



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

POTENCIALES BIOMARCADORES DE RECURRENCIA EN CÁNCER DE VEJIGA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MÉNDEZ MATÍAS GALO ABAD

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FES IZTACALA, UNAM
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE; 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

POTENCIALES BIOMARCADORES DE RECURRENCIA EN CÁNCER DE VEJIGA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MÉNDEZ MATÍAS GALO ABAD

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FES IZTACALA, UNAM
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE; 2016

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en ciencias biológicas, UNAM por el apoyo recibido durante la Maestría

El presente proyecto de investigación se registró ante el Comité Local de Investigación y Ética en Salud con el número R-2013-3602-17 y recibió financiamiento del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo el convenio FIS/IMSS/PROT/G14/1291

Al CONACYT por su invaluable apoyo al otorgar la beca 624173 para este trabajo de investigación.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo económico con el folio 2015-056

Finalmente agradezco a la Dra. Patricia Piña Sánchez por su incondicional apoyo y confianza durante los años que he sido su alumno al igual que a mi Comité Tutor: Dr. Federico Ávila Moreno y Dr. Alfredo Hidalgo Miranda por sus comentarios para mi desarrollo académico y profesional durante el proceso de la maestría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

“Existen males que ni los cielos pueden juzgar y tienen que resolverse en la oscuridad por nosotros...”

Anonimo.

Mi sincero agradecimiento a mi tutora la Dra. Patricia Piña Sánchez, por guiarme y enseñarme un sin número de cosas que me ayudaron a desarrollarme en lo académico como en lo personal; al igual, por permitirme estar en su laboratorio y darme esta gran oportunidad. Al Dr. Joel Quintero Becerra por ayudarme en toda la parte clínica de este proyecto y su apoyo en todo momento.

Muchas gracias a mi familia que me ha apoyado desde el inicio de esta gran carrera que es la vida, dándome consejos y llamadas de atención cuando es necesario, dándome todo lo que podían y mucho mas! Espero algún día poder pagárselos. Esta tesis va completamente dedicada a ustedes.

Un agradecimiento a mis amigos que a pesar del tiempo algunos siguen conmigo y estarán en ese día, a mis amigos y compañeros de laboratorio: Diana, Cindy, Eduardo, Ana y demás que me ayudaron en diversas ocasiones, en experimentos y problemas personales.

A mis grandes amigos; Jorge Navarrete que te conozco desde la infancia y has estado siempre firme y en la batalla; a Alejandro Cabrera que a pesar de que te conozco desde hace poco, has sabido ser un gran amigo y maestro.

Y al final a cada uno de mis maestros que me enseñaron mucho en esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

Esta tesis esta completamente dedicada a los miembros de mi familia; a aquellos que ya no están conmigo, Mi abuela Petra Ángeles Oviedo, mi tío Marcelino Ángeles Oviedo; a los que siguen conmigo mi madre Rosa María Matías Ángeles, mi padre Galo Abad Méndez Morales, mi tía Antonia Matías Ángeles, a mis hermanos Juan Carlos Méndez Matías, Juan Manuel Méndez Matías, Jonathan Méndez Matías, Josué Méndez Matías, Karla Méndez Matías.

Muchas gracias a todos ustedes por formar parte de mi vida y siempre estar para mi cuando mas lo necesitaba.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
HISTOLOGÍA DE LA VEJIGA	12
HISTOLOGÍA DEL CÁNCER DE VEJIGA	14
ESTADIFICACIÓN DE LOS TUMORES VESICALES	19
ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE VEJIGA: FACTORES DE RIESGO	23
Tabaquismo.....	23
Exposición laboral a sustancias químicas	23
Radioterapia	23
Factores alimentarios	24
Infección urinaria crónica	24
Quimioterapia	24
DIAGNÓSTICO	25
Citología urinaria	26
Cistoscopia.....	27
Prueba NMP22.....	28
Prueba BTA.....	29
Prueba ImmunoCyt.....	29
Prueba UroVysion (FISH).....	29
RECURRENCIA	31
ALTERACIONES MOLECULARES EN CÁNCER DE VEJIGA	33
ALTERACIONES GENÉTICAS EN CÁNCER DE VEJIGA	34
ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER DE VEJIGA	36
RNAs largos no codificantes (lncRNA) en cáncer de vejiga.....	36
METILACIÓN DEL DNA EN CÁNCER DE VEJIGA	38
ZNF-154	49
HOXA9	50
TWIST1	51
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
OBJETIVO GENERAL	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	53
Obtención del DNA	62
Electroforesis en gel de Agarosa.....	62
Metilación de DNA.....	63
Inmunocitoquímica	67
Análisis estadístico.....	68
RESULTADOS	68

DISCUSIÓN	81
CONCLUSIÓN	87
LITERATURA CITADA	89

RESUMEN

El propósito del presente trabajo consistió en evaluar la potencial aplicación que tienen los biomarcadores para la predicción de recurrencia en cáncer de vejiga mediante la cuantificación del porcentaje de metilación del DNA de los genes ZNF 154, HOXA9 y TWIST1 a partir de células de descamación alojadas en la vejiga y recuperadas mediante el estudio de orina. En este estudio se reporta un aumento en el porcentaje de metilación (hipermetilación) de los genes ZNF 154, HOXA9 y TWIST1 que se correlacionaba con el estado de recurrencia en cáncer de vejiga. Adicionalmente fue posible detectar que dicho aumento en el nivel de metilación de los genes ZNF 154 y HOXA9 se encuentra significativamente asociado con el grado tumoral, el tiempo de vigilancia y el tamaño del tumor. Nuestro análisis estadístico y las curvas de supervivencia permitieron asignar un valor predictivo de el estado de metilación es superior en contraste de las pruebas aprobadas por la FDA para la detección de recurrencia en cáncer de vejiga, sugiriendo por primera vez que su detección epigenética cuantitativa en muestras de orina de pacientes podría ser una alternativa diagnóstica-predictiva de tipo no invasiva de primera línea para la detección de recurrencia en cáncer de vejiga.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the potential application with biomarkers for predicting recurrence in bladder cancer by quantifying the percentage of DNA methylation of ZNF 154, HOXA9 and TWIST1 genes from desquamation cells housed in bladder and recovered by studying urine. In this study is reported an increase in the percentage of methylation (hypermethylation) of ZNF 154, HOXA9 and TWIST1 genes correlated with the state of recurrence in bladder cancer. Additionally it was possible to detect that the increase in the level of methylation of genes HOXA9 and ZNF 154 is significantly associated with tumor grade, the monitoring time and tumor size. Our statistical analysis and survival curves allowed to assign a predictive value of the methylation status is superior in contrast with the test approved by the FDA for detecting recurrence in bladder cancer, suggesting for the first time that a quantitative epigenetic detection in samples patient urine could be a predictive diagnostic-type non-invasive alternative of first-line detection of recurrence in bladder cancer.

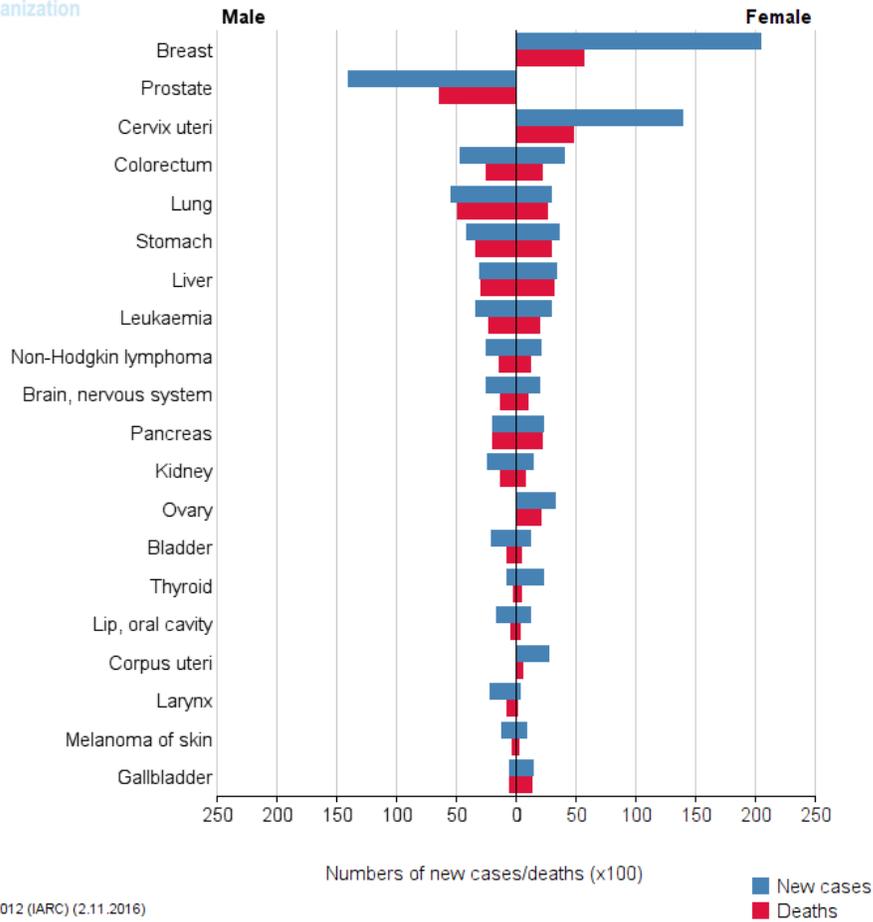
INTRODUCCIÓN

El cáncer de vejiga de entre todas las neoplasias malignas es la segunda más frecuente entre los tumores genitourinarios y la novena neoplasia más común entre todos los tipos de cáncer, así como, la onceava casusa de muerte por cáncer, por año se presentan cerca de 429,793 nuevos casos de los cuales 165,068 mueren a causa de esta enfermedad (World Health Organization, 2004; European Association of Urology, 2010).

El 70 % de los casos por cáncer de vejiga se diagnostica sin invasión muscular (CVSIM), mientras que el 30 % como enfermedad con invasión muscular (CVIM) (European Association of Urology, 2010). El tratamiento estándar para pacientes con cáncer de vejiga músculo invasivo es la cistectomía radical o resección transuretral (Li et al., 2014).

En México, el cáncer de vejiga es catorceavo mas frecuente y diagnostican 3,245 nuevos casos por año, con 1,166 muertes de los casos detectados (Figura 1; GLOBOCAN, 2012). Más del 94% de los tumores del urotelio se originan en la vejiga, 8% en la pelvis renal y el 2% restante en el uréter y uretra. El carcinoma urotelial de células transicionales, es un subtipo histológico más común con el 94% de los casos, los otros subtipos histológicos están constituidos por tumores de células escamosas con el 3%, adenocarcinomas con el 2%, mientras que los tumores de células pequeñas con el 1%. Los tumores uroteliales pueden tener un componente histológico mixto, tales como urotelial y escamoso, adenocarcinoma, micro papilar y sarcomatoide y todos ellos son tratados como cáncer de urotelio (IMSS, Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica IMSS-325-10; 2010).

El 70% de todos los pacientes con cáncer de vejiga de células transicionales, tienen una enfermedad confinada al epitelio o al tejido conectivo subepitelial y pueden ser manejados a nivel clínico con resección transuretral (RTU) con o sin terapia intravesical (Shariat et al., 2008), su tasa de recurrencia va del 50-70% y su indice de progresión a enfermedad músculo-invasora del 10-15% en un período de 5 años, estimando que estos valores han permanecido actualmente (Pagano et al., 1991).



GLOBOCAN 2012 (IARC) (2.11.2016)

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los 20 tipos de cáncer más frecuentes en México; Cáncer de vejiga ocupa el catorceavo lugar de incidencia y mortalidad (Tomada de GLOBOCAN, 2012)

HISTOLOGÍA DE LA VEJIGA

La vejiga urinaria es un órgano hueco musculoso que forma parte del tracto urinario, el cual recibe la orina de los uréteres, la almacena y la expulsa a través de la uretra al exterior del cuerpo durante la micción. La vejiga urinaria se desarrolla principalmente de la porción vesical del seno urogenital y del endodermo de esta misma región se formará el epitelio de la vejiga. El resto de las capas de su pared se forman a partir del mesénquima esplácnico adyacente (<http://fournier.facmed.unam.mx>). La vejiga está situada en la pelvis por detrás de la sínfisis pubiana, su forma y tamaño cambian a medida que está se

llena (Ross & Pawlina, 2008), por lo cual su pared puede presentar distensión notable. La vejiga tiene tres orificios, dos para los uréteres (orificios uretrales) y uno para la uretra (orificio uretral interno), la región triangular definida por estos tres orificios se llama trigono, este es relativamente liso y tiene un espesor constante, mientras que el resto de la pared vesical es grueso y con pliegues cuando la vejiga está vacía y liso y delgado cuando la vejiga esta distendida. Estas diferencias reflejan los orígenes embrionarios del trigono y del resto de la pared vesical. El trigono deriva de los conductos mesonéfricos y la porción principal de la pared vesical tiene su origen en la cloaca además de todo el aparato urinario que va desde el riñón, los uréteres, la vejiga urinaria y la uretra (Ross & Pawlina, 2008).

Histológicamente la vejiga se divide en tres zonas celulares: **(a)** la capa basal, que tiene de espesor una sola capa de células; las células basales son columnares cuando la vejiga esta contraída y puede cambiar a cuboidales cuando la vejiga está llena o extendida, **(b)** la capa intermedia, que puede estar formada de hasta 5 capas de células dependiendo de las distensión de la vejiga, está compuesta de células de tamaño parabasal y **(c)** la capa transicional, está conformada por una sola capa de células superficiales transicionales, son largas y usualmente son del tamaño de una célula superficial escamosa, pero algunas veces es considerablemente más larga. Por último se encuentran los capilares que se sitúan en el estroma inmediatamente debajo del urotelio dentro del tejido conectivo que está rodeado de tejido muscular (Figura 2; Mac de May, 1996).

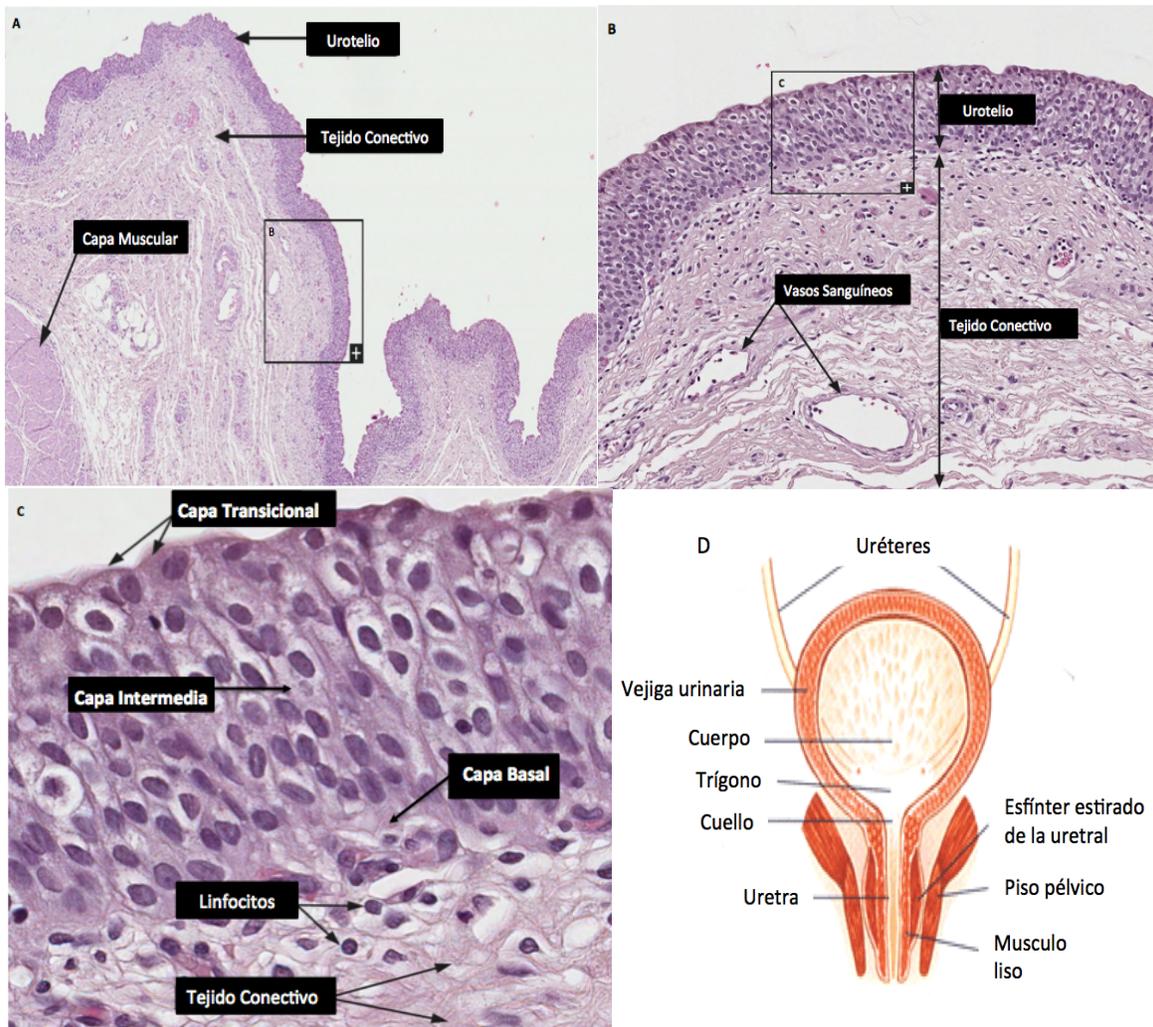


Figura 2. Histología de la vejiga urinaria (a) Se observa el lumen de la vejiga contraída la cual tiene tres capas principales: capa muscular, tejido conectivo y urotelio; (b) dentro del tejido conectivo se encuentran los vasos sanguíneos y capilares; (c) el urotelio es dividido del tejido conectivo por linfocitos. El urotelio esta compuesto por tres capas: basal, intermedia y transicional; d) esquema del interior de la vejiga urinaria (tomado de www.thehumanproteinatlas.org, Consultado en Septiembre 2014; Tomado y modificado de <http://estudiosistemasbiologicos.blogspot.mx/2010/09/aparato-excretor-renal.html>).

HISTOLOGÍA DEL CÁNCER DE VEJIGA

Entre los diferentes cambios que ocurren en la transformación del epitelio de la vejiga es el desarrollo de hiperplasia la cual ha sido definida como una capa de urotelio grande que

contiene cerca de 7 células de espesor, también se puede denotar como un aparente aumento en el número de capas de células. El término hiperplasia papilar urotelial en el pasado ha sido un término impreciso, el cual consiste de una mucosa engrosada sin atipia citológica. Para diagnosticar esta condición se requiere la detección de un engrosamiento epitelial marcado en contraste del aumento del número de capas de células. (Epstein et al., 1998).

Hiperplasia Papilar Urotelial

La Hiperplasia papilar urotelial es una lesión usualmente asintomática y generalmente encontrada en el seguimiento clínico de rutina mediante la cistoscopia. Está caracterizada como una protuberancia ligeramente ondulada, o crecimiento papilar revestida por epitelio la cual es de espesor variable y que carece de atipia. La lesión a menudo tiene unos pocos capilares pequeños dilatados en su base, pero carece de un núcleo fibrovascular bien desarrollado (Epstein et al., 1998; Figura 3).

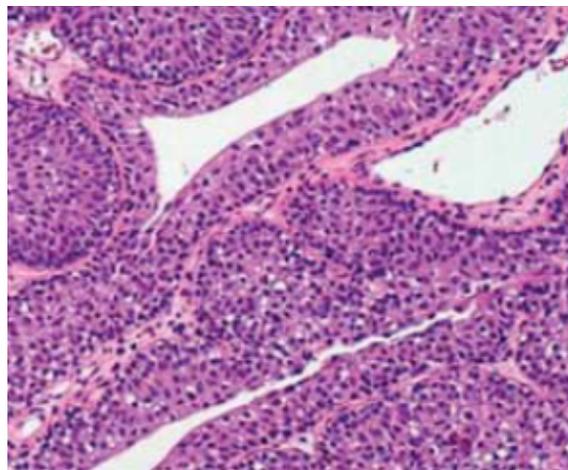


Figura 3. Hiperplasia urotelial con patrón endófitico (Tomado de Amin et al., 2015)

Dentro de las vías para el desarrollo del tumor urotelial existen dos grandes rutas, la Papilar y la No-Papilar (o sólidos), las cuales son independientes, sin embargo en algún momento presentan estadios que se comparten. Los tumores papilares se originan por

cambios difusos hiperplásicos también conocidos como neoplasias uroteliales de bajo grado o papilomas uroteliales. Estos son típicamente de grado histológico bajo y crecen superficialmente como protuberancias no invasivas papilares (frondas). Estos tumores tiene un alto porcentaje de recurrencia, sin embargo, estos prácticamente nunca invaden la vejiga o desarrollan metástasis (World Health Organization, 2004; Mc Conkey *et al.*, 2010).

Neoplasias uroteliales no papilares: Carcinoma in-situ y Displasias

Los tumores sólidos no papilares envuelven a las displasias o carcinomas *in situ* (CIS; Figura 4) también denominadas como neoplasias uroteliales de alto grado. La gran mayoría de las neoplasias uroteliales de alto grado son desarrolladas por pacientes sin una historia previa de tumores papilares. Los carcinomas sólidos de alto grado invaden agresivamente la vejiga teniendo la posibilidad de desarrollar metástasis en los nodos linfáticos y sitios anatómicos distantes. Solo un pequeño porcentaje de los tumores papilares (10-15%) eventualmente progresa a carcinoma invasivo de alto grado, tal progresión precede típicamente al desarrollo de CIS en la mucosa adyacente de la vejiga o en el mismo tumor papilar, estas lesiones son caracterizadas por la presencia de células alargadas, irregulares, núcleos hiper cromáticos que puede estar presentes en todo el espesor del epitelio o solo en parte de este. La actividad mitótica es frecuente en este tipo de lesiones, a menudo en el urotelio superior (Epstein *et al.*, 1998; Mc Conkey *et al.*, 2010). Las displasias presentan cambios arquitectónicos y citológicos apreciables como en las neoplasias, sin embargo está por debajo de los umbrales de diagnóstico de un carcinoma *in situ*. Se caracterizan por presentar atipia inflamatoria que puede estar acompañadas por tejido normal y son denominadas en algunos casos como neoplasias intrauroteliales de bajo grado. Sin embargo, este tipo histológico puede progresar, en algunos casos hacia lesiones precursoras de carcinoma invasivo (World Health Organization, 2004).

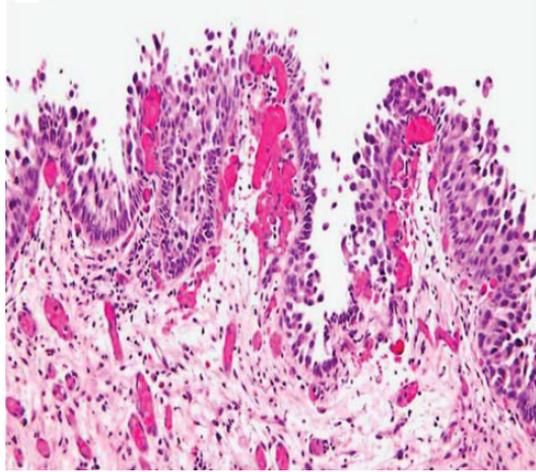


Figura 4. A: Carcinoma urotelial In-situ (Tomado de Amin et al., 2015)

Papiloma Urotelial

El papiloma urotelial está compuesto por un delicado núcleo fibrovascular cubierto por un urotelio indistinguible que lo separa del urotelio normal. La lesión está caracterizada por frondas papilares sin fusiones. El estroma puede presentar células inflamatorias dispersas, mientras que el epitelio presenta pérdida de la atipia y las células superficiales pueden presentarse prominentes. La mitosis esta ausente o puede presentarse en las capas basales, son embargo esto no es considerado anormal desde el punto de vista histopatológico (Figura 5; World Health Organization, 2004).

