
RB1-2	3 (3.7)	2 (7.1)	1 (18.9)	2 (3.0)	1 (6.7)	0 (0.0)	3 (3.7)	2 (3.6)	1 (3.9)	2 (3.9)	1 (3.3)
THBS1	4 (4.9)	1 (3.6)	3 (5.7)	4 (6.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (4.9)	3 (5.5)	1 (3.9)	10 (19.6)	3 (10.0)
PYCARD	45 (55.6)	15 (53.6)	30 (56.6)	39 (59.1)	6 (40.0)	0 (0.0)	45 (55.6)	25 (45.5)	20 (76.9)	26 (51.0)	19 (63.3)
CDH13	29 (35.8)	7 (25.0)	22 (41.5)	24 (36.4)	5 (33.3)	0 (0.0)	29 (35.8)	19 (34.5)	10 (38.5)	13 (25.5)	16 (53.3)
TP53	23 (28.4)	6 (21.4)	17 (32.1)	18 (27.3)	5 (33.3)	0 (0.0)	23 (28.4)	17 (30.9)	6 (23.1)	13 (25.5)	10 (33.3)
BRCA1	28 (34.6)	9 (32.1)	19 (35.9)	22 (33.3)	6 (40.0)	0 (0.0)	28 (34.5)	17 (30.9)	11 (42.3)	16 (31.4)	12 (40.0)
STK11	76 (93.8)	26 (92.9)	50 (94.3)	61 (92.4)	15 (100)	0 (0.0)	76 (93.8)	53 (96.4)	23 (88.5)	48 (94.1)	28 (93.3)
GATA5	46 (56.8)	18 (64.3)	28 (52.8)	39 (59.1)	7 (46.7)	0 (0.0)	46 (56.8)	27 (49.1)	19 (73.1)	28 (54.9)	18 (60.0)

Tabla 24. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en el grupo T1BG para un umbral de metilación de 0.5. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

T1AG IM > 0.5	Metilación global n=91 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=27	n=64	n=83	n=8	n=28	n=63	n=55	n=36	n=50	n=41
TP73	5 (5.5)	2 (7.4)	3 (4.4)	5 (6.0)	0 (0.0)	4 (14.3)	1 (1.6)	4 (7.3)	1 (2.8)	3 (6.0)	2 (4.9)
MSH6	15 (16.5)	8 (29.6)	7 (10.1)	14 (16.9)	1 (12.5)	7 (25.0)	8 (12.7)	10 (18.2)	5 (13.9)	10 (20.0)	5 (12.2)
VHL	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
RARB	26 (28.6)	8 (29.6)	18 (26.1)	23 (27.7)	3 (37.5)	9 (32.1)	17 (27.0)	17 (30.9)	9 (25.0)	14 (28.0)	12 (29.3)
ESR1	4 (4.4)	1 (3.7)	3 (4.4)	4 (4.8)	0 (0.0)	2 (7.1)	2 (3.2)	3 (5.5)	1 (2.8)	3 (6.0)	1 (2.4)
CDKN2A	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
PAX5A	19 (20.9)	6 (22.2)	13 (18.8)	16 (19.3)	3 (37.5)	7 (25.0)	12 (19.0)	10 (18.2)	9 (25.0)	11 (22.0)	8 (19.5)
PTEN	1 (1.1)	1 (3.7)	0 (0.0)	1 (1.2)	0 (0.0)	1 (3.6)	0 (0.0)	1 (1.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.4)
MGMT	5 (5.5)	2 (7.4)	3 (4.4)	5 (6.0)	0 (0.0)	2 (7.1)	3 (4.8)	4 (7.3)	1 (2.8)	2 (4.0)	3 (7.3)
MGMT-2	50 (54.9)	16 (59.3)	34 (49.3)	46 (55.4)	4 (50.0)	14 (50.0)	36 (57.1)	30 (54.5)	20 (55.5)	30 (60.0)	20 (48.8)
PAX6	6 (6.6)	1 (3.7)	5 (7.3)	6 (7.2)	0 (0.0)	1 (3.6)	5 (7.9)	2 (3.6)	4 (11.1)	5 (10.0)	1 (2.4)
WT1	24 (26.4)	6 (22.2)	18 (26.1)	19 (22.9)	5 (62.5)	7 (25.0)	17 (27.0)	8 (14.5)	16 (44.4)	13 (26.0)	11 (26.8)
CD44	19 (20.9)	7 (25.9)	12 (17.4)	18 (21.7)	1 (12.5)	7 (25.0)	12 (19.0)	11 (20.0)	8 (22.2)	14 (28.0)	5 (12.2)
GSTP1	12 (13.2)	5 (18.5)	7 (10.1)	10 (12.1)	2 (25.0)	7 (25.0)	5 (7.9)	11 (20.0)	1 (2.8)	7 (14.0)	5 (12.2)
ATM	3 (3.3)	2 (7.4)	1 (1.5)	2 (2.4)	1 (12.5)	3 (10.7)	0 (0.0)	2 (3.6)	1 (2.8)	2 (4.0)	1 (2.4)
IGSF4	11 (12.1)	4 (14.8)	7 (10.1)	9 (10.8)	2 (25.0)	6 (21.4)	5 (7.9)	8 (14.5)	3 (8.3)	5 (10.0)	6 (14.6)
CHFR	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (1.5)	1 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (2.8)	1 (2.0)	0 (0.0)
BRCA2	13 (14.3)	6 (22.2)	7 (10.1)	12 (14.5)	1 (12.5)	5 (17.9)	8 (12.7)	10 (18.2)	3 (8.3)	6 (12.0)	7 (17.0)
RB1	2 (2.2)	0 (0.0)	2 (2.9)	2 (2.4)	0 (0.0)	1 (3.6)	1 (1.6)	2 (3.6)	0 (0.0)	1 (2.0)	1 (2.4)
RB1-2	3 (3.3)	0 (0.0)	3 (4.4)	3 (3.6)	0 (0.0)	1 (3.6)	2 (3.2)	3 (5.5)	0 (0.0)	2 (4.0)	1 (2.4)
THBS1	6 (6.6)	3 (11.1)	3 (4.4)	6 (7.2)	0 (0.0)	1 (3.6)	5 (7.9)	5 (9.1)	1 (2.8)	3 (6.0)	3 (7.3)
PYCARD	6 (6.6)	2 (7.4)	4 (5.8)	4 (4.8)	2 (25.0)	3 (10.7)	3 (4.8)	5 (9.1)	1 (2.8)	5 (10.0)	1 (2.4)
CDH13	34 (37.4)	8 (29.6)	26 (37.7)	30 (36.1)	4 (50.0)	11 (39.3)	23 (36.5)	16 (29.1)	18 (50.0)	19 (38.0)	15 (36.8)
TP53	12 (13.2)	6 (22.2)	6 (8.7)	10 (12.1)	2 (25.0)	6 (21.4)	6 (9.5)	7 (12.7)	5 (13.9)	8 (16.0)	4 (9.8)
BRCA1	31 (34.1)	12 (44.4)	19 (27.5)	30 (36.1)	1 (12.5)	11 (39.3)	20 (31.7)	18 (32.7)	13 (36.1)	18 (36.0)	13 (31.7)
STK11	80 (87.9)	23 (85.2)	57 (82.6)	73 (88.0)	7 (87.5)	23 (82.1)	57 (90.5)	46 (83.6)	34 (94.4)	44 (88.0)	36 (87.8)
GATA5	20 (22.0)	8 (29.6)	12 (17.4)	17 (20.5)	3 (37.5)	8 (28.6)	12 (19.0)	13 (23.6)	7 (19.4)	10 (20.0)	10 (24.4)

Tabla 25. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en el grupo T1AG para un umbral de metilación de 0.5. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

Global IM > 0.5	Metilación global n=251 (%)	Edad (%)		Sexo (%)		Cis asociado		Tamaño (%)		Multifocalidad (%)	
		<65 años	≥65 años	Varón	Mujer	Si	No	<3 cm	≥3 cm	1 tm	≥2 tm
		n=80	n=171	n=213	n=38	n=28	n=223	n=177	n=74	n=161	n=90
TP73	6 (2.4)	2 (2.5)	4 (2.3)	6 (2.8)	0 (0.0)	1 (3.6)	5 (2.2)	5 (2.8)	1 (1.4)	3 (1.9)	3 (3.3)
MSH6	45 (17.9)	16 (20.0)	29 (17.0)	37 (17.4)	8 (21.1)	7 (25.0)	38 (17.0)	33 (18.6)	12 (16.2)	29 (18.0)	16 (17.8)
VHL	5 (2.0)	1 (1.3)	3 (1.8)	5 (2.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.2)	3 (1.7)	2 (2.7)	2 (1.2)	3 (3.3)
RARB	121 (48.2)	39 (48.8)	82 (48.0)	102 (47.9)	19 (50.0)	9 (32.1)	112 (50.2)	88 (49.7)	33 (44.6)	76 (47.2)	45 (50.0)
ESR1	17 (6.8)	3 (3.8)	14 (8.2)	16 (7.5)	1 (2.6)	2 (7.1)	15 (6.7)	12 (6.8)	5 (6.8)	10 (6.2)	7 (7.8)
CDKN2A	6 (2.4)	1 (1.3)	5 (2.9)	6 (2.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (2.7)	5 (2.8)	1 (1.4)	3 (1.9)	3 (3.3)
PAX5A	38 (15.1)	9 (11.3)	2 (17.0)	33 (15.5)	5 (13.2)	7 (25.0)	31 (13.9)	22 (12.4)	16 (21.6)	22 (13.7)	16 (17.8)
PTEN	11 (4.4)	4 (5.0)	7 (4.1)	7 (3.3)	4 (10.5)	1 (3.6)	10 (4.5)	7 (4.0)	4 (5.4)	6 (3.7)	5 (5.6)
MGMT	23 (9.2)	6 (7.5)	17 (9.9)	20 (9.4)	3 (7.9)	2 (7.1)	21 (9.4)	17 (9.6)	6 (8.1)	11 (6.8)	12 (13.3)
MGMT-2	140 (55.8)	48 (60.0)	92 (53.8)	120 (56.3)	20 (52.6)	14 (50.0)	126 (56.5)	98 (55.4)	42 (56.8)	85 (53.3)	55 (61.1)
PAX6	14 (5.6)	2 (2.5)	12 (7.0)	14 (6.6)	0 (0.0)	1 (3.6)	13 (5.8)	9 (5.1)	5 (6.8)	9 (5.6)	5 (5.6)
WT1	70 (27.9)	14 (17.5)	56 (32.8)	60 (28.2)	10 (26.3)	7 (25.0)	63 (28.3)	45 (25.4)	25 (33.8)	43 (26.7)	27 (30.0)
CD44	106 (42.2)	35 (43.8)	71 (41.5)	90 (42.3)	16 (42.1)	7 (25.0)	99 (44.4)	72 (40.7)	34 (45.9)	72 (44.7)	34 (37.8)
GSTP1	92 (36.7)	28 (35.0)	64 (37.4)	73 (34.3)	19 (50.0)	7 (25.0)	85 (38.1)	72 (40.7)	20 (27.3)	60 (37.3)	32 (35.6)
ATM	15 (6.0)	4 (5.0)	11 (6.4)	11 (5.2)	4 (10.5)	3 (10.7)	12 (5.4)	11 (6.2)	4 (5.4)	9 (5.6)	6 (6.7)
IGSF4	28 (11.2)	10 (12.5)	18 (10.5)	23 (10.8)	5 (13.2)	6 (21.4)	22 (9.9)	22 (12.4)	6 (8.1)	15 (9.3)	13 (14.4)
CHFR	6 (2.4)	0 (0.0)	6 (3.5)	4 (1.9)	2 (5.3)	0 (0.0)	6 (2.7)	5 (2.8)	1 (1.4)	4 (2.5)	2 (2.2)
BRCA2	30 (12.0)	10 (12.5)	20 (11.7)	27 (12.7)	3 (7.9)	5 (17.9)	25 (11.2)	24 (13.6)	6 (8.1)	5 (9.3)	15 (16.7)
RB1	5 (2.0)	0 (0.0)	5 (2.9)	5 (2.4)	0 (0.0)	1 (3.6)	4 (1.8)	3 (1.7)	1 (1.3)	3 (1.9)	2 (2.2)
RB1-2	8 (3.2)	3 (3.8)	5 (2.9)	7 (3.3)	1 (2.6)	1 (3.6)	7 (3.1)	6 (3.4)	2 (2.7)	6 (3.7)	2 (2.2)
THBS1	12 (4.8)	4 (5.0)	8 (4.7)	12 (5.6)	0 (0.0)	1 (3.6)	11 (4.9)	9 (5.1)	3 (4.1)	5 (9.3)	7 (7.8)
PYCARD	108 (43.0)	37 (46.3)	71 (41.5)	90 (42.3)	18 (47.4)	3 (10.7)	105 (47.1)	81 (45.8)	27 (36.5)	72 (44.7)	36 (40.0)
CDH13	77 (30.7)	20 (25.0)	57 (33.3)	65 (30.5)	12 (31.6)	11 (39.3)	66 (29.6)	46 (26.0)	31 (41.9)	41 (25.5)	36 (40.0)
TP53	67 (26.7)	20 (25.0)	47 (27.5)	53 (24.9)	14 (36.8)	6 (2.4)	61 (27.4)	51 (28.8)	16 (21.6)	45 (28.0)	22 (24.4)
BRCA1	90 (35.9)	30 (37.5)	60 (35.1)	78 (36.6)	12 (31.6)	11 (39.3)	79 (35.4)	61 (34.5)	29 (39.2)	58 (36.0)	32 (35.6)
STK11	233 (92.8)	74 (82.5)	159 (93.0)	196 (92.0)	37 (97.4)	23 (82.1)	210 (94.2)	164 (92.7)	69 (93.2)	152 (94.4)	81 (90.0)
GATA5	122 (48.6)	44 (55.0)	78 (45.6)	99 (46.5)	23 (60.5)	8 (28.6)	114 (51.1)	88 (49.7)	34 (45.9)	76 (47.2)	46 (51.1)

Tabla 26. Número y porcentaje de pacientes que presentan metilado cada uno de los genes a nivel global y divididos según cada una de las variables clínico-patológicas en la serie completa para un umbral de metilación de 0.5. En rojo se reflejan aquellos genes que presentan una frecuencia de metilación mayor del 30%. En amarillo se destacan las asociaciones estadísticamente significativas

2.2.1 Tumores TaBG

Cuando comparamos el rango de metilación de cada uno de los genes en el grupo de tumores no invasivos de bajo grado para cada una de las características clínico-patológicas se obtuvo, únicamente, una asociación significativa entre ESR1 ($p=0.011$), MGMT2 ($p=0.017$), ATM ($p=0.041$) y GATA5 ($p=0.006$) y la presencia de al menos dos neoformaciones [Tabla 27].

ASOCIACIÓN	GEN	p
Multifocalidad	ESR1	0.011
	MGMT2	0.017
	ATM	0.041
	GATA5	0.006

Tabla 27. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en el grupo TaBG para un índice de metilación >0.5

2.2.2 Tumores T1BG

En los tumores que invaden el tejido conectivo subepitelial (T1) de bajo grado se observaron diferencias significativas para la edad menor de 65 años cuando el índice de metilación de WT1 ($p<0.001$) era mayor de 0.5; para el tamaño con RARB ($p=0.035$), CD44 ($p=0.008$) y GATA5 ($p=0.035$) relacionándose con tumores de 3 cm o más y, por último, se encontró una significación estadística entre CDH13 ($p=0.011$) y la existencia de más de un tumor [Tabla 28].

ASOCIACIÓN	GEN	p
Edad	WT1	<0.001
Tamaño	RARB	0.035
	CD44	0.008
	GATA5	0.035
Multifocalidad	CDH13	0.011

Tabla 28. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en el grupo T1BG para un índice de metilación >0.5 . Dentro de la edad, se refleja en verde la asociación con menos de 65 años

2.2.3 Tumores T1AG

Dentro de los tumores de alto grado se encontraron diversas asociaciones significativas entre metilación (IM > 0.5) y factores clínico-patológicos [Tabla 29]. Cuando la metilación de MSH6 se encontró por encima del umbral de 0.5 se asoció a una edad al diagnóstico inferior a 65 años (p=0.033). Por su parte, la hipermetilación de WT1 (p=0.028) se asoció al sexo femenino y la de ATM (p=0.027) a la presencia de *Cis*. Cuando comparamos los rangos de metilación en relación al tamaño, WT1 (p=0.002) y CDH13 (p=0.037) se asociaron a tumores ≥ 3 cm, mientras que GSTP1 (p=0.015) se asoció a tumores menores.

ASOCIACIÓN	GEN	p
Edad	MSH6	0.033
Sexo	WT1	0.028
Cis asociado	ATM	0.027
Tamaño	WT1	0.002
	GSTP1	0.015
	CDH13	0.037

Tabla 29. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en el grupo T1AG para un índice de metilación >0.5. Dentro de la edad y sexo se refleja en verde la asociación con menos de 65 años y sexo femenino, respectivamente. En azul se reflejan los genes asociados con variables de menor agresividad (tamaño menor de 3 cm)

2.2.4 Serie global

Cuando se analizó el número total de pacientes de la serie (n=251), además de las características clínico-patológicas valoradas en los subgrupos (edad, sexo, presencia de *Cis*, tamaño y multifocalidad), se estudió el grado y el estadio [Tabla 30], al igual que cuando tomamos el umbral de 0.3. De esta manera, cuando comparamos el rango de metilación de Ta frente a T1, observamos que la hipermetilación de RARB (p=0.002), CD44 (p=0.002), GSTP1 (p=0.001), PYCARD (p<0.001), TP53 (p=0.001), STK11 (p=0.041) y GATA5 (p<0.001) presentaba una asociación estadísticamente significativa con el estadio no invasivo (Ta). Por el contrario, la hipermetilación por encima de 0.5 de PAX5A (p=0.005) y CDH13 (p=0.002) se asoció con el estadio T1.

En relación al grado también se encontraron asociaciones. La hipermetilación de TP73 (p=0.025) y PAX5A (p=0.043) se asoció a tumores de alto grado, mientras que en

el caso de RARB ($p<0.001$), PTEN ($p=0.048$), CD44 ($p<0.001$), GSTP1($p<0.001$), PYCARD ($p<0.001$), TP53 ($p<0.001$), STK11 ($p=0.023$) y GATA5 ($p<0.001$) se asoció a tumores de bajo grado.

Otros factores que presentaron significación estadística con la hipermetilación ($IM>0.5$) de algunos genes fueron la ausencia de *Cis* para RARB ($p=0.053$), CD44 ($p=0.037$), PYCARD ($p<0.001$), STK11 ($p=0.037$) y GATA5 ($p=0.019$), el tamaño inferior a 3 cm para GSTP1 ($p=0.027$) y superior para CDH13 ($p=0.01$) y la multifocalidad para CDH13 ($p=0.013$).

ASOCIACIÓN	GEN	p
Estadio	RARB	0.002
	CD44	0.002
	PAX5A	0.005
	GSTP1	0.001
	PYCARD	<0.001
	CDH13	0.002
	TP53	0.001
	STK11	0.041
	GATA5	<0.001
Grado	TP73	0.025
	RARB	<0.001
	PAX5A	0.043
	PTEN	0.048
	CD44	<0.001
	GSTP1	<0.001
	PYCARD	<0.001
	TP53	<0.001
	STK11	0.023
GATA5	<0.001	
Cis asociado	RARB	0.053
	CD44	0.037
	PYCARD	<0.001
	STK11	0.037
	GATA5	0.019
Tamaño	GSTP1	0.027
	CDH13	0.01
Multifocalidad	CDH13	0.013

Tabla 30. Asociación entre características clínico-patológicas y genes en la serie global para un índice de metilación >0.5 . En azul se reflejan los genes asociados con variables de menor agresividad (Ta, BG, ausencia de Cis y tamaño menor de 3 cm)

2.3 Comparación de ambos índices de metilación

Para facilitar la comprensión, en este apartado se resumen las asociaciones significativas en cada uno de los subgrupos, tanto para IM>0.3 como para IM>0.5. Por una parte se comparan los umbrales de metilación en función de las variables clínico-patológica en los diferentes subgrupos de tumores [Tabla 31] mientras por otro se comparan dichos umbrales para estadio y grado en la serie global [Tabla 32].

	TUMORES TaBG		TUMORES T1BG		TUMORES T1AG		SERIE GLOBAL	
	IM > 0.3	IM > 0.5	IM > 0.3	IM > 0.5	IM > 0.3	IM > 0.5	IM > 0.3	IM > 0.5
EDAD						MSH6		
	PAX5A							
			PAX6					
				WT1				
SEXO			CDH13					
			RARB			WT1		
			CD44					
			PYCARD					
CIS ASOCIADO			GATA5					
							RARB	
						ATM	CD44	
							PYCARD	
TAMAÑO							STK11	
				RARB			GATA5	
						WT1		
				CD44				
					GSTP1	GSTP1	GSTP1	
					PYCARD		PYCARD	
MULTI FOCALIDAD						CDH13		CDH13
			BRCA1					
					STK11			
				GATA5				
					VHL		VHL	
			RARB					
		ESR1						
		MGMT2					CD44	
	ATM							
						IGSF4		
				BRCA2		BRCA2		
		THBS1				THBS1		
			CDH13				CDH13	
	GATA5							

Tabla 31. Asociaciones significativas con edad (<65 años en azul, ≥65 años en amarillo), sexo (femenino en azul, masculino en amarillo), presencia de Cis (no en azul, sí en amarillo), tamaño (<3 cm en azul, ≥3cm en amarillo) y multifocalidad (tumores únicos en azul, múltiples en amarillo) en cada uno de los subgrupos y la serie global, obtenidos para ambos índices de metilación

TUMORES TaBG			
ESTADIO		GRADO	
IM > 0.3	IM > 0.5	IM > 0.3	IM > 0.5
			TP73
RARB		RARB	
PAX5A			PAX5A
			PTEN
CD44		CD44	
GSTP1		GSTP1	
IGSF4		IGSF4	
		CHFR	
PYCARD		PYCARD	
CDH13			
TP53		TP53	
	STK11	STK11	
GATA5		GATA5	

Tabla 32. Genes asociados a estadio (Ta en azul, T1 en amarillo) y grado (BG en azul, AG en amarillo) para ambos índices de metilación

3. EVOLUCIÓN

Si consideramos el grupo global de tumores estudiados, la mediana de tiempo de seguimiento fue de 55 meses (3.0-153.0), muy similar a la de cada uno de los grupos por separado.

La mediana de tiempo libre de enfermedad fue de 59.5 meses (25-218) para los TaBG, 71 meses (27-218) para los T1BG, 69 meses (40-235) para los T1AG y 64 meses (25-235) para el grupo global. Por otro lado, el tiempo hasta la progresión fue de 58 meses (3-129) para los tumores considerados de bajo riesgo, 65 meses (3-129) para los T1BG, 50 meses (3-130) para los de alto riesgo y 58 meses (3-130) para el grupo global [Tabla 33]. En 28 pacientes (11.2%) se produjeron 3 o más recidivas no músculo-invasivas durante el seguimiento y en 18 (7.2%) la progresión se produjo en la primera recidiva. En los primeros 6 meses tras la RTUv se produjeron 23 recidivas (9.2%) y 12 progresaron en el primer año (4.8%).

Dos pacientes murieron por cáncer en el grupo TaBG, uno a los 46 meses y otro a los 56 y sólo uno en el de T1BG, a los 102 meses de seguimiento. La mediana de supervivencia cáncer específica en T1AG fue de 16 meses (5-126) y 24 meses (5-129) en el grupo global [Tabla 33].

