



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
TRABAJO DE TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIRUGÍA Y CIENCIAS
MORFOLÓGICAS**

Línea de investigación: pruebas predictivas de respuesta

**CAPACIDAD PREDICTIVA CLÍNICA Y MOLECULAR
DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA
NEOADYUVANTE EN PACIENTES CON TUMOR
VESICAL MÚSCULO INVASIVO**

Memoria para optar al grado de doctor en cirugía

Autor

José Luis Gago Ramos

Bajo la dirección de los doctores

Luis Ibarz Servio
Albert Font Pous

con la dirección y tutoría del doctor

Antoni Gelabert i Mas

Barcelona, junio de 2019

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento a quienes me han ayudado en este proyecto.

Al Dr. Luis Ibarz Servio, director de esta tesis, por su buena voluntad, apoyo y confianza mostrados para llevarla a cabo.

Al Dr. Albert Font Pous, también director, por su paciencia, disponibilidad y diligencia para poder realizar tanto esta tesis como otros proyectos relacionados.

Al Prof. Antoni Gelabert, director y tutor de la tesis, por su buena disposición hacia la misma.

A la Dra. Montserrat Domènech y al Dr. Héctor López del *Hospital de Manresa Fundació Althaia*, por su colaboración y permitir compartir su base de datos.

Al Dr. José Luis Ramírez, al Dr. Vicens Ruiz de Porras y a Tania Lobato, así como a todos los integrantes del laboratorio del *Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol* por su amabilidad, disponibilidad y asesoramiento técnico en todo momento.

Al Dr. Francesc X. Real del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, por proporcionarme la oportunidad de realizar esta tesis dentro del proyecto enfocado hacia una medicina predictiva personalizada y por su inestimable aportación científica.

A *Pangaea Oncology*, especialmente al Dr. Miguel Ángel Molina y a la Dra. Cristina Aguado, por su predisposición para facilitar llevar a cabo los análisis de expresión bajo su tutela.

A la Dra. Malu Calle y a la Dra. Nuria Malats por su conocimiento, audacia y buen hacer estadístico que han permitido el enfoque correcto para llevar a cabo el análisis adecuado.

A *Whole Genix*, especialmente a Beatriz Cadenas y al Dr. Cristian Tornador, por su trabajo de análisis el cual se ha ido modelando y adecuando a los planteamientos requeridos.

A todos mis compañeros y excompañeros del Servicio de Urología (especialmente a los Dres. Joan Areal y Oscar Buisan), del Servicio de Anatomía Patológica (sobre todo a la Dra. Cristina Carrato) y del Servicio de Oncología Médica del *Hospital Germans Trias i Pujol – Institut Català d'Oncologia* que han colaborado de forma directa e indirecta en este proyecto.

A mis padres, Dori Ramos y Valerio Gago, por enseñarme a perseverar de forma inquebrantable e inculcarme su tenacidad.

A mi esposa Sandra Vila y mi hijo Arnau Gago por el tiempo que me ceden cada día tanto para proyectos como el presente, mi profesión y realización personal, sin su amor todo ello no sería posible.

A todos los pacientes que colaboran todos los días ayudando desinteresadamente al progreso científico.

Por último, y no menos importante, a la Asociación Española Contra el Cáncer, ya que sin su soporte y apoyo económico este trabajo no hubiera sido posible financieramente.

A todos, mi sincera gratitud.

Índice

ABREVIATURAS	9
NOTA PRELIMINAR	13
1. RESUMEN	15
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. EPIDEMIOLOGÍA: INCIDENCIA Y MORTALIDAD.....	21
2.2. FACTORES.....	23
2.2.1. Edad.....	23
2.2.2. Género.....	23
2.2.3. Tabaquismo.....	24
2.2.4. Factores ocupacionales y exposición a agentes químicos.....	24
2.2.5. Arsénico y otros contaminantes del agua.....	24
2.2.6. Fármacos.....	24
2.2.7. Irradiación.....	25
2.2.8. Hábitos.....	25
2.2.9. Factores dietéticos.....	25
2.2.10. Condiciones médicas e infecciosas.....	25
2.2.11. Historia familiar y factores genéticos.....	26
2.3. DIAGNÓSTICO.....	26
2.3.1. Síntomas.....	26
2.3.2. Examen físico.....	27
2.3.3. Sedimento de orina.....	27
2.3.4. Imagen.....	27
2.3.5. Citología urinaria y marcadores urinarios.....	27
2.3.6. Cistoscopia.....	28
2.3.7. Resección transuretral de tumores infiltrantes de vejiga.....	28
2.3.8. Segundas resecciones transuretrales.....	28
2.4. ESTADIFICACIÓN POR IMAGEN.....	29
2.4.1. Estadiaje local.....	29
2.4.2. Evaluación de la afectación ganglionar por imagen.....	30
2.4.3. Evaluación de la afectación metastásica.....	30
2.5. ESTADIAJE PATOLÓGICO E HISTOPATOLOGÍA.....	31
2.5.1. Metodología del facultativo de urología para la obtención de muestras.....	31
2.5.2. Metodología del facultativo de anatomía patológica para el procesamiento de muestras.....	31
2.5.3. Clasificación del estadiaje de la afectación tumoral, linfática y metastásica: TNM.....	32
2.5.3.1. Recomendaciones para la evaluación del estadiaje.....	33
2.5.3.2. Histología del cáncer vesical músculo invasivo.....	33
2.6. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL TUMOR VESICAL MÚSCULO INFILTRANTE.....	35
2.6.1. Indicaciones.....	35
2.6.2. Cistectomía radical y linfadenectomía: técnica y extensión.....	35
2.6.3. Cistectomía laparoscópica o robótica.....	37
2.6.4. Morbilidad y mortalidad.....	37
2.6.5. Supervivencia.....	37
2.7. TRATAMIENTO SISTÉMICO DEL TUMOR VESICAL MÚSCULO INFILTRANTE.....	38
2.7.1. Quimioterapia neoadyuvante.....	38
2.7.1.1. Introducción a la quimioterapia neoadyuvante.....	38
2.7.1.2. Quimioterapia neoadyuvante: evidencia de los estudios aleatorizados.....	38
2.7.1.3. Metaanálisis.....	40
2.7.1.4. Ventajas e inconvenientes de la quimioterapia neoadyuvante.....	41
2.7.1.5. Situación actual de la quimioterapia neoadyuvante.....	42
2.7.1.6. Nuevas estrategias: terapias dirigidas e inmunoterapia.....	43
2.7.2. Quimioterapia adyuvante.....	45
2.8. FACTORES PRONÓSTICOS.....	46
2.8.1. Factores pronósticos precistectomía.....	46
2.8.1.1. Sexo.....	46
2.8.1.2. Edad y comorbilidades.....	46
2.8.1.3. Presencia de hidronefrosis preoperatoria.....	47