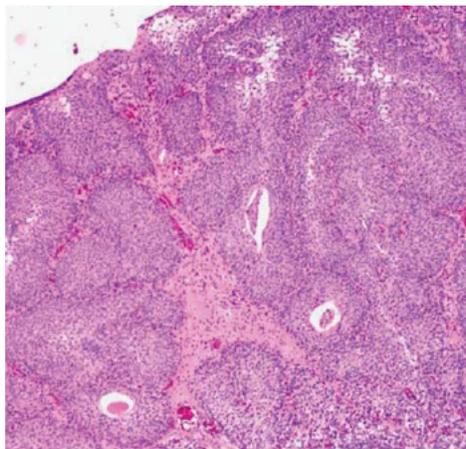


Figura 5. Papiloma urotelial (Tomado de Amin et al., 2015)

Neoplasias uroteliales papilares de bajo grado

Las neoplasias uroteliales papilares muestran un incremento en la proliferación celular lo que provoca un aumento del espesor del urotelio normal. Las papilas de estas neoplasias son discretas en tamaño, alargadas y no fusionadas las cuales están delimitadas por una multicapa de urotelio con atipia celular (World Health Organization, 2004). Las neoplasias uroteliales papilares se caracterizan por un crecimiento papilar con un núcleo central fibrovascular delimitado por urotelio con un espesor y citología normal. En este tipo de neoplasias conforme van avanzado de bajo grado a alto grado, va aumentando la atipia nuclear, el espesor de las células, la distensión de la vejiga, adicionalmente las células se van elongando significativamente y aumenta el desorden en la arquitectura celular (Epstein et al., 1998; Figura 6).

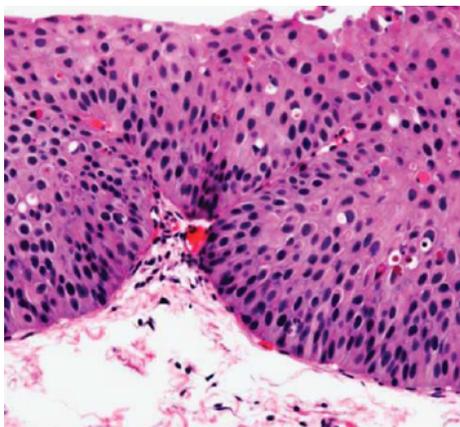


Figura 6. Neoplasia urotelial papilar de bajo grado (Tomado de Amin et al., 2015)

Neoplasias uroteliales papilares de alto grado

Estas neoplasias presentan un revestimiento en las frondas papilares con un patrón desordenado con moderada a elevada atipia celular. El tumor se caracteriza por una arquitectura tisular tipo papilar frecuentemente fusionadas, las cuales pueden presentar algún tipo de ramificación. Este tipo de neoplasias son fácil de reconocer por marcadas variaciones en la polaridad nuclear, tamaño, forma y patrones en la cromatina (Figura 7; World Health Organization, 2004).

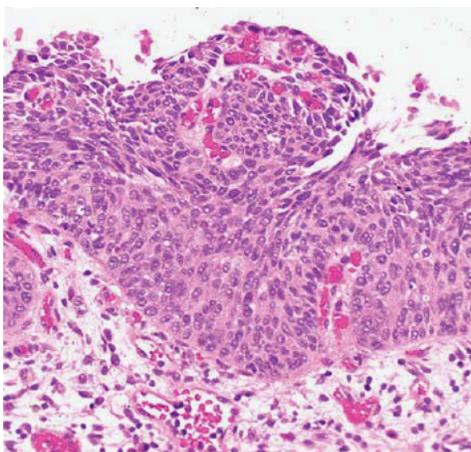


Figura 7. Neoplasias uroteliales papilares de alto grado (Tomado de Amin et al., 2015)

La histología de los carcinomas uroteliales es variable, muchos de los cánceres pT1 son papilares, de bajo o alto grado, mientras que los pT2-T4 son no papilares y de alto grado. Estos carcinomas son evaluados de bajo o alto grado dependiendo del grado de anaplasia nuclear y algunas anormalidades arquitectónicas. El elemento más importante para la evaluación patológica de cáncer de urotelio es el reconocimiento de la presencia y la extensión de la invasión.

Los carcinomas uroteliales están propensos a divergir en su histología debido a cambios en la diferenciación, el más común de estos es el escamoso seguido del tipo glandular. El espectro de la variantes de cáncer de vejiga puede presentarse en proporciones variables. Divergencias en la diferenciación frecuentemente se encuentran en carcinomas de alto grado o de alto estadio (World Health Organization, 2004).

ESTADIFICACIÓN DE LOS TUMORES VESICALES

La clasificación utilizada para este tipo de cáncer es la TMN (T: tumor primario, M: metástasis a distancia y N: Ganglios linfáticos regionales al tumor primario) del 2009 (Tabla 1; Figura 8), la cual está aprobada por la Unión Internacional contra el Cáncer y goza de aceptación generalizada desde el 2010 (European Association of Urology, 2010).

Tabla 1. Clasificación TMN para cáncer de vejiga; 2009.

T – Tumor primario

TX	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Ausencia de datos de tumor primario
Ta	Carcinoma papilar no invasor
Tis	Carcinoma in situ: “tumor plano”
T1	El tumor invade el tejido conjuntivo subepitelial
T2	El tumor invade el músculo
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
T3a	Microscópicamente (masa extravesical)
T3b	Macroscópicamente (masa extravesical)
T4	El tumor invade cualquiera de las estructuras siguientes: próstata, útero, vagina, pared de la pelvis, pared abdominal
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 solo ganglio linfático en la pelvis verdadera (hipogástricos, obturadores, iliacos externos o presacros)
N2	Metástasis en varios ganglios linfáticos en la pelvis verdadera (hipogástricos, obturadores, iliacos externos o presacros)
N3	Metástasis en uno o varios ganglios linfáticos iliacos comunes

M – Metástasis a distancia

MX	Metástasis distante no puede ser evaluada
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Estadio

0a	Ta	N0	M0
0is	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a,b	N0	M0
III	T3a,b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IV	T4b	N0	M0
	cualquier T	N1, N2, N3	M0
	cualquier T	cualquier N	M1

En 1998, la OMS y la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) propusieron una nueva clasificación para los tumores uroteliales no invasores. La última actualización fue publicada por la OMS en el 2004 y continúa vigente la utilizada actualmente (Sauter et al., 2004, Tabla 2).

Tabla 2. Gradación para cáncer de vejiga, 2004.

Gradación de la OMS de 2004

Papiloma urotelial

Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno (NUPBPM)

Carcinoma urotelial papilar de bajo grado

Carcinoma urotelial papilar de alto grado

Esta gradación diferencia entre papiloma, neoplasias uroteliales papilares de bajo potencial maligno y carcinomas uroteliales de bajo y alto grado (European Association of Urology, 2010).

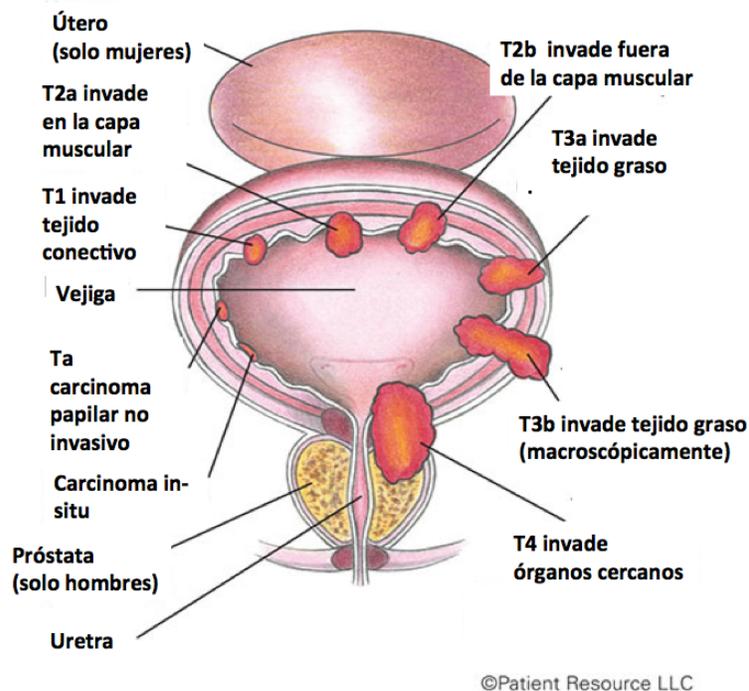


Figura 8. Esquematación de la clasificación de cáncer de vejiga basado en TMN (Tomado y modificado de [http://www.patientresource.com/userfiles/image/Bladder-\(Female-and-Male\)-with-Tumors.jpg](http://www.patientresource.com/userfiles/image/Bladder-(Female-and-Male)-with-Tumors.jpg))

Es reconocido que los tumores de urotelio se desarrollan a lo largo de dos grandes tipos, llamados papilares y no papilares (o sólidos), los cuales son independientes pero en algunas etapas biológicas son similares. Los tumores papilares se originan al difundir cambios hiperplásicos uroteliales, también referidos como neoplasias intrauroteliales de bajo grado, estas son típicamente de grado histológico bajo y crecen como protuberancias superficiales no invasivas papilares; estos tumores tienen alta probabilidad de recurrencia pero prácticamente nunca invaden la vejiga o son metastásicos. Los tumores sólidos o no papilares involucran a las displasias severas o carcinoma in situ, también determinados como neoplasia intrauroterial de alto grado. Gran parte de los tumores no papilares de alto grado se desarrollan en pacientes sin una previa historia de tumores papilares. Los carcinomas sólidos de alto grado invaden la vejiga y pueden desarrollar metástasis a nodos linfáticos cercanos y a sitios anatómicos distantes (Mc Conkey et al., 2010). Aproximadamente, uno de cada tres pacientes diagnosticados con cáncer de vejiga músculo invasivo tiene metástasis no detectada en el momento del tratamiento para tumores primarios y el 25% de los pacientes quienes fueron sometidos a cistectomía presentan invasión en nodos linfáticos al momento de la recurrencia (Stenzl et al., 2012).

Con el fin de mejorar estos resultados insatisfactorios la quimioterapia ha sido incluida en el tratamiento desde los años 80s. Sin embargo, solo 50% de los pacientes con cáncer de vejiga con invasión muscular responden a la quimioterapia basada en cisplatino (Herr et al., 2007). La radioterapia como tratamiento único (40-50 Gy) no es considerada un tratamiento estándar para los pacientes con tumor vesical invasor, debido a que los resultados de la radioterapia como monoterapia se consideran inferiores a los obtenidos con la cirugía radical, solo en casos de que el paciente no tolere la cistectomía y la quimioterapia, se les aplica radioterapia (NCCN, 2009). La quimioterapia adyuvante basada en cisplatino con cistectomía mejora significativamente la supervivencia global. Se ha probado la terapia con CAP (ciclofosfamida, doxorubicina y cisplatino) MVAC o MVEC (metotrexate, vinblastina, epirubicina y cisplatino), sin embargo, existen problemas metodológicos que cuestionan el uso de estos componentes en la práctica clínica (NCCN, 2009).

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE VEJIGA: FACTORES DE RIESGO

Existen varios factores de riesgo conocidos, dentro de los más comunes esta el humo del cigarro y exposición laboral a aminas aromáticas, siendo estos los más importantes (World Health Organization, 2004).

Tabaquismo

El tabaquismo es el factor de riesgo más frecuente en cáncer de vejiga, el 50-65% de los casos en varones y el 20-30% de los casos en mujeres está relacionados con el hábito de fumar. Los componentes cancerígenos del humo del tabaco comprenden las arilaminas, en particular, el potente carcinógeno 4-aminobifenilo (4-PBA), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), aminas heterocíclicas y diversos epóxidos (European Association of Urology, 2010).

Exposición laboral a sustancias químicas

La exposición laboral es el segundo factor de riesgo más importante de cáncer de vejiga. Los casos relacionados con el trabajo comprenden entre 20-25 % de todos los casos de cáncer de vejiga en varios estudios. Los compuestos implicados en la exposición a sustancias químicas han sido derivados del benceno y arilaminas, siendo probable que se produzca en profesiones en las que se emplean colorantes, gomas, tejidos, pinturas, cueros y productos químicos (European Association of Urology, 2010).

Radioterapia

Se han descrito mayores tasas de neoplasias vesicales malignas secundarias después de aplicar radioterapia externa; dado que el cáncer de vejiga tarda mucho en desarrollarse, los pacientes tratados con radioterapia a una edad temprana son los que presentan un mayor riesgo y deben ser objeto de un seguimiento estrecho, por lo que se considera factor de riesgo para recurrencia en cáncer de vejiga (Nieder et al., 2008; European Association of Urology, 2010).

Factores alimentarios

Se ha pensado que varios factores alimentarios, como la presencia de nitrosaminas en los alimentos que están relacionados con el cáncer de vejiga; sin embargo, este vínculo sigue siendo controvertido. En la actualidad, hay pocas pruebas de una relación causal entre el cáncer de vejiga y factores alimentarios (European Association of Urology, 2010).

Infección urinaria crónica

El cáncer de vejiga con invasión muscular, en especial y el carcinoma epidermoide invasor, está directamente relacionado con la presencia de una infección urinaria crónica, la cual puede estar causada, principalmente por procesos inflamatorios (European Association of Urology, 2010). El proceso inflamatorio tiene implicaciones dentro de las características del cáncer según Hanna , ya que este sule de moléculas bioactivas para el microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento que mantienen activas señales de proliferación, factores de sobrevivencia, que limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos, invasión y metástasis e induciendo señales relacionadas con la transición epitelio mesénquima (Hanahan & Weinberg, 2011).

Quimioterapia

En la quimioterapia el uso de ciclofosfamida, un alquilante utilizado en el tratamiento de enfermedades linfo-proliferativas y otras afecciones no neoplásicas, se ha correlacionado con el desarrollo posterior de un cáncer de vejiga con invasión muscular, con un periodo de latencia de 6-13 años. La acroieina es un metabolito de la ciclofosfamida y es responsable de la mayor incidencia de cáncer de vejiga. Aunque cerca de la mitad de los tumores con invasión muscular inicialmente responde a regímenes de quimioterapia basada en cisplatino, el desarrollo de resistencia es el mayor problema y la progresión de la enfermedad en tumores resistentes es rápida. Los mayores esfuerzos se están concentrado a prevenir la recurrencia del tumor papilar y definir mejor las bases biológicas del carcinoma in situ y la progresión muscular en los tumores superficiales (Mc Conkey et al., 2010; Li et al., 2014). En México el tratamiento para cáncer de vejiga en el caso de no ser suficiente la quimioterapia basada en cisplatino se combina con radioterapia seguida de Resección transuretral (RTU) alcanzado porcentajes de respuesta

completa de 60-80%. Se han reportado porcentajes de supervivencia de 50-60% a 5 años que son comparables con la cistectomía. (European Association of Urology, 2009).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de cáncer de vejiga se basa en primera instancia en el análisis de los síntomas que presenta el paciente, entre los cuales se encuentra la hematuria indolora, tenesmo vesical, disuria, poliuria y dolor pélvico. En los tumores más avanzados aparece dolor pélvico y todos los síntomas relacionados con una obstrucción de las vías urinarias. En los pacientes con tumores localmente avanzados puede identificarse una masa pélvica palpable. Además, ha de realizarse una exploración bimanual antes y después de la Resección Transuretral (RTU) para valorar si existe una masa palpable o si el tumor se encuentra fijado a la pared de la pelvis (Fossa et al., 1991).

Para la detección de cáncer en las vías urinarias se utilizan estudios de imagen conocidos como **urografía por tomografía computarizada** usada para el diagnóstico y la estratificación del cáncer de vejiga. Esta técnica es superior a su homólogo, **urografía intravenosa** (Figura 9), que también puede detectar tumores grandes que pueden identificar defectos de llenado en la vejiga, sin embargo a pesar de ser superior trae como consecuencia una mayor exposición a la radiación (López et al., 2007).

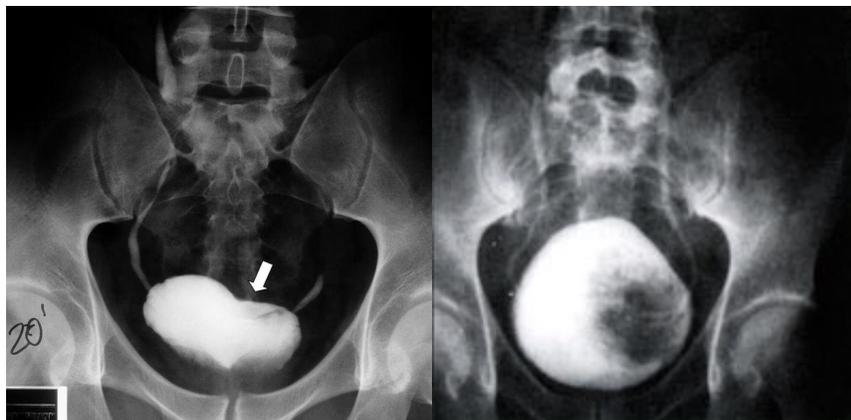


Figura 9. Urografía Intravenosa con cáncer de vejiga (Tomada y modificada de López et al., 2007).

La **ecografía** es otra alternativa para la detección de cáncer de vejiga, la cual posibilita la caracterización de masas voluminosas, la detección de hidronefrosis y la visualización de defectos de llenado intraluminales en la vejiga (Figura 10; López et al., 2007).

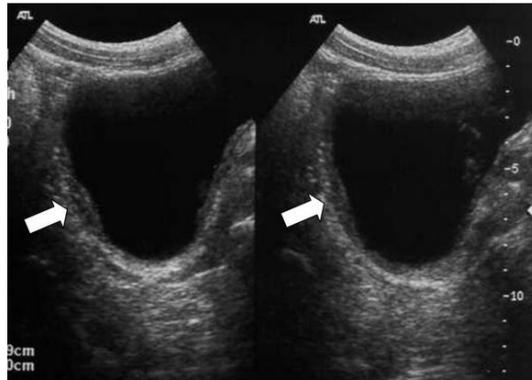


Figura 10. Ecografía vesical donde se ve el engrosamiento de la pared posterolateral izquierda de la vejiga de 23 x 7,8 mm (Tomada de y modificada de López et al., 2007).

Citología urinaria

La citología urinaria es el examen de una muestra de orina miccionada u obtenida mediante lavado vesical en busca de células cancerosas exfoliadas, tiene una sensibilidad elevada solo en los tumores de alto grado, por consiguiente, resulta útil cuando existe una neoplasia maligna de alto grado o un carcinoma in situ. Una citología urinaria positiva puede indicar la presencia de un tumor urotelial en algún lugar de las vías urinarias, desde el cáliz hasta la vejiga y la porción proximal de la uretra, pasando por los uréteres. La citología urinaria tiene una especificidad que se aproxima al 100% en neoplasias de alto grado, sin embargo su evaluación en recurrencia y neoplasias malignas de bajo grado es más complicada por lo cual su sensibilidad es muy baja (44% para cáncer y 38% para recurrencia), debido a que varios factores afectan esta prueba, tales como: bajo rendimiento celular, infecciones urinarias, cálculos o instilaciones intravesicales. La citología se debe efectuar con orina reciente y con fijación adecuada. La orina matutina no es idónea porque presenta citólisis a menudo. No hay ningún marcador urinario autorizado para el diagnóstico del cáncer de vejiga invasor (Van Rhijn et al., 2005; Figura 11).

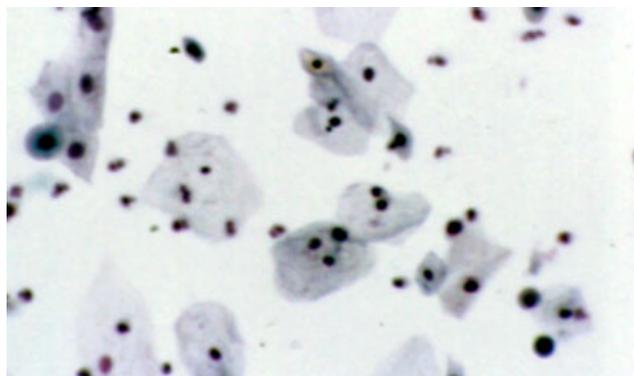


Figura 11. Citología Urinaria Normal (<http://www.conganat.org/icongreso/conferencias/003/figura1.htm>).

Cistoscopia

La cistoscopia es el estándar de oro para la detección del cáncer de vejiga. Detecta la mayor parte de las lesiones papilares y sésiles, con el inconveniente de ser un procedimiento invasivo que causa molestia al paciente. El diagnóstico del cáncer de vejiga depende básicamente de la exploración cistoscópica de la vejiga y del examen histológico del tejido resecado (Figura 12). Por lo general, la cistoscopia se efectúa en el consultorio, con instrumentos flexibles. Cuando en los estudios de imagen iniciales, resonancia magnética o ecografía se ha observado un tumor vesical sin duda alguna, puede omitirse la cistoscopia diagnóstica porque el paciente se someterá a una RTU para obtener un diagnóstico histológico. Se requiere una descripción meticulosa de los hallazgos, que debe incluir la consignación del lugar, tamaño, número y aspecto de los tumores (frondas), así como una descripción de las alteraciones de la mucosa (European Association of Urology). La cistoscopia de luz blanca convencional, siendo un estudio invasivo y molesto para el paciente, alcanza una sensibilidad del 62% para carcinoma in situ y del 85% para tumores exofíticos, con una especificidad del 81% para ambos casos (Van der Poel et al., 1998). La cistoscopia podría ocasionalmente ser inconclusa, debido a apariencia anormal de la mucosa vesical, con inflamación activa o en presencia de hematuria macroscópica. Tiene una tasa elevada de falsos negativos debido a error por parte del operador o debidas a presencia de áreas pequeñas de carcinoma in situ (CIS), las cuales son difíciles de detectar (Herr, 1999).



Figura 12. Cistoscopia: Tumor vesical pTa papilar (Tomado de WHO, 2004)

Además de estas técnicas convencionales para la detección de cáncer de vejiga existen técnicas moleculares (marcadores) que pueden auxiliar al diagnóstico del paciente, sin embargo algunas resultan ser muy costosas y en algunos casos con una sensibilidad y especificidad baja, lo cual no las hace en algunas ocasiones la opción más viable. Entre los marcadores más usados se encuentran:

Prueba NMP22

Esta prueba identifica proteínas de la matriz nuclear que intervienen en la replicación del DNA y la síntesis del RNA durante el proceso mitótico. NMP22 es una proteína que se localiza en los polos del huso celular durante la mitosis y así regula las cromátidas y la separación de las células hijas. Existe un mayor nivel de NMP22 en la orina de pacientes con cáncer vesical. En esta técnica se detectan muchos falsos positivos, ya que los procesos inflamatorios o infecciosos (cistitis, piuria y hematuria) dan lecturas parecidas al diagnóstico del cáncer del urotelio. Si bien en un principio la sensibilidad parecía que lo seleccionaría como un test para el diagnóstico, la baja especificidad limita la utilización para el seguimiento del cáncer de vejiga. Esta técnica presenta niveles de sensibilidad de 62% y especificidad de 76% (Gelabert, 2007; Tabla 3).