Durante el seguimiento completo progresaron 31 pacientes (12.4%), teniendo lugar el 80.6% en el grupo de alto grado (n=25). En 8 casos no se realizó cistectomía por enfermedades asociadas o por edad elevada, por lo que fueron etiquetados de pTx por no haberse realizado una estadificación patológica completa al no haber pieza quirúrgica, aunque clínicamente eran T2-4 o existían metástasis ganglionares y a distancia en las pruebas de imagen. Entre los pacientes a los que sí se les practicó cirugía radical, 1 fue un pT0N0M0 con una anatomía patológica en la RTUv previa de T2G3; 12 fueron pT2, de los cuales uno presentó adenopatías positivas y 3 presentaron metástasis ganglionares y a distancia; 4 fueron pT3, uno de ellos con enfermedad ganglionar y los 6 restantes fueron cistectomías paliativas con resultado de la pieza de pT4 [Tabla 34].

		TaBG (n=79)	T1BG (n=81)	T1AG (n=91)	GLOBAL (n=251)
	Recidiva	46	45	37	128
	Progresión	2	4	25	31
	Muertos	15	23	39	77
	Muertos por cáncer	2	1	13	16
	Muertos por otra causa (sin eventos)	13 (7)	22 (10)	26 (16)	61 (33)
	Vivos*	64	58	52	174
	Casos que recidivaron perdidos	3	1	1	5
Mediana de tiempo	Recidiva	27 (3-111)	35 (3-107)	43 (3-114)	35 (3-114)
	Progresión	58 (3-129)	65 (3-129)	50 (3-130)	58 (3-130)
	Muerte por cáncer	46 y 26 (n=2)**	102 (n=1)**	16 (5-126)	24 (5-129)
	Muerte por otra causa	32 (4-68)	43.5 (3-144)	30.5 (12-180)	33 (3-180)
	Libre de enfermedad	59.5 (25-218)	71 (27-218)	69 (40-235)	64 (25-235)
	Seguimiento global	53 (3-129)	60 (3-129)	52 (3-131)	55 (3-153)

Tabla 33. Distribución de los principales parámetros a tener en cuenta durante la evolución en la serie global y en cada uno de los grupos a estudio. (*) Existen 5 pacientes perdidos que dado el largo seguimiento que tuvieron se incluyen como pacientes vivos. (**) Dado el escaso número de fallecimientos se refieren los meses absolutos hasta la muerte de cada uno de los pacientes y no la mediana de tiempo

	N0M0	N+M0	N+M+	TOTAL PACIENTES
Tx (no cistectomía)	2	-	6	8
pT0	1	-	-	1
pT2	8	1	3	12
pT3	3	1	-	4
pT4	3	2	1	6

Tabla 34. Clasificación TNM de las progresiones

3.1 Tumores TaBG

3.1.1 Tiempo Libre de Enfermedad

La mediana de tiempo libre de enfermedad fue de 59.5 meses (25-218) [Tabla 33].

- **Para un índice de metilación mayor de 0.3**

Se analizaron los factores clínico-patológicos tradicionales del tumor en lo que se refiere a tamaño y multifocalidad. Ninguno presentó *Cis* asociado y al pertenecer al mismo grupo, estadio y grado es común en todos los pacientes.

En el *análisis univariado* no se encontró significación estadística con ninguna de las características clínico-patológicas. En lo que respecta al estudio de metilación de los genes, se observó asociación para PAX5A ($p=0.016$), WT1 ($p=0.036$) y BRCA1 ($p=0.023$). En los dos primeros la metilación por encima del umbral 0.3 implica menor tiempo libre de enfermedad (TLE) (recidiva más precoz) ($HR>1$), mientras que en BRCA1 se relaciona con mayor tiempo libre (recidiva más tardía) ($HR<1$) [Tabla 35 y Figura 28].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PAX5A	0.016	2.248	1.163	4.345
WT1	0.036	1.919	1.045	3.524
BRCA1	0.023	0.503	0.279	0.91

Tabla 35. Genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en tumores TaBG. En azul se refleja la asociación con un mayor TLE

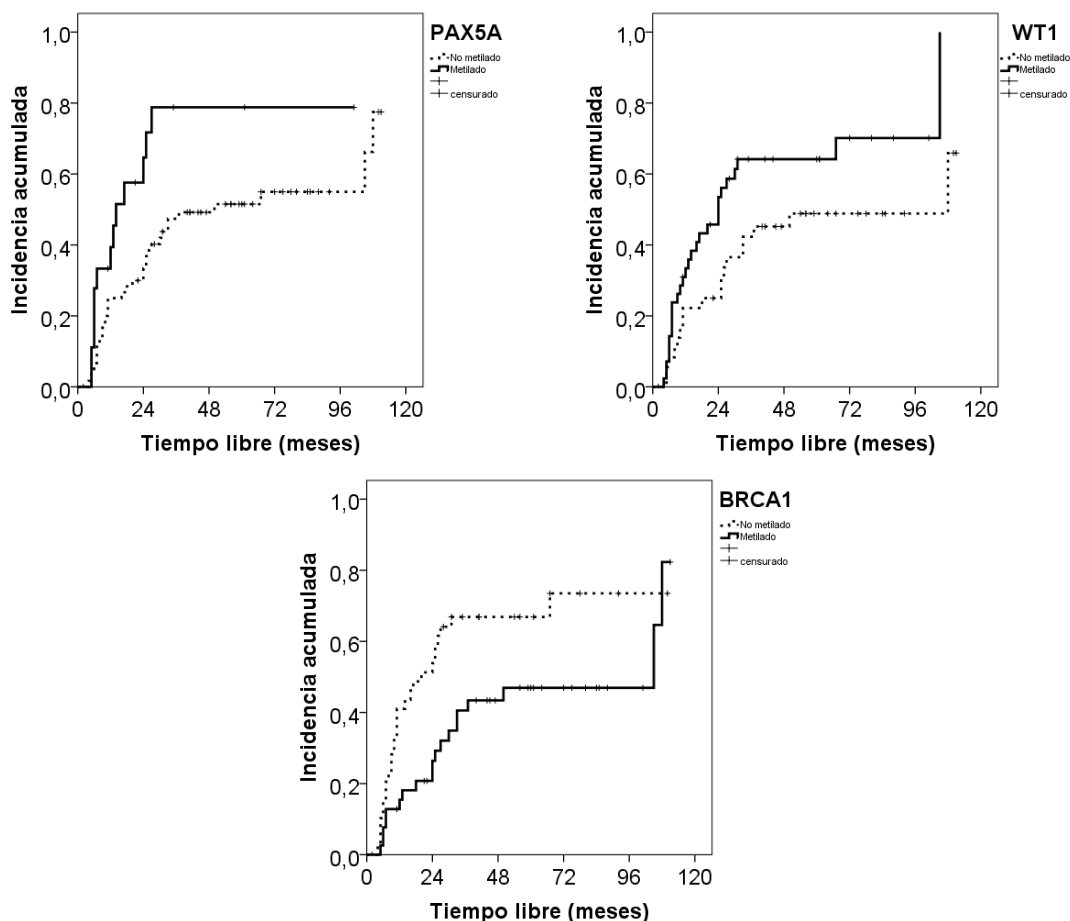


Figura 28. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en tumores TaBG

En el estudio multivariado de Cox, considerados los riesgos competitivos, se confirma que los tres genes del análisis univariado son factores independientes respecto a las variables clínico-patológicas tradicionales. Así la metilación de PAX5A ($p=0.019$) y WT1 ($p=0.042$) implica un menor tiempo libre de enfermedad mientras que la de BRCA1 ($p=0.023$) tiene un papel protector, asociándose a una recidiva más tardía [Tabla 36].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PAX5A	0.019	2.2	1.13	4.28
WT1	0.042	1.88	1.02	3.49
BRCA1	0.023	0.5	0.27	0.91

Tabla 36. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en el grupo de TaBG cuando el índice de metilación es > 0.3 . En azul se refleja la asociación con un mayor TLE

- **Para un índice de metilación mayor de 0.5**

Cuando tomamos como punto de corte un índice de metilación mayor de 0.5, en el estudio univariado la hipermetilación del gen WT1 ($p=0.019$) se asoció a un menor tiempo libre de enfermedad mientras que la de GSTP1 ($p=0.034$) y BRCA1 ($p=0.031$) se observó que implica un tiempo mayor y, por tanto, una recidiva más tardía [Tabla 37 y Figura 29].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
WT1	0.019	2.055	1.127	3.747
GSTP1	0.034	0.523	0.287	0.951
BRCA1	0.031	0.498	0.264	0.939

Tabla 37. Genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores TaBG. En azul se refleja la asociación con un mayor TLE

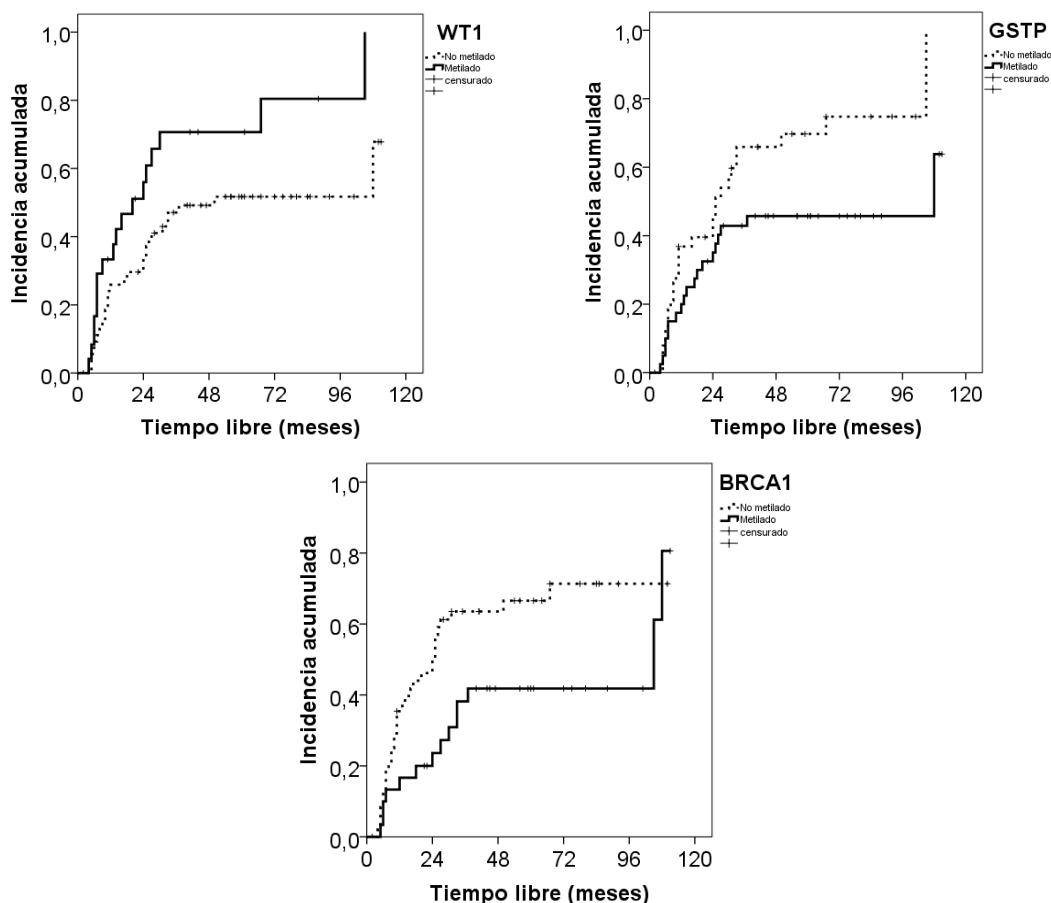


Figura 29. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores TaBG

A partir de estos datos se realizó un análisis multivariado de Cox en el que se confirmaron todos los genes obtenidos en el estudio univariado [Tabla 38].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
WT1	0.014	2.12	1.15	3.89
GSTP1	0.034	0.49	0.26	0.95
BRCA1	0.034	0.5	0.26	0.94

Tabla 38. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en el grupo de TaBG cuando el índice de metilación es > 0.5. En azul se refleja la asociación con un mayor TLE

3.2 Tumores T1BG (n=81)

3.2.1 Tiempo Libre de Enfermedad

La mediana de tiempo libre de enfermedad fue de 71 meses (27-218) [Tabla 33].

- **Para un índice de metilación mayor de 0.3**

Todos los pacientes presentan el mismo grado y estadio y ninguno de ellos presentó *Cis* asociado. Por tanto, se analizaron los factores clínico-patológicos del tumor únicamente en lo que se refiere a tamaño y multifocalidad. En el análisis univariado no se encontró significación estadística con ninguna de las características clínico-patológicas. Por el contrario, se observó que la hipermetilación de los genes VHL (p=0.034), PAX6 (p=0.043), ATM (p=0.009), CHFR (p=0.049) y RB1 (p=0.013) se asociaba a un menor tiempo libre de enfermedad (recidiva más precoz) [Tabla 39 y Figura 30].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
VHL	0.034	3.066	1.088	8.639
PAX6	0.043	2.233	1.027	4.853
ATM	0.009	2.705	1.284	5.7
CHFR	0.049	2.277	1.005	5.161
RB1	0.013	3.03	1.262	7.278

Tabla 39. Genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en tumores T1BG

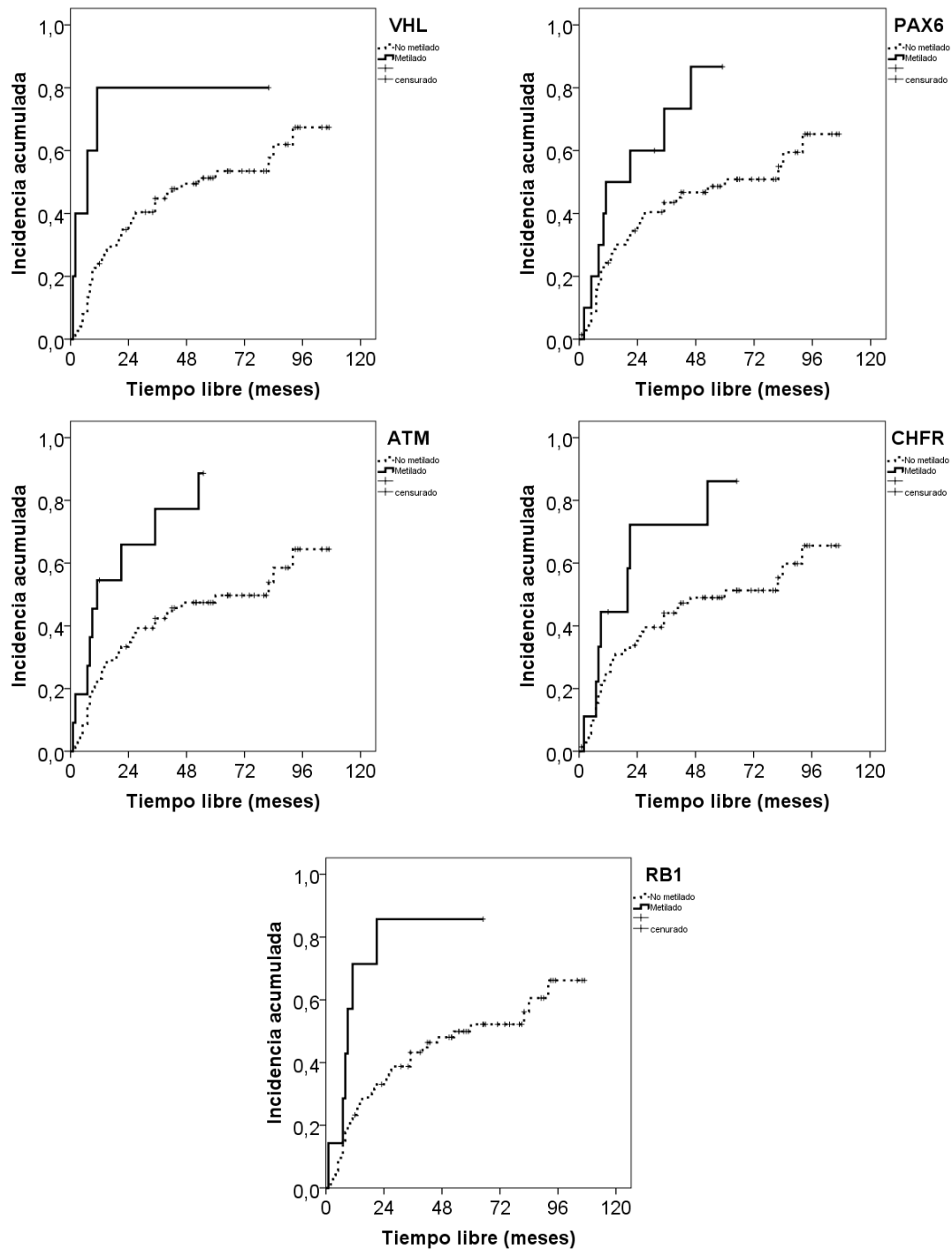


Figura 30. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en tumores T1BG

En el estudio multivariado de Cox se confirmó que la metilación por encima del umbral 0,3 de PAX6 ($p=0.044$), ATM ($p=0.004$), CHFR ($p=0.035$) y RB1 ($p=0.007$) era un factor independiente para el tiempo libre de enfermedad [Tabla 40].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PAX6	0.044	2.23	1.01	4.9
ATM	0.004	3.02	1.4	6.5
CHFR	0.035	2.42	1.06	5.54
RB1	0.007	3.51	1.40	8.78

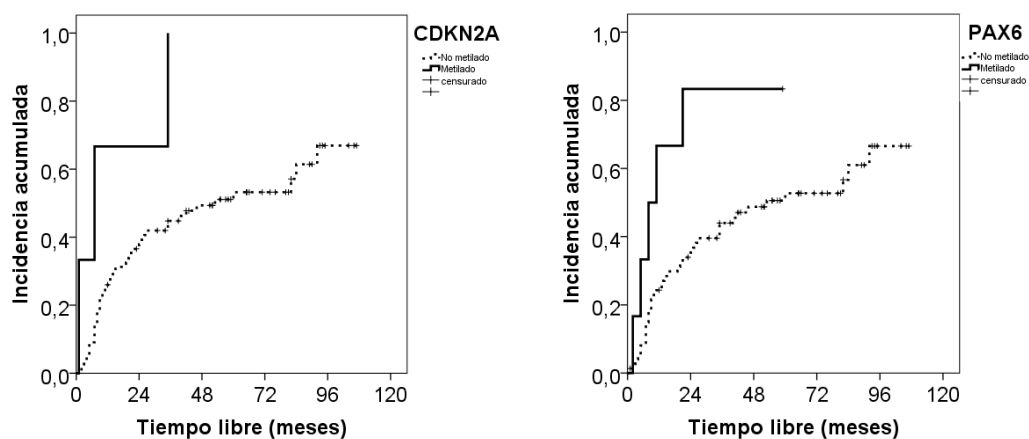
Tabla 40. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en el grupo de TIBG cuando el índice de metilación es > 0.3

• **Para un índice de metilación mayor de 0.5**

Cuando realizamos el estudio univariado para un IM mayor de 0,5, se observó que la metilación por encima de ese valor en los genes CDKN2A ($p=0.022$), PAX6 ($p=0.026$), ATM (0.002) y RB1 ($p=0.006$) implicaba un menor tiempo libre de enfermedad [Tabla 41 y Figura 31].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
CDKN2A	0.022	3.972	1.217	12.965
PAX6	0.026	2.925	1.139	7.508
ATM	0.002	3.69	1.613	8.442
RB1	0.006	7.967	1.837	34.551

Tabla 41. Genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores TIBG



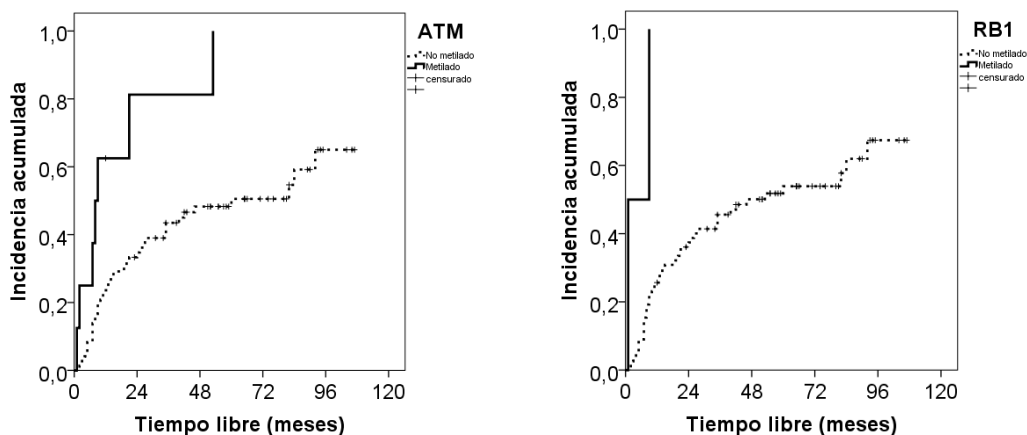


Figura 31. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores T1BG

En el análisis multivariado de Cox se confirmó la hipermetilación de los cuatro genes como factor independiente de tiempo libre de enfermedad [Tabla 42].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
CDKN2A	0.013	4.57	1.36	15.36
PAX6	0.014	3.33	1.26	8.8
ATM	0.0025	3.63	1.56	8.39
RB1	0.007	8.08	1.76	36.9

Tabla 42. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en el grupo de T1BG cuando el índice de metilación es > 0.5

3.3 Tumores T1AG (n=91)

3.3.1 Tiempo Libre de Enfermedad

La mediana de tiempo libre de enfermedad fue de 69 meses (40-235 meses) [Tabla 33].