2.8.1.4. TNM clínico	47
2.8.1.5. Invasión linfovascular.....	47
2.8.1.6. Variantes histológicas uroteliales.....	47
2.8.1.7. Anemia preoperatoria.....	48
2.8.1.8. Cociente entre neutrófilos y linfocitos en sangre periférica	48
2.8.2. Factores pronósticos postoperatorios.....	49
2.8.2.1. Estadio patológico	49
2.8.2.2. Extensión de la linfadenectomía y afectación ganglionar	49
2.8.2.3. Márgenes positivos y volumen tumoral.....	50
2.9. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE VEJIGA	50
2.9.1. Vías genéticas involucradas en la carcinogénesis del tumor vesical.....	50
2.9.1.1. Papel de los genes reguladores del ciclo celular: TP53 y RB	51
2.9.2. Taxonomía biomolecular del tumor vesical	53
2.9.2.1. Introducción.....	53
2.9.2.2. Clasificaciones biomoleculares según el perfil de expresión.....	54
2.9.2.3. Implicación de la taxonomía sobre la estrategia terapéutica	55
2.9.3. Biomarcadores predictores de respuesta a quimioterapia	59
2.9.3.1. Descripción de las vías de reparación del ADN.....	59
2.9.3.2. Deficiencias en las vías de reparación del ADN en diversos tumores.....	60
2.9.3.3. Biomarcadores predictivos de respuesta.....	61
2.9.3.4. Genes de las vías reparadoras del ADN descritos en el tumor vesical músculo infiltrante.....	63
2.9.3.5. Diferencias genómicas entre el tumor vesical músculo infiltrante primario y el secundario..	68
2.9.4. Biomarcadores relacionados con las dianas terapéuticas	69
2.9.5. Biomarcadores relacionados con la inmunoterapia.....	70
3. HIPÓTESIS.....	73
4. OBJETIVOS	77
4.1. OBJETIVO PRINCIPAL	79
4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	79
5. MATERIAL Y MÉTODOS	81
5.1. DISEÑO.....	83
5.2. POBLACIÓN.....	83
5.3. INFORMACIÓN CLÍNICA, PATOLÓGICA Y DE SEGUIMIENTO	83
5.4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EL ESTUDIO	84
5.4.1. Extracción del ARNm mediante <i>Covaris</i> ®.....	84
5.4.1.1. Obtención del material de muestras parafinadas.....	84
5.4.1.2. Preparación de reactivos para la purificación del ARNm.....	85
5.4.1.3. Extracción del ARNm del tejido parafinado	85
5.4.1.4. Tratamiento con <i>ADNasa</i>	85
5.4.1.5. Purificación con columnas	85
5.4.2. Cuantificación del ARNm por fotometría mediante <i>Qbit</i> ®	86
5.4.3. Metodología utilizada para la selección de los biomarcadores	86
5.4.4. Metodología utilizada para la clasificación taxonómica.....	88
5.4.5. Análisis de la expresión del ARNm mediante <i>nCounter</i> ®	89
5.4.5.1. Preparación de las muestras de ARNm	90
5.4.5.2. Hibridación del ARNm	90
5.4.5.3. Purificación e inmovilización.....	91
5.4.5.4. Cuantificación y adquisición digital de datos de expresión de ARNm.....	92
5.5. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	92
6. RESULTADOS	95
6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO, COMPARACIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS GRUPOS..	97
6.2. ANÁLISIS DE LOS PACIENTES SEGÚN SU CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y ASOCIACIÓN DE ÉSTA CON LA EXPRESIÓN DEL ARN	99
6.3. ANÁLISIS DE VARIABLES CLÍNICAS, PATOLÓGICAS Y DE TAXONOMÍA DEL GRUPO DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARN	101
6.4. ANÁLISIS UNIVARIANTE CLÍNICO, PATOLÓGICO Y TAXONÓMICO	103
6.5. NORMALIZACIÓN Y TRANSFORMACIÓN LOGARÍTMICA DE LA EXPRESIÓN DEL ARN.....	103
6.6. ESTRATEGIA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESARROLLADO PARA LA FIRMA PREDICTIVA DE RESPUESTA..	105
6.7. ANÁLISIS UNIVARIANTE GENÉTICO.....	110

6.8.	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA SEGÚN LA RESPUESTA	111
6.8.1.	Supervivencia Libre de Progresión	112
6.8.2.	Supervivencia Global.....	112
6.8.3.	Supervivencia Cáncer Específica.....	113
6.9.	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA PARA LA FIRMA SELECCIONADA.....	113
6.9.1.	Supervivencia Libre de Progresión	114
6.9.2.	Supervivencia Global.....	115
6.9.3.	Supervivencia Cáncer Específica.....	116
7.	DISCUSIÓN	119
8.	CONCLUSIONES.....	137
8.1.	CONCLUSIÓN DEL OBJETIVO PRINCIPAL	139
8.2.	CONCLUSIONES DE LOS OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	139
9.	BIBLIOGRAFÍA	141
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	155
	ÍNDICE DE TABLAS	157
	APÉNDICE	159

Abreviaturas

<i>ABC</i>	<i>Advanced Bladder Cancer Meta-Analysis Collaboration</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AECC	Asociación Española Contra el Cáncer
<i>altNEHJ</i>	<i>alternative Non-Homologous End Joining</i>
<i>AMVAC</i>	<i>Accelerated Methotrexate Vinblastine Adriamycin Cisplatin</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
<i>ASCO</i>	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<i>AUC</i>	<i>Area Under the Curve</i>
<i>BASQ</i>	<i>Basal/Squamous-Like</i>
<i>BER</i>	<i>Base Excision Repair</i>
CaG	Carboplatino Gemcitabina
<i>CART</i>	<i>Classification And Regression Tree</i>
CEIC	Comité de Ética e Investigación Clínica
<i>Cis</i>	<i>Carcinoma in situ</i>
<i>CMV</i>	<i>Cisplatin Methotrexate Vinblastine</i>
<i>cNHEJ</i>	<i>classical Non-Homologous End Joining</i>
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
<i>CoXEN</i>	<i>Co-Expression Extrapolation</i>
CVMI	Cáncer de Vejiga Músculo Invasivo
CVNMI	Cáncer de Vejiga No Músculo Invasivo
<i>DDGC</i>	<i>Dose-Dense Gemcitabine Cisplatin</i>
<i>DDMVAC</i>	<i>Dose-Dense Metotrexate Vinblastin Adriamycin Cisplatin</i>
<i>DDR</i>	<i>Detection Damage Response</i>
<i>DFCI</i>	<i>Dana Farber Cancer Institute</i>
DNA	ADN
<i>DSB</i>	<i>Double Strand Break</i>
<i>EAU</i>	<i>European Association of Urology</i>
EEUU	Estados Unidos
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal Growing Factor Receptor</i>
<i>EORTC</i>	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
<i>EUCAN</i>	<i>European Cancer Observatory</i>

<i>FA</i>	<i>Fanconi Anemia</i>
<i>FCCC</i>	<i>Fox Chase Cancer Center</i>
<i>FDA</i>	<i>Food & Drug Administration</i>
<i>FDG</i>	<i>Fluorodesoxiglucosa</i>
<i>FFPE</i>	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
<i>FGFR</i>	<i>Fibroblast Growing Factor Receptor</i>
<i>GC</i>	<i>Gemcitabina Cisplatino</i>
<i>HR</i>	<i>Homologous Recombination</i>
<i>HR-DDR</i>	<i>Homologous Recombination Detection Damage Response</i>
<i>ICL</i>	<i>Interstrand Cross Links</i>
<i>IHQ</i>	<i>Inmunohistoquímica</i>
<i>ISUP</i>	<i>International Society of Urological Pathology</i>
<i>Lasso</i>	<i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator</i>
<i>MDA</i>	<i>MD Anderson</i>
<i>MMR</i>	<i>Miss Match Repair</i>
<i>MRC</i>	<i>Medical Research Cambridge Center</i>
<i>MSKCC</i>	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
<i>MVAC</i>	<i>Methotrexate Vinblastine Adriamycin Cisplatin</i>
<i>NER</i>	<i>Nucleic Excision Repair</i>
<i>NGS</i>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<i>NHEJ</i>	<i>Non Homologous End Joining</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
<i>PARP</i>	<i>Poli-ADP Ribosa Polimerasa</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PET</i>	<i>Positron Emission Tomography</i>
<i>PET-TC</i>	<i>Positron Emission Tomography - Tomography Computerized</i>
<i>QNA</i>	<i>Quimioterapia Neoadyuvante</i>
<i>RB</i>	<i>Retinoblastoma</i>
<i>RPc</i>	<i>Respuesta Patológica completa</i>
<i>RM</i>	<i>Resonancia Magnética</i>
<i>RNA</i>	<i>ARN</i>
<i>ROC</i>	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
<i>rSSB</i>	<i>repair Single Strand Break</i>
<i>RTU</i>	<i>Resección Transuretral</i>
<i>SCC</i>	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>