Prueba BTA

Esta prueba BTA (Bladder Test Antigen) es un inmunoensayo que detecta la proteína relacionada con el factor H del complemento humano (hCFHrp) en orina utilizando dos anticuerpos monoclonales X13.2 y X52.1. (Feil & Stenzl, 2006). Es un ensayo de aglutinación. En un principio, los ensayos iniciales le concedían una eficacia importante, pero los estudios posteriores le asignan una sensibilidad inferior a la citología urinaria, y sobre todo, menor especificidad, especialmente en pacientes con patologías inflamatorias e infecciosas (Gelabert, 2007; Tabla 3), al igual que con padecimientos genitourinarios benignos, particularmente hematuria. Esta prueba presenta un valor de sensibilidad de 49-68% y especificidad de 73-85% (Abbate et al., 1998; Tabla 3)

Prueba ImmunoCyt

Es un ensayo de inmunofluorescencia (inmunocitoquímica) que detecta marcadores celulares en cáncer vesical de células uroteliales exfoliadas utilizando 3 anticuerpos monoclonales fluorescentes específicos al antígeno carcinoembrionario (CEA) glicosilado de alto peso molecular, al antígeno M344 y LDQ10 dos proteínas mucinosas (Valladares 1995; Feil & Stenzl, 2006). Requiere el uso de microscopía fluorescente por personal entrenado, realizándose en un laboratorio de referencia. Su especificidad se ha reportado del 69%-79%, aunque disminuye significativamente en pacientes con hiperplasia prostática benigna y con cistitis, en quienes tuvieron falsos positivos. En esta metodología se presentan niveles de sensibilidad 76% y especificidad de 77% (Vriesema et al., 2001; Tabla 3).

Prueba UroVysion (FISH)

Es un estudio basado en la detección de las células uroteliales exfoliadas en la orina con alteraciones genéticas consistentes con el diagnóstico de carcinoma urotelial. Las alteraciones cromosómicas que se analizan son principalmente en los cromosomas 3, 7, 9 y 17, presentando aneuploidia para los cromosomas 3,7 y 17 y pérdida en el cromosoma 9 (locus 9p21). La prueba de FISH supera la citología urinaria en todas las etapas y grados

de carcinoma urotelial con valores de sensibilidad 79% y especificidad 83% (Halling et al., 2002; Tabla 3).

Existen más técnicas clínicas y marcadores moleculares para la detección de cáncer de vejiga sin embargo los valores de especificidad y sensibilidad son bajos, además de tener una alta incidencia de falsos positivos, por lo cual, para su utilización, se tendría que asegurar que los resultados obtenidos en estas sean debido a la presencia de cáncer de vejiga y no a otros padecimientos como antes se ha mencionado.

Marcador	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Citología	42	95
NMP22	68	76
BTA	49-68	73-85
InmunoCyt	76	77
FISH	79	83

Tabla 3. Valores de sensibilidad y especificidad para los test analizados con el 95% de confianza en los intervalos, basados en estudios de metaanálisis (Tomado y modificado de Gelabert, 2007).

Actualmente no existen trabajos relacionados sobre pruebas diagnosticas NMP22, BTA, Inmunocyt y FISH en la población Mexicana, con los cuales se pueda comparar su valor diagnostico en sensibilidad y especificidad para la detección de cáncer de vejiga.

RECURRENCIA

El cáncer de vejiga es una neoplasia con un alto índice de recurrencia, de hasta un 70% en un periodo de latencia de hasta 5 años (Mathers et al., 2008). Para determinar la posibilidad de recurrencia de un paciente se debe de llevar seguimiento del paciente en base a tres puntos:

- Cronología natural de las recurrencias (Figura 13).
- Probabilidad de las recurrencias en la enfermedad (Tabla 4).
- Deterioro funcional en lugares concretos (Figura 14).

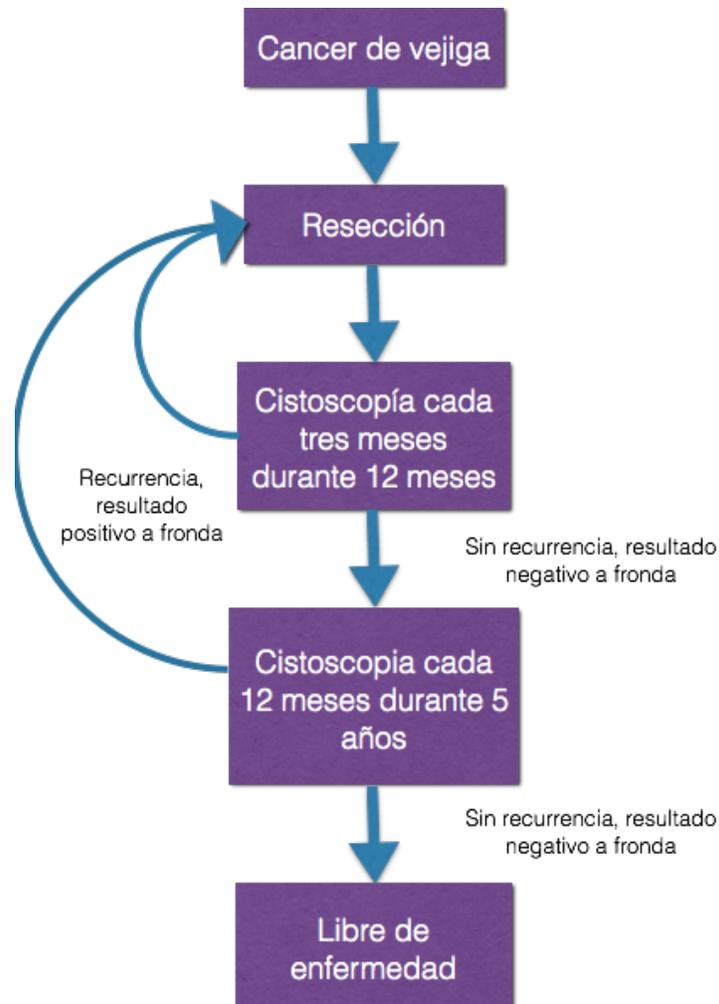


Figura 13. Régimen de vigilancia para recurrencia en cáncer de vejiga (European Association of Urology, 2010)

Patología	Probabilidad aproximada de recurrencia en 5 años	Probabilidad aproximada de progresión a musculo invasión
Ta-Bajo grado	50%	Mínimo
Ta-Alto grado	60%	Moderado
T1-Bajo grado	50%	Moderado
T1-Alto grado	50%-70%	Moderado-Alto
Tis	50%-90%	Alto

Tabla 4. Probabilidad aproximada de recurrencia y progresión de cáncer de vejiga , en 5 años después de la intervención (Tomado y modificado del NCCN, Agosto del 2014).

Para una mejor predicción de recurrencia se deben de incluir en el historial del paciente: la edad, invasión linfovascular, CIS, quimioterapia neoadyuvante y radioterapia adyuvante. Con estos se ha determinado que aumenta un 3.2% las predicciones de recurrencia (European Association of Urology, 2010; Karakiewicz 2006).

El tratamiento definitivo puede conseguir una supervivencia prolongada y en la mayoría de los casos, proporciona un alivio significativo de los síntomas. El tratamiento consiste en quimioterapia sistémica, cirugía local o radioterapia. Las recurrencias a distancia se observan hasta en un 70%-50% de los pacientes tratados con cistectomía. Casi todas las recurrencias se producen durante los primeros 24 meses, aunque se ha observado progresión después de más de 10 años (European Association of Urology, 2010; Mathers et al., 2008). El tratamiento más común para este padecimiento es una resección transuretral complementada con el uso de inmunoterapia intravesical o quimioterapia en orden dependiendo del número de recurrencias y si existe progresión de la enfermedad (Wolf et al., 2011). Actualmente no se cuenta con información acerca de la probabilidad de recurrencia y progresión de la enfermedad en México, sin embargo, se tiene el estimado de que el cáncer de vejiga corresponde al 14.4% de los cánceres genitourinarios, ubicándose como el 4 más frecuente (Mayorga et al., 2014). En pacientes con carcinomas de células transicionales, la recurrencia se presenta usualmente local, es decir intravesical, aunque raramente puede presentarse en la vía urinaria alta, aún después de varios años,

por lo cual requiere una vigilancia durante toda la vida. El 30% de pacientes, presentarán una enfermedad músculo-invasora al momento del diagnóstico. En esta población, el 50% tendrán metástasis a distancia en los siguientes 2 años y 50% morirán de cáncer en los siguientes 5 años a pesar del tratamiento (Stein et al., 1998; GLOBOCAN 2012).

A menudo, los regímenes de vigilancia no logran detectar a los tumores antes de que surjan los síntomas, por lo que la búsqueda de marcadores tempranos para la detección de recurrencia es importante. Actualmente solo se cuenta con las mismas técnicas para detección de cáncer de vejiga como para recurrencia, sin embargo, no alcanzan los valores deseados de sensibilidad y especificidad (Todenhöfer et al., 2014).

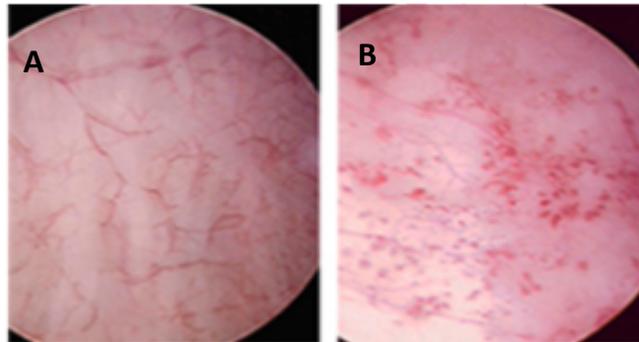


Figura 14. Cistoscopia del interior de la vejiga donde se observa el deterioro funcional de lugares concretos, A. Vejiga normal. B. Vejiga con lesiones. (<http://revistareportemedico.com/home/wp-content/uploads/2014/07/cistitis-intersticial3-reportemedico.jpg>)

ALTERACIONES MOLECULARES EN CÁNCER DE VEJIGA

El cáncer de vejiga tiene un componente multifactorial, por lo cual diferentes alteraciones en la célula pueden estar involucrados en el desarrollo y mantenimiento del cáncer, alteraciones moleculares que van desde modificaciones a nivel genético y epigenético, las cuales pueden estar indicadas por los factores de riesgo antes mencionados.

ALTERACIONES GENÉTICAS EN CÁNCER DE VEJIGA

El cáncer de vejiga contiene múltiples alteraciones a nivel genético, cerca del 65% de todas las mutaciones descritas para cáncer de vejiga son consecuencia de APOBEC, que es una enzima que cataliza la deaminación de citosinas provocando una conversión a uracilo, resultando en una alteración en la secuencia de DNA o RNA. De igual manera existe una alta frecuencia de amplificaciones o deleciones genéticas mediadas por APOBEC que afectan algunas de las vías canónicas de señalización involucradas en el desarrollo del cáncer: ciclo celular, receptor de tirosina quinasa, RAS y PI3K/mTOR (KIm et al., 2015; Henderson et al., 2014). Para identificar los genes comúnmente mutados en cáncer de vejiga se ha tomado en cuenta distintas bases de datos, logrando identificar genes involucrados en la regulación de la cromatina, transcripción, regulación del ciclo celular, reparación del DNA y migración (Tabla 5; KIm et al., 2015). Estos hallazgos conducen a un largo número de potenciales terapias para el tratamiento del cáncer de vejiga, enfocadas en las mutaciones y sus efectos en el desarrollo del cáncer en vías de señalización importantes como en ciclo celular, genes reguladores de la cromatina, vía de PI3K-AKT_mTOR y en los receptores de tirosina quinasa-RAS-ERK.

Tabla 5. Genes significativamente mutados en cáncer de vejiga (Tomado y modificado de Kim et al., 2015)

Categoría	Genes	Total de mutaciones	Prevalencia en cáncer de vejiga
Ciclo Celular	TP53	176	44%
	CDKN1A	33	8%
	RB1	66	16%
	CDKN2A	20	5%
RAS	HRAS	26	6%
	KRAS	40	10%
Transcripción	ELF3	41	10%
	ZFP36L1	28	7%
	RXRA	27	7%
	KLF5	19	5%
	NFE2L2	17	4%
Cromatina	KDM6A	105	26%
	ARID1A	94	23%
	EP300	54	13%
	MLL2	70	17%
	BRWD1	18	4%
	MBD1	11	3%
PI3K/mTOR	PIK3CA	84	21%
	TSC1	25	6%
RTK	FGFR3	51	13%
	TYRO3	14	3%
	ERBB3	43	11%
	TGFBR1	12	3%
	ERBB2	37	9%
	ERBB4	25	6%
	IRS4	8	2%
Migración	RHOB	18	4%
	RHOA	18	4%
Regulación de ROS	TXNIP	16	4%
Segregación cromosómica	STAG2	52	13%
Reparación del DNA	ERCC2	41	10%
Otros	FAM47C	15	4%
	CHIT1	11	3%
	C3orf70	13	3%

Nota: Mutaciones identificados en un análisis de 404 pacientes con cáncer de vejiga (Kim et al., 2015)

Dentro de las alteraciones más caracterizadas está la pérdida de la heterocigosidad (LOH, Loss of Heterozygosity, por sus siglas en ingles), seguidos por las mutaciones y polimorfismos. Dentro de las alteraciones pertenecientes a LOH encontramos los *loci* 3q22, 5q22– 23, 9q21, 10q26, 13q14, and 17p13, los cuales contiene algunos genes tales

como *p16*, *ARF*, *P2RY5*, *ITM2B*, *Rb*, *MLNR* *ARL11*. Estos mismos pueden presentar otras alteraciones como en el caso de *ITM2B* el cual se ha reportado que presenta metilación en ausencia de LOH. Los genes *Rb* y *P2RY5* presentan mutaciones reportadas en cáncer de vejiga. Por último los polimorfismos están presentes en los genes *ARL11* y *P2RY5*. La mayoría de estos genes está involucrados en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis lo cual habla de su importancia durante el proceso neoplásico (KIm et al., 2015)

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER DE VEJIGA

Dentro de las alteraciones epigenéticas podemos encontrar 3 tipos principales: modificaciones de histonas, metilación del DNA y RNAs no codificantes. Dentro de estas las mas reportadas en cáncer de vejiga son la metilación de DNA, modificaciones de histonas y los RNAs no codificantes o de interferencia.

RNAs largos no codificantes (lncRNA) en cáncer de vejiga

Los lncRNAs, tentativamente son definidos como RNAs no codificantes de más de 200 nucleótidos de longitud, pero con pérdida de la capacidad de codificar a proteína. Los lncRNAs juegan papeles importantes en distintos procesos biológicos a través de varios mecanismos y en diversos estudios se les ha implicado en una variedad de enfermedades, incluyendo al cáncer. La pérdida de la regulación de los lncRNAs ha mostrado una asociación con metástasis y con el pobre pronóstico. Sin embargo, hay solo estudios preliminares sobre el papel de los lncRNAs en cáncer de vejiga, por lo cual su contribución de estos en este tipo de cáncer permanece desconocida (Zhang et al., 2016). En los estudios realizados por Zhang y colaboradores se identificó un lncRNA sobreexpresado en muestras de tejido de 65 pacientes en comparación con tejido adyacente, al cual denominaron lncRNAs-UNMIBC y determinaron que tiene interacción física con el complejo PCR2 (Complejo Represivo Policomb) mediante las subunidades SUZ12 y EZH2. Al correlacionar las características clínicas observaron que aquellos pacientes con un aumento en expresión de este lncRNA se correlacionaban con la recurrencia en un periodo de seguimiento de 42 meses (Figura 15).

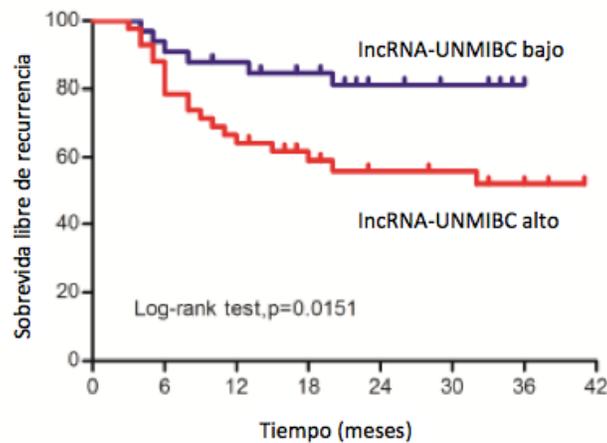


Figura 15. Sobrevida libre de recurrencia de 65 pacientes, con alto y bajo nivel de expresión de lncRNA-UNMIBC en un periodo de seguimiento de 42 meses (Tomado y modificado de Zhang et al., 2016).

Los RNAs no codificantes juegan un papel muy importante para el desarrollo del cáncer ya que algunos de estos se han encontrado relacionados con la quimio-resistencia y quimio-sensibilidad en terapias neoadyuvantes basadas en cisplatino. Se ha descrito la participación de miR-34a en la quimio-sensibilidad en regímenes basados en cisplatino; este miRNA se ha reportado hipermetilado y su expresión reducida en cáncer de vejiga en comparación con tejido adyacente (Figura 16A), sin embargo cuando a los pacientes se les trata con cisplatino, el nivel de metilación baja permitiendo la expresión de miR-34a, el cual, es considerado como un supresor de tumores ya que está implicado en la apoptosis, arresto del ciclo celular y por lo tanto la viabilidad de las células tumorales se ve disminuida (Figura 16B). Sin embargo solo el 50% de los pacientes responden a quimioterapia basada en cisplatino y el restante adquiere quimio-resistencia (Li *et al.*, 2014).

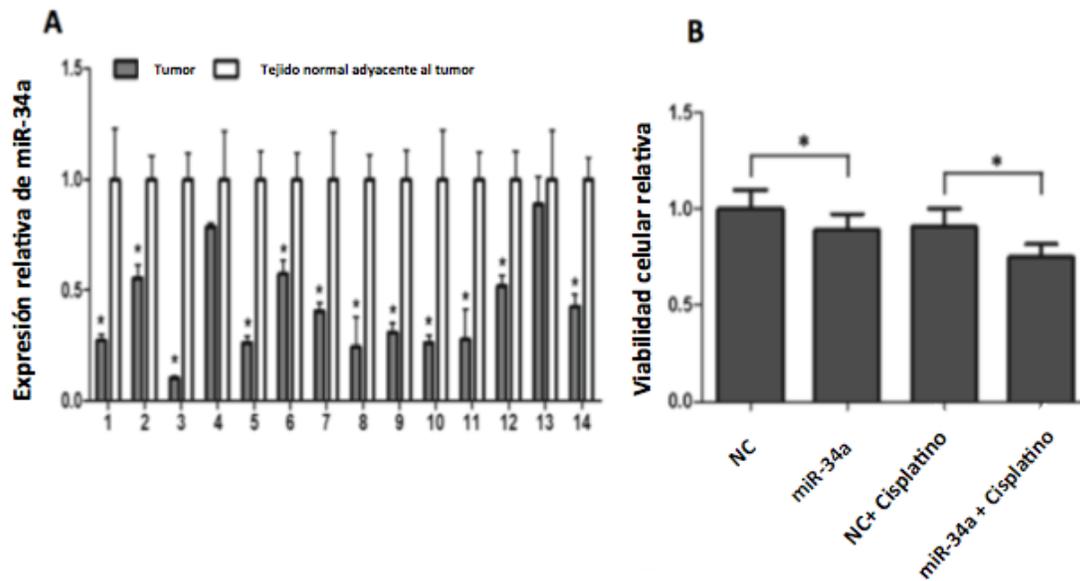


Figura 16. a) Expresión relativa de miR-34a en paciente con cáncer de vejiga, tanto en tejido tumoral como normal adyacente b) Viabilidad de las células tumores bajo condiciones de cisplatino y miR-34a (Tomado y modificado de Li *et al.*, 2014).

METILACIÓN DEL DNA EN CÁNCER DE VEJIGA

La metilación del DNA es catalizada por las DNA metiltransferasas, este proceso involucra la transferencia del grupo metilo de la adenosil-L-metionina al carbono 5 de la citosina (Figura 17; Doerfler, 1983). En células de mamífero se han identificado tres enzimas diferentes que llevan a cabo esta reacción y se han clasificado en dos grupos: las DNA metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1) y las metilasas *de novo* (DNMT3A y DNMT3B) (Okano *et al.*, 1999; Bestor, 2000). La acción de la DNMT1 ocasiona que el DNA sea metilado al inicio de la replicación, solo la cadena nueva es metilada y por esta razón los patrones de metilación son heredables de una manera semiconservativa y pueden ser perpetuados en la población celular (Figura 17; Rodríguez *et al.*, 2004). Esta enzima se expresa de forma ubicua en los tejidos somáticos y su principal actividad se observa durante la replicación del DNA, interactuando con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la proteína que ancla a la ADN polimerasa en la horquilla de replicación

(Chuang *et al.*, 1997). Además, la DNMT1 interacciona con complejos protéicos implicados en la represión transcripcional que incluyen a las deacetilasas de histonas (HDAC) (Bestor, 2000).

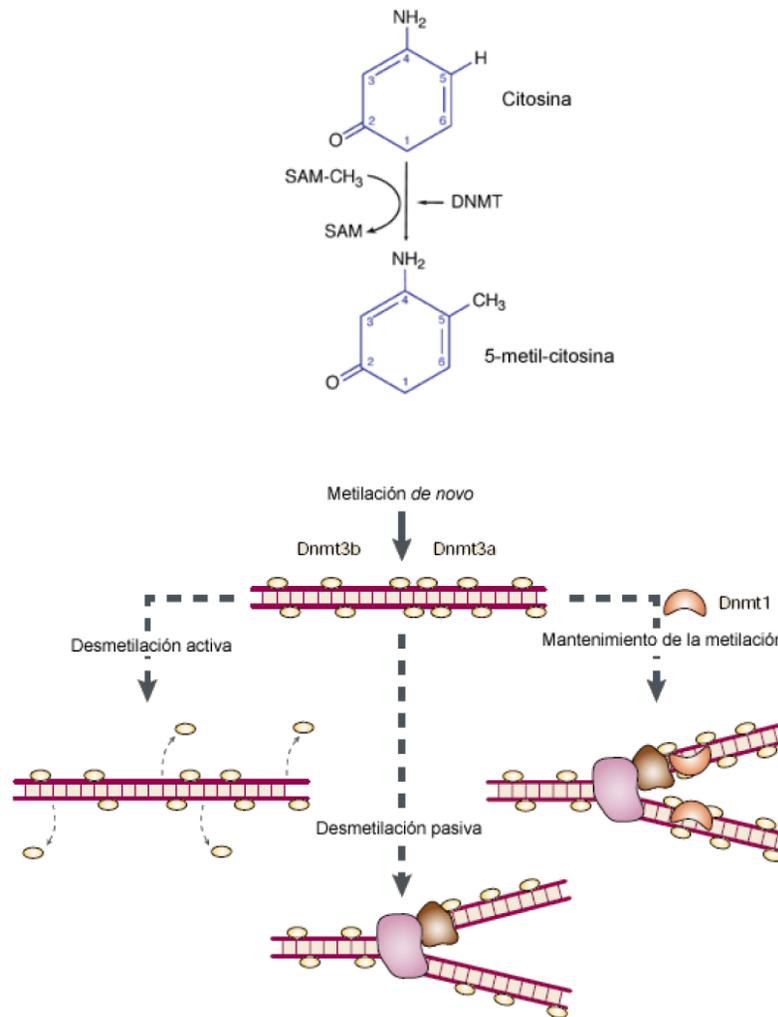


Figura 17. Mecanismo de metilación del DNA. SAM: S-adenosil-metionina, DNMT DNA metiltransferasa; Metilación del DNA en dinucleótidos CpG en mamíferos (Tomado y modificado de Reik & Walter 2001)

La actividad de las DNMT3A y DNMT3B consiste en la adición de un grupo metilo a la citosina del dinucleótido CpG no metilado, creando un nuevo CpG altamente hemimetilado (Okano *et al.*, 1999). Estas metiltransferasas también se unen a las

deacetilasas de histonas para el silenciamiento de genes (Rodríguez *et al.*, 2004). Adicionalmente, existe un tercer miembro de la familia DNMT3, denominado DNMT3L, el cual se cree que no codifica para una metiltransferasa funcional dada la pérdida de diferentes motivos conservados del dominio catalítico de la enzima. Sin embargo, DNMT3L contiene el motivo conservado PHD a través del cual se asocia con la deacetilasa de histonas 1 (HDAC1) para reprimir la transcripción, sugiriendo que la DNMT3L podría tener un papel en la regulación del establecimiento de la metilación en la impronta genómica, y que la asociación con las HDAC podría ser relevante para su funcionamiento (Bestor, 2000; Burgers *et al.*, 2002).