- **Para un índice de metilación mayor de 0.3**

En el análisis univariado de las características clínico-patológicas sólo la multifocalidad se relacionó significativamente con el tiempo hasta la recidiva. Por otro lado se observó que la metilación del PYCARD por encima de 0.3 implicaba menor tiempo libre de enfermedad [Tabla 43 y Figura 32].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PYCARD	0.027	2.553	1.113	5.853

Tabla 43. Gen asociado a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en tumores TIAG

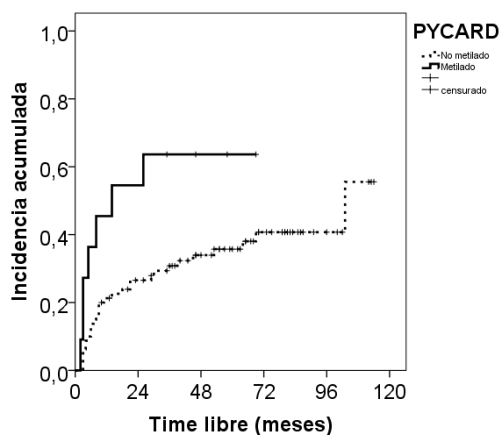


Figura 32. Curva de incidencia acumulada para el gen asociado a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en tumores TIAG

En el estudio multivariado de Cox, PYCARD resultó significativo e independiente. Sin embargo, en este grupo de tumores existía un número limitado de pacientes con PYCARD metilado que hubiesen presentado recidiva (n=12) [Tabla 44].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Múltiple	0.07	0.51	0.24	1.06
PYCARD*	0.035	2.65	1.06	6.61

Tabla 44. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en el grupo de TIAG cuando el índice de metilación es > 0.3. (*) Únicamente hubo 12 casos con PYCARD metilado y recidiva

- **Para un índice de metilación mayor de 0.5**

Cuando realizamos el estudio univariado para un IM mayor de 0.5, se vió que la metilación por encima de ese valor en los genes PAX5A (p=0.04), PTEN (p=0.017) y PYCARD (p=0.007) implicaba un menor tiempo libre de enfermedad [Tabla 45 y Figura 33].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PAX5A	0.04	2.059	1.032	4.107
PTEN	0.017	12.732	1.566	103.483
PYCARD	0.007	3.725	1.432	9.692

Tabla 45. Genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores TIAG

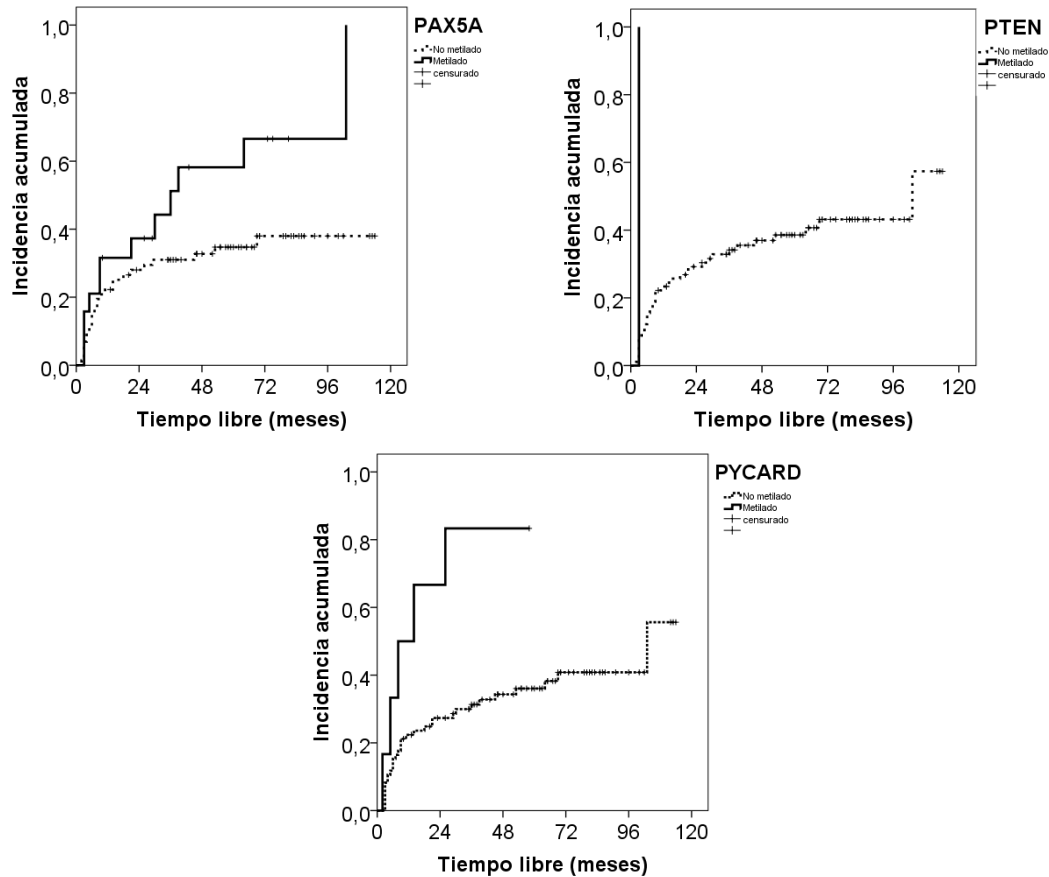


Figura 33. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores TIAG

No se realizó análisis multivariado de Cox para PTEN por el escaso número de pacientes con el gen hipermetilado que habían presentado recidiva ($n < 5$). PYCARD resultó significativo como factor independiente [Tabla 46].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Múltiple	0.12	0.55	0.26	1.17
PYCARD*	0.039	3.1	1.05	8.6

Tabla 46. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en el grupo de TIAG cuando el índice de metilación es > 0.5. (*) De los 6 pacientes con PYCARD metilado, 5 presentaron recidiva

3.3.2 Tiempo hasta la Progresión

La mediana de tiempo hasta la progresión fue de 50 meses (3-130) [Tabla 33].

- **Para un índice de metilación mayor de 0.3**

En el estudio univariado las variables clínico-patológicas que se estudiaron fueron presencia de *Cis* asociado, tamaño y multifocalidad, no resultando significativa ninguna de ellas.

Cuando estudiamos la metilación de los genes en relación al tiempo hasta la progresión ninguno de ellos resultó asociado en el análisis univariado ni en el multivariado para este punto de corte.

- **Para un índice de metilación mayor de 0.5**

Para una índice de metilación mayor de 0.5, en el estudio univariado la metilación por encima de ese umbral de los genes PTEN (p=0.002) y PYCARD (p=0.043) implica una progresión más precoz [Tabla 47]. No obstante, se debe tener en cuenta que estos resultados se obtuvieron en base a un paciente que progresó teniendo el gen PTEN metilado y a 6 pacientes con PYCARD metilado de los cuales sólo 4 progresaron. Debido a esto, sólo se representa el gen PYCARD [Figura 34].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PTEN*	0.002	6.56	1.92	22.44
PYCARD**	0.043	3.03	1.034	8.916

Tabla 47. Genes asociados a tiempo hasta la progresión en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores TIAG. (*) 1 paciente con PTEN metilado progresó. (**) 6 pacientes con PYCARD metilado de los cuales 5 presentaron progresión

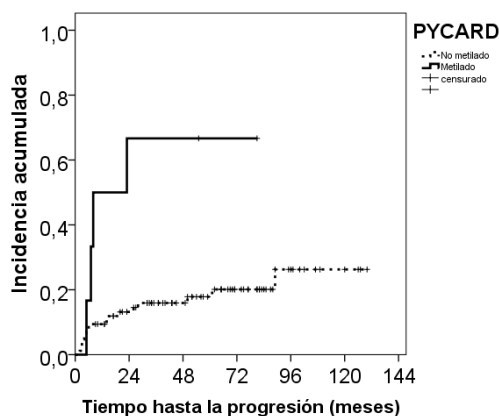


Figura 34. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a tiempo hasta la progresión en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en tumores TIAG

En el estudio multivariado se obtiene que el PYCARD es un factor independiente para progresión cuando el análisis se realiza para un índice de metilación mayor de 0.5 [Tabla 48]. En cuanto a PTEN, dado el escaso número de casos con evento, no se realizó estudio multivariado.

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PYCARD	0.041	3.34	1.04	10.69

Tabla 48. Factores independientes en el estudio multivariado para el tiempo hasta la progresión en el grupo de TIAG cuando el índice de metilación es > 0.5

3.3.3 Supervivencia Cáncer Específica

La mediana de tiempo hasta la muerte cáncer específica fue de 16 meses (5-126) [Tabla 33].

Ninguno de los genes resultó asociado, para ninguno de los dos índices de metilación, en el estudio uni ni en el multivariado por el escaso número de pacientes que fallecieron por cáncer (n=13).

3.4 Serie Global (n=251)

3.4.1 Tiempo Libre de Enfermedad

La mediana de tiempo libre de enfermedad fue de 64 meses (25-235) [Tabla 33].

- **Para un índice de metilación mayor de 0.3**

En el grupo global de pacientes se analizaron los factores clínico-patológicos tradicionales del tumor en lo que se refiere a estadio, grado, presencia o no de *Cis* asociado, tamaño, multifocalidad y tratamiento adyuvante y también respecto a la hipermetilación de cada uno de los genes. En el *análisis univariado*, se encontró significación estadística con el grado (mayor tiempo libre en los BG, $p=0.039$) y con el tipo de instilaciones [Tabla 49].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Grado (AG/BG)	0.039	0.669	0.456	0.980
Instilaciones (No/MMC/BCG)	0.049	0.87	0.76	0.99

Tabla 49. Factores clínico-patológicos asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global

En lo que respecta al estudio de los genes se observó asociación para PAX5A ($p=0.018$), WT1 ($p=0.049$), CHFR ($p=0.041$), RB1 ($p=0.006$) y PYCARD ($p=0.016$). En todos ellos la metilación por encima del umbral 0.3 implica menor tiempo libre de enfermedad o lo que es lo mismo, se asoció a una recidiva más precoz [Tabla 50 y Figura 35].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PAX5A	0.018	1.534	1.075	2.188
WT1	0.049	1.422	1.002	2.019
CHFR	0.041	2.036	1.03	4.023
RB1	0.006	2.388	1.281	4.452
PYCARD	0.016	1.543	1.083	2.199

Tabla 50. Genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global

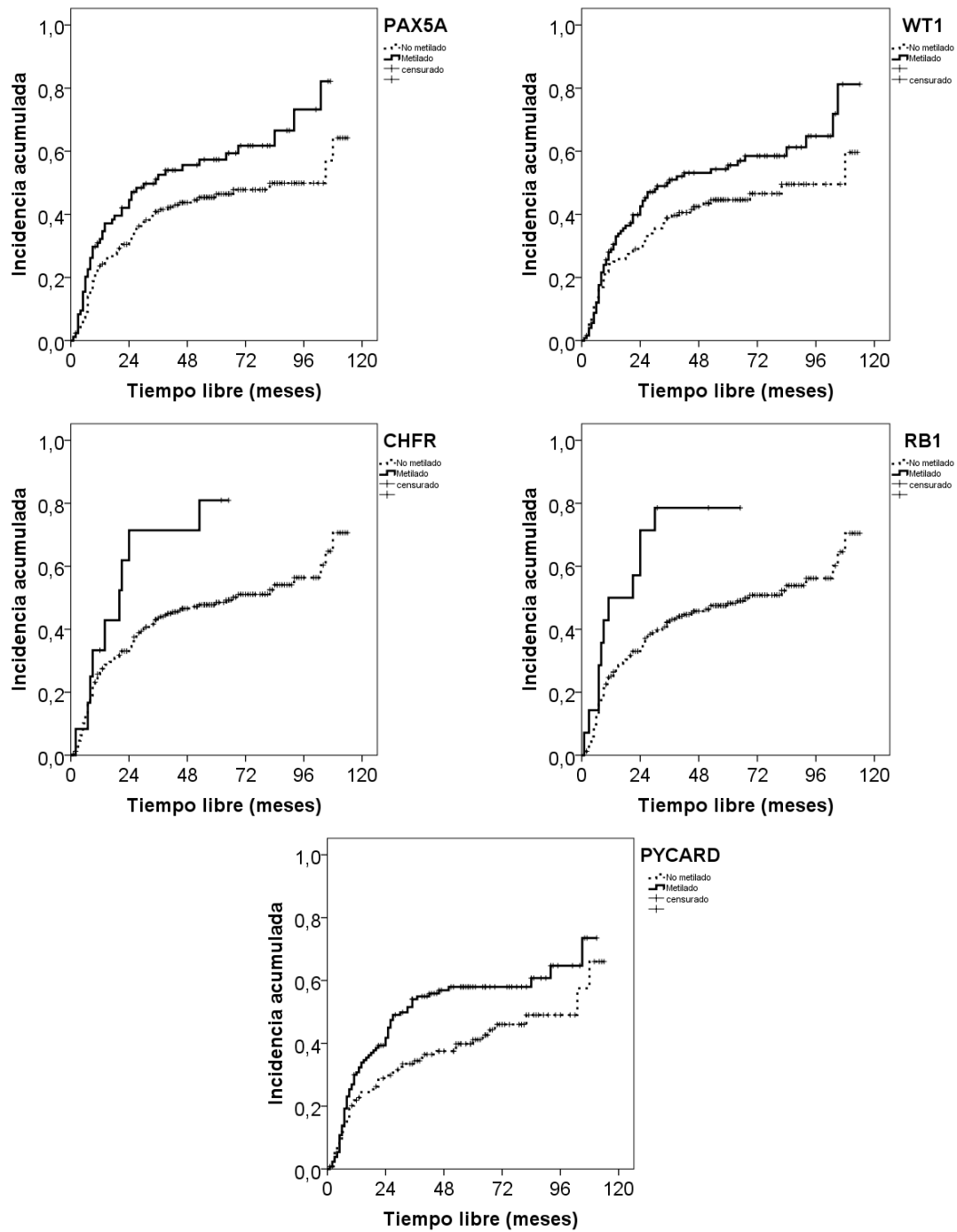


Figura 35. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global

A partir de estos datos se realizó un análisis multivariado de Cox considerando los riesgos competitivos y se encontró que sólo PAX5A ($p=0.01$) y RB1 ($p=0.008$) eran factores independientes para el tiempo libre de enfermedad [Tabla 51].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Grado (AG/BG)	0.158	0.668	0.382	1.17
Instilación (No/MMC/BCG)	0.811	0.928	0.506	1.704
PAX5A	0.01	1.61	1.11	2.33

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Grado (AG/BG)	0.18	0.68	0.38	1.19
Instilación (No/MMC/BCG)	0.65	0.86	0.47	1.59
RB1	0.008	2.31	1.23	4.33

Tabla 51. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en la serie global cuando el índice de metilación es > 0.3

- **Para un índice de metilación mayor de 0.5**

Cuando tomamos como punto de corte un índice de metilación mayor de 0.5, en el estudio univariado la metilación por encima de ese umbral en los genes RARB (p=0.037), PAX5A (p=0.009), PAX6 (p=0.041) y PYCARD (p=0.023) implicó menor tiempo libre de enfermedad, es decir, una recidiva más precoz [Tabla 52 y Figura 36].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
RARB	0.037	1.45	1.024	2.055
PAX5A	0.009	1.782	1.157	2.743
PAX6	0.041	1.964	1.027	3.756
PYCARD	0.023	1.497	1.057	2.119

Tabla 52. Genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en la serie global

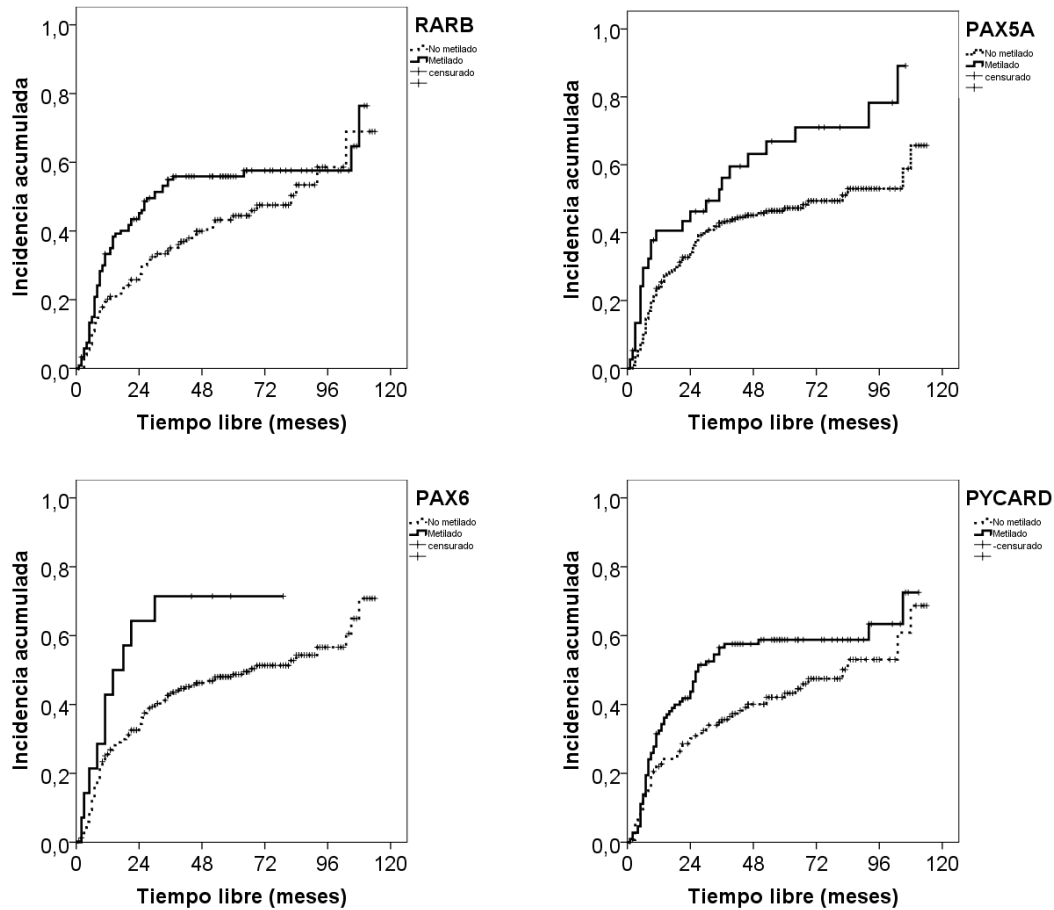


Figura 36. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a TLE en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en la serie global

Sólo PAX5A y PAX6, estudiados uno a uno con el resto de factores clínico-patológicos, resultaron independientes para recidiva en el análisis de Cox-multivariado [Tabla 53].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Grado (AG/BG)	0.14	0.65	0.37	1.14
Instilación (No/MMC/BCG)	0.77	0.91	0.49	1.671
PAX5A	0.004	1.94	1.22	3.06

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Grado (AG/BG)	0.08	0.61	0.34	1.07
Instilación (No/MMC/BCG)	0.91	0.96	0.52	1.78
PAX6	0.024	2.14	1.10	4.18

Tabla 53. Factores independientes en el estudio multivariado para el TLE en la serie global cuando el índice de metilación es > 0.5

3.4.2 Tiempo hasta la Progresión

Se observaron 31 progresiones a T2+ durante el seguimiento, 25 de ellos (80.6%) en T1AG y 7 en tumores de bajo grado [Tabla 33]. La mediana de tiempo hasta la progresión fue de 58 meses (3-130) [Tabla 33].

- **Para un índice de metilación mayor de 0.3**

En el grupo global de pacientes se analizaron los factores clínico-patológicos tradicionales del tumor en lo que se refiere al estadio, grado, presencia o no de *Cis* asociado, tamaño, multifocalidad y tratamiento adyuvante. Posteriormente, se analizó la metilación de cada uno de los genes.

En el estudio univariado las variables clínico-patológicas que se asociaron a la progresión fueron el estadio T ($p=0.005$), el grado ($p<0.001$) y el *Cis* asociado ($p<0.001$) [Tabla 54].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Estadio (Ta/T1)	0.005	0.13	0.031	0.54
Grado (AG/BG)	0.00001	8.62	3.74	19.83
<i>Cis</i> asociado (Si/No)	0.00001	5.32	2.62	10.79

Tabla 54. Factores clínico-patológicos asociados a tiempo hasta la progresión en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global

Cuando estudiamos la metilación de los genes en relación a la progresión a un tumor músculo-invasivo se observó que sólo el CD44 ($p=0.01$), el GSTP1 ($p<0.001$) y el PYCARD ($p=0.06$) se relacionaban con la progresión pero de manera invera. Así, la

metilación por debajo del umbral de 0.3 implicó un menor tiempo hasta el evento o, lo que es lo mismo, la hipermetilación de estos genes se relacionó con una progresión más tardía a modo de variación epigenética protectora [Tabla 55 y Figura 37].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
CD44	0.01	0.39	0.19	0.802
GSTP1	0.00001	0.19	0.076	0.513
PYCARD	0.006	0.36	0.172	0.754

Tabla 55. Genes asociados a tiempo hasta la progresión en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global. En azul se refleja la asociación con un mayor hasta la progresión

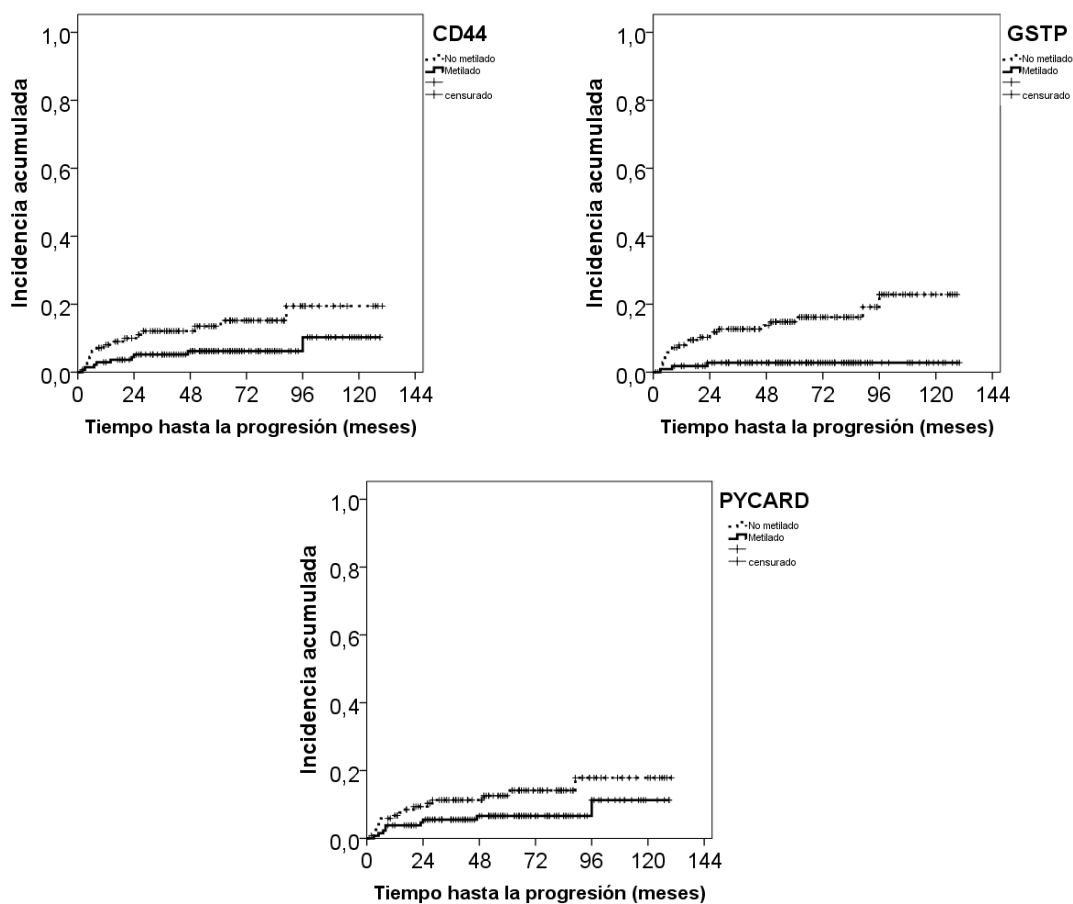


Figura 37. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a tiempo hasta la progresión en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global

Al realizar el estudio multivariado la hipermetilación de ningún gen fue independiente frente a los factores clínico-patológicos. Por esta razón, al desarrollar el análisis por grupos sólo se estudió la progresión en los T1AG.