SCE	Supervivencia Cáncer Específica
SEER	<i>Surveillance Epidemiology & End Results Database</i>
SG	Supervivencia Global
SLP	Superivencia Libre de Progresión
SOGUG	<i>Spanish Oncology Genitourinary Group</i>
SSA	<i>Single Strand Annealing</i>
SSB	<i>Single Strand Break</i>
SWOG	<i>South West Oncology Group</i>
TC	Tomografía Computerizada
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TK	<i>Tirosin Kinasa</i>
TLS	<i>Translesion Synthesys</i>
TNM	<i>Tumour Nodes Metastasis</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
UNC	Universidad Carolina del Norte
vs	<i>versus</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>

Nota preliminar

Dado el carácter y la finalidad exclusivamente de investigación y académica, así como el carácter eminentemente ilustrativo de algunas de las explicaciones utilizadas en el presente trabajo, el autor se acoge al artículo 32 de la Ley de la Propiedad Intelectual vigente respecto al uso parcial de obras ajenas como imágenes, gráficos u otro material contenidos en la obra, referenciándolo y citándolo correspondientemente.

1. Resumen

1. Resumen.

La QNA basada en cisplatino seguida de cistectomía constituye el tratamiento recomendado para el CVMI con el mayor nivel de evidencia. La QNA basada en cisplatino ha demostrado un beneficio significativo en SG a 5 años. Diversos metaanálisis han demostrado que el beneficio del tratamiento con QNA se limita a un subconjunto de pacientes. Aquellos pacientes que logran una RPc obtienen el mayor beneficio en términos de SG, SCE y SLP.

Actualmente, en la práctica clínica, no se dispone de marcadores predictivos de RPc a QNA basada en platino. Las variables clínicas y patológicas no son capaces de predecir la respuesta de manera adecuada. La clasificación jerárquica según la taxonomía del CVMI y la expresión de genes implicados en las vías de reparación del ADN o en la respuesta inmune se han relacionado con la predicción de respuesta.

En el presente estudio retrospectivo con 112 pacientes diagnosticados de CVMI se ha analizado inicialmente la capacidad predictiva de las variables clínicas y patológicas (AUC=0,52). Al añadir la información que aportaban las variables del análisis de taxonomía y de expresión genética, tanto de genes de reparación de ADN como de respuesta inmune, se observó un aumento de la capacidad predictiva de respuesta (AUC=0,671).

Acorde con lo descrito en la literatura, en nuestro estudio la RPc también se asoció significativamente a mejor SG, SCE y SLP ($p=0,001$ en todos los casos).

La firma predictiva clínica y molecular que incluía la información de las variables correspondientes a hidronefrosis, histología urotelial, taxonomía y expresión genética mediante ARN de RAD51, CXCL9 y PARP se asoció a mayor SG ($p=0,01$) y SCE ($p=0,033$) de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, no alcanzó la asociación estadísticamente significativa en relación con una mayor SLP ($p=0,059$).

El análisis conjunto de variables clínicas, patológicas, taxonómicas y de expresión genética aumenta la capacidad predictiva de respuesta y puede tener implicaciones sobre el pronóstico. Es preciso validar estos resultados en series independientes, así como realizar estudios prospectivos para identificar qué firma predictiva clínica y molecular va a ser capaz de lograr la mayor capacidad predictiva de respuesta a la QNA basada en cisplatino en el CVMI.

2. Introducción

2. Introducción.

2.1. Epidemiología: incidencia y mortalidad.

El cáncer de vejiga constituye el séptimo tumor más frecuente a nivel mundial por lo que respecta a los hombres y el undécimo respecto a ambos sexos. La incidencia es de 9 hombres y 2,2 mujeres por cada 100.000 personas y año (1). La tasa de mortalidad es de 3,2 muertes por cada 100.000 personas y año en los hombres y de 0,9 en las mujeres (2).

En Europa y Norteamérica se concentra la mayor incidencia. Excepcionalmente, en Egipto también se registra una alta incidencia debida a la relación entre la infección crónica por el *Schistosoma haematobium* y el cáncer vesical con histología de células escamosas.

Si ajustamos por edad y sexo, España es el cuarto país europeo con mayor tasa de incidencia: 27,5 casos por cada 100.000 habitantes. Ajustando por sexo, es el tercer país europeo por lo que respecta a los hombres (3) (figura 1).

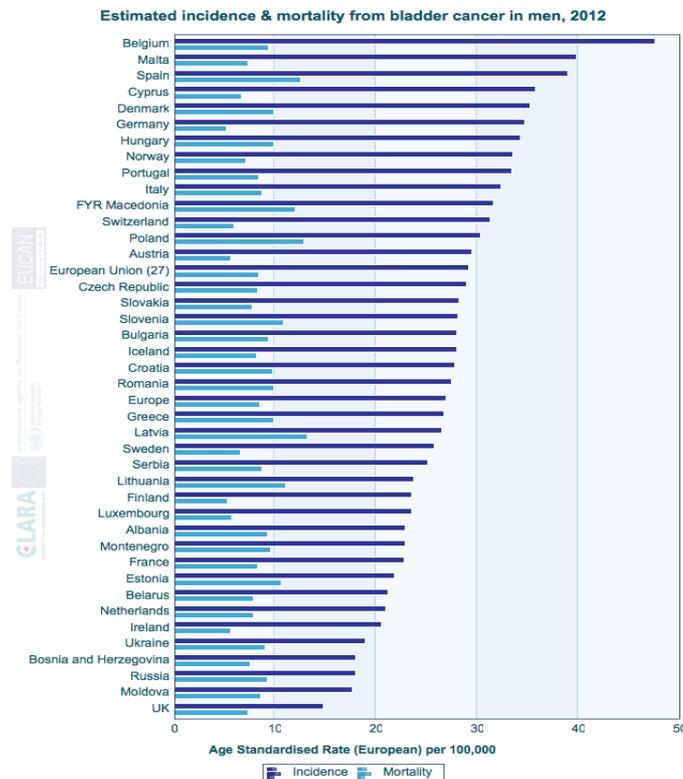


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de vejiga en hombres en Europa (3).

También es el segundo país respecto a mortalidad estimada, con 15,6 muertes por cada 100.000 habitantes. El cáncer de vejiga es el quinto tumor más frecuente en España si se incluyen ambos sexos (figura 2).