La metilación del DNA es un proceso dinámico eficientemente regulado, las secuencias no metiladas pueden ser metiladas y los grupos metilo pueden perderse, por lo que los patrones de metilación de las células somáticas son el resultado de ambas actividades, metilación y desmetilación (Rodríguez *et al.*, 2004). Alteraciones en la metilación del DNA ha sido asociado con varias patologías en el humano, incluyendo el cáncer. El aumento en el porcentaje de metilación (hipermetilación) es un mecanismo establecido la inactivación transcripcional y el silenciamiento de genes (Martínez, 2010).

De igual manera existe un mecanismo inverso, la desmetilación, la cual involucra a las enzimas TET (Metil-citosina dioxygenasa), las cuales pueden catalizar la oxidación secuencial de 5mC (5 metil-citosina) a 5hmC y posteriormente a 5 formil-citosina (5fC) y después a 5 carboxil-citosina (5caC) esto dispara la sustitución de 5mC a una citosina no metilada mediante el mecanismos de reparación del DNA BER (reparación por escisión de base) (Valentini *et al.*, 2016).

La transformación de una célula normal a una célula neoplásica, es derivada de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que proveen a las células con una ventaja de crecimiento al incidir en los mecanismo clave de control celular. Una gran cantidad de cambios genómicos han sido demostrados en tumores de vejiga, que van desde aberraciones cromosómicas hasta sustituciones de un solo nucleótido. La visión actual que se tiene, determina que solo una minoría de los cambios encontrados en

tumores, pueden ser necesarios para iniciar y mantener la neoplasia, siendo eventos pasajeros aquellos que se presentan con poca frecuencia en el fenotipo maligno (Serizawa *et al.* 2010).

Sin embargo, algunas alteraciones en el DNA pueden tener potencial como biomarcadores para cáncer de vejiga y recurrencia, siempre y cuando estos cambios solo se presenten en fenotipos malignos. Los cambios genómicos que cumplen con este criterio, podrían proveer fundamentos para las pruebas basadas en la especificidad y sensibilidad (Serizawa *et al.* 2010).

Existen evidencias de que los genes sufren un cambio en el nivel de metilación en sus secuencias durante un evento neoplásico. En células cancerígenas los cambios en la metilación del DNA están asociados con genes supresores de tumores, los cuales se encuentran hipermetilados. Hasta el momento se han documentado más de 100 genes con hipermetilación en las islas CpG cerca de las regiones promotoras, este hecho está asociado con la inactivación transcripcional y represión de la expresión (Ballestar *et al.*, 2008).

Un mecanismo común en la inactivación de genes es la hipermetilación de dinucleótidos CpG en las regiones promotoras de un gen. Se ha observado que la hipermetilación del promotor en cáncer humano, involucrando a genes que funcionan como supresores de tumores o ejercen sobre el control de las vías de señalización (Jones *et al.* 2002).

Muchos de los sitios CpG están escasamente distribuidos a lo largo del genoma y son metilados, con la excepción de sitios localizados en grupos o clusters, denominados islas CpG. La mayoría de las islas CpG están desmetiladas y localizadas en la región promotora y en el exón 1 (en más del 50% de todos los genes conocidos). Los dinucleótidos CpG fuera de las islas CpG son generalmente metilados en células normales y son sometidos a una pérdida substancial de metilación en cáncer. Los dinucleótidos CpG aparecen una vez cada 100 dinucleótidos y se encuentran fuertemente metilados con objeto de estructurar la cromatina nuclear en un estado represivo que impida la transcripción de regiones poco

útiles y potencialmente peligrosas del DNA, tales como las secuencias repetitivas *Alu* o transposones (Martínez, 2010).

La inactivación transcripcional por hipermetilación de los promotores de las islas CpG son un mecanismo establecido para el silenciamiento de genes en cáncer incluyendo el cáncer de vejiga y algunos fenómenos de metilación aberrante podrían estar asociadas con el estado y grado del tumor, así como con la probabilidad de recurrencia y progresión (Reinert *et al.*, 2012).

El análisis computacional de la secuencia del genoma humano predice cerca de 29,000 islas CpG y se ha demostrado que la gran mayoría no están metiladas en todos los estados del desarrollo ni en todos los tipos de tejidos (Lander *et al.*, 2001). En las células somáticas humanas, las citosinas metiladas constituyen 1% del total de las bases del DNA y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La presencia de citosinas metiladas produce un cambio conformacional en la doble cadena del DNA, lo cual podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del DNA y la expresión génica (Bird, 2002).

La principal consecuencia de la metilación de los promotores es el silenciamiento en la expresión del gen correspondiente. Gracias a este mecanismo se impide la transcripción de secuencias parásitas del DNA, potencialmente dañinas para la integridad celular, tales como retrovirus endógenos o transposones. Además, la metilación es muy útil para la célula en la inactivación de uno de los cromosomas X en la mujer, la impronta génica o la expresión de genes específicos de tejidos (Figura 18; Martínez, 2010).

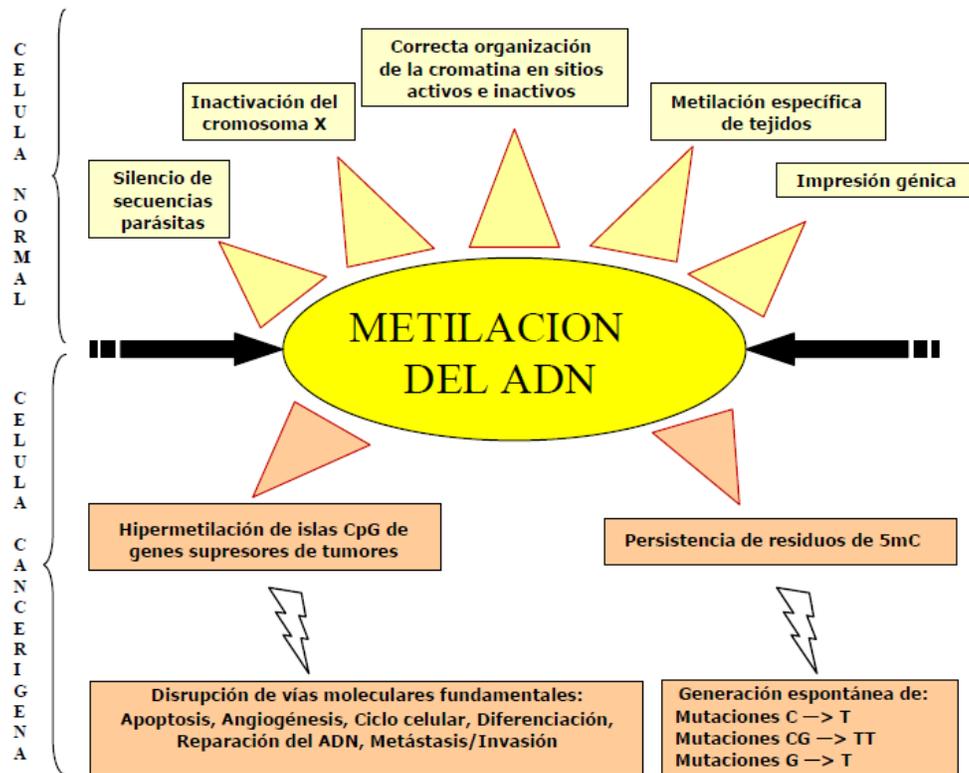


Figura 18. Papel de la metilación del ADN en el comportamiento normal y maligno de la célula (Tomado y modificado de Martínez, 2010).

La metilación es un proceso común en el proceso cancerígeno, ya que en carcinomas de células renales se ha demostrado que existe metilación en proteínas de adhesión celular como la γ -catenina que fue recientemente encontrada en forma hipermetilada y se correlacionó con la agresividad del tumor (Frank *et al.* 2006).

En las células tumorales, la hipermetilación aberrante de las islas CpG en torno a las regiones promotoras de los genes es el cambio epigenético mejor caracterizado; se encuentra virtualmente en todos los tipos de neoplasias humanas y está asociada con la inhibición de la transcripción mediante el silenciamiento de genes. La hipermetilación del promotor es tan o más frecuente, que los trastornos de los genes supresores de tumores clásicos por mutación o delección. La hipermetilación de los promotores puede encontrarse de manera temprana en la tumorigénesis y estas alteraciones epigenéticas pueden ocasionar pérdidas prematuras en el control del ciclo celular, regulación alterada

de los factores de transcripción génica, trastornos de la interacción célula-célula, desregulación en la reparación del ADN, resistencia a drogas, destoxificación, apoptosis y angiogénesis, e incluso múltiples tipos de inestabilidad genética, todas ellas características del comportamiento maligno exhibido por las células tumorales humanas (Martínez, 2010). Del mismo modo, un evento de metilación aberrante es la hipometilación global, que en contraste con la hipermetilación regional, es conocida por inducir inestabilidad genética (deleciones y eventos recombinantes anormales), incluyendo la descondensación de la cromatina permitiendo la recombinación y activación de elementos retrotransponibles. Además la hipometilación de los sitios denominados *enhancers* o la represión de otros sitios reguladores por metilación puede desencadenar la expresión de genes promotores de cáncer, también conocidos como oncogenes (Esteller, 2008; Soares et al, 1999; Jackson et al, 2004).

Recientemente estudios epidemiológicos han investigado si el nivel de metilación global en células de sangre periférica para uso potencial como un biomarcador para cáncer. Aunque la mayoría de estas potenciales asociaciones han sido examinadas en estudios caso-control y requieren una cuidadosa interpretación, los resultados tienden a sugerir que un bajo nivel de metilación global está asociado con un incremento en el riesgo y número de casos con cáncer, incluyendo adenomas colorectales, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer gástrico y cáncer de mama. El nivel global de metilación puede servir como una medida intermedia para el desarrollo del cáncer, reflejando la acumulación de múltiples factores reversibles e irreversibles, incluyendo edad, sexo, estilo de vida, la exposición ambiental y polimorfismos genéticos (Kuchiba, 2014)

Existen varios trabajos que relacionan el estado de metilación con el diagnóstico de distintas enfermedades , tal es el caso del cáncer de vejiga, donde se han reportan una alta sensibilidad y especificidad de algunos genes como marcadores epigenéticos para la detección de cáncer de vejiga utilizando la presencia de metilación, los cuales muestran un alto potencial de aplicación (Reinert, 2012). Uno de los trabajos en los cuales evalúan un pool de genes, es el realizado por Jian y colaboradores en el 2007, en el cual evaluaron

a *SALL3*, *CFTR*, *ABCC6*, *HPR1*, *RASSF1A*, *MT1A*, *RUNX3*, *ITGA4*, *BCL2*, *ALX4*, *MYOD1*, *DRM*, *CDH13*, *BMP3B*, *CCNA1*, *RPRM*, *MINT1*, y *BRCA1*, estos alcanzaron un valor predictivo, teniendo diferencias significativas en 121 de los 132 casos analizados de cáncer de vejiga en los cuales reportan una sensibilidad del 91.7% y una especificidad del 87% (Jian *et al.*, 2007).

También se encuentra el trabajo realizado por Friedrich y colaboradores en el 2004 en el cual evaluó un pool de genes conformado por *ARF*, *FADD*, *TNFRSF21*, *BAX*, *LITAF*, *DAPK*, *TMS-1*, *BCL2*, *RASSF1A*, *TERT*, *TNFRSF25* y *EDNRB*, los cuales son genes asociados a apoptosis, con lo cual infirieron que podrían estar silenciados permitiendo el establecimiento del cáncer de vejiga, encontrando diferencias significativas en los genes *DAPK*, *BCL2*, *TERT*, *RASSF1A* y *TNFRSF25* mostrando una sensibilidad de 45.9% y una especificidad del 78.4% (Friedrich *et al.*, 2004).

Entre los trabajos más recientes se tienen los realizados por Sánchez en el 2013 en los cuales evaluaron genes anteriormente reportados como hipermetilados en cánceres ováricos serosos y cáncer de ovario, y cáncer de endometrio. Entre el set de genes se encontraban *ZNF 154*, *VHL*, *BTNL2*, *FLJ446744*, *KRTAP11-1*, *DEFB118* y *CASP8*. Estos genes fueron evaluados en muestras de varios tipos de cáncer y en diferentes líneas celulares entre los cuales se encontraba cáncer de vejiga. En este ensayo descubrieron hipermetilación por parte de *ZNF 154* en líneas y muestras de cáncer, además de hipometilación en los genes *VHL* y *CASP8* en líneas y muestras de cáncer con diferencias significativas en comparación con los demás genes. Los fines de este trabajo no eran obtener valores de especificidad y sensibilidad si no de tratar de estandarizar los valores de metilación para varios tipos de cáncer teniendo en promedio para *ZNF 154* un 82% de metilación en tumores y 4% en normales, *CASP8* presentaba un porcentaje de 24% de metilación en tumores y 87% en normales, por ultimo en *VHL* se encontró un 32% de metilación en tumores y 85% en normales (Sanchez *et al.*, 2014).

En otros trabajos han identificado correlación entre el estado metilación y las características clínicopatológicas, tal es el caso del trabajo realizado por Aine y colaboradores en el cual observaron cambios en el patrón de metilación del locus HOXA identificando regiones diferencialmente metiladas (DMRs) entre 98 tumores diferentes subtipos, entre los cuales se encuentran Urobasal A, Urobasal B, Genómicamente inestable y carcinoma de células escamosas; estos subtipos han sido establecidos según un sistema de clasificación molecular basado en patrones de expresión génica global. Con esta información lograron caracterizar un patrón parecido a un *switch* involucrando al locus anterior (HOXA1-6) y posterior (HOXA7-13) de HOXA. Se identificó una correlación entre el estado de metilación con el grado tumoral, teniendo metilación del cluster anterior con grado tumoral alto (genéticamente inestable y carcinoma de células escamosas), mientras que una metilación del cluster posterior con un grado tumoral bajo (Urotelial A y Urotelial B) que es probablemente una consecuencia de activación diferencial de dominios asociados topológicamente conservados que dividen al locus HOXA dentro de unidades regulatorias separadas (Aine et al., 2015).

Existe una gran variedad de estudios desarrollados en los últimos años tratando de utilizar la hipermetilación de genes importantes en el ciclo celular y la apoptosis como biomarcadores de cáncer de vejiga, pero retomando un poco el comportamiento del cáncer de vejiga, una de las principales complicaciones de este tipo de neoplasia es el alto porcentaje de recurrencia, por lo cual es un foco de importancia tratar de predecir este evento, sin embargo existen pocos trabajos relacionado con recurrencia en cáncer de vejiga.

Hasta la fecha uno de los trabajos mas importantes, en el cual relacionan la metilación en las regiones promotoras de ciertos genes con la recurrencia fue realizado por Reinert y colaboradores en 2012, en el cual evalúa la hipermetilación en un grupo de genes para la predicción de cáncer de vejiga y de recurrencia, entre sus hallazgos encontró sus genes evaluados presentaban altos valores de sensibilidad y especificidad (Figura 19), pero al evaluarlos para recurrencia la especificidad baja considerablemente (Figura 20).

Gen	Sensibilidad % (pos./total)	Especificidad % (neg./total)	AUC (95% IC)	P value
EOMES	88 (160/182)	97 (34/35)	0.96 (0.94-0.99)	<0.0001
HOXA9	82 (141/173)	100 (35/35)	0.91 (0.88/0.94)	<0.0001
POU4F2	85 (154/182)	94 (33/35)	0.94 (0.91-0.97)	<0.0001
TWIST1	88 (159/180)	100 (35/35)	0.94 (0.92-0.97)	<0.0001
VIM	89 (159/179)	100 (35/35)	0.97 (0.94-0.99)	<0.0001
ZNF 154	87 (160/184)	100 (35/35)	0.95 (0.93-0.97)	<0.0001
Citologia	81 (119/147)	N/A	N/A	N/A

Figura 19. Valores de sensibilidad y especificidad para la detección de cáncer de vejiga (Tomado y modificado de Reinert *et al.*, 2012).

Gen	Sensibilidad % (pos./total)	Especificidad % (neg./total)	AUC (95% IC)	P value
EOMES	94(116/124)	39 (24/61)	0.78 (0.71-0.85)	<0.0001
HOXA9	92 (108/117)	38 (18/48)	0.70 (0.61-0.80)	<0.0001
POU4F2	87 (104/120)	47 (28/60)	0.75 (0.68-0.83)	<0.0001
TWIST1	89 (113/127)	28 (17/60)	0.71 (0.63-0.80)	<0.0001
VIM	90 (113/126)	43 (24/56)	0.72 (0.63-0.81)	<0.0001
ZNF 154	93 (115/123)	47 (29/62)	0.78 (0.71-0.86)	<0.0001
Citologia	77 (88/115)	60 (35/58)	0.68 (0.61-0.76)	<0.0001

Figura 20. Valores de sensibilidad y especificidad para la detección de recurrencia (Tomado y modificado de Reinert *et al.*, 2012).

Una de las limitantes de este trabajo es la técnica utilizada para el análisis de metilación de los genes, debido a que en el ensayo Methy Ligth se realiza una conversión por bisulfito, la cual dependiendo de las condiciones, puede ser incompleta, afectando a la sensibilidad y especificidad para la detección de recurrencia cáncer de vejiga. Adjunto al punto anterior la cantidad de DNA necesario para realizar la prueba limita el valor pronóstico, debido a que la cantidad de células en la orina de pacientes sin recurrencia para cáncer de vejiga es baja.

Sin embargo entre sus hallazgos encontraron al analizar la sobrevida libre de recurrencia que aquellos pacientes que presentaban hipermetilación en los genes que evaluaron tenían un mayor índice de recurrencia que aquellos que tuvieron un resultado negativo para hipermetilación (Figura 21), tomando en cuenta este hecho y los anteriores trabajos en donde los genes ZNF 154, HOXA9 y TWIST1 son los genes mas presentes, además de tener diferencias en el porcentaje de metilación entre pacientes con cáncer de vejiga y pacientes sanos, inclusive el mismo tejido normal adyacente; estos genes, en distintos estudios, han mostrado un porcentaje de sensibilidad y especificidad altos, adquiriendo con esto un valor predictivo alto por parte del porcentaje de metilación como método pronóstico para cáncer de vejiga y por lo tanto podrían presentar potencial para el predicción de recurrencia en cáncer de vejiga.

Teniendo esto en cuenta, nos enfocaremos en los genes que nos podrían aportar mayor información para el pronóstico de recurrencias, tal es el caso de ZNF 154, HOXA9 y TWIST1 los cuales presentaban altos valores de sensibilidad y especificidad para la detección de cáncer de vejiga, teniendo en promedio una sensibilidad de 85.5% y de especificidad del 100%.

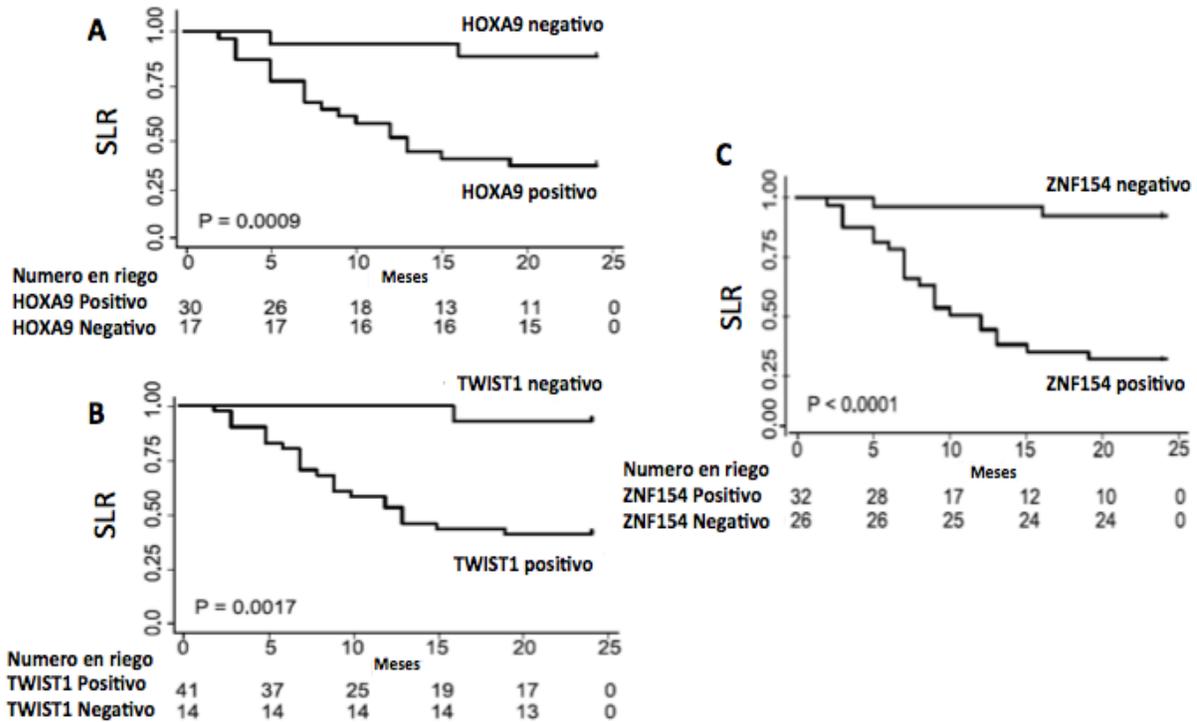


Figura 21. Valor pronóstico de los marcadores de metilación para predecir recurrencias en muestras de orina de pacientes que acudieron a visita de revisión con diagnóstico libre de tumor por cistoscopia en un periodo de vigilancia de 25 meses; SLE: Sobrevivida libre de recurrencia A) HOXA9 B) TWIST1 y C) ZNF154 (Tomado y modificado de Reinert *et al.*, 2012)

ZNF-154

Localización: 19q13.4

Este gen codifica para una proteína que pertenece a la familia de “proteínas dedos de zinc Kruppel” las cuales son reguladores transcripcionales, que están involucrados en el crecimiento y diferenciación de una célula. Hipermetilación de este gen está asociado con la recurrencia de cáncer de vejiga no músculo invasivo. Existe splicing alternativo que resultan en múltiples variantes de transcritos. Durante el desarrollo fetal y durante toda la vida del individuo se encuentra expresado de manera uniforme sin diferencias entre estadio o tejido por otro lado en la expresión de mensajeros existen diferencias entre

tejidos. La expresión de este gen se encuentra principalmente en el núcleo de las células (Figura 25). Sin embargo en algunos tipos de cáncer la expresión de este gen se anula casi por completo (www.genecards.org, Agosto 2014). ZNF 154 pertenece a la familia de dedos de zinc tipo C2H2 los cuales se encuentran dispersos en los cromosomas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 16 y 19, del mismo modo la mayoría de los miembros de la familia pertenece al cluster ubicado en la región 19q13 (www.genenames.org; Septiembre 2014). ZNF 154 ha sido reportado con hipermetilación en distintos tipos de cáncer como mama, cabeza y cuello, riñón, ovario, páncreas, próstata, recto, estómago y útero (Sanchez et al., 2013; Reinert et al., 2012).