- **Para un índice de metilación mayor de 0.5**

Cuando tomamos como punto de corte un umbral de metilación mayor de 0.5, en el estudio univariado la hipermetilación los genes GSTP1 ($p=0.004$), PYCARD ($p=0.038$) y STK11 ($p=0.005$) implicó mayor tiempo hasta la progresión, o lo que es lo mismo, una progresión más tardía, por lo que podrían tener un valor protector [Tabla 56 y Figura 38].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
GSTP1	0.004	0.21	0.075	0.61
PYCARD	0.038	0.44	0.208	0.959
STK11	0.005	0.305	0.132	0.702

Tabla 56. Genes asociados a tiempo hasta la progresión en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en la serie global. En azul se refleja la asociación con un mayor tiempo hasta la progresión

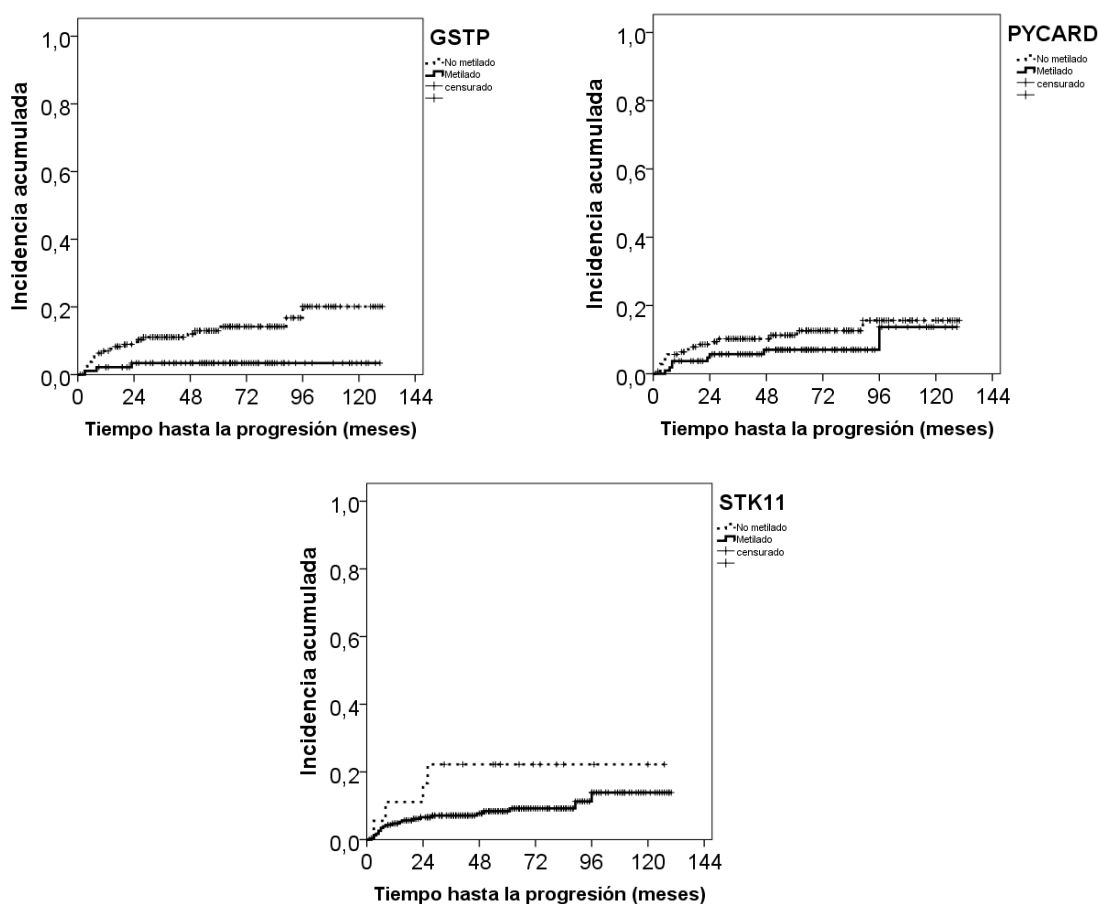


Figura 38. Curvas de incidencia acumulada para los genes asociados a tiempo hasta la progresión en el análisis univariado para un índice de metilación >0.5 en la serie global

Al realizar el estudio multivariado no se obtuvo ningún gen que fuese independiente para el tiempo hasta la progresión.

3.4.3 Supervivencia Cáncer Específica

En lo referente a los fallecidos, sólo 16 pacientes murieron por cáncer, por tanto se trata de un número limitado para un análisis de supervivencia. De ellos, 3 eran tumores de bajo grado (18.8%) y 13 de alto grado (81.2%).

- **Para un índice de metilación mayor de 0.3**

Las características clínico-patológicas que se analizaron en el estudio univariado en relación a la muerte cáncer específica fueron estadio, grado, *Cis* asociado, tamaño y multifocalidad. De todas ellas resultaron significativas el estadio ($p=0.004$), el grado ($p<0.001$) y el *Cis* asociado ($p=0.003$) [Tabla 57].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
Estadio (Ta/T1)	0.004	3.62	1.52	8.63
Grado (AG/BG)	0.0001	8.68	3.56	21.19
Cis asociado	0.003	4.7	1.7	12.99

Tabla 57. Factores clínico-patológicos asociados a tiempo hasta la muerte en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global

Al evaluar la metilación de los genes por encima de un IM de 0.3 sólo se encontró asociación con el PYCARD ($p=0.003$), pero debemos tener en cuenta que únicamente 4 casos con PYCARD hipermetilado fallecieron por cáncer de vejiga [Tabla 58 y Figura 39].

	p	HR	95% IC	
			Inferior	Superior
PYCARD*	0.003	0.295	0.95	0.916

Tabla 58. Gen asociado a tiempo hasta la muerte en el análisis univariado para un índice de metilación >0.3 en la serie global. (*) Sólo 4 casos con PYCARD > 0.3 fallecieron por cáncer de vejiga. En azul se refleja la asociación con un mayor supervivencia

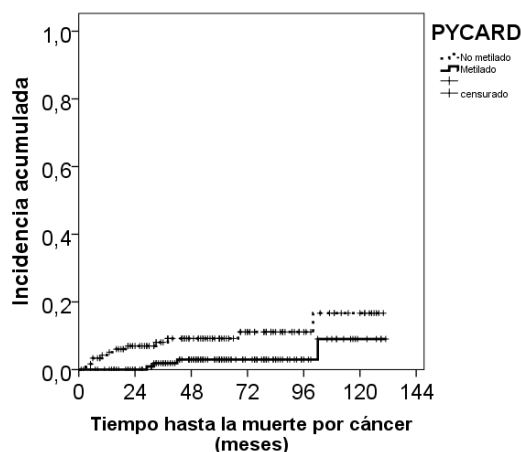


Figura 39. Curva de incidencia acumulada para el gen asociado a tiempo hasta la muerte en el análisis univariado para un umbral de metilación >0.3 en la serie global

Al realizar el estudio multivariado la hipermetilación de PYCARD no resultó factor independiente de supervivencia cáncer específica ($p=0.981$).

- **Para un índice de metilación mayor de 0.5**

Ninguno de los genes para el umbral de 0.5 resultó ser significativo para mortalidad cáncer específica ni en el estudio univariado ni en el multivariado.

3.5 Resumen del Análisis de Supervivencia

A modo de resumen, para facilitar la lectura de estos resultados se presentan aquellos que resultaron estadísticamente significativos en el análisis de supervivencia de cada uno de los subgrupos estudiados (TaBG, T1BG y T1AG) y para la serie global. Se destaca en azul aquellos genes cuya metilación resultó un factor independiente con peor evolución (menor tiempo libre de enfermedad, menor tiempo hasta progresión o menor supervivencia cáncer específica) y en verde las asociaciones con un mejor pronóstico (inverso a lo anterior). En gris se destacan aquellos resultados significativos en el estudio univariado que no lo fueron en el multivariado [Tabla 59]

	TUMORES TaBG		TUMORES T1BG		TUMORES T1AG		SERIE GLOBAL	
	IM > 0.3	IM > 0.5	IM > 0.3	IM > 0.5	IM > 0.3	IM > 0.5	IM > 0.3	IM > 0.5
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD			VHL					RARB
				CDKN2A				
	PAX5A					PAX5A	PAX5A	
						PTEN		
			PAX6					PAX6
	WT1						WT1	
		GSTP1						
			ATM					
			CHFR				CHFR	
			RB1				RB1	
				PYCARD		PYCARD		
	BRCA1							
TIEMPO HASTA PROGRESIÓN						PTEN		
							CD44	
							GSTP1	
						PYCARD	PYCARD	
							STK11	
SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA							PYCARD	

Tabla 59. Se presentan las asociaciones existentes en cada uno de los subgrupos y en la serie global. En rosa se representan los resultados obtenidos únicamente en el estudio univariado. En amarillo aquellos genes cuya metilación se asocia con una peor evolución (menor tiempo libre de enfermedad y menor tiempo hasta progresión) y en azul las asociaciones con un mejor pronóstico (mayor tiempo libre de enfermedad)

3.6 Valores Predictivos Positivos (VPPs) y Negativos (VPNs)

Se estudió el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) que tiene la metilación de los genes estudiados para detectar recidiva no músculo invasiva, progresión a tumor músculo invasor y supervivencia cáncer específica a los 12 y 24 meses en los tumores T1AG y en la serie global. En los TaBG y T1BG se analizó únicamente el tiempo hasta la recidiva al no existir prácticamente progresiones.

En general, se observaron unos VPNs altos en relación con un número de casos elevado de no metilación ni recidiva sobre todo a los 12 meses, fenómeno que se produjo también, pero de manera inversa en el estudio de los VPP en algunos genes con escasa metilación, lo cual se señala en el texto y las tablas.

Dicho análisis se hizo para ambos umbrales. Para facilitar la lectura de resultados se presentan de manera conjunta, refiriendo, entre paréntesis, el índice de metilación para el que fue obtenido (0.3 y/o 0.5), sin incluirlo cuando fue significativo para ambos.

3.6.1 Tumores TaBG

No hubo genes con VPP alto (considerando alto un valor entorno al 70%) en el tiempo hasta la recidiva a 12 meses, excepto PAX5A (0.5), MGMT (0.5) y ATM (0.5) que sí lo presentaron pero con escasa representación de metilación o de recidiva, lo que hace dudoso el resultado. A los 24 meses PAX5A (0.3), MGMT (0.3), WT1 (0.3), GSTP1, CDH13 y GATA5 tuvieron VPPs elevados, mientras que en el caso de TP73 (0.3), ESR1 (0.5), CDKN2A (0.3), PAX5A (0.5), MGMT (0.5), PAX6 (0.5) y ATM (0.5) el resultado fue a expensas de pocos eventos con la alteración epigenética [Tabla 60].

Algunos genes tuvieron un VPN mayor a 12 meses como VHL (0.3), RARB (0.3), ESR1 (0.5), PAX5A, MGMT, MGMT2, WT1, CD44 (0.3), ATM (0.5), BRCA2 y PYCARD, CDH13 y GATA5, si bien a 24 meses los VPNs fueron bajos [Tabla 60].

TaBG		T. hasta recidiva superficial				TaBG		T. hasta recidiva superficial			
		VPP		VPN				VPP		VPN	
		12 m	24m	12 m	24m			12 m	24m	12 m	24m
TP73	0.3	33.1	100*	65.9	41.5	ATM	0.3	33.3	33.3	65.9	36.6
	0.5	34.5	61.4	65.9	38.6		0.5	100*	100*	67.4	39.5
MSH6	0.3	21.1	36.8	56	20	IGSF4	0.3	33.3	50	65.8	36.8
	0.5	22.2	-	62.9	50		0.5	20	40	64.1	35.9
VHL	0.3	50	-	67.5	50	CHFR	0.3	-	50	64.3	38.1
	0.5	-	-	64.3	35.7		0.5	-	-	50	38.6
RARB	0.3	37.5	59.4	75	33.3	BRCA2	0.3	50	50	67.5	37.5
	0.5	33.3	59.3	64.7	35.3		0.5	50	50	66.7	38.1
ESR1	0.3	30.8	53,8	64.5	46.2	RB1	0.3	33.3	33.3	65.9	36.6
	0.5	50	75*	67.5	40		0.5	-	-	65.1	37.2
CDKN2A	0.3	-	66.7*	63.4	69	RB1-2	0.3	-	64.3	-	35.7
	0.5	-	50	64.3	38.1		0.5	-	64.3	-	35.7
PAX5A	0.3	41.7	75	68.8	43.8	THBS1	0.3	33.3	33.3	65.9	36.6
	0.5	100*	100*	70.7	41.5		0.5	-	-	65.1	37.2
PTEN	0.3	-	-	63.4	34.1	PYCARD	0.3	38.2	64.7	80	50
	0.5	-	-	65.9	38.6		0.5	35.5	64.5	69.2	46.2
MGMT	0.3	50	66.7	68.4	39.5	CDH13	0.3	35.7	78.6	66.7	46.7
	0.5	66.7*	66.7*	68.3	39		0.5	44.4	66.7	68.6	40
MGMT-2	0.3	38.5	1.5	72.2	38.9	TP53	0.3	27.8	55.6	61.5	34.6
	0.5	39.1	60.9	71.4	38.1		0.5	26.7	53.3	62.1	34.5
PAX6	0.3	-	33.3	63.4	36.6	BRCA1	0.3	27.8	44.4	61.5	26.9
	0.5	-	100*	65.1	39.5		0.5	28.6	42.9	63.3	30
WT1	0.3	37	66.7	70.6	47.1	STK11	0.3	34.1	61.4	-	-
	0.5	41.2	64.7	70.4	40.7		0.5	34.1	61.4	-	-
CD44	0.3	35.7	53.6	68.8	25	GATA5	0.3	36.5	66.7	72.7	54.5
	0.5	30.4	47.8	61.9	23.8		0.5	36.7	70	71.4	57.1
GSTP1	0.3	33.3	66.7	65	45						
	0.5	31.6	68.4	64	44						

Tabla 60. VPPs y VPNs para recidiva a 12 y 24 meses en el grupo de TaBG. (*)Valores dudosos por escaso número de eventos que presentasen el gen metilado

3.6.2 Tumores T1BG

En el tiempo hasta recidiva a 12 meses se obtuvo un VPP alto para los genes TP73, VHL, ESR1 (0.5), CDKN2A (0.5), ATM (0.5), RB1 (0.5), THBS1 y BRCA1 (0.5) pero con un escaso número de casos metilados, haciendo dudoso su valor. A los 24 meses los genes MSH6 (0.5), RARB, ESR1 (0.3), PAX5A (0.3), PTEN (0.3), MGMT, MGMT2, PAX6 (0.5), WT1 (0.5), CD44, GSTP1 (0.5), IGSF4 (0.3), BRCA2 (0.3), RB1, PYCARD (0.5), TP53 y BRCA1 también tuvieron VPP alto, al igual que VHL (0.3), CDKN2A (0.5), ATM (0.5), TP73, CHFR y THBS1 aunque estos presentaban pocos casos con el gen metilado [Tabla 61].

Los VPNs fueron bajos salvo para RARB a los 12 y 24 m y para MGMT2, CD44 y BRCA1 a los 12m [Tabla 61].

T1BG		T. hasta recidiva superficial				T1BG		T. hasta recidiva superficial			
		VPP		VPN				VPP		VPP	
		12 m	24 m	12 m	24m			12 m	24m	12 m	24m
TP73	0.3	66.7*	83.3*	61.1	43.7	ATM	0.3	50	62,5	58.8	38.2
	0.5	100*	100*	58.5	39		0.5	66.7*	66.7*	61.1	38.9
MSH6	0.3	40	55	54.5	31.8	IGSF4	0.3	53.8	76.9	62.1	44.8
	0.5	33.3	66.7	54.5	39.4		0.5	28.6	57.1	54.3	37.1
VHL	0.3	75*	100*	60.5	42.1	CHFR	0.3	50	66.7*	58.3	38.9
	0.5	100*	58.5	100*	39		0.5	33.3	66.7*	56.4	38.5
RARB	0.3	50	70.6	87.5	75	BRCA2	0.3	50	66.7	60	40
	0.5	61.5	84.6	87.5	75		0.5	42.9	57.1	57.1	37.1
ESR1	0.3	60	70	62.5	40.6	RB1	0.3	60	80	59.5	40.5
	0.5	75*	60.5	75*	39.5		0.5	100*	100	60	40
CDKN2A	0.3	50	50	58.3	36.1	RB1-2	0.3	25	50	55.3	36.8
	0.5	66.7*	66.7*	59	38.5		0.5	50	50	57.5	37.5
PAX5A	0.3	50	66.7	62.5	41.7	THBS1	0.3	75*	100*	60.5	42.1
	0.5	50	60	59.4	37.5		0.5	100*	100*	61.5	41
PTEN	0.3	44.4	66.7	57.6	39.4	PYCARD	0.3	41.9	64.5	54.5	44.5
	0.5	40	60	56.8	37.8		0.5	50	75	66.7	55.6
MGMT	0.3	50	66.7	60	40	CDH13	0.3	47.6	57.1	61.9	33.3
	0.5	44.4	66.7	57.6	39.4		0.5	47.1	52.9	60	32
MGMT-2	0.3	48.3	69	69.2	53.8	TP53	0.3	50	75	61.5	46.2
	0.5	53.8	76.9	75	62.5		0.5	46.7	73.3	59.3	44.4
PAX6	0.3	37.5	62.5	55.9	38.2	BRCA1	0.3	57.9	73.7	69.6	43.8
	0.5	60	80	59.5	40.5		0.5	66.7	80	70.4	48.1
WT1	0.3	43.5	65.2	57.9	42.1	STK11	0.3	41.5	61	-	-
	0.5	63.6	72.7	64.5	41.9		0.5	39.5	60.5	25	25
CD44	0.3	46.9	65.6	70	50	GATA5	0.3	43.3	60	58.3	33.3
	0.5	60	82.6	78.9	63.2		0.5	47.8	65.2	63.2	42.1
GSTP1	0.3	45.5	63.6	60	40						
	0.5	52.6	73.7	65.2	47.8						

Tabla 61. VPPs y VPNs para recidiva a 12 y 24 meses en el grupo de T1BG. (*)Valores dudosos por escaso número de eventos que presentasen el gen metilado

3.6.3 Tumores T1AG

Cuando se analizó el VPP para recidiva no músculo invasiva a 12 meses, bien por escasa proporción de metilación en algunos genes o de recidiva en otros, no hubo valores elevados. Sin embargo, a los 24 m se obtuvo un alto VPP para MSH6 (0.3), PAX6, GSTP1 (0.5), PYCARD, CDH13 (0.5) y STK11. MGMT (0.5) también presentó un elevado VPP pero con pocos casos por lo que hace dudoso el resultado. Por otra parte, los VPPs fueron relativamente bajos [Tabla 62].

En el tiempo hasta la progresión, pocos genes mostraron un estado de metilación con altos valores predictivos positivos. A 12 meses MGMT (0.3), a 24 meses RARB, PAX5A, MGMT2, WT1 (0.3), BRCA1 (0.5), STK11 y GATA5 (0.3) y a 12 y 24 MSH6 (0.3) y PYCARD. También se obtuvieron VPPs altos para otros genes, pero se trata de un resultado dudoso ya que existían escasos pacientes con progresión y metilación de los mismos. Estos genes fueron TP73, ESR1 (0.3), PTEN, MGMT (0.5), PAX6, WT1 (0.5) BRCA2 (0.5), RB1 (0.3), RB1-2 (0.3) y TP53 a 12 y 24 m y CD44, IGFS4 (0.3) y CDH13 a 24m [Tabla 62].

En cuanto a la mortalidad cáncer específica, hubo metilación en pocos casos, por lo que los valores predictivos negativos fueron altos. Algunos genes tuvieron un VPP mayor: TP73 y PAX6 a 12 y 24 m, MGMT2 (0.5) a 12m y CD44, IGFS4 (0.3), CDH13 (0.5), TP53 y BRCA1 (0.5) a 24 m, [Tabla 62].

TIAG		T. hasta recidiva superficial				T. hasta progresión				T. sup. cáncer -específica			
		VPP		VPN		VPP		VPN		VPP		VPN	
		12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m
TP73	0.3	-	-	56.3	37.5	100*	100*	55.6	33.3	100*	100*	83.3	58.3
	0.5	-	-	56.3	37.5	100*	100*	55.6	33.3	100*	100*	83.3	58.3
MSH6	0.3	42.9	71.4	60	50	66.7	88.9	63.6	45.5	28.6	57.1	83.3	66.7
	0.5	33.3	33.3	57.1	35.7	50	75*	50	31.3	25	50	77.8	55.6
VHL	0.3	-	-	58.8	41.2	50	50	50	27.8	-	-	76.9	53.8
	0.5	-	-	58.8	41.2	-	50	-	30	-	-	76.9	53.8
RARB	0.3	12.5	50	33.3	33.3	50	70	50	30	14.3	42.9	66.7	50
	0.5	16.7	50	45.5	36.4	50	75	50	33	20	40	75	50
ESR1	0.3	-	33.1	50	35.7	100*	100*	55.6	33.3	50	50	81.9	54.5
	0.5	-	50	53.3	40	-	-	50	93.3	-	-	76.9	53.8
CDKN2A	0.3	-	-	58.8	41.2	-	-	47.4	26.3	-	-	76.9	53.8
	0.5	-	-	58.8	41.2	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
PAX5A	0.3	30	40	42.9	14.3	50	75	50	33	20	60	75	62.5
	0.5	28.6	28.6	50	20	60	80	53.3	33.3	-	50	72.7	54.5
PTEN	0.3	-	50	53.3	40	100*	100*	52.6	31.6	-	-	76.9	53.8
	0.5	-	-	58.8	41.2	100*	100*	52.6	31.6	-	-	76.9	53.8
MGMT	0.3	-	-	53.3	40	75	100*	56.3	37.5	-	-	72.7	45.5
	0.5	-	100*	56.3	43.8	100*	100*	52.6	31.6	-	-	76.9	53.8
MGMT-2	0.3	20	50	28.6	28.6	50	70	50	30	16.7	16.7	71.4	71.4
	0.5	20	50	28.6	28.6	44.4	66.7	45.5	27.3	66.7*	16.7	71.4	71.4
PAX6	0.3	-	66.7	50	42.9	100*	-	52.6	31.6	100*	100*	83.3	58.3
	0.5	-	66.7	50	42.9	100*	100*	52.6	31.6	100*	100*	83.3	58.3
WT1	0.3	40	50	57.1	28.6	57.1	71.4	53.8	30.8	-	66.7	70	60
	0.5	33.3	50	54.5	36.4	75*	75*	56.3	31.3	-	100*	75	58.3
CD44	0.3	-	40	41.7	33.3	60	80*	53.3	33.3	50	75*	88.9	66.7
	0.5	-	40	41.7	33.3	60	80*	53.3	33.3	50	75*	88.9	66.7
GSTP1	0.3	25	50	53.8	38.5	50	50	50	27.8	23.1	-	76.9	53.8
	0.5	33.1	66.7	57.1	42.9	50	50	50	27.8	-	-	76.9	53.8
ATM	0.3	-	-	53.3	33.3	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
	0.5	-	-	53.3	37.5	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
IGSF4	0.3	42.9	42.9	60	30	60	80*	53.3	33.3	50	100*	81.8	63.6
	0.5	-	-	50	28.6	50	50	50	27.8	-	-	76.9	53.8
CHFR	0.3	-	-	58.8	41.2	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
	0.5	-	-	58.8	41.2	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
BRCA2	0.3	25	50	53.8	38.5	25	50	43.8	25	-	-	76.9	45.5
	0.5	33.3	33.3	57.1	35.7	100*	100*	52.6	31.6	-	-	76.9	53.8
RB1	0.3	-	-	56.3	37.5	100*	100*	52.6	31.6	-	-	76.9	53.8
	0.5	-	-	56.3	37.5	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
RB1-2	0.3	-	-	56.3	37.5	100*	100*	52.6	31.6	-	-	75	53.8
	0.5	-	-	56.3	37.5	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
THBS1	0.3	-	-	50	28.6	-	-	47.4	26.3	-	-	76.9	53.8
	0.5	-	-	53.3	33.3	-	-	50	30	-	-	76.9	53.8
PYCARD	0.3	50	100	60	46.7	80	80	60	33.5	-	-	75	50
	0.5	-	100	56.3	43.8	75	75	56.3	31.5	-	-	75	50
CDH13	0.3	37.5	50	55.6	33.3	46.9	71.4*	46.2	30.8	20	60	75	62.5
	0.5	50	66.7	63.6	45.5	40	80*	46.7	33.3	-	66.7*	70	60
TP53	0.3	-	20	41.7	25	75*	100*	56.3	37.5	-	66.7*	70	60
	0.5	-	-	50	28.6	75*	100*	56.3	37.5	-	66.7*	70	60
BRCA1	0.3	22.2	55.6	37.5	37.5	50	62.5	50	25	33.3	66.7	85.7	71.4
	0.5	14.3	42.9	40	30	57.1	71.4	53.8	30.8	40	80*	87.5	75
STK11	0.3	46.7	66.7	100*	100*	50	70	-	-	23.1	46.2	-	-
	0.5	46.7	66.7	100*	100*	47.1	70.6	33.3	33.3	25	50	100*	100*
GATA5	0.3	44.4	55.6	62.5	37.5	60	70	60	30	25	50	77.8	55.6
	0.5	33.3	50	54.5	36.4	60	60	53.3	26.7	-	-	75.9	50

Tabla 62. VPPs y VPNs para recidiva, progresión y supervivencia cáncer específica a 12 y 24 meses en el grupo de TIAG (*) Valores dudosos por escaso número de eventos que presentasen el gen metilado

3.6.4 Serie Global

Cuando se analizó el tiempo hasta la recidiva no músculo invasiva a los 12 meses, no hubo genes con VPP alto, salvo el TP73 (0.5). Se encontraron VPPs mayores a los 24 m para VHL (0.3), ESR1 (0.5), MGMT (0.5), MGMT-2 (0.5), PAX6 (0.5), GSTP1 (0.5), CHFR (0.5), PYCARD (0.5) y GATA5 (0.5). Los VPNs fueron relativamente bajos [Tabla 63].