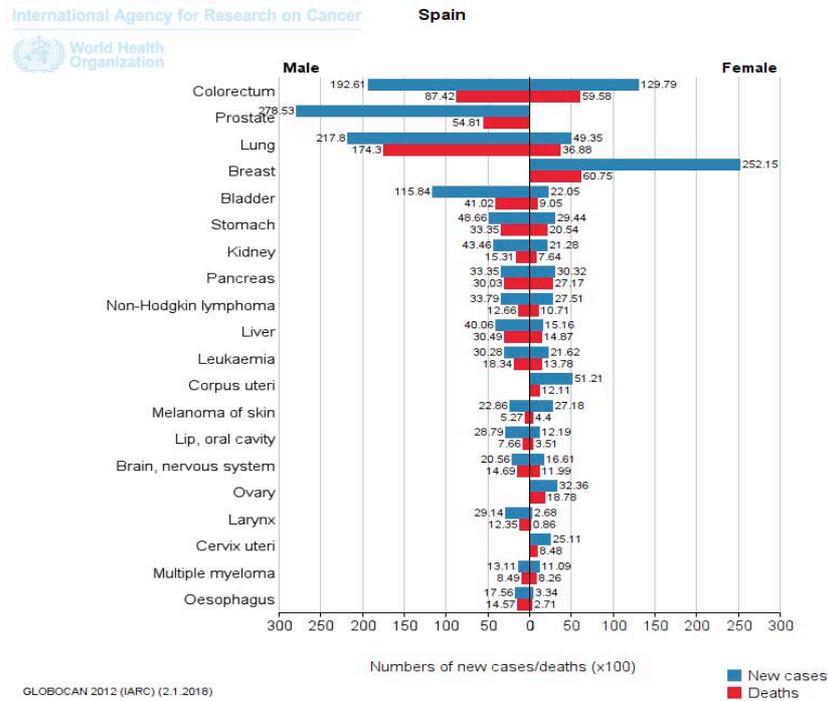


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en España (3).

Respecto a Cataluña, en 2017 se diagnosticaron 2.535 casos nuevos de cáncer de vejiga (2.137 hombres y 398 mujeres) (4). Según datos del 2016, las muertes causadas por cáncer de vejiga se cifraron en 806 (666 hombres y 140 mujeres). La SCE a 5 años se situó en un 27,9% en los hombres y en un 66,9% en las mujeres. Respecto a los hombres, cada año se diagnostican 50,3 casos por cada 100.000 habitantes y mueren 15,5 por cada 100.000. En el caso de las mujeres, las cifras son 9,2 y 3,6 respectivamente. A partir del 1994, la incidencia ha disminuido un 1,0% en hombres y un 1,8% en mujeres, mientras que la mortalidad anual ha disminuido un 1% en hombres y un 1,3% en mujeres (figura 3).

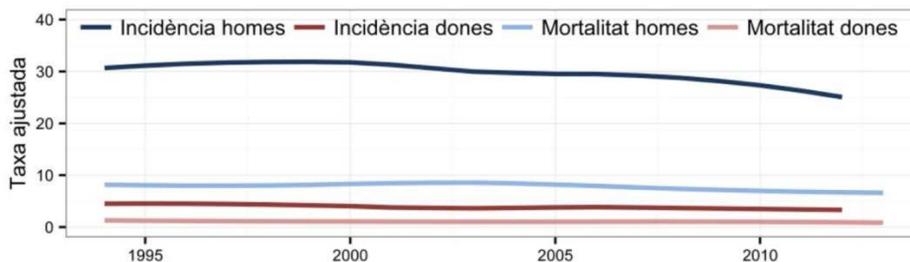


Figura 3. Evolución temporal de la incidencia y mortalidad por cáncer de vejiga de hombres y mujeres en Cataluña entre los años 1994 y 2016 (5).

Si ajustamos las tasas respecto a los hombres, Cataluña se situaría como la segunda población europea en incidencia y la cuarta en mortalidad (figura 4).

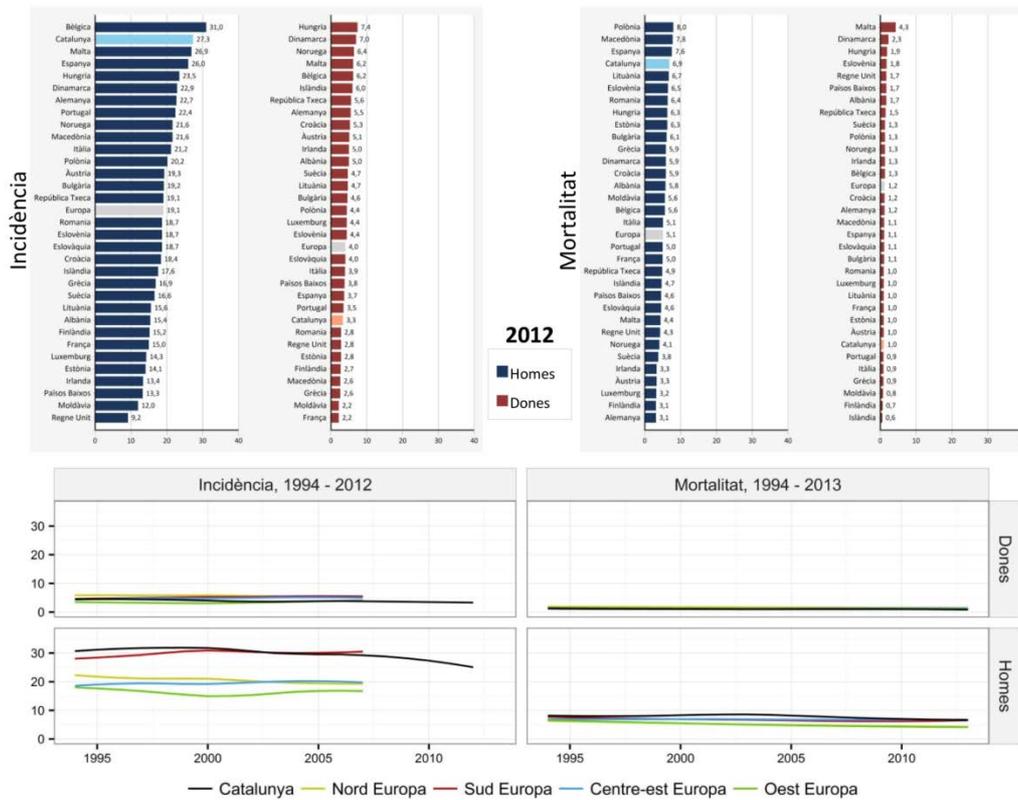


Figura 4. Incidencia y mortalidad del cáncer de vejiga en Cataluña con respecto a Europa. Evolución de la tendencia temporal de la incidencia y mortalidad por cáncer de vejiga en Cataluña y regiones de Europa durante los años 1994 y 2012/13 (5).

2.2. Factores.

La etiopatogenia del cáncer de vejiga es multifactorial. Su relación con factores genéticos y ambientales es cada vez más evidente (6).

2.2.1. Edad.

La edad promedio de diagnóstico del tumor vesical está alrededor de los 67 años. Excepcionalmente se diagnostica antes de los 40 años (6). Presenta un pico de incidencia por encima de los 75 años (7).

2.2.2. Género.

La incidencia del cáncer de vejiga es mayor en los hombres, en parte debida a una mayor adicción histórica al tabaco. Sin embargo, también pueden contribuir en la carcinogénesis

las diferencias a nivel del metabolismo hepático y los efectos de los andrógenos o los estrógenos. Es importante señalar que el cáncer de vejiga suele debutar en mujeres con estadios más avanzados, presentando peores tasas de supervivencia respecto a los hombres (8).

2.2.3. Tabaquismo.

El hábito tabáquico es el factor de riesgo mejor establecido como causa del cáncer de vejiga. Es responsable del 50-65% de los casos masculinos y del 20-35% de los femeninos (9).

Se ha establecido una relación causa-efecto entre la exposición al tabaco y el cáncer de vejiga en varios estudios, donde se pueden descartar razonablemente interferencias con otros factores de confusión, sesgo o aleatoriedad (10).

2.2.4. Factores ocupacionales y exposición a agentes químicos.

Se ha estimado que el contacto con carcinógenos profesionales podría estar relacionado con el 25-27% de los casos. Las sustancias relacionadas con la exposición a agentes químicos corresponden a las aminas y a los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Colorantes, caucho, pintura, barnices, industria del textil y del cuero también se asocian a un mayor riesgo de padecer cáncer de vejiga (11).