HOXA9

Localización: 7p15.2

Este gen codifica para una clase de factores de transcripción llamados genes homeobox que se encuentran en grupos o clusters nombrados A, B, C y D en cuatro cromosomas separados. La expresión de las proteínas codificadas por estos genes son regulados espacialmente y temporalmente durante el desarrollo embrionario. HOXA9 es parte del cluster A en el cromosoma 7 y codifica un factor de transcripción que se une al DNA y puede regular la expresión génica, morfogénesis y diferenciación. La expresión de HOXA9 esta principalmente en el núcleo de la célula. En el proceso de carcinogénesis la expresión de HOXA9 se ve atenuada observándose este patrón en varios tipos de tejidos (www.genecards.org, Agosto 2014). Este gen pertenece a la familia de los homeoboxes los cuales se encuentran en los cromosomas 2, 5, 7, 12, 13, 17 y X (www.genenames.org; Septiembre 2014). Este gen ha sido reportado hipermetilado en cáncer de vejiga en distintos trabajos y se ha observado un aumento de sus niveles de expresión en leucemia mieloide aguda (Strathdee et al., 2007; Reinert et al., 2012; Mattias et al., 2015).

TWIST1

Localización: 7p21.2

TWIST1 es un factor de transcripción que ha sido implicado en la determinación del linaje celular y en la diferenciación. Una fuerte expresión esta presente en el tejido placentario, por otro lado en adultos, se expresa preferencialmente este RNAm en tejidos derivados del mesodermo. Dentro de sus funciones está el inhibir la miogénesis por arresto de proteínas E, inhibición por MEF2 e inhibición de ligandos al DNA por *MYOD1* a través de interacciones físicas. También reprime la expresión de citocinas pro-inflamatorias tales como TNFA y IL1B. Regula los patrones de sutura craneal y fusión. Activa la transcripción en forma de heterodímero con proteínas E. Regula la expresión diferencialmente, dependiendo de la composición de dímeros, estando presente en homodímeros regula la expresión de FGFR2 y POSTN mientras que en forma de heterodímero reprime la expresión de FGFR2 y POSTN. En un evento neoplásico se ha reportado que la expresión de la proteína es baja, exceptuando en cáncer de próstata, mama, cervical y ovario. Se localiza principalmente en núcleo y citoesqueleto (www.genecards.org). TWIST1 pertenece a la familia de proteínas básicas hélice-bucle-hélice, los cuales se encuentran dispersos en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ,8, 10, 12, 17, 20, 21 y X (www.genenames.org; Septiembre 2014). El gen TWIST1 ha sido reportado con un aumento el nivel de metilación en cáncer de vejiga y en cáncer colorectal (Galvan et al., 2014; Reinert et al.,m 2012; Yegin et al., 2013).

La cistoscopia es la técnica que actualmente se tiene como diagnóstico principal para recurrencia de cáncer de vejiga, sin embargo tiene una alta tasa de falsos negativos ya sea por error del operador o por la presencia de áreas pequeñas que presentan la neoplasia, las cuales son difíciles de detectar. En algunas ocasiones se ha presentado recurrencia por pequeños tumores no detectados durante la resección. Estas variaciones en el diagnóstico del paciente ante la recurrencia dan paso a la búsqueda de técnicas de diagnóstico con mayor grado de eficiencia. Tomando en cuenta el bienestar del paciente, la cistoscopia es un método invasivo que trae como consecuencia malestar para el

paciente, la cual es otra razón para utilizar alguno de otros marcadores de tipo no invasivos, las cuales requieren solo una muestra urinaria por parte del paciente, además de que estas técnicas cuentan con una mayor sensibilidad y la especificidad para la detección de cáncer de vejiga y recurrencia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La recurrencia en cáncer de vejiga es un evento que tiene una probabilidad de hasta el 70% y se ha presentado inclusive después de 5 años de la intervención quirúrgica. El diagnóstico de recurrencia involucra una cistoscopia la cual es un método invasivo, incómodo y de alto costo. La cistoscopia es un procedimiento de detección de recurrencia que tiene hasta un 96% de sensibilidad para cáncer de vejiga no músculo invasivo, presentando un descenso de la sensibilidad en displasias y carcinomas *in-situ* a 68% . La citología urinaria es una técnica que es llevada a cabo junto con la cistoscopia, llegando a tener en conjunto una especificidad del 96% pero con una baja sensibilidad de 34% la cual solo aumenta con la progresión de estado y grado del tumor. Las variaciones entre la especificidad y sensibilidad así como entre los estadios y grado del tumor para un buen diagnóstico de recurrencia en cáncer de vejiga, utilizando solo la cistoscopia y la citología urinaria, ponen de manifiesto la necesidad de identificar a la búsqueda de biomarcadores para la detección de recurrencia que sean no invasivas, siendo los marcadores epigenéticos, específicamente la metilación de DNA urinario una opción a evaluar para la detección de recurrencia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el estado de metilación de manera cuantitativa de las secuencias promotoras de los genes *ZNF 154*, *HOXA9* y *TWIST1* asociado a la recurrencia de cáncer de vejiga.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar parámetros clínicos y su correlación con la recurrencia
- Analizar la metilación del DNA de los promotores de *ZNF 154*, *HOXA9* y *TWIST1*
- Identificar un punto de corte de metilación para recurrencia
- Correlación del estatus de metilación y expresión
- Correlación de la expresión por inmunocitoquímica de los genes evaluados
- Analizar la correlación entre el estado de metilación y las características clínicas

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio: Pacientes atendidos en el Hospital de Oncología del IMSS con diagnóstico de cáncer de vejiga y que fueron intervenidos por resección intravesical 2014-2015.

Criterios de inclusión: Pacientes con RTU en vigilancia cada tres meses, de cualquier género y edad, cualquier tipo histológico. Positivos y negativos para fronda detectados por cistoscopia confirmados por citología urinaria.

Criterios de exclusión: Pacientes sin recurrencia en un periodo mayor a 5 años. Pacientes con diagnóstico de cáncer no vesical (próstata, renal y concomitante no urológico)

Tipo de Estudio: Cohorte de pacientes en seguimiento durante 12 meses a partir de la primera toma de muestra, para observar los cambios en la recurrencia.

Definición de variables

Se evaluaron distintos aspectos tanto clínicos como los resultados obtenidos en el laboratorio, entre los cuales se encuentran: la citología urinaria, cistoscopia y metilación de los genes evaluados (Tabla 6). Además como covariables: edad, género, peso, talla, hemoglobina sérica, creatinina sérica, albumina sérica, linfocitos totales, colesterol, eritrocituria, comorbilidad asociada, grado tumoral, tiempo de vigilancia alcanzado desde la última resección, número de frondas encontradas, tratamiento intravesical profiláctico concomitante y tamaño tumoral (Tabla 7). Todas las variables obtenidas se recopilaban mediante una hoja de datos de paciente en la cual firmaron de enterados y autorizan la utilización del material biológico obtenido (Anexo 1).

Durante la recolección de las muestras se tomaron en cuenta los aspectos éticos pertinentes al igual que los datos clínicos de los pacientes, los cuales fueron plasmados en el formato diseñado para este trabajo (Anexo 1), este fue firmado por el paciente y dos testigos. Los datos obtenidos fueron trasladados a la base de datos en formato SPSS.

Tabla 6. Variables consideradas para el estudio.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable y escala	Categorías
Citología urinaria	Interpretación patológica (por un patólogo) de las características morfológicas de las células uroteliales descamadas mediante la evaluación microscópica de frotis celulares de orina teñidos.	Interpretación patológica de las características morfológicas de las células uroteliales descamadas del sedimento urinario centrifugado, mediante la evaluación microscópica de frotis celulares de orina teñidos conforme a los criterios de la ISUP	Cualitativa nominal:	Maligna No maligna: Normal Atípica/indeterminada Sospechosa
Metilación de ADN	Proceso bioquímico que involucra la adición de un grupo metilo a los dinucleótidos CG del DNA.	Medición e interpretación de la metilación del ADN mediante extracción de DNA de orina y qPCR de la isla CpG en la región promotora de los genes seleccionados ZNF-154, HOXA9 y TWIST1	Cualitativa nominal:	No metilado Metilado

Tabla 7. Covariables consideradas para el estudio.

Covariables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable y escala	Medida
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo	Edad cronológica del sujeto en años	Cuantitativa discreta	Años cumplidos
Género	Rango de características físicas, mentales o del comportamiento que distinguen entre masculinidad y feminidad	Sexo biológico, masculino o femenino	Cualitativa dicotómica	Femenino Masculino
Peso	Peso en kilogramos del individuo.	Peso en kilogramos del individuo, pesado en la báscula del consultorio de la consulta externa, vistiendo solo la bata institucional de paciente.	Cuantitativa discreta	Kilogramos
Talla	Medida en metros y centímetros del individuo, medido con una escala métrica vertical desde los talones hasta el nivel mas alto de la cabeza en posición normal.	Medida en metros y centímetros del paciente en cuestión, medido en la escala métrica vertical de la misma báscula donde se pesa.	Cuantitativa continua	Metro
Hemoglobina sérica	Heteroproteína de la sangre, color rojo que transporta el oxígeno desde la sangre hasta los tejidos y el bióxido de carbono desde los tejidos hasta los pulmones, participa en la regulación del pH de la sangre. Sus valores de referencia son de 14-16 mg/dl para la Ciudad de México.	Resultado de su determinación sérica en laboratorio, del paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento.	Cuantitativa continua	g/dl

Continua Tabla 7

Continua Tabla 7

Covariables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable y escala	Medida
Creatinina sérica	Compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina, nutriente muscular, producto de desecho del metabolismo muscular a una tasa constante dependiente de la masa muscular, que se filtra por los riñones y su medición sérica es el modo mas simple de vigilar la función renal. Los valores de referencia son de 0.6 - 1.3 mg/dl	Resultado de su determinación sérica en laboratorio, del paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento.	Cuantitativa continua	mg/dl
Albúmina sérica	Principal proteína de la sangre humana, sintetizada por el hígado. Su concentración normal en la sangre humana oscila entre 3.5 y 4.0 g/dl.	Resultado de su determinación sérica en laboratorio, del paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento.	Cuantitativa continua	g/dl
Linfocitos totales	Tipo de leucocito (glóbulo blanco) comprendido dentro de los agranulocitos, representando aproximadamente el 30% del total en la sangre periférica.	Resultado de su determinación sérica en laboratorio, del paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento.	Cuantitativa continua	Células / ml
Colesterol total	Esterol (lípidos) de los tejidos corporales y plasma sanguíneo, cuya concentración plasmática deseable para la población general es de 150-200 mg/dl	Resultado de su determinación sérica en laboratorio, del paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento.	Cuantitativa continua	mg/dl
Eritrocituria	Eritrocitos presentes en el sedimento urinario por arriba del valor de referencia.	Número de eritrocitos presentes reportados en el sedimento urinario del exámen general de rina.	Cuantitativa continua	Células por campo.

Continua Tabla 7

Covariables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable y escala	Medida
Comorbilidad asociada	Diagnósticos establecidos previos al padecimiento actual.	Diagnósticos referidos en su expediente clínico hasta antes del momento de su evaluación clínica para la cistoscopia de vigilancia.	Cualitativa politómica	No aplica
Grado tumoral	Medida de anaplasia celular (reversión de diferenciación) en la muestra de tumor y se basa en la semejanza del tumor al tejido de origen.	Grado de diferenciación bajo y alto, según la clasificación de la ISUP-2004 para tumores uroteliales	Cualitativa dicotómica	Bajo grado Alto grado
Tiempo de vigilancia alcanzado desde la última resección	Tiempo de vigilancia transcurrido sin evidencia de nueva recurrencia intravesical, desde la última resección transuretral vesical.	Número de meses transcurridos sin evidencia de actividad tumoral intravesical desde la última resección transuretral vesical.	Cuantitativa discreta	Meses
Tratamiento intravesical profiláctico concomitante	Instilación intravesical de inmunoterapia con BCG ó con quimioterapia con MMC con el fin de inhibir y prevenir crecimiento tumoral urotelial.	Presencia de tratamiento intravesical profiláctico en curso, ya sea con BCG ó con MMC	Cualitativa dicotómica	Presente Ausente
Número de frondas encontradas	Contabilización del número de frondas encontradas en la cistoscopia.	Cuenta del número de frondas y de su extensión en milímetros.	Cuantitativa discreta	Número de frondas
Tamaño tumoral	Medición en milímetros del diámetro mayor de la fronda tumoral	Medición en milímetros de la extensión de todas las frondas	Cuantitativa continua	Milímetros de diámetro

Índices y escalas categóricas

A partir de los elementos de las variables estudiadas se determinaron los índices y escalas categóricas, las cuales son relativas a las características clínicas de los pacientes, esto con la finalidad del manejo de los datos y poder determinar asociaciones con la condición de recurrencia y no recurrencia (Tabla 8).

Tabla 8. Índices categóricos

Índice	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable y escala	Medida
Índice de masa corporal (IMC)	Medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo. Se calcula del producto del peso por la talla al cuadrado.	Cálculo obtenido del producto del peso por el cuadrado de la talla.	Cuantitativa continua	Kg / m ²
Escala de Sobrepeso	Escala acumulativa del estado nutricional, basada en la clasificación internacional de la OMS, derivada del índice de masa corporal.	Escala acumulativa basada en el IMC: IMC ≤18.4 = Infrapeso IMC=18.5-24.99 = Normal. IMC=25.00-29.99 = Sobrepeso IMC=30.00-34.99 = Obesidad grado I. IMC= 35.00-39.99 = Obesidad grado II. IMC=>40 = Obesidad grado III	Cualitativa ordinal	Numeral
Índice tabáquico (IT)	Estimación acumulativa del consumo de tabaco definido como la práctica de quemar tabaco de cigarro, puro o pipa, inhalación del humo por la boca y luego exhalación calculada mediante la fórmula número de cigarros fumados al día entre 20 multiplicado por el número de años fumando.	Cálculo obtenido del producto del número de cigarros fumados al día entre 20 y multiplicado por el número de años fumando.	Cuantitativa discreta	cajetillas - año.

Continua Tabla 8

Continua Tabla 8

Índice	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable y escala	Medida
Hábito Tabáquico	Nivel de consumo tabáquico basado en el índice tabáquico calculado sobre el número de cajetillas por año.	Nivel de consumo tabáquico basado en una escala de rangos relativo al índice tabáquico. IT = 0 = Nulo IT = 0.1-10 = Leve IT = 11-20 = Moderado IT = 21-30 = Intenso IT = 31-40 = Muy intenso IT \geq 41 Extremo	Cualitativa ordinal	Numeral
Escala del déficit de albúmina	Escala acumulativa derivada de la suma del nivel de déficit respecto al valor normal de albúmina sérica.	Escala acumulativa derivada de la suma del nivel de déficit respecto al valor normal de albúmina sérica. ≥ 3.4 = Normal 3.0 - 3.9 = Déficit leve 2.5 - 2.9 = Déficit moderado ≤ 2.4 Déficit severo	Cualitativa ordinal	Numeral
Escala nutricional	Estimación acumulativa derivada de la suma de los grados de déficit entre las variables albúmina sérica, linfocitos totales y colesterol total plasmático medidos de un individuo en cuestión.	Escala acumulativa derivada de la estimación acumulativa de la suma de los grados de déficit entre la combinación de las variables albúmina sérica, linfocitos totales y colesterol total plasmático medidos del paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento. 0-1 = Normal 2-4 = Desnutrición leve 5-8 = Desnutrición moderada ≥ 8 = Desnutrición severa	Cualitativa ordinal	Numeral
Índice de comorbilidad de Charlson	Estimación acumulativa derivada de la suma de puntuaciones asignadas a las enfermedades comórbidas que padece el individuo en cuestión.	Estimación acumulativa derivada de la suma de puntuaciones asignadas a las enfermedades comórbidas que padece el paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento.	Cuantitativa discreta	Numeral

Continua Tabla 8

Índice	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable y escala	Medida
Escala categórica de Charlson	Estimación acumulativa derivada de la suma de puntuaciones asignadas a las enfermedades comórbidas que padece el individuo en cuestión y la colocación en un nivel categórico arbitrario de puntuación	Estimación basada en la escala de categorías derivadas de la suma acumulativa de las puntuaciones relativas a las enfermedades comórbidas que padece el paciente sujeto a vigilancia durante su seguimiento. 1-5 = Charlson I 6-10 = Charlson II 11-16 = Charlson III	Cualitativa ordinal	Numeral

Obtención y preservación de muestras

La obtención de las muestras se realizó en la Unidad de Urología del Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI de pacientes con recurrencia de cáncer de vejiga, tomando el criterio de la presencia o ausencia de fronda; estas fueron tomadas con consentimiento del paciente. Un segundo grupo de muestras será tomado de pacientes negativos a fronda como grupo control a recurrencia. Las muestras de orina fueron obtenidas por micción y lavado vesical, aproximadamente 40 ml, los cuales fueron preservadas en 2.5 ml de PreserCyt (Hologic, Marlborough MA), por cada 20 ml de orina.

Procesamiento de las muestras

Posteriormente para la obtención del botón celular, las muestras de orina fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 20 minutos, realizando dos lavados, un primer lavado con 500 µl de PBS-Tween al 0.05% y un segundo lavado con 500 µl de PBS, entre cada lavado se centrifugaron las muestras a 6000 rpm y se desechó el sobrenadante, el botón obtenido fue fijado con PreserCyt en una proporción 3:1 conservándolo a -20°C hasta su uso.

Preparación de las citologías urinarias

Las citologías urinarias fueron realizadas mediante un frotis de 200 μ l de botón celular el cual con lavado con PBS-Tween al 0.05% y con PBS, centrifugándolos a 6000 rpm, para ser re-suspendidos en 200 μ l PBS. Del volumen final se tomaron 100 μ l para teñirlas con la técnica de H&E para posteriormente ser analizadas en microscopio de campo claro por un patólogo para su diagnóstico. Dentro de las características que se evaluaron fueron los elementos normales tales como células epiteliales, infiltrado inflamatorio, necrosis, alteraciones compatibles con células neoplásicas malignas, carcinoma *in situ* así como hallazgos característicos de cada muestra.

Obtención del DNA

El botón celular se utilizó para la extracción de DNA y las citologías urinarias. Para la extracción de DNA se tomó una alícuota a la cual mediante el método de columna del kit Promega se obtuvo DNA purificado, el cual se incluyó en el estudio si cumplía con las siguientes características:

1. Una concentración mínima de 15 ng/ μ l.
2. Pureza de 1.8 a 2.0 260/280 ratios.
3. Una buena integridad del DNA.

Electroforesis en gel de Agarosa

Para la preparación del gel de agarosa al 5%, la cual fue totalmente disuelta mediante calor en 25 ml de buffer TBA 1X,. Para cargar las muestras se colocaron un mínimo de 50 ng de muestra de DNA en 4 μ l mezclados con 2 μ l de buffer de carga. Para la referencia del tamaño de los fragmentos de DNA se utilizó como marcador una escalera de 1000-100 pb.

Metilación de DNA

Si las muestras cumplen estas condiciones, fueron candidatas a evaluación del estatus de metilación, el cual se realizó para los genes *ZNF-154*, *TWIST1* y *HOXA9*, mediante por digestión por enzimas de restricción, la cual consistió en someter las muestras de DNA a enzimas dependientes y sensibles a metilación, en cuatro condiciones, según las especificaciones de EpiTec Methyl II Assay PCR SYBR® Green; QIAGEN (Figura 44). Los genes fueron evaluados mediante primers dirigidos a las islas CpG para cada caso, los cuales abarcaban una región de 300 pb (Figura 22).

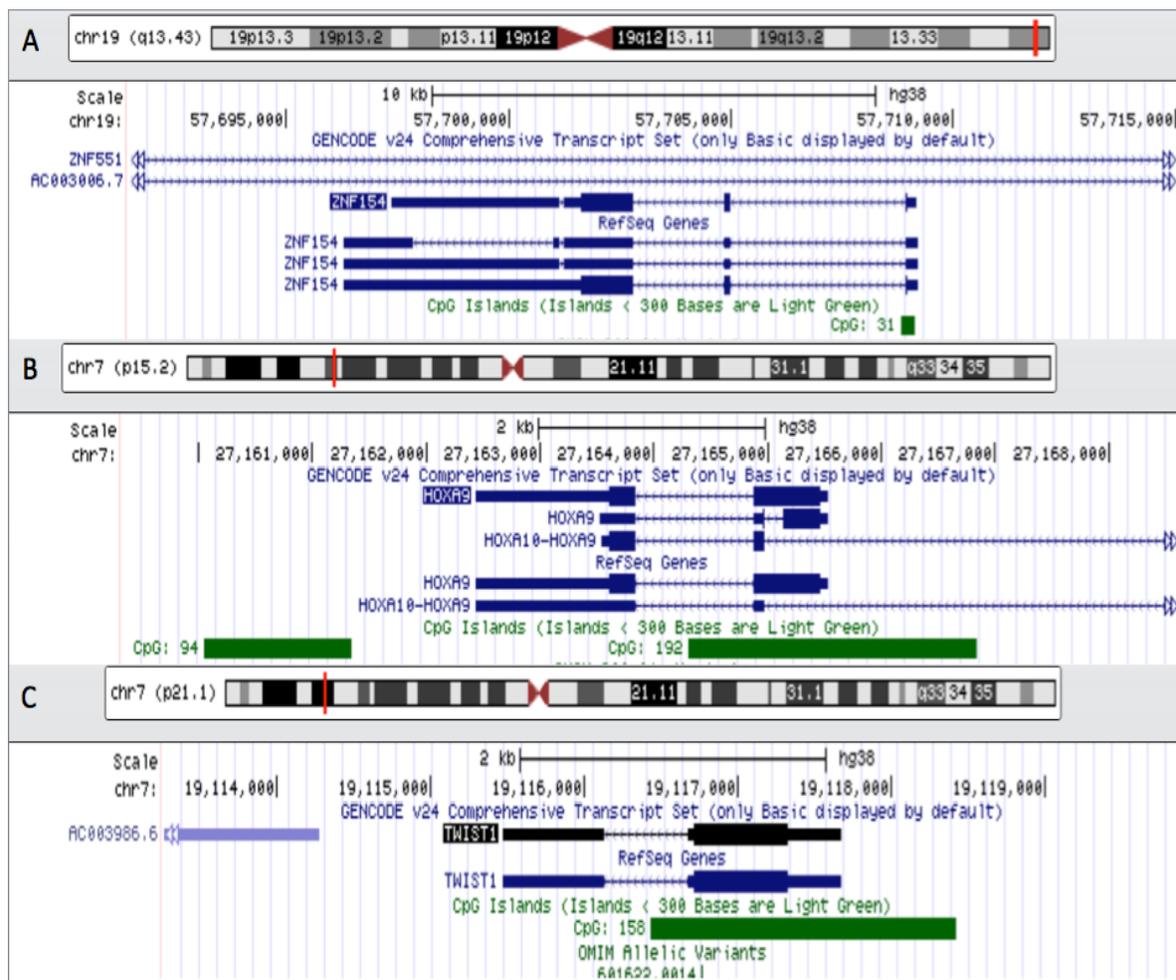


Figura 22. A) ZNF 154, B) HOXA9 y C) TWIST1; Los sitios de análisis por la prueba corresponde a las islas CpG ubicadas en la secuencia promotora y sitio de inicio de la transcripción (Tomado y modificado de <https://genome.ucsc.edu>).

Para la digestión se tomaron 150 ng de DNA para cada muestra si se realizo un mix con 5x Restriction Digestion Buffer según la Tabla 9.

Componente	Volumen
DNA genómico (250ng)	Variable
5x Restriction Digestion Buffer	13 μ l
Agua libre de RNasas/DNasas	Variable
Volumen Final	60 μl

Tabla 9. Mix de reacción con enzimas

El volumen final se dividió en 4 cantidades iguales (15 μ l) en tubos independientes, uno para cada condición: Mo (sin enzima), Ms (enzima sensible a metilación), Md (enzima dependiente de metilación) y Msd (ambas enzimas) añadiendo el tipo de enzima según lo especificado en la Tabla 10.