En el tiempo hasta la progresión, los genes que mostraron un estado de metilación con alto valor predictivo de progresión fueron MGMT (0.3) a 12 meses, MSH6 (0.3), RARB (0.5), PAX5A (0.5), CDH13, BRCA1 (0.5) y STK11 (0.5) a 24 y MGMT (0.3), GSTP1, IGFS4 y TP53 (0.3) a 12 m y 24 meses. Otros mostraron valores altos pero con muy pocos casos, lo que hace que los resultados sean dudosos: TP73, ESR1, PTEN, MGMT (0.5), PAX6, CHFR (0.3), BRCA2 (0.5), RB1 (0.3) y RB1-2 (0.3) a 12 y 24 meses y MSH6 (0.5) y TP53 (0.5) sólo a 24. No se evidenciaron valores predictivos negativos altos [Tabla 63].

En cuanto a la mortalidad cáncer específica, se pueden sacar escasas conclusiones porque hubo metilación en pocos casos, por lo que los valores predictivos negativos salen altos. Teniendo en cuenta esto, se obtuvo un VPP alto para TP73 y PAX6 a 12 y 24 meses y para IGFS4 (0.3) y RB1-2 (0.3) a 24 [Tabla 63].

GLOBAL		T. hasta recidiva superficial				T. hasta progresión				T. sup. cáncer -específica			
		VPP		VPN		VPP		VPN		VPP		VPN	
		12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m	12 m	24m
TP73	0.3	50	50	62.4	61.4	100*	100*	63.6	40.9	100*	100*	86.7	66.7
	0.5	80	50	40.9	38.6	100*	100*	60.9	39.1	100*	100*	86.7	66.7
MSH6	0.3	37.5	50.6	50.8	29.8	53.8	76.9	66.7	50	22.2	44.4	85.7	71.4
	0.5	60	52.4	35	36.6	60	80*	60	40	25	50	83.3	66.7
VHL	0.3	62.5	75	63.2	40	50	50	56.5	34.8	-	-	81.3	62.5
	0.5	33.3	33.3	61	38	-	64	56	36	-	-	81.3	62.5
RARB	0.3	40.5	63.5	65.5	44.8	46.2	61.5	48.3	33.3	11.1	33.3	71.4	57.1
	0.5	44.1	69.5	68.2	50	50	70	60	40	16.7	33.3	80	60
ESR1	0.3	38.5	57.7	61	37.7	100*	100*	63.6	40.9	50	50	85.7	64.3
	0.5	50	70	62.4	39.8	100*	100*	58.3	37.5	18.8	37.5	81.3	62.5
CDKN2A	0.3	33.3	55.6	60.6	38.3	-	-	54.2	33.3	-	-	81.3	62.5
	0.5	40	60	61.2	38.8	-	56	-	36	-	-	81.3	62.5
PAX5A	0.3	42.5	62.5	63.5	39.7	45	63.6	57.1	35.7	14.3	42.9	77.8	66.7
	0.5	50	55	63.9	37.3	50	66.7	57.9	36.8	-	33.3	76.9	61.5
PTEN	0.3	28.6	50	59.6	37.1	100*	100*	60.9	39.1	-	-	81.3	62.5
	0.5	40	60	61.2	38.8	100*	100*	58.3	37.5	-	-	81.3	62.5
MGMT	0.3	45	65	62.7	39.8	80	100	65	45	-	-	78.6	57.1
	0.5	46.2	69.2	62.2	40	100*	100*	60.9	39.1	-	-	81.3	62.5
MGMT-2	0.3	40	63.1	63.2	42.1	46.2	-	58.3	97.4	12.5	50	75	75
	0.5	42.4	66.1	65.9	45.5	45.5	63.6	57.1	35.7	14.3	57.1	77.8	77.8
PAX6	0.3	21.4	57.1	58.4	38.2	100*	100*	58.3	37.5	100*	100*	86.7	66.7
	0.5	33.3	77.8	60.6	40.4	100*	100*	58.3	37.5	100*	100*	86.7	66.7
WT1	0.3	40	63.3	62.8	41.9	45.5	63.6	57.1	35.7	-	40	72.7	63.6
	0.5	47.1	64.7	65.2	40.6	60	60	60	35	-	78.6	50	64.3
CD44	0.3	38.5	58.5	60.5	34.2	44.4	55.6	56.3	31.3	28.6	42.9	88.9	66.7
	0.5	41.2	62.7	63.5	40.4	50	62.5	58.8	35.3	33.3	50	90	70
GSTP1	0.3	38	64	60.4	41.5	66.7	66.7	59.1	36.4	-	-	81.3	62.5
	0.5	41.5	70.7	62.9	45.2	66.7	66.7	59.1	36.4	-	-	81.3	62.5
ATM	0.3	38.5	46.2	61.1	36.7	50	50	56.5	34.8	-	-	80	60
	0.5	62.5	62.5	63.2	38.9	50	50	56.5	34.8	-	-	80	60
IGSF4	0.3	46.2	61.5	63.6	39	66.7	83.3	63.2	42.1	50	100*	85.7	71.4
	0.5	20	40	58	35.2	66.7	66.7	59.1	36.4	-	-	81.3	62.5
CHFR	0.3	37.5	62.5	61.1	38.9	100*	100*	58.3	37.5	-	-	81.3	62.5
	0.5	33.3	66.7	61	39	-	-	58	36	-	-	81.3	62.5
BRCA2	0.3	45	60	62.7	38.6	40	60	55	35	-	-	78.6	57.1
	0.5	41.7	50	61.5	37.4	100*	100*	60.9	39.1	-	-	81.3	62.5
RB1	0.3	44.4	55.6	61.7	38.3	100*	100*	60.9	39.1	-	-	81.3	62.5
	0.5	38.8	50	50	38.4	-	-	56	36	-	-	81.3	62.5
RB1-2	0.3	14.3	28.6	59.4	36.5	100*	100*	60.9	39.1	-	100*	80	66.7
	0.5	20	20	60.2	36.7	-	-	56	36	-	-	81.3	62.5
THBS1	0.3	40	50	61.3	37.6	-	-	52.2	30.7	-	-	80	60
	0.5	50	50	61.9	38.1	-	-	56	36	-	-	81.3	62.5
PYCARD	0.3	40.3	65.7	63.9	47.2	55.6	55.6	62.5	31.3	-	-	75	50
	0.5	41.1	69.6	63.8	48.9	50	50.4	58.8	29.4	-	-	75	50
CDH13	0.3	41.9	62.8	63.3	40	40	70	53.3	40	16.7	50	80	70
	0.5	46.9	59.4	64.8	38	42.9	85.7	55.6	44.4	-	-	76.9	69.2
TP53	0.3	33.3	59	57.8	37.5	66.7	83.3	63.2	42.1	-	50	75	66.7
	0.5	33.3	57.6	58.6	37.1	60	80*	60	40	-	50	75	66.7
BRCA1	0.3	39.1	58.7	69.4	36.8	45.5	55.5	57.1	28.6	25	50	87.5	75
	0.5	41.7	58.3	62.7	37.3	55.6	66.7	62.5	37.5	33	66.7	90	80
STK11	0.3	39	62	66.7	66.7	44	64	-	-	18.8	37.5	-	-
	0.5	38.1	61.9	50	50	42.9	66.7	50	50	21.4	42.9	100*	100*
GATA5	0.3	40.3	62.5	64.5	41.9	50	57.1	63.6	27.3	14.3	28.6	77.8	55.6
	0.5	40.7	66.1	63.6	45.5	44.4	44.4	56.3	25	-	-	75	50

Tabla 63. VPPs y VPNs para recidiva, progresión y supervivencia cáncer específica a 12 y 24 meses en la serie global

Discusión

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE
GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS
SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO
MÚSCULO INVASIVOS

Raquel Sacristán González

1. CARACTERÍSTICAS Y LIMITACIONES DE NUESTRA SERIE

A pesar de ser morfológicamente similares, los carcinomas transicionales de vejiga no músculo invasivos presentan una evolución clínica distinta constituyendo un grupo heterogéneo de tumores^{3,8,77,141}. Ante la falta de una adecuada clasificación del riesgo de evolución resultan necesarios, en ocasiones, tratamientos que pueden ser demasiado agresivos, además de un estrecho seguimiento con pruebas invasivas repetitivas como la cistoscopia⁶. Todo ello se asocia a una alta morbilidad y a un elevado coste siendo, actualmente, uno de los procesos malignos que mayor número de recursos socio-sanitarios emplea^{2,7}.

Dado que los factores pronósticos fundamentales en este tumor actualmente son el estadio (Ta vs T1) y el grado (BG vs AG), para este estudio se ha seleccionado una serie representativa de los grupos de riesgo principales en función de estos factores, con un tiempo de seguimiento relativamente largo. Por ello, finalmente se han estudiado tres subgrupos, de acuerdo al estadio y grado, que se ajustan a las clasificaciones de riesgo de la mayoría de las líneas guías seguidas en el cáncer de vejiga⁶: TaBG, T1BG, T1AG. Dada la mínima proporción de tumores Ta de alto grado existente en nuestro ámbito, no se incluyeron casos con dicha anatomía patológica que, por otro lado, son muy escasos en la mayoría de las casuísticas de cáncer vesical⁶.

Cada uno de estos grupos fue tratado de forma diferente de acuerdo a las estrategias aceptadas actualmente⁷. De esta manera, los tumores TaBG no recibieron tratamiento y fueron únicamente controlados mediante cistoscopia y citologías, los T1BG recibieron quimioterapia adyuvante y los T1AG fueron tratados con BCG. Aunque se empleó siempre mitomicina C como quimioterápico a las mismas dosis en los tumores T1BG, los esquemas de tratamiento no siempre fueron iguales, con protocolos de mayor intensidad en las primeras semanas en pacientes en los que no se había empleado una dosis postoperatoria. Hasta el momento, no existen pautas establecidas con un nivel de evidencia alto, sin embargo, en un reciente metaanálisis, se

ha recomendado que cuando no haya sido posible realizar una instilación postoperatoria por complicaciones durante la RTU se emplee un protocolo de instilaciones más frecuentes las primeras semanas posteriores a la RTU⁵⁴, estrategia empleada desde hace años en nuestros pacientes.

Una limitación relativa de nuestra serie es que el mantenimiento con BCG fue empleado durante 6 meses en lugar de un año como se recomienda en los esquemas actuales⁶. Esto fue debido a que la mayoría de estos pacientes se trataron de acuerdo con los protocolos de tratamiento de los ensayos del grupo CUETO en los que estaban incluidos y sólo recientemente se ha demostrado la utilidad del mantenimiento anual^{56,57}. No obstante, el mantenimiento fue relativamente adecuado en un momento en que era escasamente utilizado, dado que tras la inducción con seis instilaciones semanales se emplearon otras seis adicionales en los cinco o seis meses posteriores. Además, la tasa de abandonos de la terapia con BCG en nuestro estudio fue nula, y en sólo 16 casos se precisó reducción de dosis por mala tolerancia o toxicidad, significativamente menor que las tasas de abandono publicadas con esquemas de tratamiento más largos⁵⁵.

En la actualidad, se considera que un número sustancial de recidivas precoces son debidas a tumores residuales por una resección incompleta más que a una verdadera recidiva^{37,46,47}. Las guías actuales recomiendan realizar una nueva RTUv en los tumores T1 de alto riesgo y realizar cistoscopia fotodinámica que aumenta la sensibilidad de la prueba, sobre todo, en el diagnóstico de tumores papilares múltiples de pequeño tamaño y de *Cis*. Nuestra serie no fue sometida a re-RTUv al tratarse de una recogida retrospectiva de pacientes intervenidos entre 1989 y 2009, periodo en el que no se consideraba indicada. No obstante, para obviar este problema, todas las muestras fueron seleccionadas en función de que presentaran representación de la capa muscular propia no invadida y que todas las resecciones hubieran sido completas⁶.

Por otra parte, tampoco se realizó subestadificación del estadio T1, determinación de la infiltración linfovascular ni de la presencia de áreas micropapilares, datos histológicos que se han propuesto recientemente como factores pronósticos^{1,6,37,66}. Se debe tener en cuenta la dificultad de la determinación de estos parámetros en RTU complejas (múltiples fragmentos, pequeño tamaño, resección incompleta en algunas áreas...), no siendo procedimientos todavía habituales en los servicios de Anatomía

Patológica. Estas observaciones justifican la necesidad del hallazgo de marcadores objetivos que puedan sustituir de manera fiable a parámetros cuya aplicación en la rutina diaria no es sencilla ni fácilmente reproducible.

Una vez establecidos los grupos en función del estadio y grado, también se estudiaron las características clínico-patológicas asociadas en cada grupo en función del estado de metilación de los potenciales marcadores, dado que dichas características pueden tener influencia adicional en el pronóstico, destacando la edad, sexo, presencia de *Cis* asociado, tamaño y multifocalidad tumoral. Dado que en este trabajo es fundamental relacionar la evolución con el estado de metilación epigenética, se realizaron análisis del tiempo libre de enfermedad, tiempo hasta la progresión a tumor invasor del detrusor y tiempo hasta la muerte por cáncer de vejiga en función del estado de metilación de los genes objeto de estudio. El análisis de la supervivencia cáncer específica requiere series muy amplias dado que el tumor vesical no músculo invasivo se trata de una enfermedad con una mortalidad relativamente baja a 5 años, menor del 25%⁶. Por ello, no se encontraron asociaciones significativas, si bien se exploró la posibilidad de encontrar potenciales marcadores con significación evolutiva, que podrían apuntar cierta tendencia para futuras investigaciones en mortalidad por cáncer vesical.

En nuestra serie 33 pacientes murieron por otras causas no relacionadas con el cáncer de vejiga. Estos fallecimientos ocurrieron tras haberse comenzado los análisis de metilación dada la elevada edad de muchos pacientes, con comorbilidades asociadas, y a que el tiempo de seguimiento fue relativamente largo. La existencia de muertes por causas distintas al cáncer de vejiga hizo que los pacientes que fallecieron sin que aparecieran eventos (recidiva o progresión) fuesen tratados como riesgos competitivos y que para el análisis de supervivencia se realizasen estudios de Cox uni y multivariado en lugar de rangos logarítmicos (*log-rank*), presentándose gráficamente como curvas de incidencia acumulada⁶¹.

En el grupo de tumores Ta de bajo grado, únicamente progresaron 2 pacientes, muriendo ambos por cáncer, y cuatro entre los T1BG, falleciendo sólo uno por la enfermedad. Estos resultados se ajustan a la historia natural de estos subgrupos, con bajo riesgo, y dado el reducido número de casos no se estudió el tiempo hasta la

progresión ni la supervivencia cáncer específica en ninguno de los dos^{6,61}. Habiéndose terminado el análisis de metilación y tras realizar una actualización del estado de los pacientes, 5 casos (2.0%) fueron considerados como perdidos por no tener seguimiento hasta el momento de la finalización del estudio. No obstante, todos ellos habían realizado los controles pertinentes durante más de cinco años tras la cirugía endoscópica, por lo que fueron tenidos en cuenta en el análisis de supervivencia. Por otra parte, hay que destacar que se produjeron más recidivas a tumores no músculo invasivo en el subgrupo de TaBG que en T1BG y AG, con una mediana de tiempo libre de enfermedad menor.

2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO DE METILACIÓN

La metilación es la alteración epigenética más frecuente descrita en cáncer^{77,80}. Cuando se produce en las islas CpG de los promotores se produce un silenciamiento de los genes afectados, habiéndose descrito frecuentemente en genes supresores de tumor^{73,162}. El urotelio está expuesto continuamente a carcinógenos que producen alteraciones epigenéticas inicialmente sin cambios histológicos asociados, pero se cree que un epigenoma alterado en un urotelio aparentemente sano produce un ambiente propicio para el desarrollo tumoral por el acúmulo de otras alteraciones¹⁶³. Además, alteraciones en la metilación de los promotores de algunos genes pueden favorecer la proliferación posterior y progresión del cáncer de vejiga^{12,90,94}.

Actualmente se han desarrollado técnicas que analizan el estado de metilación de varios genes mediante combinaciones de al menos 3 ó 4 genes^{10,12,86-88,90,93,94,97-100,116,118,141}. En el estudio de la metilación del ADN el método que frecuentemente se ha utilizado es el MSP que conlleva un tratamiento con bisulfito (sustituye las citosinas no metiladas por uracilo, conservando las citosinas metiladas) y la posterior amplificación del genoma por una reacción en cadena de la polimerasa específica para metilación (MSP). Esta técnica fue descrita por primera vez por Herman y cols¹⁰⁸, utilizando pequeñas cantidades de tejido, siendo rápida y relativamente fácil de reproducir, por lo que representó un avance en el estudio de metilación¹⁶⁴.

Recientemente, se ha desarrollado una técnica multiparamétrica basada en la

amplificación múltiple de sondas dependientes de ligando y específica de metilación (MS-MLPA), que permite que en una misma reacción se puedan estudiar hasta 25 genes distintos, sin requerir el laborioso procesado de las muestras con bisulfito^{8,86-88}.

En los últimos años se ha aplicado este análisis de metilación múltiple al estudio de tumores y urotelios normales⁸⁷ y más recientemente en tumores vesicales T1 de alto grado (T1G3) tratados con BCG, habiéndose observado una asociación entre el estado de metilación y la evolución al examinar los tiempos de recidiva, progresión y supervivencia cáncer específica⁸⁶. Nuestro trabajo se ha basado en estos resultados, escogiendo el mismo panel de genes y la misma metodología sobre una serie más amplia de pacientes con TNMI, que incluyera casos no sólo de tumores de alto riesgo como en el estudio referido, sino también con riesgo bajo e intermedio. Además, dado que es una técnica semicuantitativa, se han explorado también diferentes *ratios* de metilación, concretamente por encima de 0.3, es decir, que al menos un 30% del ADN estuviera metilado y por encima de 0.5. Hemos observado un mayor rendimiento de la *ratio* 0.3 en nuestra serie, por lo que ha sido el punto de corte escogido.

3. ASOCIACIONES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Los genes más frecuentemente metilados fueron STK11 (96.8%), MGMT2 (64.5%), RARB (63.0%), GATA5 (63.0%), CD44 (55.4%), PYCARD (52.2%) y WT1 (50.2%). Algunos de estos genes han sido asociados a cáncer de vejiga en una única y reciente publicación⁸⁶ como WT1, CD44, PYCARD, STK11 y GATA5. Otros genes previamente publicados que presentaron porcentajes menores de metilación en nuestra serie fueron IGFS4 (22.3%), ESR1 (19.9%), ATM (9.6%), TP73 (9.5%), THBS1 (8.8%), PTEN (8.0%) y CHFR (4.8%) [Tabla 64].

	BIBLIOGRAFÍA		NUESTRA SERIE			
	Frecuencia de metilación en muestras de tumor	Frecuencia de metilación en muestras de tejido sano	Frecuencia de metilación TaBG	Frecuencia de metilación T1BG	Frecuencia de metilación T1AG	Frecuencia de metilación Global
TP73	0% ¹⁰ Gutierrez 2004 6,45% ³¹ Cabello 2011	-	5,06% ⁷⁹	14,81% ⁸¹	8,79% ⁹¹	9,56% ²⁵¹
MSH6	29,03% ³¹ Cabello 2011	-	40,51% ⁷⁹	48,15% ⁸¹	48,35% ⁹¹	45,82% ²⁵¹
VHL	4% ⁵⁵ Tada 2005 12,9% ³¹ Cabello 2011	100% ⁵ Tada 2005	7,59% ⁷⁹	6,17% ⁸¹	7,69% ⁹¹	7,17% ²⁵¹
RARB	2,1% ⁹⁶ Yates 2007 93,33% ¹⁵ Hoque 2006	50% ² Jarmalaite 2008 100% ³⁰ Yates 2007 100% ¹⁵ Dhawan 2005	72,15% ⁷⁹	77,78% ⁸¹	41,76% ⁹¹	62,95% ²⁵¹
ESR1	16,13% ³¹ Cabello 2011	-	22,78% ⁷⁹	23,46% ⁸¹	14,28% ⁹¹	19,92% ²⁵¹
CDKN2A	0% ³¹ Cabello 2011 94% ³⁵¹ Marsit 2006	50% ² Jarmalaite 2008 100% ³⁰ Yates 2007 100% ⁵ Tada 2005	5,06% ⁷⁹	9,87% ⁸¹	2,20% ⁹¹	5,58% ²⁵¹
PAX5A	12,9% ³¹ Cabello 2011	-	24,05% ⁷⁹	39,51% ⁸¹	37,36% ⁹¹	33,86% ²⁵¹
PTEN	0% ³¹ Cabello 2011	100% ⁶ Kunze 2006	6,33% ⁷⁹	18,52% ⁸¹	5,49% ⁹¹	7,97% ²⁵¹
MGMT	0% ³¹ Cabello 2011 53,3% ¹⁵ Hoque 2006	100% ³⁰ Yates 2007 100% ⁵ Tada 2005	13,92% ⁷⁹	25,93% ⁸¹	12,09% ⁹¹	17,13% ²⁵¹
MGMT2			64,56% ⁷⁹	65,43% ⁸¹	63,74% ⁹¹	64,54% ²⁵¹
PAX6	0% ³¹ Cabello 2011 23% ³⁹ Hellwinkel 2007	95% ³⁹ Helwinkel 2009	5,06% ⁷⁹	12,34% ⁸¹	8,79% ⁹¹	8,76% ²⁵¹
WT1	38,71% ³¹ Cabello 2011	-	54,43% ⁷⁹	50,62% ⁸¹	46,15% ⁹¹	50,20% ²⁵¹
CD44	9,68% ³¹ Cabello 2011	-	69,62% ⁷⁹	72,84% ⁸¹	27,47% ⁹¹	55,38% ²⁵¹
GSTP1	0% ³¹ Cabello 2011 0% ¹⁶³ Catto 2005 0% ¹⁰ Gutierrez 2004 53,3% ¹⁵ Hoque 2006	87,7% ¹⁵ Dhawan 05 100% ⁵ Tada 2005	62,02% ⁷⁹	55,55% ⁸¹	19,78% ⁹¹	44,62% ²⁵¹
ATM	0% ³¹ Cabello 2011	-	8,86% ⁷⁹	13,58% ⁸¹	6,59% ⁹¹	9,56% ²⁵¹
IGSF4	29,03% ³¹ Cabello 2011	-	8,86% ⁷⁹	24,69% ⁸¹	31,87% ⁹¹	22,31% ²⁵¹
CHFR	0% ³¹ Cabello 2011	-	2,53% ⁷⁹	11,11% ⁸¹	1,10% ⁹¹	4,78% ²⁵¹
BRCA2	3,23% ³¹ Cabello 2011	-	13,92% ⁷⁹	23,46% ⁸¹	26,37% ⁹¹	21,51% ²⁵¹
RB1	0% ³¹ Cabello 2011 28,2% ¹⁰³ Malekzadeh 2009	95,8% ⁴⁸ Malekzadeh 2009	5,06% ⁷⁹	8,64% ⁸¹	3,30% ⁹¹	5,58% ²⁵¹
RB1-2			2,53% ⁷⁹	9,87% ⁸¹	5,49% ⁹¹	5,98% ²⁵¹
THBS1	35,48% ³¹ Cabello 2011	-	6,33% ⁷⁹	7,41% ⁸¹	12,09% ⁹¹	8,76% ²⁵¹
PYCARD	0% ³¹ Cabello 2011	-	78,48% ⁷⁹	71,60% ⁸¹	12,09% ⁹¹	52,19% ²⁵¹
CDH13	25,81% ³¹ Cabello 2011 29% ⁹⁸ Maruyama 2001	-	36,71% ⁷⁹	48,15% ⁸¹	52,75% ⁹¹	46,21% ²⁵¹
TP53	12,9% ³¹ Cabello 2011	-	49,37% ⁷⁹	35,80% ⁸¹	21,88% ⁹¹	34,66% ²⁵¹
BRCA1	70,97% ³¹ Cabello 2011	-	50,63% ⁷⁹	41,97% ⁸¹	45,05% ⁹¹	45,82% ²⁵¹
STK11	0% ³¹ Cabello 2011	-	98,73% ⁷⁹	98,76% ⁸¹	93,41% ⁹¹	96,81% ²⁵¹
GATAS	25,81% ³¹ Cabello 2011	-	77,21% ⁷⁹	71,60% ⁸¹	42,86% ⁹¹	62,95% ²⁵¹

Tabla 64. Porcentaje de metilación en cada uno de los grupos y en la serie global y número de pacientes analizados (como subíndice) para un IM>0,3 en nuestra serie, comparado con la sensibilidad y especificidad encontrada en la bibliografía en muestras de tejido, siendo, en general grupos con TMI y TNMI

3.1. Estadio, Grado y Presencia de *Cis*

Se trata de los factores pronósticos de mayor peso en el cáncer de vejiga no músculo invasor^{61,68}. Hemos observado al estudiar globalmente toda la serie de tumores no músculo invasivos una asociación significativa de la hipermetilación de **RARB**, **CD44**, **GSTP1**, **PYCARD**, **TP53** y **GATA5** con la presencia de tumores **Ta**, es decir, mínimamente invasores de la pared vesical, datos que no habían sido previamente publicados. En contraste, la metilación de **PAX5A**, **IGSF4** y **CDH13** se asoció con un estadio **T1**.