2.2.5. Arsénico y otros contaminantes del agua.

La presencia de arsénico en el agua potable se ha asociado a carcinogénesis en vejiga, pulmón y piel. Un metaanálisis demuestra esta relación, especialmente con exposiciones de 50µG/L o superiores, con un aumento de incidencia estadísticamente significativo. La evidencia es menor cuando la exposición es inferior a 10µG/L (12). Varios estudios han encontrado una asociación entre la cloración del agua y mayor riesgo de tumor vesical (13).

2.2.6. Fármacos.

El uso de analgésicos que contengan fenacetina se ha asociado a mayor riesgo. La ciclofosfamida también lo aumenta. Actualmente no existe evidencia que el paracetamol lo aumente. El uso regular de fármacos antiinflamatorios no esteroideos se asocia con una reducción del riesgo de tumor vesical en personas no fumadoras (14). No se ha hallado relación en el caso de la aspirina. La pioglitazona, utilizada en la diabetes mellitus, se ha asociado con un mayor riesgo, pero la metformina, que se ha asociado con un menor riesgo para algunos cánceres, no está relacionada con el tumor vesical (15).

2.2.7. Irradiación.

Se han descrito mayores tasas de tumor vesical secundario tras la radioterapia externa en neoplasias de ovario y de cuello uterino. El riesgo relativo tras radioterapia aumenta entre 2 y 4 veces (16). Referente al cáncer de próstata, un estudio de la *SEER* en EEUU con 243.082 hombres tratados entre 1988 y 2003, halló mayor incidencia de cáncer vesical, respecto a la población general tras recibir irradiación externa, braquiterapia o la combinación de ambas. La incidencia no aumentó si se trataban exclusivamente mediante prostatectomía radical (17).

2.2.8. Hábitos.

Actualmente existe suficiente evidencia como para afirmar que ni alcohol ni café ni té están asociados con el cáncer de vejiga. Respecto al consumo total de agua, no hay evidencia suficiente. El uso personal de tintes para el cabello no aumenta el riesgo de forma apreciable (18). La actividad física puede reducir el riesgo (19).

2.2.9. Factores dietéticos.

La evidencia sugiere que el consumo de frutas y hortalizas tiene un efecto protector sobre el tumor vesical. Las dietas con alto contenido en grasas aumentan el riesgo relativo. Los niveles suficientes de vitamina D en plasma pueden asociarse a menor riesgo (20). Se ha descrito una relación inversa entre el consumo diario de flavonoides y lignanos con el riesgo de sufrir cáncer de vejiga, particularmente en los casos de las variantes histológicas más agresivas (21).

2.2.10. Condiciones médicas e infecciosas.

No se ha encontrado una relación clara entre las infecciones urinarias bacterianas o virales y el cáncer de vejiga. No obstante, en análisis de secuenciación genética de CVMI, se ha hallado expresión de citomegalovirus, papilomavirus y BK poliomavirus en el 4% de los casos (22). Estudios futuros sobre el microbioma pueden proporcionar nuevos datos sobre su relación con la patogenia del cáncer de vejiga.

Mención aparte requiere la esquistosomiasis, la segunda infección parasitaria más frecuente después de la malaria, con 600 millones de personas expuestas en África, Asia, Sudamérica y el Caribe. Supone un riesgo cinco veces superior de sufrir cáncer de vejiga,

especialmente en su variante escamosa. En Egipto, el 60-75% de todos los tumores vesicales corresponden a esta variante histológica (23).

2.2.11. Historia familiar y factores genéticos.

La agrupación familiar del tumor vesical es poco frecuente. Sólo el 3,2% de los nuevos casos ocurridos en España durante el 2011 tenían antecedentes familiares de tumor vesical (24). No obstante, se ha encontrado asociación en pacientes menores de 45 años. La historia de cáncer familiar en primer grado se ha relacionado con un aumento de riesgo de cáncer vesical. A pesar que la presencia de factores ambientales comunes pueden ser causa de confusión, estos resultados apoyan la hipótesis que los factores genéticos desempeñan un papel en la etiología del tumor de la vejiga (25).

Estudios sobre genoma y cáncer de vejiga han identificado varios genes relacionados con mayor riesgo. Sobre todo se tratarían de diferentes polimorfismos genéticos que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo de carcinógenos uroteliales, lo que representa un riesgo adicional además de la exposición a agentes tóxicos (26). Dentro de estos genes destacan GSTM1 y NAT2 (27), supresores como TP63 (28), remodeladores de la cromatina como TERT (29) y relacionados con el factor de crecimiento de los fibroblastos como FGFR3 (28). Las vías genéticas relacionadas con la reparación del ADN y el metabolismo xenobiótico también parecen estar relacionadas. Algunas variaciones en ERCC2, NBN y XPC pueden asociarse a mayor riesgo (30). Pacientes con síndrome de Costello, mutaciones germinales de RAS, síndrome de Lynch, retinoblastoma hereditario y poliposis presentan un mayor riesgo (31).

2.3. Diagnóstico.

En la fase inicial del diagnóstico, aproximadamente el 70% corresponden a CVNMI y el 30% a CVMI. Aproximadamente un tercio de los pacientes diagnosticados como CVMI tienen metástasis no detectadas en el momento del tratamiento del tumor primario, mientras que el 25% de los pacientes sometidos a una cistectomía radical muestran afectación linfática en el momento del tratamiento quirúrgico.

2.3.1. Síntomas.

El síntoma más común es la hematuria, presente en el 85% de los casos. Puede presentarse

sintomatología de llenado y de vaciado, como son la urgencia, la polaquiuria y la disuria. Esta sintomatología ocurre en el 30% de los pacientes, es más frecuente en mujeres y puede asociarse a un *Cis*. En tumores avanzados, se puede presentar dolor pélvico y sintomatología relacionada con la obstrucción del tracto urinario común. También sintomatología en relación con el tramo superior ya sea en forma de dolor cólico del flanco lumbar afecto o dolor lumbar debido al crecimiento tumoral o a la compresión nerviosa, así como la presencia de edema en las extremidades inferiores.

2.3.2. Examen físico.

El examen físico debe incluir el tacto rectal o vaginal según proceda y la palpación pélvica bimanual. La presencia de una masa palpable móvil o fija sugerirá un estadio clínico T3 o T4 respectivamente. La palpación bimanual bajo anestesia se puede realizar tanto antes como después de la RTU (32). Sin embargo, esta información es subjetiva y existen discrepancias entre el tacto bimanual y el estadio patológico tras la cistectomía: 11% de sobre estadaje y 31% de infra estadaje clínico (33).

2.3.3. Sedimento de orina.

La presencia de microhematuria puede ayudar a su detección, pero es inespecífica.

2.3.4. Imagen.

La ecografía del tramo urinario es generalmente una buena herramienta de detección diagnóstica. A pesar de ello, los pacientes que presentan una masa identificada por esta u otra técnica de imagen deberán someterse a una cistoscopia, biopsia y/o resección para un diagnóstico y estadificación adecuados.

2.3.5. Citología urinaria y marcadores urinarios.

El examen de orina procedente tanto de micción reciente como de lavado vesical contiene células exfoliadas y posee una alta sensibilidad para la detección de tumores de alto grado o de *Cis*. La evaluación de la citología urinaria puede verse perjudicada por la presencia de otras células, infecciones o litiasis. Expertos en citología pueden obtener una especificidad superior al 90% (34), aunque debe considerarse que una citología negativa no excluye la presencia de tumor. La citología se debe realizar en una muestra de orina fresca con la fijación apropiada. La orina de la primera micción de la mañana no es valorable debido a la presencia de fenómenos de lisis celular. Cabe recordar que una citología positiva de orina

obtenida por micción puede tener origen en cualquier lugar del tracto urinario, no sólo en la vejiga.