Componente	Mo	Ms	Md	Msd
Mix de reacción del paso anterior	14 μ l	14 μ l	14 μ l	14 μ l
Enzima-A (Metil-Sensible)	-	0.5 μ l	-	0.5 μ l
Enzima-B (Metil-Dependiente)	-	-	0.5 μ l	0.5 μ l
Agua libre de RNasas/DNasas	1 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	-
Volumen Final	15 μl	15 μl	15 μl	15 μl

Tabla 10. Digestión de las muestras bajo las cuatro condiciones

En cada una de las reacciones se mezclaron los componentes y se centrifugó brevemente sin ser sometidos los tubos al vortex.

Se incubaron los 4 tubos a 37°C durante toda la noche sin exceder las 18 horas de incubación. Después del periodo de incubación, la reacción fue desactivada por choque térmico a 65°C por 20 min.

Nota: Las reacciones están listas para usarse o se pueden refrigerar a -20°C

Para preparar la reacción de PCR se centrifugaron las 4 reacciones brevemente y se prepararon reacciones individuales para cada una de las condiciones (Mo, Ms, Md, and Msd) según la Tabla 11. Las 4 reacciones finales son para un gen, para cada uno de los genes analizados (ZNF 154, HOXA9 y TWSIT1) se prepararon las mismas reacciones.

Componente	Mo	Ms	Md	Msd
PCR Master Mix	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl
PCR primer mix (ZNF 154 o HOXA9 o TWIST1)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Digestión Mo	5 µl	-	-	-
Digestión Ms	-	5 µl	-	-
Digestión Md	-	-	5 µl	-
Digestión Msd	-	-	-	5 µl
Agua libre de RNasas/DNasas	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Volumen Final	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Tabla 11. Reacción de PCR para placa de 96 pozos y un gen a analizar

Esta técnica cuenta controles llamados SEC (control de la enzima sensible a metilación) y DEC (control de la enzima dependiente de metilación) los cuales permiten evaluar la eficiencias de las enzimas de restricción y así tener resultados viables y reproducibles. Los reactivos utilizados para el mix de los controles se presenta en la Tabla 12.

Componente	Volumen
PCR Master Mix	7.5 µl
SEC ò DEC	0.5 µl
Agua libre de RNasas/DNasas	7 µl
Volumen Final	15 µl

Tabla 12. Controles SEC y DEC para el análisis de metilación.

Cada una de las condiciones se colocaron en la placa según las especificaciones del proveedor, observadas en la Figura 23:

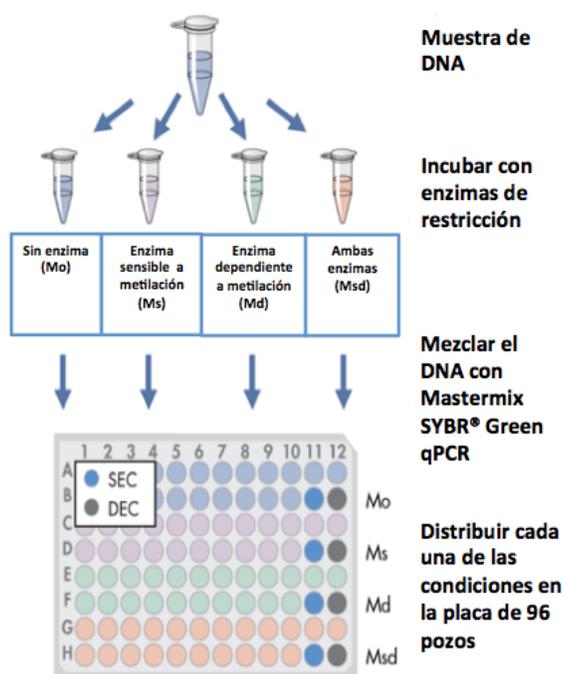


Figura 23. Diseño de la placa de 96 pozos para análisis en EpiTect Methyl II PCR System; QIAGEN®, LigthCycler 480 ROCHE.

Para la realización de la qPCR las condiciones correspondientes para experimento en LC480 ROCHE se presentan el Tabla 13.

Tabla 13. Protocolo de programación para la PCR.

Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
95°C	10 min*	1 ciclo
99°C	30s	3 ciclos
72°C	1 min	
97°C	15s	40 ciclos
72°C	1 min+	

Al final de la qPCR se extrajeron los valores de Ct de cada una de las condiciones y mediante una matriz de algoritmos provista por el QIAGEN® para obtener los valores en porcentaje de metilación para cada gen en cada muestras.

Inmunocitoquímica

Posteriormente de los 100 µl restantes de las células ya lavadas se realizó citología en capa fina para identificar la presencia de la proteínas ZNF-154, , TWIST1 y HOXA9 mediante el sistema Ventana Ultraview DAB. Con esto se analizó la correlación entre el estado de metilación y la presencia de proteínas. Las especificaciones técnicas para el proceso sistematizado de Ventana se encuentra en la Tabla 14.

Tratamiento	Tiempo
Acondicionador celular CC1	8 min
Anticuerpo (aplicación manual) ZNF 154 o HOXA9 o TWIST1	32 min
UltraWash	
Hematoxilina	6 min
Bluing Reagent	4 min

Tabla 14. Condiciones para la inmunocitoquímica semiautomática para ZNF 154, HOXA9 y TWIST1, en el equipo Ventana, ROCHE.

Análisis estadístico

Con los datos clínicos y moleculares de cada paciente se construyó una base de datos, la cual será manejada en el programa PASW Statistics 18 para evaluar la correlación entre el porcentaje de metilación y la expresión de los genes al igual curvas de ROC (Característica Operativa del Receptor) con un 95% de intervalo de confianza (IC) para la determinación de la sensibilidad y especificidad de los genes evaluados para la detección de recurrencia. Para la diferencia de medias se utilizó una t-student con un 95% de Intervalo de confianza (IC), además para el análisis de correlación se utilizó Pearson con un 95% de IC, entre las características clínicas y el estado de metilación.

Modelo de muestreo

Los pacientes que fueron intervenidos por RTU se les tomó una muestra de orina en su primer revisión (3 meses después de la RTU) de la cual se realizó una citología urinaria, estatus de metilación e inmunocitoquímica, el paciente se clasificó dependiendo del resultado de la cistoscopia, recurrente o no recurrente, en el caso de los recurrentes se les dio seguimiento por un periodo máximo de 12 meses después de la RTU; el último paciente incluido en el análisis fue hasta un plazo máximo de 12 meses después del primer individuo muestreado, esto por fines del estudio.

RESULTADOS

Durante el presente trabajo se recolectaron muestras de orina de pacientes en el Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI, obteniendo un total de 90 pacientes con recurrencia en cáncer de vejiga y 90 pacientes libres de recurrencia en cáncer de vejiga, todas las muestras fueron obtenidas bajo consentimiento informado del paciente, así como los datos clínicos de los mismos. Las muestras de orina fueron centrifugadas y lavadas con PBS 1X para la obtención del botón celular, el cual fue preservado en Persevicyt a -3°C . De las muestras preservadas se obtuvo el DNA, así como las citologías para Papanicolaou e Inmunocitoquímica, aquellas muestras que no tenían material suficiente para establecer el porcentaje de metilación fueron descartadas. Las características clínicas de los pacientes incluidos en el análisis, fueron recopiladas en la

base de datos, a continuación se presentan las mismas de manera resumida en la Tabla 15.

Tabla 15. Datos clínicos de los pacientes con recurrencia para cáncer de vejiga y sin recurrencia para cáncer de vejiga.

Característica	Recurrencia N=70 (Promedio)	No Recurrencia N=90 (Promedio)	P
Genero			0.783
Masculino	55 (81.6%)	68 (78.7%)	
Femenino	15 (18.3%)	22 (21.2%)	
Edad	66.83	66.07	0.610
Peso	74.51	75.38	0.805
Hemoglobina sérica	13.52	15.30	0.001*
Creatinina sérica	1.19	1.29	0.638
Albumina sérica	3.98		0.071
Linfocitos totales	2.06		0.470
Colesterol total sérico	175.51		0.500
Eritrocituria	41 (100)	66(100)	0.004*
0-3	16 (39)	31(47)	
4-10	7(17.1)	4(6.1)	
11-20	5(12.2)	7(10.6)	
Abundantes	9(22)	1(1.5)	
Incontables	4(9.8)	2(3.0)	
Tiempo de vigilancia desde la ultima resección Promedio	18.05	22.49	0.299

El numero de pacientes incluidos en el análisis son 70 pacientes con Recurrencia y 90 Sin Recurrencia.

* Característica clínica con diferencia significativas entre los grupos Recurrencia y No Recurrencia mediante una t-student.

Conforme a los datos clínicos de los pacientes, solo se detectaron diferencias significativas con una $P < 0.05$ entre los grupos Recurrencia y No Recurrencia para cáncer de vejiga, en la Hemoglobina sérica y para la Eritrocituria. No se encontró asociación entre las restantes características como, edad, género, peso, el tiempo de vigilancia desde la última resección, tabaquismo, creatinina sérica, albumina sérica, linfocitos totales, y colesterol.

ANÁLISIS CITOLÓGICO

Con la finalidad de que los datos del porcentaje metilación perteneciesen a células epiteliales del sistema urinario, se realizó la determinación del porcentaje de células epiteliales para cada muestra, tanto para pacientes recurrentes y no recurrentes. En el caso de los pacientes no recurrentes, se observó en todas las muestras 100% de células epiteliales con 0% de infiltrado inflamatorio, además de necrosis y bacterias en baja proporción (Figura 24); para el caso de las muestras recurrentes el porcentaje de células epiteliales se redujo a 95% con un 5% de infiltrado inflamatorio, en este caso se lograron apreciar células neoplásicas, características de carcinoma *in-situ* o en agregados en forma de papilas, además de una mayor presencia de células en necrosis y de bacterias (Figuras 25). Con estos datos podemos sugerir que los datos de metilación corresponden en mayor proporción al propio epitelio de la vejiga y para el caso de las muestras con recurrencia, de la fronda misma. Mediante el análisis de la curva ROC se establecieron los valores de sensibilidad y especificidad de 24.40 y 87.50 respectivamente.

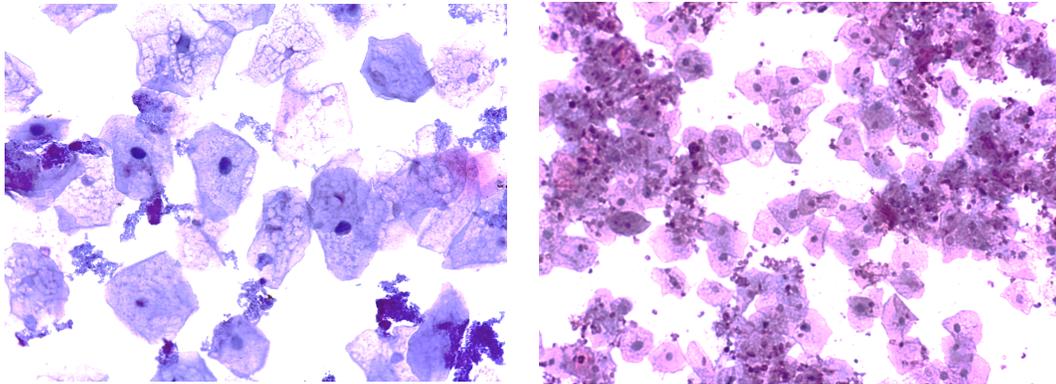


Figura 24. Citologías con tinción de Hematoxilina y Eosina de pacientes sin recurrencia, con presencia de agregados de células, sin infiltrado inflamatorio; Objetivo 40X.

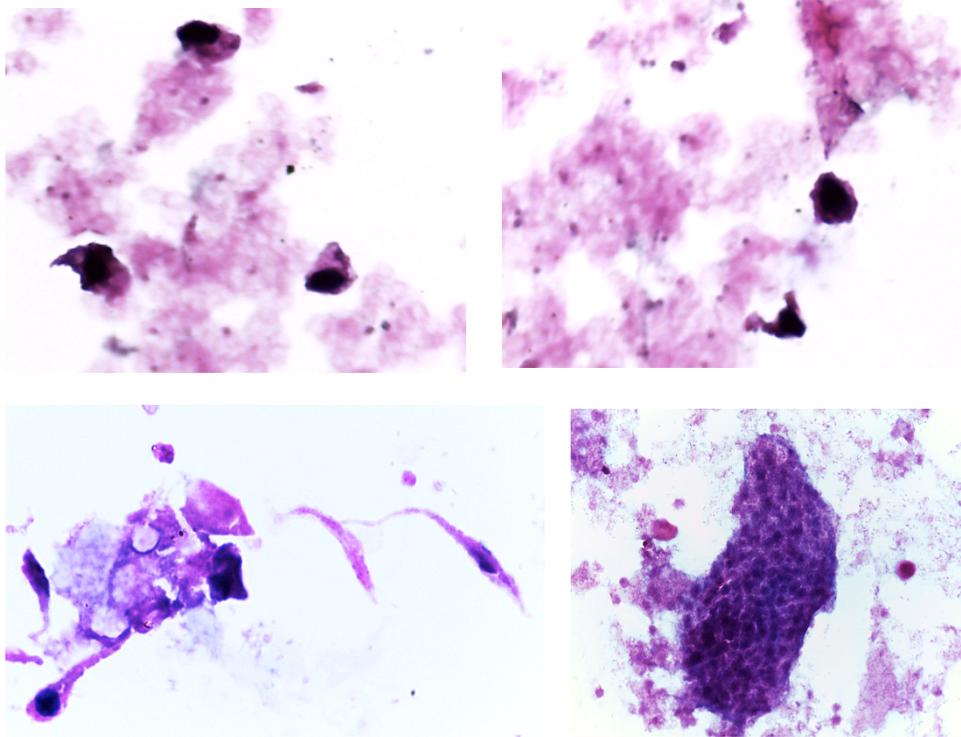
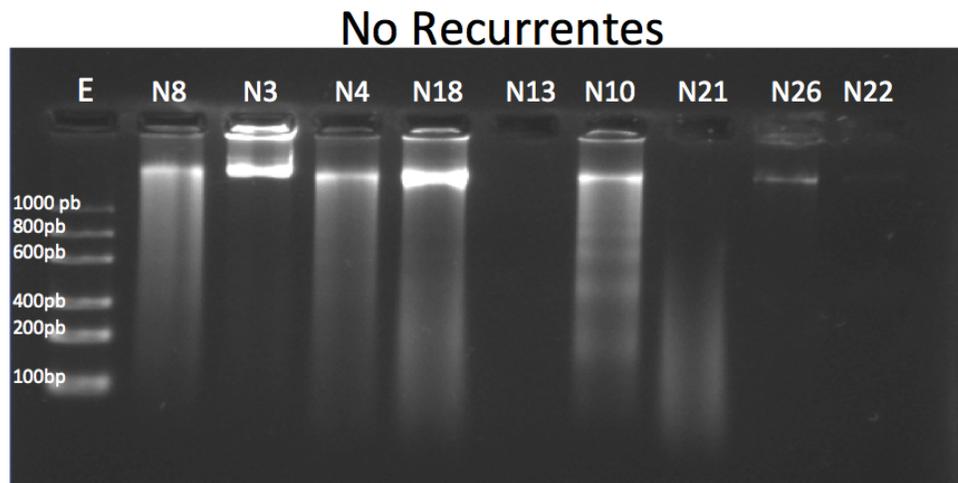


Figura 25. Citología con tinción de Hematoxilina y Eosina de pacientes con recurrencia, comparecencia de células neoplásicas y necrosis, con 5% de infiltrado celular.; Objetivo 40X.

EXTRACCIÓN DE DNA

Del total de muestras obtenidas solo de 35 pacientes con recurrencia y de 26 sin recurrencia se obtuvo el material genético necesario para hacer el análisis de metilación, además las muestras que compilan con este criterio fueron analizadas para comprobar la integridad del DNA, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y corroborar la calidad de las muestras antes de ser sometidas al análisis de metilación. En las 61 muestras analizadas la integridad del DNA fue buena al observar una banda uniforme que estuviera por arriba de la banda correspondiente a 300 pb, esto debido a que los iniciadores a utilizar comprenden una zona de la isla CpG, que en los tres genes es mayor a 300 pb (Figura 26).

A



B

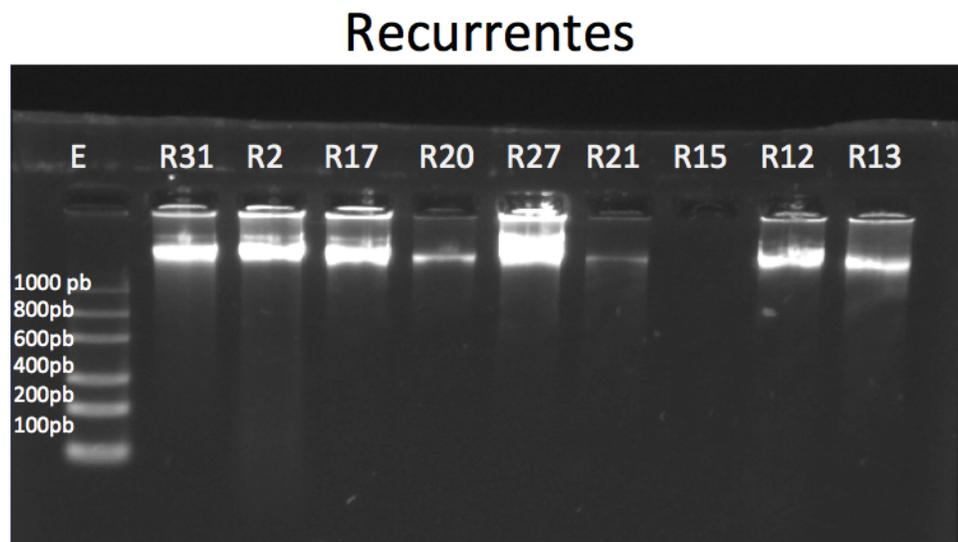


Figura 26. Integridad del DNA de las muestras recurrentes y no recurrentes; aquellas muestras que no superaran los 300 pb en la banda del gel de agarrosa fueron descartadas para el análisis de metilación. E: escalera.

METILACIÓN DEL DNA

Para el análisis del DNA metilado, a partir del botón celular se tomó una muestra, con la cual se extrajo como mínimo 60 ng totales por muestra y se sometió a digestión enzimática según las especificaciones de EpiTect Methyl II Assay PCR Syber Green QIAGEN, teniendo como resultado el porcentaje de DNA metilado y DNA no metilado para los genes ZNF 154, HOXA9 y TWIST1. El gen ZNF 154 mostro diferencias significativas con la prueba de *t* en el porcentaje de metilación entre ambos grupos, presentando un promedio de metilación de 55.07% en pacientes con recurrencia y 22.48% en pacientes sin recurrencia, con una $P < 0.0001$, observándose un aumento en el porcentaje de metilación para el caso de los pacientes con Recurrencia, que será categorizado como hipermetilación. Para el caso de el gen HOXA9, se presentó hipermetilación en el grupo de Recurrencia con un promedio de metilación de 27.93% en comparación con el grupo de no recurrencia con un promedio de metilación del 13.03%, con una $P < 0.03$. Por último para el caso de TWIST1, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en el porcentaje de metilación, presentando hipermetilación en los pacientes recurrentes con una media de 29.11% en contraste con los no recurrentes con 13.41% de metilación promedio, con una $P < 0.03$ (Figura 27).

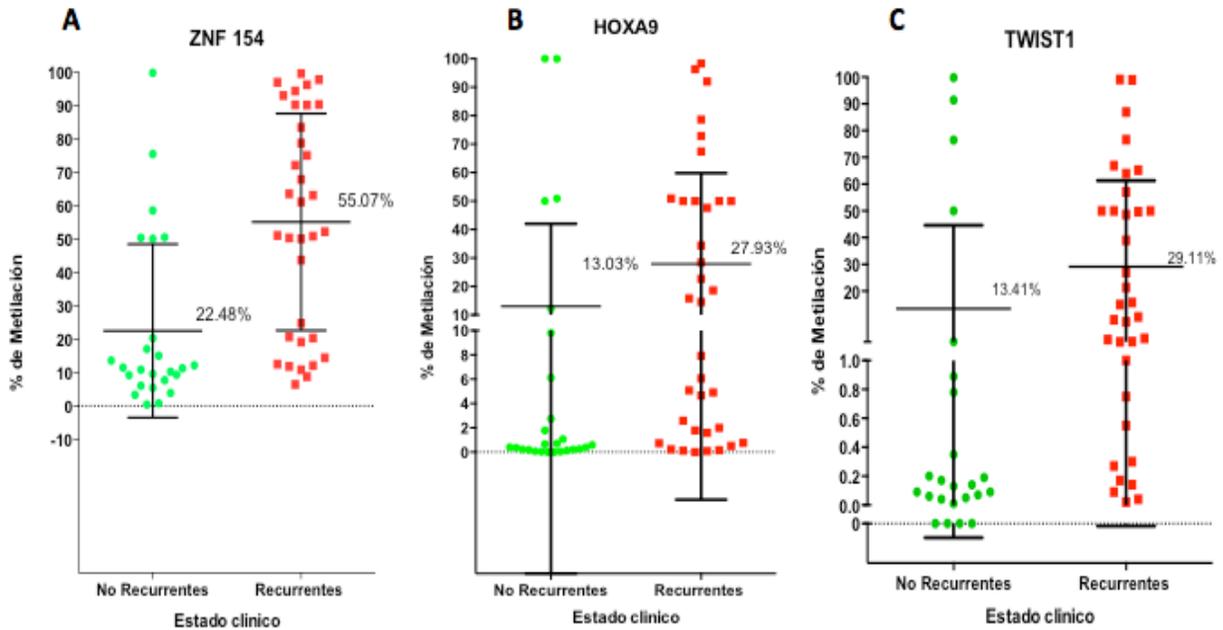


Figura 27. Comportamiento de los porcentajes de metilación para los genes A) ZNF 154 ^{***}, B) HOXA9 ^{**} y C) TWSIT1 ^{*} entre los grupos recurrentes y no recurrentes para cáncer de vejiga. La línea representa el promedio para cada grupo, la cual presente diferencias significativas mediante una prueba t-student 95% IC. ^{***} P<0.0001 ^{**} P<0.08 ^{*} P<0.006

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

A partir de los datos de metilación fue posible establecer el punto de corte, sensibilidad y especificidad de la prueba para la detección de pacientes con recurrencia en cáncer de vejiga a partir del porcentaje de metilación de los genes evaluados, además de ser una metodología de tipo no invasiva. Tomando ambos grupos, recurrentes y no recurrentes, se calculó la Curva de ROC para cada secuencia promotora del gen (Figura 28). Los valores de sensibilidad y especificidad, al igual que los puntos de corte para los genes ZNF 154, HOXA9 y TWIST1 son presentados en la siguiente tabla, al igual que el análisis de los marcadores con forma de panel, bajo distintas combinaciones (Tabla 16). Los puntos de corte representan el valor mínimo del porcentaje de metilación para ser considerados como recurrentes por la prueba, lo que significa que si un paciente sobrepasa ese punto

de corte se le categoriza como hipermetilación o positivo por la prueba y presenta la probabilidad de presentar recurrencia durante el régimen de vigilancia. Por otro lado aquellos pacientes que estén por debajo del punto de corte presentan una menor probabilidad de presentar recurrencia durante su régimen de vigilancia.

Tabla 16. Valores de sensibilidad y especificidad, expresados en porcentajes de metilación y valores de corte para las secuencias promotoras los genes ZNF 154, HOXA9 , TWIST1 y en forma de paneles.