Además, la metilación de los mismos genes asociados a **Ta** junto con la de **STK11** se asoció a la presencia de tumores de **bajo grado**, frente a **IGSF4** y **CHFR** que lo hicieron con **alto grado**. En los tumores de bajo grado también pudo encontrarse una asociación estadística de la metilación de **TP73**, **PAX5A**, **PTEN**, **MGMT**, **IGSF4**, **CHFR** y **CDH13** con **T1**.

A pesar de que el *Cis* es un tumor plano que no alcanza la lámina propia de la mucosa urotelial, sus características citológicas lo relacionan con un peor pronóstico de la enfermedad^{6,98}. Suele aparecer junto a tumores exofíticos de alto grado, al igual que ocurre en nuestra serie de pacientes en la que sólo se asoció a tumores T1AG. Existen pocos estudios que hayan valorado la metilación de varios genes en muestras de carcinoma *in situ*¹⁶⁵. En este sentido, se ha observado una mayor progresión y muerte cáncer-específica en tumores que presentan *Cis* con metilación de E-cadherina, p16 y **RARB**⁹⁸, pero no se ha valorado con anterioridad la relación entre la metilación de los genes en el tumor papilar y la presencia de una lesión plana adyacente. Sin embargo, la hipermetilación **RARB**, **CD44**, **PYCARD**, **STK11** y **GATA5**, se asoció significativamente a la **ausencia de *Cis***.

La metilación del gen **RARB** es un evento epigenético ampliamente estudiado en la carcinogénesis vesical, pero en ocasiones con resultados contrapuestos y rangos de frecuencia de metilación diferentes en muestras de tumor, que oscilan desde un 2.1% (n=96; 75TNMI, 28TMI)⁷ a un 93.3% (n=15; TMI+TNMI)⁹, debiendo remarcarse que son análisis realizados con técnicas diferentes al MS-MLPA [Tabla 64]. De este modo, existen estudios que no han observado asociación con el nivel de la profundidad de la invasión tumoral en la pared vesical^{9,10,87,90,98,99} mientras que otros sí lo han

correlacionado con el estadio local^{12,92}. En un estudio que incluía 280 tumores uroteliales se obtuvo relación entre este evento epigenético y estadios altos, pero debe tenerse en cuenta que sólo 117 eran tumores de vejiga y que la metilación de este gen era mayor en los tumores uroteliales del tracto urinario superior, lo cual podría provocar que el resultado global no refleje realmente lo que sucede en el urotelio vesical⁹⁷.

En el cáncer de vejiga, el gen **GSTP1** es un gen que ha sido ampliamente estudiado^{9,12,86,87,90,97,98,116,122,129}. En general no se ha encontrado relación con el estadio ni con la invasión del detrusor^{12,89,98,129}, excepto en un estudio basado en 175 muestras de orina donde se obtuvo relación con la infiltración de la muscular propia y con un peor pronóstico, probablemente en relación al elevado número de tumores músculo invasores en comparación con el de tumores no músculo invasivos⁹.

Por el contrario, la metilación de los genes **CD44**, **PYCARD**, **TP53** y **GATA5** ha sido escasamente estudiada, habiéndose observado porcentajes de metilación en TNMI relativamente bajos^{86,87}, a diferencia de lo que ocurre en nuestra serie, no habiéndose observado en la bibliografía asociaciones con estadio, grado ni *Cis*^{86,87}, al igual que sucede con **PAX5A** e **IGSF4**^{86,87}.

En el presente trabajo se ha observado asociación de la metilación de **CDH13** con estadios T1, en concordancia con lo publicado en otras series donde se obtuvo asociación de este gen con mayor invasividad^{11,12}. Esta misma asociación con el estadio ha sido observada también en el estudio previamente citado de 280 CCT para la metilación del CDH1, gen perteneciente, al igual que el CDH13, a la familia de las cadherinas⁹⁷.

Respecto al resto de genes, no hemos podido encontrar asociación con el estadio ni el grado. Citar que MGMT es un gen para el que se han obtenido rangos de metilación muy variables en la bibliografía, desde 0% (n=21; TNMI)⁹⁹ hasta 53.3% (n=15; TMI+TNMI)⁹ [Tabla 64]. Únicamente dos estudios en orina han observado relación con el estadio^{9,87}, frente a la ausencia de asociación comprobada por otros autores¹² que coincide con nuestros hallazgos. No hemos podido confirmar la relación previamente publicada para WT1, ATM⁸⁷, PAX6⁹ ni p16^{85,140}, si bien diversos autores tampoco han podido confirmar una asociación entre la metilación de estos genes y el estadio o grado tumoral^{4,9,10,12,98}. Tampoco hemos encontrado asociaciones

significativas del grado con el estado de metilación de VHL⁸⁷, MGMT⁸⁷, BRCA1⁸⁷, p14⁹³ y RB⁷⁶ publicadas para muestras de tumor, con el de PAX6 y BRCA2, observadas en muestras de orina⁸⁷, ni con el de CDH13, detectado por algunos autores en suero¹¹ o tumor¹². No obstante, debemos citar que las sondas empleadas en el MS-MLPA se unen exclusivamente a una isla CpG del promotor del gen, mientras que en otras técnicas, como el MSP, utilizado en la mayoría de estudios previos, lo hacen a varias, por lo que nuestros resultados, al menos en parte, no son totalmente comparables con la mayoría de los existentes.

En definitiva, se observó una asociación entre hipermetilación de RARB, CD44, GSTP1, PYCARD, TP53 y GATA5 con la existencia de Ta y bajo grado. Además, la hipermetilación de RARB, CD44, PYCARD, STK11 y GATA5 se asoció con la ausencia de *Cis*. La hipermetilación de STK11 también se asoció estadísticamente con la presencia de tumores de bajo grado. PAX5A y CDH13 se asociaron a T1 y CHFR a AG, mientras que IGSF4 se asoció a ambos.

3.2. Edad, Sexo, Tamaño y Multifocalidad

Además de los anteriores, existen otros factores que también influyen en la evolución de los tumores no músculo invasivos^{61,68} y su relación con los resultados de metilación obtenidos se discutirá a continuación.

Se ha demostrado una asociación significativa entre la metilación de **PAX5A** y una **edad** superior a 65 años en **TabG**, al igual que con la metilación de **PAX6** y **CDH13** en el grupo de **TIBG**. Únicamente se ha publicado una serie de 76 TNMI de bajo grado que asoció la metilación de otro gen perteneciente a la familia de las cadherinas, el CDH1, con la edad¹²⁸, sin embargo, es importante destacar que varios autores han observado que se encuentra metilado en urotelio normal de pacientes ancianos^{13,14,17,166}. Este fenómeno podría afectar a otros genes supresores de tumor, por lo que debe tenerse en cuenta a la hora de realizar estudios de metilación en pacientes añosos, dado que la metilación espontánea asociada a la edad se ha comprobado en diversos tumores^{167,168}.

Resulta difícil realizar análisis de metilación en relación al sexo dado que la mayoría de los tumores se producen en varones. No obstante, se ha observado

asociación significativa con dicho sexo para los genes RARB, CD44, PYCARD y GATA5 en **TIBG**.

En relación al **tamaño**, observamos una asociación significativa entre la hipermetilación de **BRCA1** y neoplasias **TIBG** mayores de 3 cm, lo cual se correlaciona con un peor pronóstico⁶¹ en este grupo de tumores. En los **TIAG** se demostró una asociación significativa entre la metilación de **GSTP1** y **PYCARD** y la presencia de tumores más pequeños (< 3 cm), dato concordante con otros de buen pronóstico vistos anteriormente (estadio, grado y ausencia de *Cis*) en estos genes que no han sido descritas previamente. Sin embargo, no se pudo confirmar la relación del estado de metilación de MSH6, VHL, RARB, CDKN2A, PTEN, BRCA2 ni TP53 con el tamaño tumoral en tumores TIAG, lo que puede ser debido a que los porcentajes de metilación de estos genes en nuestra serie fueron más bajos que los publicados⁸⁶, ni tampoco la observada en muestras de suero para CDH13¹¹ [Tabla 64].

En cuanto a la **multifocalidad**, hemos encontrado una asociación de la hipermetilación de **MGMT2** y **GATA5** con la presencia de tumores múltiples en el grupo **TaBG**, resultados no comunicados previamente. En los tumores **TIBG**, la metilación de **RARB**, **THBS1** y **CDH13** también se ha asociado con la existencia de más de un tumor. La relación de la metilación de **CDH13**, que codifica para H-cadherina, con multifocalidad se añade a otras características de peor pronóstico vinculadas a este gen que hemos citado con anterioridad. Sin embargo, a pesar de que la familia de las cadherinas ha sido estudiada por varios autores como un posible biomarcador en el cáncer de vejiga^{7,12,98,116}, no se había establecido hasta el momento una asociación con la focalidad del tumor ni para CDH13¹¹ ni para CDH1¹⁰⁶. En **TIAG**, a diferencia de lo publicado en el único estudio existente al respecto⁸⁶, se ha encontrado una asociación de **VHL** y **BRCA2** con tumores múltiples, pero no con WT1, ATM, RB1, PYCARD, CDH13 ni GATA5, quizá también relacionado con que la proporción de casos metilados en nuestra serie fue inferior [Tabla 64]. Por otra parte, se demostró una asociación significativa de **CD44** con tumores únicos en la **serie global**, lo cual se relaciona con un menor riesgo de recidiva y progresión⁶¹.

Los cambios encontrados en relación a otros estudios, además de poder deberse a la variación interindividual, puede estar relacionado con la utilización de técnicas diferentes para la determinación de la metilación y a un origen geográfico distinto de los

pacientes. Es importante considerar que el MS-MLPA necesita tener un punto de corte del 30% o mayor para que el algorítmico matemático diseñado permita diferenciar los picos de metilación. Variaciones en el punto de corte para cada uno de los genes podría mejorar la capacidad diagnóstica de la metilación de cada gen. Por otro lado, esta técnica determina la metilación de una única isla CpG en el promotor del gen, mientras que la mayor parte de técnicas de MS-PCR miden de 5 a 10, que pueden ser diferentes, y no coincidir con las que se evalúan por MS-MLPA. Finalmente, tampoco debe excluirse que pueden existir metilaciones en zonas cercanas a las CpG que se miden en MS-MLPA.

A continuación se presentan, a modo de resumen, las relaciones significativas observadas para cada gen [Tabla 65]:

	Tamaño (cm)				Mufocalidad				Sexo				Edad (años)			
	TaBG	T1BG	T1AG	Total	TaBG	T1BG	T1AG	Total	TaBG	T1BG	T1AG	Total	TaBG	T1BG	T1AG	Total
TP73																
MSH6																
VHL							≥2	≥2								
RARB						≥2				Varón						
ESR1																
CDKN2A																
PAX5A													≥65			
PTEN																
MGMT																
MGMT2						≥2										
PAX6														≥65		
WT1																
CD44								1		Varón						
GSTP1			<3	<3												
ATM																
IGSF4								≥2								
CHFR																
BRCA2							≥2	≥2								
RB1																
RB1-2																
THBS1							≥2	≥2								
PYCARD			<3	<3						Varón						
CDH13							≥2							≥65		
TP53																
BRCA1		≥3														
STK11			≥3													
GATA5						≥2				Varón						

Tabla 65. Asociaciones con características clínico-patológicas

3.3. Estudios de Supervivencia

Para la determinación de la utilidad del estado de metilación de los genes estudiados como posibles marcadores pronósticos, se realizaron estudios del tiempo libre de enfermedad, hasta la progresión y del tiempo de supervivencia cáncer específica. En nuestra serie se produjeron un escaso número de fallecimientos por el tumor, lo que dificulta la evaluación de la supervivencia cáncer específica. Este problema se deriva de que la tasa de progresión de este tumor oscila entre un 7 y un 13% por lo que se requieren grandes series para su análisis^{61,68,169}. A pesar de que en nuestro estudio de casos seleccionados se han obtenido unas tasas de progresión (27.5%) y mortalidad (14.3%) en tumores de alto grado claramente superiores a las de las grandes series de TNMI, algunos resultados se vieron afectados por un número limitado de eventos, sobre todo en aquellos genes que presentaban bajas frecuencias de metilación.

Por otro lado, el interés de un marcador pronóstico en cáncer de vejiga reside fundamentalmente en que demuestre un alto valor pronóstico de recidiva y progresión¹⁷⁰. Por eso, en nuestro estudio, se determinaron los valores predictivos positivo y negativo de la metilación de cada gen a los 12 y 24 meses para recidiva no músculo invasiva, progresión y muerte cáncer-específica, considerándose significativo cuando era superior al 70%. Sin embargo, son valores que se ven influidos por la prevalencia del fenómeno dado¹⁷¹, siendo baja para la progresión y sobre todo para la muerte por cáncer. Este hecho ha limitado la interpretación de los valores predictivos de progresión y mortalidad por cáncer que fueron relativamente bajos por los bajos índices de metilación en algunos genes.

3.3.1. Tumores TaBG

Se observó que la hipermetilación de **PAX5A** y **WT1** se asociaba a una **recidiva** más precoz en el estudio de Cox uni y multivariado. Además, la hipermetilación del primero tuvo un valor predictivo positivo de recidiva no músculo invasiva a los dos años, lo que implica que podría considerarse como candidato en futuras investigaciones de marcadores pronósticos de recidiva de tumores TaBG. Por el contrario, la metilación de **BRCA1** se asoció a una recidiva tardía, por lo que es su **hipometilación** la que se

asocia a una recidiva más precoz en nuestra serie, lo cual concuerda con la función de reparación del daño del ADN de este gen, de tal modo que su inactivación favorecería la no reparación de las lesiones presentes en las células tumorales y su muerte. No se analizó la progresión ni la supervivencia cáncer específica, debido al escaso número de eventos (n=2).

Así, se observó por primera vez en cáncer de vejiga que la metilación de **PAX5A** suponía peor evolución en este subgrupo, relacionándose con la aparición de recidivas más precoces. En diversas neoplasias se ha considerado a PAX5 como un posible marcador diagnóstico, tal como ocurre en tumores de pulmón de célula pequeña, en los que su determinación en esputo podría sustituir a la biopsia en los pacientes en los que ésta no sea factible¹⁷², si bien su papel como marcador pronóstico no se ha evaluado.

Por otra parte, la hipermetilación de **WT1** ya ha sido descrita y relacionada con la carcinogénesis vesical, habiendo sido detectada en muestras de orina⁸⁷. Sin embargo, hasta el momento, no se había relacionado con la evolución del tumor de vejiga, aunque ya se ha observado su posible implicación como factor pronóstico en otros como el adenocarcinoma de ovario de célula pequeña¹³².

El gen **BRCA1** ha sido ampliamente estudiado en los tumores de mama y ovario^{100,117}, habiéndose observado que su metilación puede implicar una menor supervivencia en el cáncer de cervix¹⁰⁰. Únicamente se había estudiado su posible valor pronóstico en una serie de 91 T1AG, donde no se obtuvieron resultados significativos⁸⁶.

3.3.2. Tumores T1BG

La metilación de los genes **PAX6**, **ATM**, **CHFR**, **RB1** y **VHL**, se asoció a una **recidiva** más precoz en los tumores T1BG, tanto en el estudio uni como en el multivariado, salvo VHL que mostró significación estadística sólo en el primero. La hipermetilación de otros genes, como la de PAX5A o la de WT1, presentó un alto valor predictivo positivo de recidiva no músculo invasiva a los dos años. No se analizó progresión debido al escaso número de eventos (n=4) ni la muerte cáncer específica (n=1).

Diversos estudios han observado una elevada frecuencia de metilación de **PAX6** en múltiples neoplasias de otras localizaciones cuando se compara con pacientes sanos^{131,149}. Sin embargo, no se ha publicado ningún trabajo que investigue el papel de su metilación como posible factor pronóstico en tumores de vejiga, excepto en la serie de 91 tumores T1G3 previamente citada, en la que se observó una tendencia a una recidiva más precoz⁸⁶ al igual que sucede en nuestra serie, pero en tumores de T1BG. De manera similar, hasta ahora, no se habían publicado datos como marcador pronóstico de **ATM** en este subgrupo de tumores.

El gen **CHFR** se ha relacionado con recidiva y supervivencia cáncer específica en otros tumores como el de colon¹³⁹ o el de pulmón no célula pequeña¹⁴⁰, pero no en vejiga. Por su parte, el **RB1** es un gen ampliamente estudiado, cuya metilación se ha presentado como un posible marcador de evolución para otros tumores como el glioma difuso de bajo grado¹⁴³. No obstante, no se había estudiado previamente la asociación con recidiva no músculo-invasiva en este subgrupo de cáncer de vejiga.

En una publicación previa, se ha encontrado una tendencia a una mayor metilación del **VHL** en TNMI que recidivaban. Sin embargo, si se desglosa la serie según el estadio y grado de los tumores, se puede observar que incluía únicamente 12 T1G1-2 en los que en ningún caso este gen se encontraba metilado, por lo que los autores no obtuvieron asociación estadística en este subgrupo¹¹⁶.

3.3.3. Tumores T1AG

La metilación del gen **PYCARD** se asoció a **recidiva** más precoz como factor independiente, presentando un elevado valor predictivo positivo de recidiva no músculo invasiva a los dos años. Estas características permiten destacar que podría ser considerado como posible factor pronóstico de recidiva en tumores de alto grado.

La relación entre metilación del **PYCARD** y una evolución más desfavorable del tumor ya ha sido demostrada en otros tumores como el neuroblastoma¹⁵⁰ o el cáncer gástrico, en el que además se le ha asociado un papel como predictor de respuesta a quimioterapia¹⁵¹. Aunque hasta hace poco no se había mostrado un papel en el cáncer de vejiga, en la serie de 91T1G3 comentada previamente, se obtuvo que la metilación de este gen se asociaba a una tendencia a un mayor tiempo hasta la progresión⁸⁶. Este

resultado es opuesto al obtenido en este trabajo, que difiere en la selección de un mayor número de casos con progresión en nuestra serie (18.7% vs 27.5%) y en el empleo de mantenimiento en nuestros pacientes frente a sólo inducción, lo que se manifiesta en una mediana mayor del tiempo hasta la progresión en nuestra serie.

En el análisis del **tiempo hasta la progresión** (25 pacientes progresaron a TMI, 27.5%) y de **muerte por cáncer de vejiga** (13 pacientes fallecieron por cáncer de vejiga, 14.3%) no encontramos genes cuya metilación se asociara de manera independiente. Debido a esto, estudiamos toda la serie para aumentar el número de eventos, pero tampoco se encontraron resultados significativos.

Los genes cuya metilación haya sido estudiada como factor independiente de progresión y supervivencia cáncer específica son limitados y aún menos para los que se hayan observado resultados significativos. Recientemente, la hipermetilación de TP73, MSH6, ESR1, RB1, THBS1, PYCARD y GATA5 se ha asociado a un mayor tiempo hasta la progresión y la de este último también a una mayor supervivencia cáncer específica en tumores T1G3, en una serie con una tasa de progresiones menor a la nuestra (18.7%) pero similar en cuanto a muertes por tumor (15.4%)⁸⁶. Por otra parte, la familia de las cadherinas ha sido una de las más analizadas en este sentido, aunque se han obtenido resultados diversos. Esta observación podría sugerir que una pérdida en la adhesión célula-célula de la cadherina puede favorecer un comportamiento más agresivo, con una mayor tendencia a metástasis y muerte. Así, la metilación de CDH13 se ha relacionado con una menor supervivencia global en estudios realizados en muestras de suero con casi un 40% de TMI y, por tanto, con alto porcentaje de tumores más agresivos que los estudiados en nuestra serie¹¹. En lo que se refiere a CDH1, algunos autores han obtenido que su metilación es un factor independiente de supervivencia, probablemente también en relación al alto porcentaje de tumores músculo-invasivos analizados^{7,12}, aunque otros no han observado dicha asociación⁹⁸.

4. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS

En este apartado se discuten las implicaciones clínicas en la estimación del pronóstico de los TNMI. Además, los datos obtenidos se han correlacionado con una posible explicación biológica del estado de metilación de los genes analizados.

4.1. Tumores TaBG

Cuando estudiamos nuestra serie globalmente, observamos una asociación entre hipermetilación de **RARB**, **CD44**, **GSTP1**, **PYCARD**, **TP53** **STK11** y **GATA5** con la existencia de Ta y BG. Todos estos genes mostraron en nuestra serie frecuencias de metilación elevadas que van desde un 49.4% para TP53 a un 78.5% para PYCARD. Resulta interesante que los porcentajes de metilación fueron descendiendo significativamente desde TaBG a T1AG en **PYCARD**, **TP53** y **GATA5** o lo que es lo mismo, estadísticamente se descubrió una hipometilación gradual de estos genes al incrementarse la agresividad del tumor.