Aún no se conocen marcadores urinarios específicos (35). No obstante, se han investigado diversos biomarcadores para el diagnóstico tanto del CVNMI como del CVMI: NMP22, BCLA-1, mutaciones de ADN, expresión de ARN y metilación de histonas, entre otros (36).

2.3.6. Cistoscopia.

El diagnóstico de cáncer de vejiga se realiza, en última instancia, mediante cistoscopia y evaluación histopatológica del material resecado. Normalmente, la cistoscopia se lleva a cabo en la consulta externa mediante el uso de instrumentos flexibles. Posteriormente se realizará en el quirófano una RTU de la tumoración para el diagnóstico histológico correspondiente. Se necesita una descripción exacta de los hallazgos de la cistoscopia. Es mandatorio documentar la localización, el número y la apariencia tumoral (sólida o papilar), así como la descripción de los hallazgos anormales que se pueden observar en la mucosa. Se recomienda el uso de diagramas vesicales para su representación iconográfica.

2.3.7. Resección transuretral de tumores infiltrantes de vejiga.

El objetivo de la RTU es permitir un diagnóstico y un estadiaje histopatológico adecuados, por lo que se requiere incluir tejido muscular en la muestra. La estrategia de resección depende del tamaño de la lesión. Los tumores pequeños, de menos de 1cm, pueden ser resecados en bloque, donde la muestra contiene todo el tumor con su base, incluido el tejido muscular de la pared vesical. Los tumores de mayor tamaño deben ser resecados en varias fracciones, incluyendo por separado la parte exofítica del tumor, la base tumoral con el músculo correspondiente y los márgenes del área resecada. Como mínimo, la parte más profunda de la muestra resecada se debe enviar al facultativo del servicio de anatomía patológica correctamente identificada para facilitar un diagnóstico correcto. Debe evitarse, en la medida de lo posible, la coagulación durante la resección para evitar la destrucción por cauterio de los tejidos y la presencia de artefactos.

2.3.8. Segundas resecciones transuretrales.

Existe un riesgo significativo de que persista tumor vesical residual tras realizar la primera RTU, persistiendo tumor residual hasta en un 33 a 53% de los casos (37). El riesgo de infra

estadiaje puede representar hasta un 25% de los casos (38). El estadiaje correcto es extremadamente importante dado que afecta directamente sobre el tipo de tratamiento requerido. No hay consenso acerca de la estrategia y el tiempo transcurrido para practicar una segunda RTU. La mayoría de los autores recomiendan una segunda resección entre 2 y 6 semanas después de la inicial. Este procedimiento debe incluir una nueva resección que incluya el lugar donde se hallaba el tumor primario.

2.4. Estadificación por imagen.

La ecografía permite la identificación de masas y de defectos intraluminales vesicales si la vejiga está correctamente replecionada. También permite detectar la presencia de hidronefrosis. No obstante, la ecografía presenta claras limitaciones para establecer el estadiaje tumoral.

En la práctica clínica habitual se utilizan la TC y la RM para el estadiaje. Sus propósitos principales son proporcionar una información cuidadosa y adecuada para planificar la estrategia terapéutica, así como determinar el pronóstico. Se deben registrar en los informes de radiología los siguientes parámetros:

- la extensión local de la invasión tumoral
- la afectación linfática local, regional y a distancia
- la afectación de la vía urinaria superior
- la presencia de metástasis a distancia.

2.4.1. Estadiaje local.

Respecto al estadiaje local, la TC presenta una mayor resolución espacial, un menor tiempo de adquisición de imágenes, una mayor cobertura y una menor susceptibilidad a los cambios debidos a factores individuales. La TC no puede diferenciar entre estadios Ta hasta T3a, pero es útil cuando se detecta la invasión del tejido perivesical (T3b) o de los órganos adyacentes. La precisión de la TC en el momento de determinar la extensión extravesical del tumor varía entre el 55% y el 92% (39). El estudio de Bostrom describió porcentajes de infra estadiaje, respecto al TC y el estadio patológico, entre el 10 y el 39%, así como de sobre estadiaje entre el 6 y el 34% (40). La sensibilidad se situó entre el 93 y el 95% y la especificidad entre el 28 y el 71%. Estas cifras pueden mejorar con la reconstrucción multiplanar de alta resolución disponible en la actualidad.

Por lo que se refiere a la RM, presenta una mejor capacidad de resolución de los tejidos blandos en comparación con la TC, pero una peor resolución espacial. En los estudios disponibles antes de la aparición de la TC multiplanar, se estableció la RM como prueba de imagen más precisa para la evaluación a nivel local. La RM combinada con contraste dinámico puede ayudar a diferenciar el tumor vesical de los tejidos circundantes y los cambios locales después de una RTU, ya que la captura del contraste debido a la neovascularización aparece antes en el tumor que en la pared normal de la vejiga (41). No obstante, las cifras de infra estadiaje respecto al estudio anatomopatológico se estiman entre el 25-26% y de sobre estadiaje entre el 5 y el 26%. Las cifras de sensibilidad se sitúan entre el 80 y el 100% y las de especificidad entre el 76 y el 91% (40).

2.4.2. Evaluación de la afectación ganglionar por imagen.

La apreciación de afectación ganglionar linfática sólo se puede basar en la medida del tamaño ganglionar. En su conjunto, tanto la TC como la RM muestran resultados similares de detección de enfermedad a nivel ganglionar, entre el 70 y el 98% (42). Las adenopatías pélvicas de más de 8 mm y las abdominales de más de 10 mm pueden ser sospechosas e informadas como patológicas (43).

No se dispone de evidencia suficiente para recomendar el uso rutinario de la *PET* o la combinación de la *PET-TC* para el estadiaje ganglionar. No obstante, estos métodos se han evaluado en ensayos prospectivos con resultados diversos (44).

2.4.3. Evaluación de la afectación metastásica.

Antes de plantear cualquier tratamiento curativo es esencial descartar la presencia de metástasis a distancia. La TC y la RM son las dos técnicas diagnósticas de elección para detectar metástasis en el pulmón (45) y en el hígado (46). La presencia de metástasis cerebrales u óseas son menos frecuentes. La gammagrafía ósea sólo se practica si existe una sospecha clínica o una alteración de las fosfatasas alcalinas en sangre periférica. La RM tiene mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de las metástasis óseas que la gammagrafía ósea (47).

La *PET-TC* con FDG puede ser útil para la evaluación de metástasis en el cáncer vesical pero todavía no se puede recomendar su utilización de forma generalizada(48) .

2.5. Estadaje patológico e histopatología.

El tratamiento y el pronóstico del CVMI está determinado tanto por el estadaje tumoral como por su histopatología (49).

2.5.1. Metodología del facultativo de urología para la obtención de muestras.

Cuando se practica la RTU, se deben enviar por separado al servicio de anatomía patológica la parte exofítica y la profunda o base tumoral (figura 5). Si se encuentran otras lesiones o se obtienen muestras aleatorias de la mucosa vesical, se recomienda un etiquetado individual, especificando la parte de la vejiga de dónde procede. Cuando se realiza una cistectomía radical, la fijación se debe realizar lo más rápido posible. Habitualmente el facultativo de anatomía patológica abrirá la pieza desde la uretra hasta la cúpula y fijará la pieza en formol. En la mujer se debe incluir toda la longitud uretral (50).