GEN	% DE METILACIÓN RECURRENTES	% DE METILACIÓN NO RECURRENTES	PUNTO DE CORTE (% DE METILACIÓN)	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
ZNF 154	56.88	21.91	18.07	82.31	73.33
HOXA9	26.40	21.18	1.33	89.66	60
TWIST1	24.81	9.31	0.94	75.86	78.57
CITOLOGIA				29.4	87.50
PANEL 1				100	40
PANEL 2				100	41.18
PANEL 3				99.10	58.82
PANEL 4				100	52.94
NMP22				68	79
InmunocCyt				76	77
UroVysion (FISH)				79	83
BTA				49	85

La sensibilidad y especificidad de los genes tanto como de la citología urinario esta basados en el estándar de oro, cistoscopia. Determinación de los puntos de corte para los genes ZNF 154 HOXA9 y TWIST1 además de los valores de sensibilidad y especificidad en comparación con los valores obtenidos de la citología urinaria. PANEL 1: se utilizaron los tres genes PANEL 2: se utilizó a los genes ZNF 154 y HOXA9, PANEL 3: se utilizaron los genes ZNF 154 y TWIST1, PANEL 4: se utilizó los genes HOXA y TWIST1.

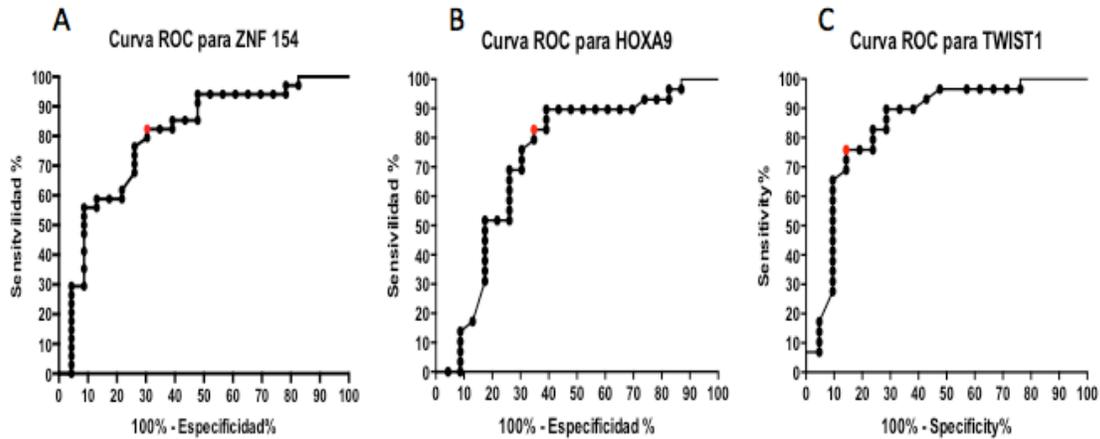


Figura 28. Curvas ROC para los genes A) ZNF 154, B) HOXA9 y C) TWIST1. Los puntos rojos representan los puntos de corte para cada caso. 95% IC; ZNF 154 $P < 0.0001$, HOXA9 $P = 0.004$ y TWIST1 $P = 0.0005$

Teniendo en cuenta estos datos se observó el comportamiento de los datos conforme a los puntos de corte para cada caso, dividiendo a la población dependiendo el estado clínico, recurrentes y no recurrentes, esto para cada gen (Figura 29).

Se determinó que existen casos extremos en donde los pacientes no recurrentes que sobrepasan el valor de corte, por lo tanto, son considerados positivos con los valores de hipermetilación para alguno de los tres genes evaluados. Del mismo modo, en el caso de los recurrentes, fueron detectados casos que mostraban un niveles menores de metilación al valor de corte, los cuales fueron considerados como negativos con base en nuestros parámetros de prueba. En el caso de los pacientes no recurrentes con valores de hipermetilación en secuencias promotoras de alguno de los genes estudiados podrían ser candidatos a indicadores de predicción de recurrencia, por lo cual se tuvo al paciente en vigilancia continuá.

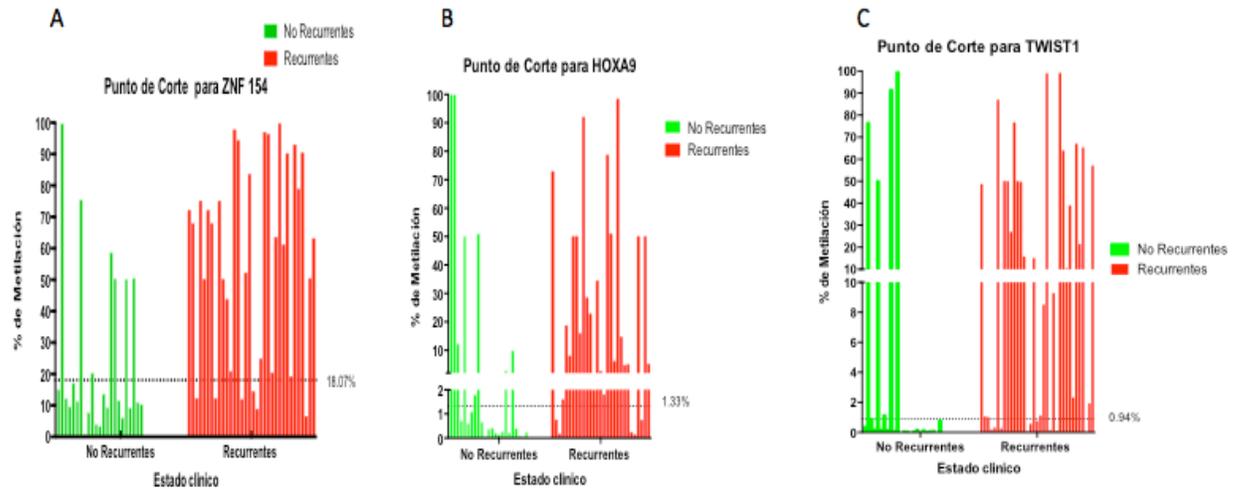


Figura 29. Porcentaje de metilación y su relación con el punto de corte según curvas ROC. Comportamiento de los porcentajes de metilación para cada gen. El punto de corte se representa en la línea punteada para cada caso, observándose casos fuera del rango, tanto para los pacientes recurrentes como para los no recurrentes. , A) ZNF 154, B)HOXA9 y C) TWIST1.

SOBREVIDA LIBRE DE RECURRENCIA

A pesar de los casos extremos presentados para cada grupo, el porcentaje de metilación presenta niveles altos de sensibilidad y especificidad para cada gen, por lo tanto se evaluó la sobrevida libre de recurrencia y determinó el valor pronóstico de la prueba, comparando el estado de metilación para cada uno de los genes y el estado clínico de los pacientes, teniendo dos variables, recurrencia (con recurrencia y sin recurrencia) y estado de metilación (metilado y no metilado). Durante el periodo de seguimiento se logró obtener un tiempo de vigilancia de hasta 72 meses desde la última RTU (Figura 30).

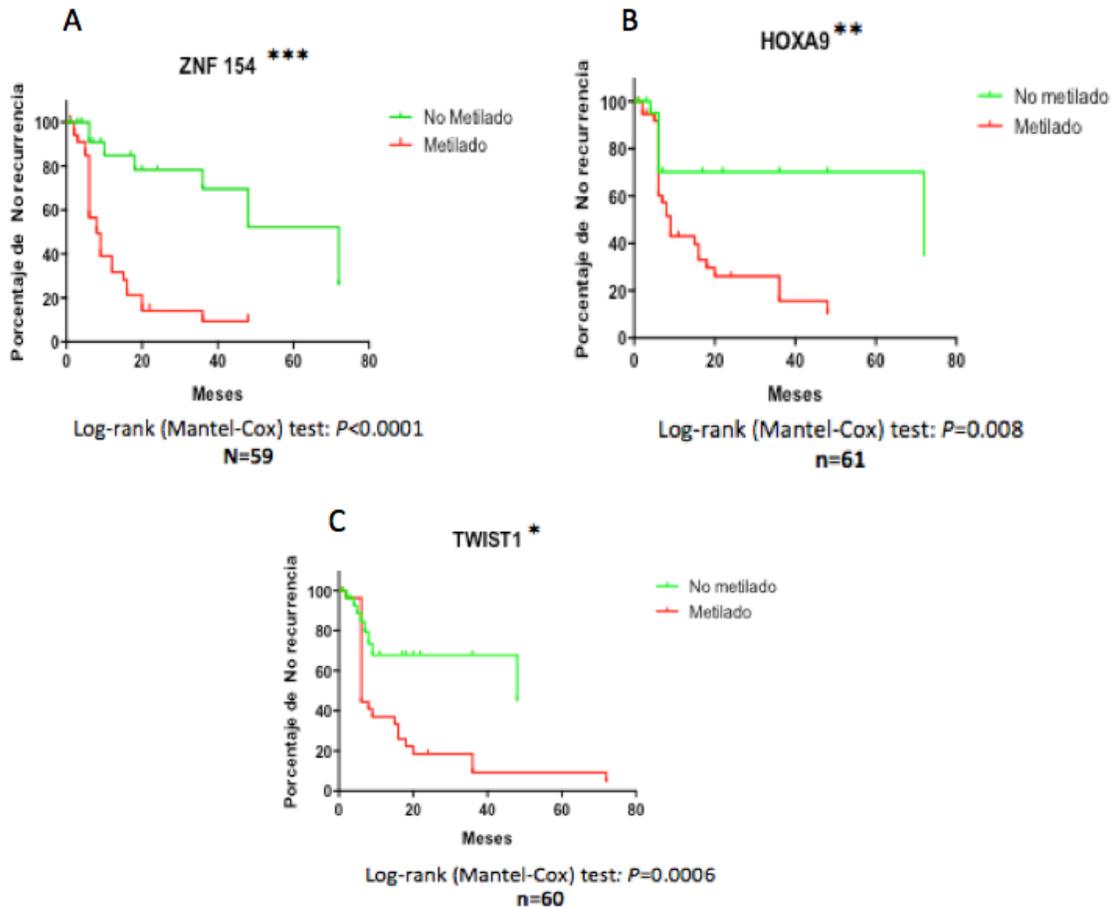


Fig 30. Curvas de supervivencia libre de recurrencia de acuerdo al estado de metilación para los genes A) ZNF - 154 *** B) HOXA9** y C) TWIST1* en un periodo de seguimiento de hasta 80 meses. *** $P < 0.0001$ ** $P < 0.008$ * $P < 0.0006$

INMUNOCITOQUÍMICA

A partir del botón celular previamente fijado y preparado para las citologías, se tomó una alícuota de 100 μl para realizar la inmunocitoquímica en el equipo Ventana de ROCHE, bajo las especificaciones técnicas del proveedor. Para la estandarización de la concentración del anticuerpo se tomó referencia a TWIST1 bajo distintas concentraciones (1:50, 1:100 y 1:200) sin embargo la calidad de la tinción y la cantidad de células fue inadecuada para el análisis, por lo cual la correlación del estado de metilación con el de expresión de los genes evaluados no fue posible (Figuras 31 y 32).

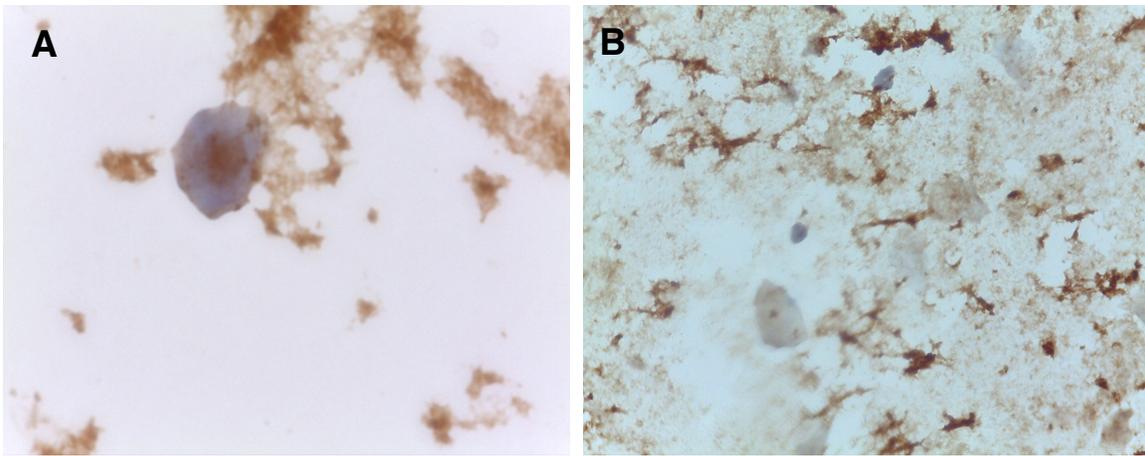


Figura 31. Inmunocitoquímica de pacientes con recurrencia en cáncer de vejiga en distintas concentraciones de anticuerpo TWIST1 (A) 1:200 y (B) 1:50; Objetivo 40X

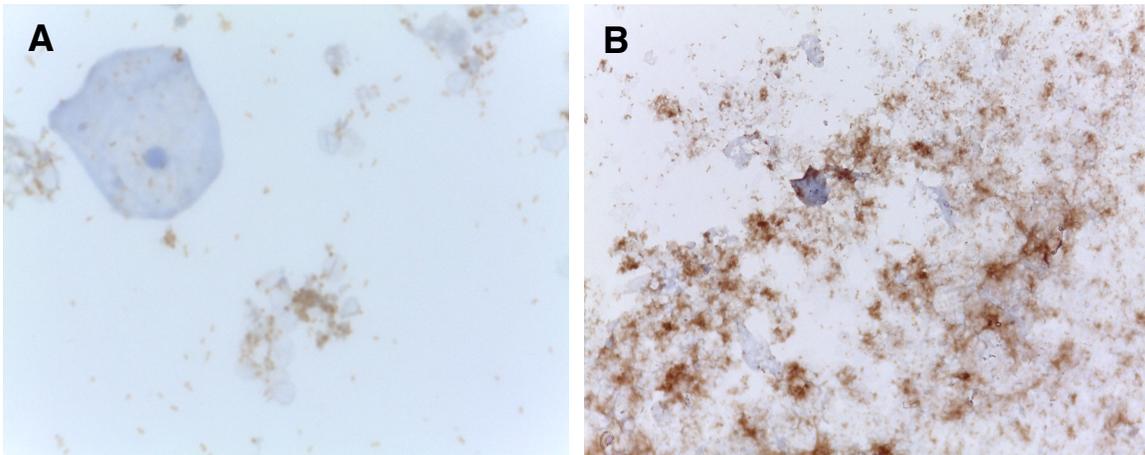


Figura 32. Inmunocitoquímica de pacientes sin recurrencia en cáncer de vejiga en distintas concentraciones de anticuerpo TWIST1 (A) 1:200 y (B) 1:50; Objetivo 40X

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Si bien cuando se presentaron las características clínicas de los pacientes, solo se observaron diferencias significativas en la Eritrocituria y la Hematuria entre los grupos sin recurrencia y con recurrencia, al realizar el análisis de correlación del estado de metilación con las características clínicas solo con los pacientes a los cuales se les efectuó el perfil de metilación, se observó que existe correlación con el grado tumoral, tiempo de vigilancia y el tamaño de la fronda, los datos se presentan en la Tabla 17. Se correlacionó

el estado de los genes (ZNF 154, HOXA9 y TWIST1) según la categorización dada por el perfil de metilación y si este rebasaba el punto de corte para cada caso, si presentaba metilación.

Tabla 17. Correlación entre las características clínicas y el estado de metilación de los genes ZNF 154, HOXA9 y TWIST1.

Característica clínica	ZNF 154		HOXA9		TWIST1	
	R <i>P value</i>	95% IC	R <i>P value</i>	95% IC	R <i>P value</i>	95% IC
Edad	-0.1336 0.45	-0.4561 a 0.2198	0.1850 0.29	-0.1635 a 0.4924	0.1456 0.41	-0.2082 a 0.4657
Genero	-0.02344 0.89	-0.3588 a 0.3173	0.2274 0.18	-0.1146 a 0.5212	-0.02344 0.89	-0.3588 a 0.3173
Peso	-0.07913 0.66	-0.4113 a 0.2716	-0.3232 0.06	-0.5963 a 0.01686	0.07847 0.66	-0.2723 a 0.4108
Talla	-0.2334 0.19	-0.5340 a 0.1196	-0.4519 0.007*	-0.6854 a -0.1342	0.1038 0.56	-0.2484 a 0.4318
IMC	-0.02982 0.86	-0.3694 a 0.3168	-0.1292 0.46	-0.4479 a 0.2186	0.2014 0.26	-0.1526 a 0.5095
Tabaquismo	0.1258 0.47	-0.2218 a 0.4451	0.0040 0.98	-0.3298 a 0.3369	0.05634 0.75	-0.2874 a 0.3872
Hemoglobina	-0.2877 0.10	-0.5743 a 0.06183	-0.1493 0.39	-0.4641 a 0.1989	0.01031 0.95	-0.3343 a 0.3524
Eritrocituria	0.2471 0.16	-0.1052 a 0.5443	0.1321 0.45	-0.2158 a 0.4502	0.07636 0.67	-0.2742 a 0.4090
Creatinina sérica	0.06335 0.72	-0.2863 a 0.3981	0.0440 0.80	-0.2986 a 0.3767	-0.1958 0.27	-0.5052 a 0.1582
Albúmina sérica	-0.08691 0.63	-0.4229 a 0.2700	0.0555 0.75	-0.2934 a 0.3915	0.04619 0.80	-0.3075 a 0.3887
Linfocitos totales	-0.1314 0.46	-0.4543 a 0.2220	-0.0470 0.79	-0.3792 a 0.2959	-0.06489 0.71	-0.3994 a 0.2848
Colesterol sérico	-0.06612 0.71	-0.4055 a 0.2893	-0.1513 0.40	-0.4703 a 0.2026	-0.02675 0.88	-0.3720 a 0.3251
Desnutrición	0.1822 0.31	-0.1720 a 0.4946	-0.0411 0.81	-0.3742 a 0.3013	0.003392 0.98	-0.3404 a 0.3464

Continua Tabla 17

Característica clínica	ZNF 154		HOXA9		TWIST1	
	R <i>P value</i>	95% IC	R <i>P value</i>	95% IC	R <i>P value</i>	95% IC
ECOG	0.2048 0.25	-0.1491 a 0.5122	-0.1333 0.45	-0.4512 a 0.2146	0.1920 0.28	-0.1621 a 0.5023
Grado	0.4721 0.004*	0.1593 a 0.6987	0.1167 0.50	-0.2254 a 0.4332	0.1560 0.37	-0.1924 a 0.4695
Tiempo de Vigilancia	-0.3797 0.02*	-0.6397 a - 0.04171	-0.4963 0.002*	-0.7146 a -0.1899	-0.1177 0.51	-0.4432 a 0.2352
Intravesical	0.09945 0.57	-0.2471 a 0.4234	0.2113 0.22	-0.1312 a 0.5088	0.09945 0.57	-0.2471 a 0.4234
Numero de frondas	0.1746 0.33	-0.1796 a 0.4887	0.1135 0.52	-0.2337 a 0.4350	-0.1988 0.26	-0.5075 a 0.1552
Tamaño de las frondas	0.3774 0.03*	0.03909 a 0.6381	0.3549 0.03*	0.01888 a 0.6188	0.3260 0.06	-0.01960 a 0.6020

DISCUSIÓN

Durante el proceso de estandarización, se determinaron varios puntos a considerar para el procesamiento de las muestras; tal es el caso de la calidad de estas, ya que durante la recolección, se determinó que es preferible que esta sea la primera micción del día o se limitara el consumo de líquidos para evitar tener orina diluida y por consiguiente tener una celularidad baja.

Una de las dificultades que se presentó durante la realización de este trabajo era el seguimiento de los pacientes ya que en muchas de las ocasiones no seguían el régimen de vigilancia establecido, una cistoscopia cada tres meses durante el primer año después de la resección transuretral, por lo que de los 61 casos analizados solo se obtuvieron 3 pacientes con más de una muestra recolectada a lo largo del tiempo, sin embargo, no en todas se realizó el análisis de metilación debido a la calidad de la muestra, presentando

poco material celular, evitando obtener la cantidad de DNA requerido. Por lo tanto del número de total de muestras recolectadas se vió reducido a 35 pacientes con recurrencia y 26 pacientes sin recurrencia.

Durante el proceso de estandarización del análisis de metilación se logró comprobar la reproducibilidad y la efectividad de la prueba, ya que se efectuó el ensayo una segunda vez con la misma muestra de DNA, realizando el proceso desde el inicio, sometiendo al DNA de la muestra a digestión enzimática y qPCR, sin embargo, solo se ocupó la mitad de reactivos y de muestra genética (60 ng de DNA). El resultado que se obtuvo fue el mismo tanto para el primer ensayo donde se utilizaron las cantidades según lo establecido por el protocolo, tanto para el segundo ensayo, donde se utilizó solo la mitad, teniendo el mismo porcentaje de metilación. Con este hallazgo, se realizaron los experimentos bajo las mismas condiciones, con la mitad de los reactivos y con mínimo 60 ng de muestra de DNA.

Si bien cuando se presentaron las características clínicas de los pacientes, solo se observó diferencias significativas en la eritrocituria y la hematuria entre los grupos sin recurrencia y con recurrencia, al realizar el análisis de correlación del estado de metilación con las características clínicas solo con los pacientes a los cuales se les efectuó el perfil de metilación, se observó que existe correlación con el grado tumoral, tiempo de vigilancia y el tamaño de la fronda, los datos se presentan en la Tabla 17. Se correlacionó el estado de los genes (ZNF 154, HOXA9 y TIWST1) según la categorización dada por el perfil de metilación y si este rebasaba el punto de corte para cada caso, si presentaba metilación.

En el análisis de correlación entre las características clínicas y el estado de metilación para el caso del gen ZNF 154 se presentó una media en el porcentaje de metilación de 55.07% para los 35 casos de pacientes que presentaban recurrencia, en comparación con los pacientes sin recurrencia que presentaron 22.48% de metilación para los 26 casos, lo cual, en distintos trabajos han relacionado la hipermetilación con la presencia de cáncer de mama, cabeza y cuello, riñón, ovario, páncreas, próstata, recto, estómago y útero (Sanchez et al., 2013; Reinert et al., 2012). En el gen ZNF 154 se encontró correlacionado

con el grado tumoral, el tiempo de vigilancia y el tamaño de la fronda, esto es posible ya que el gen está involucrado en el crecimiento celular y con la diferenciación, y al estar metilado, su papel en la diferenciación celular podría contribuir en el grado tumoral al perder las características de las célula epitelial de la vejiga en un evento neoplásico (www.genecards.org, Septiembre 2014). No se logró realizar la correlación con la expresión mediante una inmunocitoquímica, por lo que es necesario establecer condiciones adecuadas para este tipo de muestras. En el trabajo realizado por Kitchen y colaboradores en 2015 han evaluado el perfil de metilación del gen ZNF 154 en 84 biopsias mediante conversión por bisulfito y piro-secuenciación, en el cual observaron un aumento en la frecuencia de tumores metilados; así como incremento en el nivel de metilación, y su asociación con recurrencia y con progresión, sin embargo, no encontraron diferencias en la frecuencia tumores metilados y el nivel de metilación entre grado tumoral (Bajo-intermedio y alto grado) (Kitchen et al., 2015). Esto representa un hallazgo, debido a que en una corte diferente de pacientes, el nivel de metilación de ZNF 154 proporciona información sobre el estado de recurrencia del paciente al igual que del grado tumoral, pudiéndose interpretar como una característica de la población.