El gen **RARB** codifica el receptor del ácido retinoico β con un efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis. Ha sido estudiado en cáncer de vejiga como se comentó anteriormente con altas tasas de metilación^{9,12,90,91,97} [Tabla 64], pero también se considera un gen supresor de tumores implicado en cáncer de mama⁹⁰ y de pulmón y también en tejido sano pulmonar adyacente a modo de alteración premaligna⁹⁰. La inactivación por metilación aberrante de los genes relacionados con la señalización de retinoides se ha relacionado con alteraciones en la diferenciación celular⁷⁷. En este sentido se ha encontrado una asociación de la metilación de este gen con el desarrollo de cáncer de próstata en varones afroamericanos con hiperplasia benigna de próstata y en tejido sano pulmonar adyacente a tumor¹¹⁹ y en tejido sano pulmonar adyacente a tumor⁹⁰, sugiriendo que se trata de un evento de iniciación tumoral¹¹⁹, lo cual coincidiría con los hallazgos de nuestra serie al asociarse con la presencia de tumores poco agresivos. Dado que se ha podido detectar en orina por una técnica similar a la empleado en este trabajo, la metilación de RARB podría emplearse en la detección de tumores vesicales en pacientes con riesgo de padecerlo (fumadores, exposición a factores ambientales de riesgo...). Por otra parte, se ha obtenido la misma asociación para **GATA5**, gen implicado en la diferenciación celular. Además, en nuestra serie se ha

asociado a **multifocalidad** por lo que puede conferir cierto riesgo de recidiva a los pacientes con tumores TaBG que, sin embargo no se confirmó, puesto que no se comportó como un factor independiente de recurrencia.

Glutation-S-transferasa π (**GSTP1**), codifica para el enzima Glutation-S-transferasa π que juega un importante papel en la detoxificación y reparación del ADN^{77,122}. Se ha encontrado metilado en diversos tumores como el de riñón, próstata y colon^{7,90,116,118}. En vejiga también ha sido reconocida su metilación^{9,12,77,86,87,90,97,98,116,122,129} y su asociación a lesiones preinvasivas de cáncer de mama¹³⁴ y próstata¹³³ puede indicar un papel en las fases precoces de la carcinogénesis, coherente con nuestros hallazgos. Igualmente, observamos que en los tumores de T1AG que veremos más adelante, la metilación de GSTP1 se asoció con tamaño pequeño, lo que disminuye el riesgo de progresión en estos tumores, de por sí agresivos.

La pérdida de la función del gen **TP53** genera una importante inestabilidad genética. La alteración del ADN produce señales que activan p53 controlando la función de las quinasa dependientes de ciclina (CDK) requeridas para la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular. Alternativamente, cuando el daño del ADN es irreparable es capaz de activar el proceso de apoptosis celular¹⁵³. Aunque ha sido estudiado en cáncer de vejiga, los resultados en tumores no músculo invasivos han sido contradictorios, no habiéndose demostrado un claro papel como factor pronóstico de recidiva, progresión ni supervivencia en tumores T1 tratados con BCG, donde ha sido más estudiado¹⁵⁴. En nuestra serie, la metilación de TP53 se ha asociado a la presencia de tumores de bajo grado, confirmando el papel de su metilación en cáncer de vejiga^{8,86,87}. Sin embargo, es conocido que la principal alteración de p53 en esta enfermedad se debe a mutación.

Se han publicado pocos trabajos acerca del estado de metilación de CD44 y PYCARD en cáncer de vejiga^{86,87}. **CD44** codifica para una glicoproteína de superficie y su metilación se ha involucrado en fases de invasión tumoral⁷⁷. En los pocos estudios existentes en cáncer de vejiga, no se ha encontrado asociación alguna con factores pronósticos clínico-patológicos^{86,87}. Por el momento, existe poca información sobre el estado de metilación de **PYCARD** en relación al cáncer de vejiga, pero es un gen

involucrado en la apoptosis tumoral que se cree necesario para que p53 lleve a cabo su función¹⁴⁸.

Además de **GATA5**, ya comentado, **MGMT** se asoció a **multifocalidad**. Aunque no mostraron una tendencia a la recidiva precoz en el estudio de supervivencia, es una variable relacionada con un mayor riesgo de recidiva en este grupo de tumores^{61,68}. **MGMT** está relacionado con **TP53** en su papel de reparación del ADN⁷⁷ y ha mostrado porcentajes de metilación variables en los diferentes artículos publicados^{0,10,99} [Tabla 64].

Además, la metilación de **PAX5A** y de **WT1** en este grupo también demostró una tendencia significativa a la recidiva precoz, algo similar a lo que se observó con la hipometilación de **BRCA1**, pudiendo haber frecuentemente otros cambios como mutaciones, que alteran su función¹⁷³. No obstante si tenemos en cuenta que se trata de un gen reparador de ADN⁷⁷, su silenciamiento por metilación hace que no se produzca dicha reparación en las células tumorales, facilitando la interpretación de su efecto protector de recidiva. La hipermetilación de **PAX5A** también se asoció a la presencia de tumores que infiltran la lámina propia de la mucosa vesical (**T1**) en nuestro estudio. La función de tumor supresor y la metilación de **WT1** han sido descubiertas en los últimos años, habiéndose relacionado en estudios recientes con la presencia de **tumores T1**^{8,86}, lo que es coherente con una mayor capacidad de invasión que en los tumores Ta. Además, **PAX5A** mostró un **valor predictivo positivo** de recidiva relativamente elevado a 2 años, por lo podría considerarse en el futuro como marcador pronóstico en este grupo de pacientes.

4.2. Tumores T1BG

La metilación de **PAX5A**, **MGMT**, **TP73**, **PTEN** y **CDH13**, con proporciones variables que van desde un 14.8% para **TP73** a un 48.2% en **CDH13**, se asoció a la presencia de tumores T1 de bajo grado.

Tanto la hipermetilación de **PAX5A** como de **MGMT** se asoció a tumores de bajo grado pero con una invasión más profunda de la mucosa urotelial (**T1BG**). Estos genes se han asociado con factores de recidiva de los tumores TaBG como hemos visto antes, bien con multiplicidad (**MGMT2**) o directamente con una recidiva más precoz en el análisis de supervivencia. Por ello, es lógico pensar que la presencia de metilación de

estos genes en el grupo de menor riesgo (TaBG) pudiera relacionarse con **una recidiva a tumores T1** y que, aun tratándose de tumores de **bajo grado**, la metilación de estos dos genes tenga un comportamiento más parecido al de los **tumores T1** que al de los Ta.

PAX5A es un gen supresor de tumores con una función de control del ciclo celular modulando la apoptosis a través de la vía de p53¹²⁴. Recientemente, su metilación se ha relacionado con la hepatocarcinogénesis¹²⁴, pero su papel en cáncer de vejiga no es aún conocido⁸⁶. Funcionalmente, el **TP73** puede producir la activación de las proteínas de respuesta a p53, inhibir el crecimiento e inducir la apoptosis, por lo que participa en diversas vías del desarrollo y progresión tumoral^{112,124}. Recientemente, su inactivación por metilación aberrante se ha asociado a la existencia de linfomas de mal pronóstico¹¹⁵. Nuestros hallazgos también indican una tendencia a la asociación con tumores de mayor riesgo, si bien los porcentajes de metilación encontrados fueron bajos en todos los grupos.

PTEN es uno de los principales componentes de la vía AKT/PI3K/mTOR¹²⁵ y su mutación en línea germinal se relaciona con la carcinogénesis¹⁷⁴. Se ha encontrado una reducción de su expresión en alrededor de la mitad de tumores vesicales¹²⁵, con diferentes porcentajes según los distintos estudios¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, si bien la pérdida de expresión es más frecuente en tumores músculo invasivos¹⁷⁸. Se cree que para que PTEN se inactive en el cáncer vesical, es necesaria la participación de otros componentes de la vía AKT. Incluso, se ha comprobado experimentalmente que la presencia de mutaciones simultáneas de PTEN y p53 tienden a inducir tumores músculo invasivos¹⁷⁷, observaciones consistentes con la inactivación de este gen por hipermetilación que podría asociarse a la presencia de tumores de gran tamaño y de alto grado^{86,87}. De este modo, nuestros resultados sugieren una tendencia a mayor invasividad (T1) aunque no se observaron asociaciones con tumores de alto grado ni con datos de peor evolución en nuestra serie.

La H-cadherina codificada por **CDH13** está implicada en la adhesión celular e inhibe la proliferación por contacto¹⁵². Su disfunción conduce a un incremento de invasividad y diseminación metastásica de las células neoplásicas¹⁷⁹. En este sentido, la metilación de CDH13 se ha relacionado en el cáncer de vejiga con mayor tendencia a

recidiva¹¹, progresión y, en general, mayor tendencia a la invasión de la pared vesical^{12,87}. Nuestros resultados en tumores no músculo invasivos confirman una asociación significativa con la presencia de tumores que infiltran la lámina propia (T1). Aunque se observó un aumento de la proporción de casos con CDH13 metilado en tumores T1AG respecto a T1BG y T1BG, no encontramos en T1 una relación estadística con alto grado. Sin embargo, se vió una asociación estadística de la metilación de CDH13 en T1BG con **multifocalidad**, factor que se ha asociado a una mayor recidiva y progresión en tumores T1^{47,180}, lo que implica que la metilación de este gen puede aportar información de **peor evolución en tumores T1**.

En nuestros pacientes con tumores T1BG, se encontró que aquellos que presentaban una metilación de **ATM** recidivan más precozmente. En los estudios limitados sobre su metilación en vejiga se ha encontrado que ATM se asocia a multifocalidad en tumores T1 de alto grado⁸⁶. Se trata de un gen implicado en la reparación de ADN mediante la estabilización de p53¹³⁵, por lo que su silenciamiento conducir a una mayor inestabilidad genómica.

Además, en este grupo de tumores también hemos observado un menor tiempo hasta la recidiva relacionado con la metilación de ciertos genes involucrados en el control del ciclo celular. Así, la metilación de **CHFR** se asoció además a la presencia de tumores de **alto grado**, pudiendo indicar progresión cuando aparece metilado en los tumores T1BG. El **PAX6**, miembro de la familia de genes PAX junto a PAX5A, está implicado en la diferenciación estromal, proliferación celular y apoptosis¹⁸¹. Se ha comprobado una progresiva hipermetilación de este gen en los estadios precoces del cáncer de vejiga¹²⁹ que también hemos observado aunque nuestros porcentajes de metilación fueron relativamente bajos. Igualmente, se ha observado en nuestra serie que la metilación de PAX6 está asociada a una **reducción del tiempo hasta la recidiva en tumores T1BG**, hallazgo similar al demostrado recientemente en tumores T1 de alto grado⁸⁶.

La proteína **Rb** es un regulador crucial del ciclo celular cuya actividad está regulada por la vía CDKN2A/CCND1. El daño del ADN incrementa la expresión de CDKN2A, inactivando los complejos de quinasas dependientes de ciclinas y Ciclina D (CDKs/CCND), lo que conduce a la hipofosforilación de Rb1 y a la progresión descontrolada del ciclo celular¹²¹. Recientemente, se ha relacionado la pérdida de

función de Rb y p53 a través de la inactivación de CDKN2A y se cree que mutaciones de p53 inducen la pérdida de función de estos 2 genes de la vía de CDKN2A/CCND1¹⁸². Pueden existir deleciones o mutaciones que afecten al gen RB, pero la inactivación de **CDKN2A** y **RB1** en cáncer de vejiga también pueden producirse por hipermetilación de sus promotores⁷⁷. La metilación de RB1 ha mostrado una asociación significativa a la **recidiva precoz**, con un **alto valor predictivo positivo para recidiva**, lo que apoya su papel como candidato a posible marcador pronóstico en estos tumores.

4.3. Tumores T1AG

Al analizar toda la serie objetivamos altos porcentajes de metilación en este grupo para STK11, MGMT2, CDH13, MSH6 y WT1, siendo genes con altas proporciones de metilación en todos los grupos. Sin embargo, sólo la hipermetilación de **IGSF4** y **CHFR** se asoció estadísticamente con la presencia de tumores T1 de alto grado, a pesar de que sus porcentajes de metilación global fueron limitados, de un 31.9% y del 1.1% respectivamente.

El gen **IGSF4** está implicado en la adhesión celular y sólo recientemente se ha demostrado metilado en cáncer de vejiga⁷⁷. La hipermetilación de **IGSF4** se asoció en nuestra serie a la presencia de tumores T1 de alto grado, con un porcentaje de metilación significativamente más alto (31.9%) que el de los tumores TaBG (8.9%) pero ligeramente superior que el de los T1BG (24.7%). **CHFR** es un gen involucrado en el control del ciclo celular que ha demostrado ser un potente supresor de tumores, si bien su mecanismo de acción no es completamente conocido. Aunque no parece relacionado con la vía de p53, tiene múltiples funciones de control del ciclo celular y su inactivación favorece la invasión tumoral¹³⁸. En nuestra serie, la hipermetilación de **CHFR** se asoció a la presencia de **tumores más agresivos** (T1AG).

La hipermetilación de **PYCARD** tomando 0.3 como punto de corte se asoció a una recidiva y progresión precoz en T1AG, mientras que la ratio de metilación fue superior en tumores Ta de bajo grado. Estos resultados difieren de los publicados recientemente en una serie de tumores T1 de alto grado tratados con BCG sin mantenimiento⁸⁶ y a los obtenidos en el análisis univariado cuando analizamos la

progresión en toda nuestra serie, incluyendo los pacientes de bajo grado que progresaron. Estas observaciones sugieren que la respuesta a inmunoterapia es más favorable en pacientes con este gen metilado y pone de manifiesto que los diferentes esquemas de tratamiento empleando o no mantenimiento, pueden influir en la evolución dada la variabilidad interindividual relacionada con el mecanismo inmunológico de respuesta a BCG en cada paciente. La proteína codificada por PYCARD (ASC) presenta una función dual, por un lado de control de la apoptosis a través de la regulación de las caspasas, y por otro interviniendo también en las vías de inflamación a través de *NFκβ* (Factor nuclear kappa β)¹⁴⁷. Estudios posteriores determinarán si estos mecanismos pueden estar implicados en la respuesta a BCG¹⁸³.

4.4. Interpretación Biológica

Nuestros resultados han permitido diferenciar los tres fenotipos principales en tumores no músculo invasivos en función del estado de metilación de estos genes supresores y evaluar su utilidad como marcadores pronósticos de los tumores vesicales no músculo-invasivos.

Se han descrito dos vías principales de carcinogénesis en el tumor de vejiga. Por un lado, los tumores no invasivos papilares se cree que aparecen a partir de una hiperplasia tisular y presentan frecuentemente mutaciones de *FGFR3*¹⁸⁴, gen implicado en la diferenciación celular y angiogénesis¹⁸⁵ o de *H-ras*⁶⁰. Los pacientes con estos tumores no suelen desarrollar progresión a enfermedad músculo invasiva pero sí recidivas frecuentes^{186,187}. Por otro lado, los tumores músculo invasivos se cree que una gran parte de ellos se inician por displasia y desarrollo de carcinoma *in situ* y presentan anomalías de los genes supresores *TP53*^{60,184,188} y *Rb*. Suelen ser agresivos y progresar, asociándose a elevada mortalidad [Figura 40].

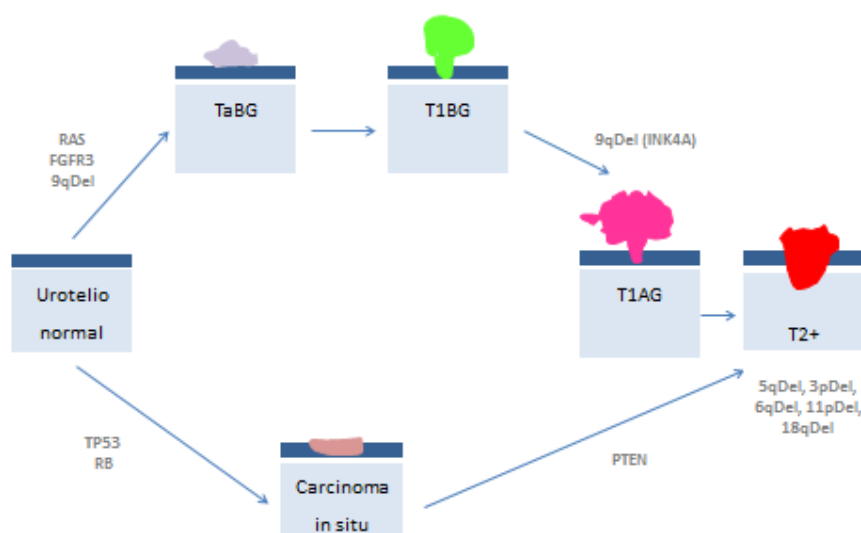


Figura 40. Vías moleculares en el cáncer de vejiga⁶⁰

Sin embargo, aunque algunas alteraciones genéticas han sido relativamente contrastadas, los cambios epigenéticos que se producen en la iniciación y progresión del cáncer de vejiga aún se desconocen. No obstante, se están comenzando a relacionar cómo la hipermetilación de genes específicos impacta o contribuye en las vías biológicas de desarrollo del cáncer vesical y a caracterizar perfiles de metilación que se correlacionen mejor con el comportamiento clínico para identificar marcadores útiles de diagnóstico y pronóstico en tejido tumoral y orina⁷⁷. La asociación de las vías de carcinogénesis con el análisis del pronóstico del cáncer de vejiga puede favorecer la interrelación clínica y biológica.

De este modo, integrando en los esquemas previos nuestros resultados [Figura 41] podemos concluir que la metilación de los genes **RARB**, **CD44**, **GSTP1**, **PYCARD**, **TP53**, **STK11** y **GATA5** podría producirse en el inicio de la enfermedad, siendo alteraciones que se encuentran en tumores TaBG y que suelen estar ausentes en el urotelio normal como se ha observado previamente⁸⁷. También se observó una mayor tendencia a recidiva cuando el tumor TaBG presenta metilación de PAX5A y WT1, frente a la metilación de BRCA1 que parece actuar como protector de recurrencia por su función como reparador de daño de ADN pudiendo ser útiles para identificar los pacientes más propensos a recidivar.

Por otra parte, se cree que en los TNMI se produce una evolución con aumento secuencial de agresividad desde fases no invasivas (TaBG) a invasión del tejido conjuntivo subepitelial (T1BG). En base a nuestros resultados, la metilación de los genes PAX5A, IGSF4 y CDH13 podría estar implicada en dicho proceso. Además, dentro de los T1BG se observó que existía un menor tiempo libre de enfermedad cuando los genes PAX6, ATM, CHFR y RB estaban metilados, pudiendo aplicarse la metilación de estos genes en el establecimiento del pronóstico de este tipo de pacientes.

Por último, los T1AG son considerados tumores con alto riesgo de recidiva y progresión a TMI, de ahí la búsqueda de marcadores que nos puedan aportar información adicional. La metilación de CHFR permitió diferenciar la mayor agresividad que adquieren los tumores al aumentar de grado, de los T1BG a los T1AG. Además, la metilación de VHL y BRCA2 se asoció a una mayor multifocalidad, lo cual podría sugerir una mayor capacidad de anidamiento de las células tumorales. Cuando se analizó la evolución de los T1AG, PYCARD se asoció a un menor tiempo libre de recidiva, por lo que el estudio de metilación permitiría identificar aquellos tumores más agresivos con mayor tendencia a recurrir y que pudieran requerir un control más incisivo de su enfermedad.

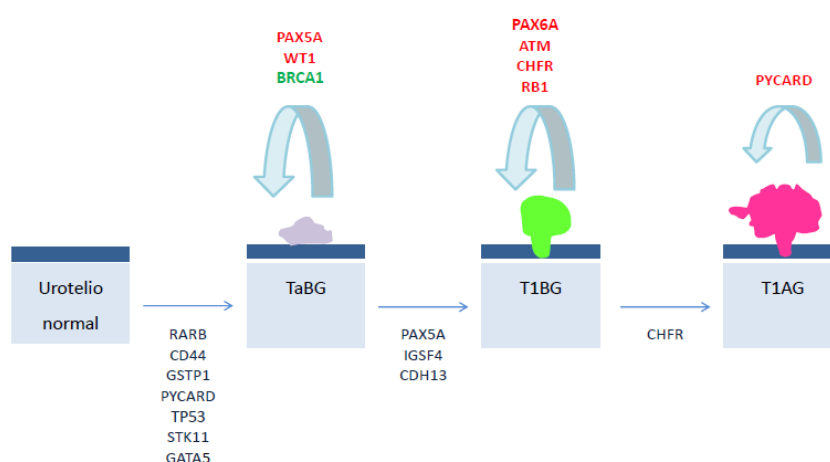


Figura 41. Modelo propuesto desde los resultados de nuestro estudio. En rojo se reflejan los genes cuya metilación estaba asociada a un menor tiempo libre de enfermedad y en verde el gen cuya metilación se ha asociado a recidiva más tardía

Conclusiones

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE
GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS
SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO
MÚSCULO INVASIVOS

Raquel Sacristán González

En respuesta al objetivo global del estudio se concluye que los genes que están diferencialmente metilados en los tumores Ta de bajo grado (TaBG) son RARB, CD44, GSTP1, PYCARD, TP53, STK11 y GATA5; en los T1 de bajo grado (T1BG), PAX5A, IGSF4 y CDH13 y en los T1 de alto grado (T1AG) el CHFR. En respuesta a los objetivos secundarios observamos que:

1. Los genes más frecuentemente metilados en la serie global fueron STK11, MGMT, RARB y GATA5. En los TaBG fueron STK11, PYCARD, GATA5, RARB, CD44, MGMT y GSTP1; en los T1BG, STK11, RARB, CD44, PYCARD, GATA5 y MGMT y en los T1AG, STK11 y MGMT.
2. En la serie global se encontraron asociaciones significativas con el estadio para RARB, CD44, PAX5A, GSTP1, IGSF4, PYCARD, CDH13, TP53 y GATA5, con grado para RARB, CD44, GSTP1, IGSF4, CHFR, PYCARD, TP53, STK11 y GATA5, con ausencia de *Cis* para RARB, CD44, PYCARD, STK11 y GATA5, con tamaño para GSTP1 y PYCARD y con multifocalidad para VHL, CD44, IGSF4, BRCA2 y THBS1. Se destacan dentro de cada subgrupo las siguientes relaciones:
 - En TaBG: MGMT y GATA5 con multifocalidad y PAX5A con la edad
 - En T1BG: BRCA1 con tamaño, RARB, THBS1 y CDH13 con multiplicidad, PAX6 y CDH13 con edad y RARB, CD44, PYCARD y GATA5 con sexo
 - En T1AG: GSTP1, PYCARD y STK11 con tamaño y VHL y BRCA2 con multifocalidad
3. Al analizar la relación de la metilación de los distintos genes con la evolución clínica de los pacientes las asociaciones que se confirmaron por modelos uni y multivariados permitieron pronosticar la recidiva tumoral. En la serie global para PAX5A y RB1, en los TaBG para PAX5A, WT1 y BRCA1, en los T1BG para PAX6, ATM, CHFR y RB1 y en los T1AG para PYCARD

Bibliografía

COMPARACIÓN DE PERFILES DE METILACIÓN DE
GENES SUPRESORES TUMORALES EN DISTINTOS
SUBGRUPOS DE TUMORES VESICALES NO
MÚSCULO INVASIVOS

Raquel Sacristán González

1. Wood DP. Urothelial tumors of the bladder. En: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell-Walsh Urología. 10ª ed. Philadelphia: PA Elsevier Saunders, 2012. 2309-34.
2. Joshi A, Preslan E. Risk factors for bladder cancer: challenges of conducting a literature search using PubMed. *Perspect Health Inf Manag.* 2011 Apr 1;8:1e.
3. Sylvester RJ. Natural history, recurrence, and progression in superficial bladder cancer. *ScientificWorldJournal* 2006;6:2617-25.
4. Valenzuela MT, Galisteo R, Zuluaga A, Villalobos M, Núñez MI, Oliver FJ et al. Assessing the use of p16INK4a promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 2002;42:622-630.
5. Knowles MA. Bladder cancer subtypes defined by genomic alterations. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008 Sept;(218):116-30.
6. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J. Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Cis). Update March 2011. Arnhem, the Netherlands: European Association of Urology; 2011. 1-35.
7. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2046–53.
8. Zuiverloon TC, Beukers W, van der Keur KA, Munoz JR, Bangma CH, Lingsma HF, Eijkemans MJ et al. A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine. *BJU Int.* 2011;109:941-8.
9. Hoque MO, Begum S, Topaloglu, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W et al. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:996–1004.
10. Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaite K, Suziedelis K, Mutanen P, Husgafvel-