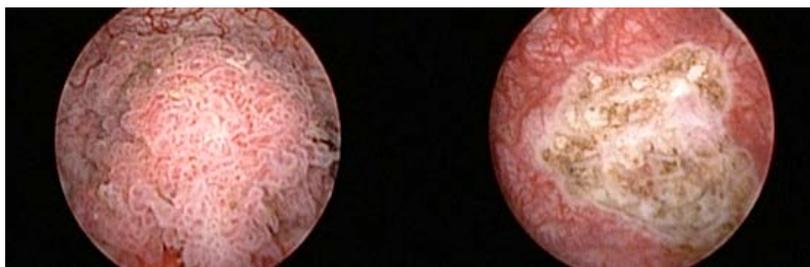


Figura 5. Tumor vesical papilar exofítico y su base. Las muestras de la base deben ser recogidas evitando una coagulación abundante y así prevenir el artefacto que supone el cauterio sobre la muestra.

2.5.2. Metodología del facultativo de anatomía patológica para el procesamiento de muestras.

El procesamiento de las muestras debe seguir las normas generales establecidas por el grupo de consenso entre urólogos y anatomopatólogos (51). Hay que considerar que puede resultar difícil confirmar la presencia de una lesión neoplásica mediante la inspección macroscópica, especialmente después de haber practicado una RTU o tras realizar QNA, por lo que se debe incluir la totalidad de las zonas ulceradas y cicatriciales.

Es obligatorio estudiar la uretra, los uréteres, los márgenes quirúrgicos y la próstata en los hombres (52). En las cistectomías con preservación uretral, el nivel de disección debe incluir la próstata hasta el ápex en los hombres. En las mujeres se debe incluir el cuello vesical, con un mínimo de uretra distal adyacente, además de incluir tanto el útero como la

cúpula vaginal.

Respecto a la técnica de linfadenectomía, los ganglios linfáticos se deben proporcionar en su totalidad y debidamente identificados en diferentes recipientes. En caso de duda entre tejido linfático o adiposo, se debe incluir todo el material extirpado. Los ganglios reseca- dos se deben medir y contar, especificando si hay afectación o interrupción de su cápsula. También se debe indicar el porcentaje de ganglios invadidos, así como la afectación vascular. En caso de diseminación hacia la grasa perivesical, no de invasión directa tumoral, se debe considerar como afectación linfática.

Los márgenes positivos de la grasa perivesical deben ser teñidos. La presencia de márgenes positivos disminuye la SCE (53).

2.5.3. Clasificación del estadiaje de la afectación tumoral, linfática y metastásica: TNM.

La clasificación TNM ha sido ampliamente utilizada en la práctica clínica habitual para la estadificación del cáncer de vejiga, valorando tanto su extensión local y regional como su afectación por diseminación a distancia. La octava edición, publicada en 2016, está vigente en la actualidad y prácticamente no ha sufrido cambios en las últimas décadas (tabla 1)(54).

T - Primary Tumour	
Tx	Primary tumour cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumour
Ta	Non-invasive papillary carcinoma
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : "flat tumour"
T1	Tumour invades subepithelial connective tissue
T2	Tumour invades muscle
T2a	Tumour invades superficial muscle (inner half)
T2b	Tumour invades deep muscle (outer half)
T3	Tumour invades perivesical tissue:
T3a	microscopically
T3b	macroscopically (extravesical mass)
T4	Tumour invades any of the following: prostate stroma, seminal vesicles, uterus, vagina, pelvic wall, abdominal wall
T4a	Tumour invades prostate stroma, seminal vesicles, uterus, or vagina
T4b	Tumour invades pelvic wall or abdominal wall
N - Regional Lymph Nodes	
Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in a single lymph node in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral)
N2	Metastasis in multiple regional lymph nodes in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral)
N3	Metastasis in a common iliac lymph node(s)
M - Distant Metastasis	
M0	No distant metastasis
M1a	Non-regional lymph nodes
M1b	Other distant metastasis

Tabla 1. Clasificación patológica por TNM del cáncer de vejiga (54).

2.5.3.1. Recomendaciones para la evaluación del estadiaje.

Evaluaciones obligatorias:

- subtipo histológico
- profundidad de la invasión
- estado de los márgenes de resección
- presencia y representación de la extensión linfovascular

Clasificaciones opcionales:

- invasión de los vasos de pared vesical
- presencia de *Cis*

Aparte del estadiaje del propio tumor (figura 6), el patrón de afectación en la capa muscular puede proporcionar cierta información pronóstica (55). Tanto la invasión vascular como la linfática tienen implicaciones pronósticas independientes (56). El estadiaje patológico a nivel linfático puede depender del número de ganglios estudiados por el facultativo de anatomía patológica (57). Por esta razón, algunos autores han sugerido que para confirmar un estadiaje patológico linfático pN0 se deben incluir más de 9 ganglios linfáticos como mínimo (58).

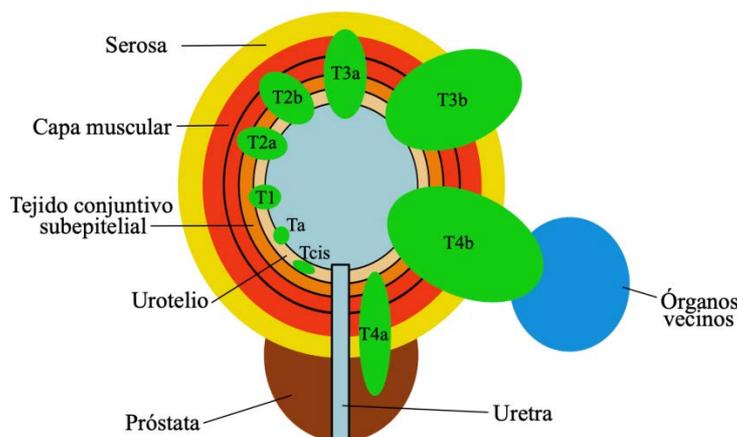


Figura 6. Estadiaje del cáncer de vejiga (59).

2.5.3.2. Histología del cáncer vesical músculo invasivo.

El tipo de tumor vesical más frecuente en los países desarrollados es el carcinoma de células transicionales. Es el responsable del 90% de los casos en Europa. El 10% restante contienen focos de diferenciación glandular o escamosa. El carcinoma de células escamosas representa el 1,4% en hombres y el 3,6% en mujeres respecto todos los cánceres de vejiga. En las áreas endémicas de esquistosomiasis puede constituir hasta el 75% de los casos. El

adenocarcinoma representa el 1,6% en hombres y el 2,3% en mujeres.

Por lo general, no existen casos de carcinoma de bajo grado o neoplasias de bajo potencial maligno en el CVMI. Todos los casos son carcinomas de alto grado. Por esta razón, no se puede establecer ninguna otra información pronóstica a partir del grado de las lesiones (55).

La OMS ha llevado a cabo una nueva clasificación durante el 2016 y, aunque por lo que se refiere al CVMI se continúa recomendando la del 1997 de la *ISUP*, considera que el informe debe reflejar el porcentaje de carcinoma urotelial y de histología divergente o variantes morfológicas presentes.

La incidencia de histología divergente respecto al carcinoma urotelial convencional es del 33%. La divergencia es más común en tumores localmente más avanzados (60) y puede estar relacionada con tumores más agresivos, por lo que se debe reflejar en el informe anatomopatológico definitivo (61).