El gen HOXA9 en nuestro análisis presentó una media en el porcentaje de metilación de 27.83%, en contraste, los pacientes sin recurrencia en cáncer de vejiga presentaban un disminución en el porcentaje de metilación, teniendo como valor medio de 13.03%, por lo cual se denomina que HOXA9 presenta hipermetilación en recurrencia para cáncer de vejiga. En distintos reportes se presenta hipermetilación para HOXA9 tanto para cáncer de vejiga como en leucemia mieloide aguda (Strathdee et al., 2007; Reinert et al., 2012; Mattias et al., 2015). Para HOXA9 solo se encontró correlacionado con el tiempo de vigilancia y con el tamaño de la fronda, si bien no existe algún tipo de información en la cual correlacionen el tiempo de vigilancia y tamaño de la fronda con el estado de metilación de HOXA9, este factor de transcripción tiene función en la morfogénesis y la diferenciación (www.genecards.org, Septiembre 2014), lo cual podría estar participando en el aumento del tamaño de la fronda, permitiendo al estar metilado, que se pierda la diferenciación de las células epiteliales, a células con mayor capacidad de proliferación,

como son las células cancerosas. En el mismo estudio realizado por Kitchen y colaboradores en el 2015, también evaluaron el perfil de metilación de HOXA9, encontrando una asociación entre la recurrencia y progresión con el aumento de metilación de este gen, comparado con su contraparte, el grupo no recurrente. Además, encontraron diferencias en la frecuencia de metilación al igual que el nivel de metilación entre los pacientes con bajo-intermedio grado y progresión a alto grado (Kitchen et al., 2015). En este trabajo se encontró un comportamiento diferente de HOXA9 debido a que no existe una correlación entre el nivel de metilación con el grado tumoral, sin embargo si se encontró correlación entre el estado de recurrencia del paciente.

Los valores de metilación para el gen TWIST1 presentaron un comportamiento similar a los otros dos genes evaluados, teniendo hipermetilación para los pacientes que presentaban recurrencia en cáncer de vejiga con una media de 29.11%, por otro lado los pacientes que no presentaron recurrencia, tuvieron una media de 13.41%; este aumento en el porcentaje de metilación se ha reportado en otros trabajos para cáncer de vejiga al igual que en cáncer colorectal (Galvan et al., 2014; Reinert et al., 2012; Yegin et al., 2013). Si bien, en el caso de TWIST1 no se encontró ninguna correlación con alguna característica clínica, este factor de transcripción está relacionado con la transición epitelio-mesénquima (www.genecards.org, Septiembre 2014), por lo cual participa en la metástasis, si bien en estos casos TWIST1 se encuentra metilado y se asume que si su expresión está atenuada, esto podría estar implicado con el hecho de que la mayoría de los casos son tumores confinados en la vejiga y de bajo grado. Sin embargo existe el trabajo realizado por Fantony y colaboradores en el 2015, en el cual evaluaron el estado de metilación de TWIST1 en 209 muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga, mediante la plataforma MS-PCR, para probar la capacidad de este gen en la detección de cáncer de vejiga, y observaron que en pacientes con cáncer el nivel de metilación de TWIST1 aumenta e impresionantemente el hábito de fumar afecta en la metilación del DNA en cáncer de vejiga ya que reportan diferencia en la metilación entre fumadores y no fumadores. En su cohorte de pacientes el ensayo de metilación tenía mejores valores de sensibilidad en paciente con alto índice de tabaquismo (78%) comparado con los

fumadores ocasionales (56%) y los no fumadores (44%). Por otro lado no se encontró otra correlación entre las características clínicas y el estado de metilación (Fantony et al., 2015).

El estado de metilación de los genes evaluados resultó ser un componente muy heterogéneo, sin embargo, se logró identificar un aumento de metilación en pacientes con recurrencia en cáncer de vejiga, en comparación con los pacientes que no presentaban fronda al momento de la cistoscopia.

Debido a que los valores de sensibilidad y especificidad de los genes es de manera individual, se evaluó el valor pronóstico de estos en forma de panel, además de compararlos con los valores de las principales técnicas utilizadas para la detección de cáncer de vejiga aprobadas por la FDA (Tabla 16). Los paneles 1 (ZNF 154, HOXA9 y TIWST1), 2 (ZNF 154 HOXA9) y 4 (HOXA9 y TWIST1), ofrecen un valores que llegan hasta el 100% de sensibilidad, en comparación con el panel 3 (ZNF 154 y TWIST1), que alcanzó un valor de 99.10% de sensibilidad, los cuales son superiores a los valores obtenidos por la citología urinaria obtenida en el hospital y lo reportado en las referencias (Reinert et al., 2012), sin embargo, los valores de especificidad descienden a valores entre 40-58.82%, los cuales están por debajo de los valores correspondientes a los genes de manera individual a la citología urinaria. El valor de especificidad de HOXA9 de manera individual es el más bajo (60%) del los tres genes evaluados, esto al parecer afecta al valor de especificidad cuando se evalúan los paneles presentados en tabla 16, ya que el panel con el mayor valor de especificidad fue el panel 3 (ZNF 154 y TWIST1) que no contaba con este gen. Los paneles 1 (ZNF 154, HOXA9) y TIWST1) y 2 (ZNF 154 y HOXA9) son los que presentan los valores mas bajos de especificidad (40% y 41.18%, respectivamente), teniendo como denominador la presencia del HOXA9. Por lo cual se podría proponer la utilización del panel 3 para la evaluación d el recurrencia en cáncer de vejiga.

La baja en el porcentaje de especificidad en los genes para la detección de recurrencia en cáncer de vejiga, es similar con lo reportado con las pruebas aprobadas por la FDA, al analizarlas en forma de panel en pacientes con recurrencia en cáncer de vejiga. Tal es el

caso del trabajo realizado por Todenhöfer y colaboradores en el cual evaluaron a 483 bajo vigilancia de cáncer de vejiga no músculo invasivo, con las técnicas: citología urinaria, FISH, NMP22 y uCyt, observando valores de sensibilidad de 66.4-74.3% y de especificidad de 49.9- 75.5% cuando se utilizan de manera individual. Sin embargo, cuando se evaluaron en manera de panel, utilizando de 2, 3 y 4 técnicas distintas y observaron que en algunos casos los valores de especificidad descendían hasta 33.1%, además de presentar un aumento en los valores de sensibilidad de 94.5% (Todenhöfer et al., 2014). La variación de los valores de sensibilidad y especificidad pone en cuestionamiento la importancia de estos dos valores, aunque la especificidad es importante para prevenir falsos positivos, se debe de tener más importancia en obtener un valor de sensibilidad alto con valor predictivo negativo durante el régimen de vigilancia posterior a la RTU, ya que con esto se prevendría la pérdida de recurrencias potenciales.

La baja del porcentaje de especificidad de los genes y en los paneles es debido a que existen casos extremos en cada grupo, es decir, existen casos de pacientes que no presentaron recurrencia al momento de la cistoscopia pero presentan un nivel de metilación alto que sobrepasaba el punto de corte. En total se presentaron 8 casos de pacientes sin recurrencia al momento de la cistoscopia y tenían un perfil de metilación que sobrepasaba el punto de corte, ya sea de alguno de los genes evaluados, ZNF 154, HOXA9 o TWIST1, o alguna combinación de estos (Figura 36). Durante el seguimiento de estos pacientes solo se presentó 1 recurrencia en un periodo de 6 meses después de la última toma de muestra, por lo cual, queda seguir el régimen de vigilancia para posibles recurrencias de los pacientes que presentaban hipermetilación.

Del mismo modo para el caso de los pacientes que presentaron recurrencia al momento de la toma de la muestra, existían casos el nivel de metilación de alguno de los tres genes no permitía sobrepasar el punto de cohorte para determinar positividad a recurrencia por la prueba. En total existen 10 casos de pacientes con recurrencia que no presentaban hipermetilación en algún de los tres genes o en combinación de estos (Figura 36).

Si bien en ninguno de los cuatro percentiles se observó alguna característica relacionada, como el estado clínico, tamaño de la fronda, tabaquismo, hematuria o eritrocituria, los cambios en el nivel de metilación es un componente multifactorial que no podría estar reflejado en el historial clínico del paciente, sin embargo, existe la posibilidad para el caso de los pacientes sin recurrencia con hipermetilación, que sea un indicativo de una futura recurrencia en un periodo de tiempo más largo que no pudo ser captado por este estudio.

En este trabajo se pudo relacionar el porcentaje de metilación con el estado de expresión a nivel citológico de los genes evaluados mediante una inmunocitoquímica, debido a distintos factores: el número de células necesarias para evaluar una inmunocitoquímica de células epiteliales provenientes de orina son 500 células, esto acordado por American Joint Cancer Committee TNM staging system (2002) y The World Health Organisation/International Society of Urologic Pathology grading system (1998)(Cha et al., 2011). Además de la cantidad de sedimento urinario dificultaba la tinción de las células y por lo tanto el análisis de las mismas, por lo cual no se logró estandarizar la concentración del anticuerpo TWIST1, por lo cual se seguirá trabajando en la estandarización de esta técnica, bajo las recomendaciones y observaciones obtenidas durante la realización de este trabajo.

CONCLUSIÓN

Durante la estandarización de este trabajo se lograron determinar las condiciones de recolección y preservación de las muestras urinarias, para que estas representen una opción viable para la determinación de metilación en el DNA de tipo no invasiva y su uso como biomarcador de recurrencia en cáncer de vejiga.

Uno de los hallazgos obtenidos en este estudio, fue la determinación de la cantidad de DNA necesario para el análisis de metilación; 60 ng son la cantidad mínima, lo cual representa una ventaja sobre otras técnicas enfocadas en la determinación de los niveles de metilación, ya que en el caso de las muestras urológicas, la cantidad de material disponible es escaso debido a las observaciones que se presentan en este trabajo.

El estado de metilación de ciertos genes ha sido utilizado como biomarcador predictivo y de diagnóstico para distintas enfermedades, tal es el caso del cáncer, en donde los genes

evaluados (ZNF 154, HOXA9 Y TWIST1) muestran potencial para el diagnóstico de recurrencia en cáncer de vejiga, de igual manera en panel, correspondiente a ZNF 154 y TWIST1, debido a que los valores de sensibilidad y especificidad son mayores a los de las pruebas de rutina como la citología urinaria y de las pruebas aprobadas por la FDA (NMP22, BTA test, InmunoCyt y UroVision) utilizadas para la detección de cáncer de vejiga y de recurrencia. Además el análisis de metilación representan una alternativa de tipo no invasiva para el paciente, lo cual podría evitar complicaciones, junto con esto al no estar correlacionado con alguna de las características clínicas evaluadas en este trabajo, la probabilidad de falsos positivos causados por estas características es baja. La metilación de los genes evaluados además de ser una herramienta predictiva de recurrencia, nos provee de información relacionada con el tiempo de vigilancia y el grado tumoral, ya que se encuentran correlacionados con la hipermetilación de los genes ZNF 154 y HOXA9.

La inmunocitoquímica debido a la calidad de las muestras, para este estudio, no resulta ser una opción viable para la evaluación de la recurrencia en cáncer de vejiga por lo que tiene que mejorarse la técnica al momento de la recolección de la muestra, tanto al momento de la preservación como en las indicaciones hacia el paciente para mejorar la calidad de las muestras.

El estado de metilación de los genes se puede utilizar como prueba de primera línea para la detección de recurrencia en cáncer de vejiga, y los valores obtenidos de Sensibilidad y Especificidad son semejantes a los de las pruebas aprobadas por la FDA, en el caso de existir dudas en el diagnóstico de recurrencia, se realizaría la cistoscopia y se confirmaría por citología urinaria. Debido a que el estado de metilación presenta un valor pronóstico alto, este podría representar una alternativa de tipo no invasiva para las detecciones de recurrencia.

LITERATURA CITADA

- Abbate I, D'Introno A, Cardo G. 1998. Comparison of nuclear matrix protein 22 and bladder tumor antigen in urine of patients with bladder cancer. *Anticancer Res*; 18: 3803-3805.
- Amin M, Smith S, Reuter V, Epstein J, Grignon D, Hansel D, Lin O, McKenney J, Montironi R, Paner G, Al-Ahmadie H, Algaba F, Ali S, Alvarado-Cabrero I, Bubendorf L, Cheng L, Chevillet J, Kristiansen G, Cote R, Delahunt B, Eble J, Genega E, Gulmann C, Hartmann A, Langner C, Lopez-Beltran A, Magi-Galluzzi C, Merce J, Netto G, Oliva E, Rao P, Ro J, Srigley J, Tickoo S, Tsuzuki T, Umar S, Van der Kwast T, Young R and Soloway M. 2015 Update for the practicing pathologist: The International Consultation On Urologic Disease-European association of urology consultation on bladder cancer. USCAP. *Modern Pathology*; 28: 612-630.
- Aine M, Sjö Dahl G, Eriksson P, Veerla S, Linfgren, Ringnér M, Höglund M. 2015. Integrative epigenomic analysis of differential DNA methylation in urothelial carcinoma. *Genome Medicine*; 7:23. pp 1-20
- Ballestar E & Esteller M. 2008. SnapShot: The Human DNA Methylome in Health and Disease. Cancer Epigenetics Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), 28029 Madrid, Spain. 2008.
- Bestor TH. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*; 9: 2395-402.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. 2002. DNA methyltransferases get connected to chromatin *Trends Genet*; 18: 275-7.
- Chan *et al.* 2002. Hypermethylation of Multiple Genes in Tumor Tissues and Voided Urine in Urinary Bladder Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 8:464-470.
- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. 1997. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*; 277: 1996-2000.
- Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 93-124.
- Dulaimi *et al.* 2004. Detection of Bladder Cancer in Urine by a Tumor Suppressor Gene Hypermethylation Panel. American Association for Cancer. *Clin Cancer Res*; 10:1887-1893.
- Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358: 1148-1159.

- Epstein, Jonathan I. M.D.; Amin, Mahul B. M.D.; Reuter, Victor R. M.D.; Mostofi, Fathollah K. M.D. 1998. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder. *The American Journal of Surgical Pathology*; 22: 12: 1435-1448
- European Association of Urology. 2010. Guía clínica sobre el cáncer de vejiga con invasión muscular y metastásico.
- Fantony J, Abern M, Gopalakrishna A, Qwusu R, Tay K, Lance R, Inman B. 2015. Multi-institutional external validation of urinary TWIST1 and NID2 methylation as a diagnostic test for bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 33; 387. pp 387.e1–387.e6.
- Feil G & Stenzl. 2006. Pruebas de marcadores tumorales en el cáncer de vejiga. *Actas Urol Esp*; 30 (1): pp 38-45
- Fossa SD, Ous S, Berner A. 1991. Clinical significance of the 'palpable mass' in patients with muscle-infiltrating bladder cancer undergoing cystectomy after pre-operative radiotherapy. *Br J Urol* Jan;67(1):54-60.
- Frank *et al.* 2006. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications. *Clin Cancer Res. American Association for Cancer*; 12: 5040-5046.
- Friedrich *et al.* Detection of mutilated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *American Association for Cancer. Clin Cancer Res*; 10:7457-7465.
- Gelabert Mass Antoni. 2007. Cáncer vesical que no infiltra musculo. Marge Media Books. *Monografias de Urologia Oncologica. 1er Edicion*; 160:83-88.
- GLOBOCAN 2012. <http://globocan.iarc.fr>
- Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. 2002. A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol*; 167: 2001-2006.
- Hanahan D & Weinberg R. 2011. *Hallmarks of Cancer: The Next*. Cell 144, Elsevier Inc. DOI 10.1016.
- Henderson S, Chakravarthy A, Xiaoping S, Boshoff C, Fenton T. 2014. APOBEC-Mediated Cytosine Deamination Links PIK3CA Helical Domain Mutations to Human Papillomavirus-Driven Tumor Development. *Cell Press Reports* 7; pp 1–9

- Herr HW. 1999. The natural history of a T1 bladder cancer: life-long tumour diathesis. *BJU Int*; 84: pp 1102-1103.
- Herr HW, Dotan Z, Donat SM, Bajorin DF. 2007. Defining optimal therapy for muscle invasive bladder cancer. *J Urol*; 177: pp437–443.
- Hinostroza F. Juan Alberto. 2001. Manual de semiología urológica. Facultad de Medicina Universidad de la Frontera. Temuco. Chile.
- IMSS, Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica IMSS-325-10; 2010.
- Jackson K, Yu M, Arakawa K, Fiala E, Youn B, Fiegl H, Muller-Holzner E, Widschwendter M, Ehrlich M. 2004. DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biol Ther*; 3: 1225–1231.
- Jian Yu, Tongyu Zhu, Zhirou Wang, et al. 2007. A Novel Set of DNA Methylation Markers in Urine Sediments for Sensitive/Specific Detection of Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*; 13; 24
- Jones *et al.* 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*;3: 415. 28.
- Karakiewicz PI, Shariat SF, Palapattu GS, Gilad AE, Lotan Y, Rogers CG, Vazina A, Gupta A, Bastian PJ, Perrotte P, Sagalowsky AI, Schoenberg M, Lerner SP. 2006. Nomogram for predicting disease recurrence after radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*; 176: 1354-61; 1361-2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16952631>
- Kiemeny et al., 2008. Sequence variantion 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nature Genetics*, vol. 40, no. 11, pp. 1307–1312.
- Kim J, Akbani R, Creighton C, Lermer S, Weinstein J, Getz G, Kwiatkowski D. 2015. Invasive Bladder Cancer: Genomic Insights and Therapeutic Promise. *Clin Cancer Res*; 21(20).
- Kuchiba A, Iwasaki M, Ono H, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Tsugane S y Yoshida T. 2014. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case–control study in Japanese women. *British Journal of Cancer*; 223: 1-7.
- Lander ES, Linton LM, Birren B. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*; 409: 860-921.
- López González L, González Medina AR, Izquierdo F, García Díez F. 2007. Radiología: La esquistosomiasis vesical: una causa poco frecuente de engrosamiento de la pared vesical. *Radiología*;49(6):440-3

- Mac de May Richard. 1996. The art and science of cytopatology, exfoliative cytology. American Society of clinical Pathologists Chicago. Volumen 1; 385-387.
- Martinez. 2010. Papel de la Metilación de los MicroRNAs en la patogénesis y pronóstico de la leucemia aguda linfoblástica. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. Universidad de Córdoba. Tesis Doctoral.
- Mathers MJ, Zumbe J, Wyler S, Roth S, Gerken M, Hofst.dter F, Klotz T. 2008. Is there evidence for a multidisciplinary follow-up after urological cancer? An evaluation of subsequent cancers. *World J Urol*;26(3): pp 251-6.
- Mayorga G, Ibarra O, Sedano B, Trujillo O, Cornejo D, Palmeros R, Uberetagoyna T, Garza S, Osornio S, Camacho C, García S, Muñoz I, Cantellano O, Martínez A, Morales M y Pacheco G. 2014. Aplicación de nomogramas en México para cáncer de vejiga en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. *ELSEVIER Rev Mex Urol*;74(1):3-8.
- McConkey D, Lee S, Woonyoung C, Tran M, Tadeusz Majewski, Sooyong L, Siefker-Radtke A, Dinney C, Czerniak B. 2010. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier Inc; 28:429–440.
- National Cancer Insitute Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), <http://seer.cancer.gov/faststats/selections.php>
- Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study. *J Urol* 2008 Nov;180 (5):2005-9; discussion 2009-10.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for the novo methylation and mammalian development. *Cell*; 99: 247-57
- Pagano F, Bassi P, Galetti TP, et al. 1991. Results of contemporary radical cystectomy for invasive bladder cancer: A clinicopathological study with an emphasis on the inadequacy of the tumor, nodes and metastases classification. *J Urol*; 145:45-50.

- Reinert et al., 2012. Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers. *Clin Cancer Res* 17: 5582–5592.
- Reinert. 2012. MethylationMarkers for Urine-Based Detection of Bladder Cancer: The Next Generation of UrinaryMarkers for Diagnosis and Surveillance of Bladder Cancer. Hindawi Publishing Corporation. *Advances in Urology*. Volume 2012, Article ID 503271, 11 pages.
- Reinert *et al.*, 2012. Diagnosis of Bladder Cancer Recurrence Based on Urinary Levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 Hypermethylation. *Plos One*. Volumen 7.
- Rodríguez M, Téllez N, Cerbón M, López M, Cervantes A. 2004. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev. invest. clín*; 56(1): 56-71. Disponible en:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003483762004000100010&lng=es.
- Ross Michael H. And Pawlina Wojciech. 2008. *Histologia*. 5ª Edición. Editorial Medica Panamericana.
- Sánchez-Vega F, Gotea V, Petrykowska H, Margolin G, Krivak T, DeLoia J, Bell D y Elnitski L. 2014. Recurrent patterns of DNA methylation in the ZNF154, CASP8, and VHL promoters across a wide spectrum of human solid epithelial tumors and cancer cell lines. *Epigenetics* 8:12, 1355–1372.
- Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Chevillet J, Gasser T, Grignon DJ, Hofstadter F, Lopez-Beltran A, Epstein JI. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. 2004. WHO classification of classification of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press, , pp. 29-34.
- Serizawa R, Ralfkiær U, Steven K, Lam G, Schmiedel S, Schu"z J, Hansen A, Horn T y Guldborg P. 2010. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cáncer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int. J. Cancer*; 129, pp 78–87.
- Shariat SF, Karam JA, Lotan Y. 2008. Critical evaluation of urinary markers for bladder cancer detection and monitoring. *Rev Urol*; 10(2): pp 120-135.
- Soares J, Pinto A, Cunha C, Andre S, Barao I, Sousa J, Cravo M. 1999. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer*; 85: pp 112–118.

- Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, et al: Prognostic markers in bladder cancer: A contemporary review of the literature. *J Urol* 1998; 160: 645-659.
- Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA, European Association of Urology. 2012. Treatment of muscle- invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines. *Actas urologicas espanolas* 36:449–460.
- Strathdee G, Holyoake T, Sim A, Parker A, Oscier D, Melo J, Jorgensen H, Soutar R, Brown. Inactivation of HOXA Genes by Hypermethylation in Myeloid and Lymphoid Malignancy is Frequent and Associated with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res*;13(17). pp 5048-5055
- Todenhöfer T, Hennenlotter J, Esser M, Mohrhardt S, Aufderklamm S, Böttge J, Rausch S, Mischinger J, Bier S, Gakis G, Kuehs U, Stenzl, A y Schwentner . 2014. Stepwise Application of Urine Markers to Detect Tumor Recurrence in Patients Undergoing Surveillance for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Hindawi Volumen 2014, Article ID 973406,*
- Van der Poel HG, van Balken MR, Schamhart DH, et al: Bladder wash cytology, quantitative cytology, and the qualitative BTA test in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 1998 Jan; 51(1):44-50.
- Valentini E, Zampieri M, Malavolta M, Bacalini M, Calabrese R, Guastafierro T, Reale A, Franceschi C, Hervonen A, Koller B, Bernhardt J, Slagboom P, Toussaint O, Sikora E, Gonos E, Breusing N, Grune T, Jansen E, Dollé M, Moreno-Villanueva M, Sindlinger T, Bürkle16, Ciccarone A, Caiafa P. 2016 Analysis of the machinery and intermediates of the 5hmC-mediated DNA demethylation pathway in aging on samples from the MARK-AGE Study www.aging-us.com.
- Valladares Y. 1995. La biología molecular y citogenética en el diagnóstico de los cánceres urológicos. *Clínicas Urológicas de la Complutense*. 3, pp 13-72.
- Van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast Th. 2005. Urine Markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol Jun*;47(6):736-48.
- Vriesema JL, Atsma F, Kiemeny LA, et al: Diagnostic efficacy of the ImmunoCyt test to detect superficial bladder cancer recurrence. *Urolog' y* 2001; 58: 367-371.
- Wolf H, et al., Bladder tumors. Treated natural history. *Prog Clin Biol Res* 1986; 221:223–55.
- Zhang S, Zhong G, He W, Yu H, Huang J, Lin T. 2016. LncRNA Up-regulated in Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Facilitates Tumor Growth and Acts as a Negative Prognostic Factor of Recurrence, *The Journal of Urology*®, doi: 10.1016/j.juro.2016.05.107