- Pursiainen K. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology* 2008;75:145–51.
11. Lin YL, Sun G, Liu XQ, Li WP, Ma JG. Clinical significance of CDH13 promoter methylation in serum samples from patients with bladder transitional cell carcinoma. *J Int Med Res* 2011;39:179-86.
 12. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659–63.
 13. Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jul;62:220-41.
 14. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10-29.
 15. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
 16. Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 2009;27:289-93.
 17. <http://www.facs.org/cancer/ncdb>
 18. López-Abente G, Ramis R, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Gómez-Barroso D et al. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer del Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII, año 2007.
 19. Messing EM. Tumores uroteliales de vejiga. En: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urología.* 9ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008. 2407-46.
 20. Oishi EJ, Hirota T, Matsumoto K., Kakizoe T, Murase T, Fujita J: Carcinoma of the bladder: A clinical and pathological analysis of 87 autopsy cases. *J Urol* 1981;125:36-43.
 21. Bidoli E, Negri E, Franceschi S. Epidemiología del cáncer vesical. En: Vicente J, Chéchile G, Salvador J. *Tumores vesicales superficiales.* Madrid. Acción

- Médica, S.A.;2000. 3-16.
22. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/bladder/incidence>
 23. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000;89:630-9.
 24. Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, Van Den Brandt PA. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 2004;21:392-7.
 25. 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: 289-93.
 26. Monson, RR, Christianini DC: Summary of the evidence: Occupation and environment and cáncer. *Cancer Causes Control* 1997;8:529-31.
 27. Steinmaus CM, Núñez S, Smith AH. Diet and bladder cancer: A meta-analysis of six dietary variables. *Am J Epidemiol* 2000;151:693-702.
 28. La Vecchia C, Negri E: Nutrition and bladder cancer. *Cancer Causes Control*, 1996;7:95-100.
 29. Kamat AM, Lamm DL. Chemoprevention of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2002; 29:157-9.
 30. Grossfeld GD, Carroll PR. Carcinoma urotelial: cánceres de vejiga, del uréter y de la pelvis renal. En: Tanagho EA, McAninch JW. *Urología general de Smith*. 13ª ed. México: El Manual Moderno, 2005. 317-36.
 31. Amin MB. Urotelial dysplasia. En: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA: *Tumours of the urinary system and male genital organs. Pathology and genetics. World health organization classification of tumours. IARC Press; Lyon, 2004: 111-2.*
 32. Jewett HJ. Proceedings: Cancer of the bladder. Diagnosis and staging. *Cancer* 1973;32:1072-4.
 33. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C (eds). *TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-*

- Blackwell, 2009 Dec; pp. 262-265.
34. Jones S, Laschian WA. Non-muscle-invasive bladder cáncer (Ta,T1 and Cis) . En: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell-Walsh Urología. 10ª ed. Philadelphia: PA Elsevier Saunders, 2012. 2335-54.
 35. <http://www.urotecno.es/vejiga-urinaria.htm>
 36. Sauter G, Algaba F, Amin M. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press, 2004. 29-34.
 37. van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 2009;56:430-42.
 38. Pavone-Macaluso M, Caramia M, Pavone C. Tumores vesicales: manifestaciones clínicas. En: Vicente J, Chéchile G, Salvador J. Tumores vesicales superficiales. Madrid. Acción Médica, S.A.;2000. 63-6.
 39. Gorin MA, Ayyathurai R, Soloway MS. Diagnosis and treatment of bladder cancer: how can we improve? *Postgrad Med* 2012;124:28-36.
 40. Dindyal S, Nitkunan T, Bunce CJ. The economic benefit of photodynamic diagnosis in non-muscle invasive bladder cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008; 5:153-8.
 41. Lee CS, Yoon CY, Witjes JA. The past, present and future of cystoscopy; the fusion of cystoscopy and novel imaging technology. *BJU Int* 2008;102:1228-33.
 42. Amin MF, Abd El Hamid AM. The diagnostic accuracy of multidetector computed tomography with multiplanar reformatted imaging and virtual cystoscopy in the early detection and evaluation of bladder carcinoma: comparison with conventional cystoscopy. *Abdom Imaging*. 2012. Published online: 24 May 2012.
 43. Siddappa S, Mythri K, Kowsalya R. Cytological findings in routine voided urine samples with hematuria from a tertiary care center in south India. *J Cytol*. 2012;29:16-9.

44. Stenzl A, Witjes JA, Compérat E, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk M et al. Guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. Update March 2011. Arnhem, the Netherlands: European Association of Urology; 2011.1-75.
45. Brausi MA: New insights in the management of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2007;6:787-88.
46. Brausi M, Collette L, Kurth K, Van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA et al. EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Collaborative Group. Variability in the recurrence rate at first follow up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol* 2002;41:523-31.
47. Kulkarni GS, Hakenberg OW, Gschwend JE, Thalmann G, Kassouf W, Kamat A, Zlotta A. An updated critical analysis of the treatment strategy for newly diagnosed high-grade T1 (previously T1G3) bladder cancer. *Eur Urol* 2010;57:60-70.
48. Jalón Monzón A, Fernández Gómez JM, García Rodríguez J, Rodríguez Faba O, Rodríguez Martínez JJ, Regadera Sejas FJ. Utilidad de la Tomografía Computarizada en la extensión del tumor vesical infiltrante: nuestra experiencia. *Arch Esp de Urol* 2003; 56:133-7.
49. Blick CG, Nazir SA, Mallett S, Turney BW, Onwu NN, Roberts IS 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;110:84-94.
50. Barentsz JO, Jager GJ, Witjes JA, Ruijs JF. Primary staging of urinary bladder carcinoma: the role of MRI and a comparison with CT. *Eur Radiol* 1996;6:129-33.
51. Ahlstrom H, Malmstrom PU, Letocha H, Andersson J, Langstrom B, Nilsson S. Positron emission tomography in the diagnosis and staging of urinary bladder cancer. *Acta Radiol* 1996;37:180-5.
52. Brausi M, Witjes JA, Lamm D, Persad R, Palou J, Colombel M, Buckley R, Soloway M, Akaza H, Böhle A. A review of current guidelines and best practice

- recommendations for the management of nonmuscle invasive bladder cancer by the International Bladder Cancer Group. *J Urol*. 2011;186:2158-67.
53. Huncharek M, McGarry R, Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res* 2001;21:765-9.
 54. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Witjes JA. The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non muscle invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials. *Eur Urol* 2008;53:709-19.
 55. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA et al. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent Ta, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol* 2000;163:1124-9.
 56. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002;168:1964-70.
 57. Böhle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*. 2003;169:90-5.
 58. Böhle A, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 2004;63:682-7.
 59. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009;56:247-56.
 60. Sánchez-Carbayo M, Cordon-Cardó C. Molecular alterations associated with bladder cancer progression. *Semin Oncol* 2007;34:75-84.
 61. 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. *European Urology* 2006;49: 466-77.
62. Fernandez-Gomez JM, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñero 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;182:2195-203.
63. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñero L, Ojea A et al; Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico. The EORTC tables overestimate the risk of recurrence and progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: external validation of the EORTC risk tables. *Eur Urol* 2011 Sep;60:423-30.
64. Fernández-Gómez JM. Reply from authors re: Sylvester RJ. How well can you actually predict which non-muscle-invasive bladder cancer patients will progress? *Eur Urol* 2011;60:431-3. *Eur Urol* 2011; 60:434.
65. Lee JY, Joo HJ, Cho DS, Kim SI, Ahn HS, Kim SJ. Prognostic Significance of Substaging according to the Depth of Lamina Propria Invasion in Primary T1 Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Korean J Urol* 2012;53:317-23.
66. Orsola A, Trias I, Raventós CX, Español I, Cecchini L, Búcar S et al. Initial high-grade T1 urothelial cell carcinoma: feasibility and prognostic significance of lamina propria invasion microstaging (T1a/b/c) in BCG-treated and BCG-non-treated patients. *Eur Urol* 2005;48:231-8.
67. Kamat AM. The Case for Early Cystectomy in the Treatment of Nonmuscle Invasive Micropapillary Bladder Carcinoma. *J Urol* 2006 Mar;175:881-5.
68. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodríguez J. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol* 2000; 164:680-4.
69. Wolff EM, Liang G, Jones PA. Mechanisms of Disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2005;2:502-10.
70. Phé V, Cussenot O, Rouprêt M. Interest of methylated genes as biomarkers in

- urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU Int* 2009;104:896-901.
71. Sánchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E, Lu M, Prystowsky M, Childs G et al. Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res* 2002;62:6973-80.
 72. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature* 2007;8:286-98.
 73. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16:6-21.
 74. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007;16:50-9.
 75. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-7.
 76. Malekzadeh K, Sobti RC, Nikbakht M, Shekari M, Hosseini SA, Tamandani DK et al. Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer. *Cancer Invest.* 2009;27:70-80.
 77. Sánchez-Carbayo M. Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications. *Tumour Biol* 2012;33:347-61.
 78. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 2002;3:415-28. Jones PA, Laird PW.
 79. Fatemi M, Pao MM, Jeong S, Gal-Yam EN, Egger G, Weisenberger DJ et al. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor* 2006;33:76-84.
 80. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:629-56.
 81. Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Tsai YC, Nguyen CT, Jones PA. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:2378-84.
 82. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ et al. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol.* 2003;163:505-16.
 83. Kim YK, Kim WJ. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder

- cancer. *Int J Urol* 2009;16:17-22.
84. Kim WJ, Kim YJ. Epigenetic biomarkers in urotelial bladder cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9:259-69.
 85. Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Muñoz C et al. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res.* 2003;530:9-17.
 86. Agundez M, Grau L, Palou J, Algaba F, Villavicencio H, Sanchez-Carbayo M. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *Eur Urol.* 2011;60:131-40.
 87. Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A et al. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagn.* 2011;13:29-40.
 88. Serizawa RR, Ralfkiaer U, Dahl C, Lam GW, Hansen AB, Steven K et al. Custom-designed MLPA using multiple short synthetic probes: application to methylation analysis of five promoter CpG islands in tumor and urine specimens from patients with bladder cancer. *J Mol Diagn* 2010;12:402-8.
 89. Yu J, Zhu T, Wang Z, Zhang H, Qian Z, Xu H et al. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:7296–304.
 90. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:464–70.
 91. Negraes PD, Favaro FP, Camargo JL, Oliveira ML, Goldberg J, Rainho CA et al. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer* 2008;8:238.
 92. Serizawa RR, Ralfkiaer U, Steven K, Lam GW, Schmiedel S, Joachim Schütz et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int. J. Cancer* 2011;129:78-87.
 93. Chen PC, Tsai MH, Yip SK, Jou YC, Ng CF, Chen Y et al. Distinct DNA

- methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine. *BMC Med Genomics*. 2011;4:45.
94. Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 2004;10:1887–93.
 95. Marsit CJ, Houseman EA, Christensen BC, Gagne L, Wrensch MR, Nelson HH et al. Identification of methylated genes associated with aggressive bladder cancer. *PLoS One* 2010;5:e12334.
 96. Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K et al. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res* 2010;70:8169–78.
 97. Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, et al. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2903-10.
 98. Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, Patterson J, Cross SS, Feeley KM et al. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol* 2006;209:336-43.
 99. Jarmalaite S, Andrekute R, Scesnaite A, Suziedelis K, Husgafvel-Pursiainen K, Jankevicius F. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes and response to interleukin-2 treatment in bladder cancer: a pilot study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:847-54.
 100. Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC et al. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer* 2005;41:2769–78.
 101. Alvarez-Múgica M, Cebrian V, Fernández-Gómez JM, Fresno F, Escaf S, Sánchez-Carbayo M. Myopodin methylation is associated with clinical outcome in patients with T1G3 bladder cancer. *J Urol*. 2010;184:1507-13.
 102. Aleman A, Cebrian V, Alvarez M, Lopez V, Orenes E, Lopez-Serra L et al.

- Identification of PMF1 methylation in association with bladder cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2008;14:8236-43.
103. Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:399-409.
104. Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG et al. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24:1270-8.
105. Mack GS. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1443-4.
106. Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li LC, Nojima D et al. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Mol Carcinog* 2002;34:187-98.
107. Egger G, Aparicio AM, Escobar SG, Jones PA. Inhibition of histone deacetylation does not block resilencing of p16 after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Cancer Res* 2007;67:346-53.
108. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9821-6.
109. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:e128.
110. Matsubara N. Epigenetic regulation and colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2012;55:96-104.
111. Toyooka KO, Toyooka S, Maitra A, Feng Q, Kiviat NC, Smith A. Establishment and validation of real-time polymerase chain reaction method for CDH1 promoter methylation. *Am J Pathol* 2002;161:629-34.
112. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently

- deleted in neuroblastoma and other human cancers. *M Cell* 1997 22;90:809-19.
113. Maas AM, Bretz AC, Mack E, Stiewe T. Targeting p73 in cáncer. *Cancer Lett.* 2011 Aug 22 (*pendiente de publicación*)
114. Gutierrez MI, Siraj AK, Khaled H, Koon N, El-Rifai E, Bhatia K. CpG island methylation in Schistosoma- and non-Schistosoma-associated bladder cancer. *Mod Pathol* 2004;17:1268-74.
115. Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, Jose Garcia M, Nomdedeu J, Rivas C, Fernandez-Piqueras J, Benítez J. Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer* 2002;102:15-9.
116. Tada Y, Wada M, Taguchi K, Mochida Y, Kinugawa N, Tsuneyoshi M et al. The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res* 2002;62:4048–53.
117. Kornegoor R, Moelans CB, Verschuur-Maes AH, Hogenes MC, de Bruin PC, Oudejans JJ, van Diest PJ. Promoter hypermethylation in male breast cancer: analysis by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Breast Cancer Res.* 2012 Jul 5;14(4):R101.
118. Chung WB, Hong SH, Kim JA, Sohn YK, Kim BW, Kim JW. Hypermethylation of tumor-related genes in genitourinary cáncer cell lines. *J Korean Med Sci* 2001;16:756-61.
119. Rybicki B, Mitache N, Do K, Jankowski M, Tang D, Rundle D et al. Methylation of Retinoic Acid Receptor, Beta (RARβ) Gene Increases Risk for Prostate Cancer in African-American Men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:718.
120. Marzese DM, Gago FE, Orozco JI, Tello OM, Roqué M, Vargas-Roig LM. Aberrant DNA methylation of cancer-related genes in giant breast fibroadenoma: a case report. *J Med Case Rep* 2011;5:516.
121. Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999, 13:1501-1512.
122. Marsit CJ, Karagas MR, Danaee H, Liu M, Andrew A, Schned A et al. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer.

- Carcinogenesis 2006;27:112-6.
123. Domínguez G, Carballido J, Silva J, Silva JM, García JM, Menéndez J et al. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002;8:980-5.
 124. Liu W, Li X, Chu ES, Go MY, Xu L, Zhao G, Li L et al. Paired box gene 5 is a novel tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through interaction with p53 signaling pathway. *Hepatology* 2011;53:843-53.
 125. Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6008-17.
 126. Kunze E, Wendt M, Schlott T. Promoter hypermethylation of the 14-3-3 sigma, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. *Int J Mol Med* 2006;18:547-57.
 127. Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, Romero E, Zheng S, Wiencke JK et al. PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro Oncol* 2012 Jun 29.
 128. Owen HC, Giedl J, Wild PJ, Fine SW, Humphrey PA, Dehner LP et al. Low frequency of epigenetic events in urothelial tumors in young patients. *J Urol* 2010;184:459-63.
 129. Hellwinkel OJ, Kedia M, Isbarn H, Budäus L, Friedrich MG. Methylation of the TPEF- and PAX6-promoters is increased in early bladder cancer and in normal mucosa adjacent to pTa tumours. *BJU Int* 2007;101:753-7.
 130. Li CG, Eccles MR. PAX Genes in Cancer; Friends or Foes? *Front Genet* 2012;3:6.
 131. Salem CE, Markl ID, Bender CM, Gonzales FA, Jones PA, Liang G. PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells. *Int J Cancer* 2000;87:179-85.
 132. Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Shiina H, Yamada H, Yamamoto R, et al. WT1 and WT1-AS genes are inactivated by promoter methylation in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Cancer* 2005;104:1924-30.

133. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:366-81.
134. Pasquali L, Bedeir A, Ringquist S, Styche A, Bhargava R, Trucco G. Quantification of CpG island methylation in progressive breast lesions from normal to invasive carcinoma. *Cancer Lett* 2007;257:136-44.
135. Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* 1998 Dec;20:398-400.
136. Brennan K, Garcia-Closas M, Orr N, Fletcher O, Jones M, Ashworth A, Swerdlow A, Thorne H; KConFab Investigators, Riboli E, Vineis P, Dorronsoro M, Clavel-Chapelon F, Panico S, Onland-Moret NC, Trichopoulos D, Kaaks R, Khaw KT, Brown R, Flanagan JM. Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res.* 2012;72:2304-13.
137. Mazumder Indra D, Mitra S, Roy A, Mondal RK, Basu PS, Roychoudhury S et al. Alterations of ATM and CADM1 in chromosomal 11q22.3-23.2 region are associated with the development of invasive cervical carcinoma. *Hum Genet* 2011;130:735-48.
138. Scolnick DM, Halazonetis TD. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature.* 2000;406:430-5.
139. Tanaka M, Chang P, Li Y, Li D, Overman M, Maru DM et al. Association of CHFR promoter methylation with disease recurrence in locally advanced colon cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:4531-40.
140. Koga T, Takeshita M, Yano T, Maehara Y, Sueishi K. CHFR hypermethylation and EGFR mutation are mutually exclusive and exhibit contrastive clinical backgrounds and outcomes in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2011;128:1009-17.
141. Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, Kubo H, Nishiyama K, Kawahara M et al. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:790-6.
142. Schena M, Salón D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene

- expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70.
143. Kim YH, Lachuer J, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K et al. Alterations in the RB1 pathway in low-grade diffuse gliomas lacking common genetic alterations. *Brain Pathol.* 2011;21:645-51.
144. Recouvreux MV, Camilletti MA, Rifkin DB, Becu-Villalobos D, Díaz-Torga G. Thrombospondin-1 (TSP-1) Analogs ABT-510 and ABT-898 Inhibit Prolactinoma Growth and Recover Active Pituitary Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1). *Endocrinology* 2012;153:3861-71.
145. Bonazzi VF, Nancarrow DJ, Stark MS, Moser RJ, Boyle GM, Aoude LG et al. Cross-platform array screening identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma. *PloS one.* 2011;6:e26121.
146. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10:417-26.
147. Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, Adrain C, Creagh EM, MacFarlane M et al. CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. *J Biol Chem.* 2001;276:44069-77.
148. Hasegawa M, Kawase K, Inohara N, Imamura R, Yeh WC, Kinoshita T et al. Mechanism of ASC-mediated apoptosis: bid-dependent apoptosis in type II cells. *Oncogene.* 2007;26:1748-56.
149. Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol* 2011;225:222-31.
150. Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, Oltra S et al. Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol Carcinog* 2011 Mar;50:153-62.
151. Kato K, Iida S, Uetake H, Takagi Y, Yamashita T, Inokuchi M et al. Methylated TMS1 and DAPK genes predict prognosis and response to chemotherapy in gastric cancer. *Int J Cancer.* 2008;122:603-8.

152. Levenberg S, Yarden A, Kam Z, Geiger B. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 1999;18:869-76.
153. Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 2002;21:7421-34.
154. Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol*. 2003;169:1219-28.
155. Kouidou S, Malousi A, Maglaveras N. Methylation and repeats in silent and nonsense mutations of p53. *Mutat Res* 2006;599:167–77.
156. Upadhyay S, Liu C, Chatterjee A, Hoque MO, Kim MS, Engles J et al. LKB1/STK11 suppresses cyclooxygenase-2 induction and cellular invasion through PEA3 in lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:7870-9.
157. Peters I, Eggers H, Atschekzei F, Hennenlotter J, Waalkes S, Tränkenschuh W et al. GATA5 CpG island methylation in renal cell cancer: a potential biomarker for metastasis and disease progression. *BJU Int* 2012;110:144-52.
158. <http://www.ncbi.nlm.gov/gene>
159. <http://www.genecards.org>
160. Lamm D, Colombel M, Persad R, Soloway M, Böhle A, Palou J et al. Clinical Practice Recommendations for the Management of Non–Muscle Invasive Bladder Cancer. *Eur urol european urology supplements* 7 (2008) 651–666 (issue 10).
161. <http://www.mlpa.com>
162. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3740-5.
163. Han H, Wolff EM, Liang G. Epigenetic Alterations in Bladder Cancer and Their Potential Clinical Implications. *Adv Urol* 2012;2012:546917.
164. Coffee B. Methylation-specific PCR. *Curr Protoc Hum Genet* 2009;10:106-14.
165. Horikawa Y, Sugano K, Shigyo M, Yamamoto H, Nakazono M, Fujimoto H et

- al. Hypermethylation of an E-cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J Urol*. 2003;169:1541-5.
166. Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman JG, Gabrielson E. Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol*. 2001;159:831-5.
167. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
168. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:101-18.
169. Fernández-Gómez JM, Solsona E, Unda M, Martínez-Piñeiro L, González M, Hernández R et al. Prognostic factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus calmette-guerin: multivariate analysis of data from four randomized CUETO trials. *Eur Urol* 2008;53:992-1002.
170. Sylvester RJ. How well can you actually predict which non-muscle-invasive bladder cancer patients will progress? *Eur Urol* 2011;60:431-3.
171. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: predictive values. *BMJ* 1994;309:102.
172. Belinsky SA, Grimes MJ, Casas E, Stidley CA, Franklin WA, Bocklage TJ et al. Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum. *Br J Cancer*. 2007;96:1278-83.
173. Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol*. 1999;9:359-67.
174. Brugarolas J, Kaelin WG Jr. Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer Cell*. 2004;6:7-10.
175. Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Fariñas S, López-Guerrero JA, Rubio J, Solsona E et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *Eur Urol*. 2006;50:506-15.
176. Yoo LI, Liu DW, Le Vu S, Bronson RT, Wu H, Yuan J. Pten deficiency

- activates distinct downstream signaling pathways in a tissue-specific manner. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66:1929-39.
177. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev* 2009;23:675-80.
178. Cappellen D, Gil Diez de Medina S, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene.* 1997;14:3059-66.
179. Christofori G. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J.* 2003;22:2318-2.
180. Dalbagni G, Vora K, Kaag M, Cronin A, Bochner B, Donat SM et al. Clinical outcome in a contemporary series of restaged patients with clinical T1 bladder cancer. *Eur Urol.* 2009;56:903-10.
181. Li CG, Eccles MR. PAX Genes in Cancer; Friends or Foes? *Front Genet* 2012;3:6
182. Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2006 Jun;130:844-52.
183. Taxman DJ, Huang MT, Ting JP. Inflammasome inhibition as a pathogenic stealth mechanism. *Cell Host Microbe* 2010;8:7-11.
184. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol.* 2001;158:1955-9.
185. Munro NP, Knowles MA. Fibroblast growth factors and their receptors in transitional cell carcinoma. *J Urol* 2003;169:675-82.
186. Knowles MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol* 2001;54:215-21.
187. Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis.* 2006;27:361-73.
188. Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L et al.

FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 2003;63:8108-12.