La especificación sobre variantes uroteliales puede ser útil para establecer el pronóstico y definir diferentes opciones terapéuticas. La clasificación de los carcinomas uroteliales infiltrantes de la OMS (62) incluye los siguientes tipos:

1. anidado (*nested* y *large nested*)
2. microquístico
3. micropapilar
4. linfoepitelial (*limphoepithelioma-like*)
5. plasmocitario o de células en anillo y difusas
6. sarcomatoide
7. celular gigante
8. pobremente diferenciado
9. rico en lípidos
10. celular claro

Además, se pueden registrar otras estirpes diferentes al tumor urotelial como el escamoso, el carcinoma uracal, el de tipo Müllleriano, el neuroendocrino, el melanocítico, el mesenquimal, el hematopoyético, el linfoide así como otras misceláneas.

2.6. Tratamiento quirúrgico del tumor vesical músculo infiltrante.

El CVMI debe considerarse una enfermedad agresiva, con una alta tasa de diseminación sistémica temprana y una influencia directa sobre la SG a 5 años. La cistectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral es el tratamiento quirúrgico de elección. Mediante esta técnica se logra el tratamiento local de la enfermedad y además se obtiene información pronóstica. Sin embargo, este tratamiento de referencia obtiene tan sólo tasas de supervivencia a 5 años del 50% (63). Se utiliza la quimioterapia desde 1980 para intentar mejorar estos resultados (64). Por otra parte, tanto el estado funcional, la edad y la calidad de vida influyen sobre la elección del tratamiento. En ocasiones se plantea la preservación vesical combinando resección endoscópica radical con radio y quimioterapia.

2.6.1. Indicaciones.

La indicación de cistectomía radical se ha realizado tradicionalmente en pacientes con CVMI T2-T4a, N0-NX, M0 (65). Otras indicaciones también incluyen el CVNMI de alto riesgo multirrecidivante que no responde a la terapia intravesical con *BCG*, el tumor papilar extenso y la presencia de *Cis* concomitante. La cistectomía de salvación está indicada en pacientes que no respondan al tratamiento conservador o en los casos meramente paliativos, incluyendo fístulas, dolor no controlable y hematuria recurrente o anemizante.

2.6.2. Cistectomía radical y linfadenectomía: técnica y extensión.

La cistectomía radical en el hombre consiste en la extirpación en bloque de la vejiga urinaria, el fondo del saco peritoneal en contacto con la misma, el tejido adiposo perivesical, los uréteres en su porción más distal, la próstata, las vesículas seminales, el conducto deferente pélvico y los ganglios linfáticos regionales. En las mujeres, además se realiza la resección de la uretra, incluyendo el meato externo, el útero, las trompas de Falopio, los ovarios y la pared vaginal anterior (50).

Sigue existiendo controversia sobre la relevancia clínica respecto al papel de la linfadenectomía: si se trata más de un procedimiento para el estadiaje tumoral o terapéutico en sí mismo. Fundamentalmente existen dos estudios sobre cistectomía radical realizados en autopsias. El primero, encontró que la frecuencia de afectación linfática a nivel regional era del 92%, a nivel retroperitoneal del 72% y abdominal del 35%. Se halló una correlación significativa entre la afectación linfática y la presencia de metástasis a distancia. Cerca del 47% de los casos presentaban afectación tanto linfática regional como

a distancia. Tan sólo el 12% de los casos presentaban afectación linfática local o regional exclusivamente (66). El segundo, analizó el número de ganglios linfáticos obtenidos cuando se realizó una linfadenectomía pélvica extensa. Este estudio encontró diferencias significativas en relación con el recuento ganglionar, hallando un amplio rango que variaba entre 10 y 53 ganglios. Estos resultados demostraron el valor limitado del recuento de ganglios linfáticos como evaluación representativa de la extensión de la linfadenectomía (67).

La linfadenectomía estándar debe incluir todo el tejido linfático craneal a la vejiga, hasta la bifurcación de los vasos ilíacos comunes, utilizando como referencia medial el uréter e incluyendo los ganglios linfáticos internos, los presacros, los obturadores y los ilíacos externos. La linfadenectomía extendida incluye todos los ganglios linfáticos de la región de la bifurcación aórtica y de los vasos ilíacos mediales al cruce con el uréter, así como el área descrita previamente en la linfadenectomía estándar. El límite lateral de la disección es el nervio genitofemoral, el caudal la vena ilíaca circunfleja, el ligamento lagunar y el ganglio linfático de Cloquet. La linfadenectomía súper extendida se prolonga cranealmente hasta el nivel de la arteria mesentérica inferior (figura 7) (68).

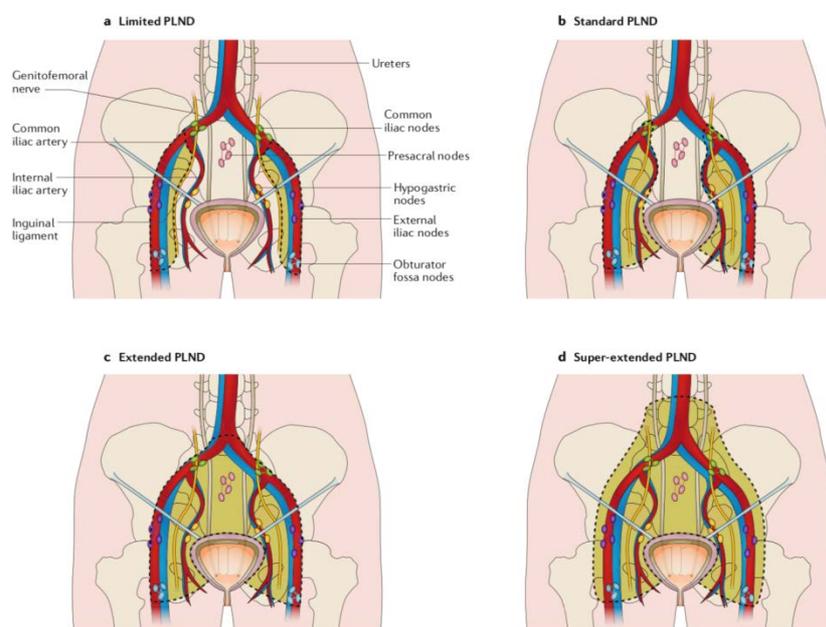


Figura 7. Plantillas limitada (A), estándar (B), extendida (C) y súper extendida (D) (68).

Los ganglios linfáticos regionales incluyen todo el territorio por debajo de la bifurcación de la aorta (57). Existe evidencia que, incluso en casos de CVMI en estadio clínico N0M0, la realización de una linfadenectomía implica un beneficio sobre la supervivencia (69). La realización de una linfadenectomía extendida respecto a una estándar también representa

un beneficio (70). Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre la extendida y la súper extendida (69). La linfadenectomía limitada se asocia tanto a un estadiaje subóptimo como a una peor supervivencia (71).

En resumen, se ha sugerido que tanto la SLP como la SG puedan estar en relación con el número de ganglios linfáticos que se extraen. Aunque no existen estudios aleatorizados controlados en relación al número mínimo de ganglios, la supervivencia aumenta con el número de ganglios extraídos durante el acto quirúrgico (72). Se cree que una extirpación de 10 ganglios linfáticos es suficiente, tanto para una correcta evaluación del estadio como para la obtención de beneficio sobre SG (73).

2.6.3. Cistectomía laparoscópica o robótica.

La cistectomía laparoscópica y la robótica han sido reproducidas tanto en hombres como en mujeres. Se trata de una técnica altamente calificada y con una curva de aprendizaje apreciable. Generalmente, tanto las series de cistectomías laparoscópicas como robóticas contienen sesgos, dada la selección de pacientes más jóvenes, con menores estadio clínico y comorbilidad. Ambas técnicas se han considerado como experimentales dado el número limitado de casos y la falta de monitorización oncológica o funcional a largo plazo (74). No obstante, empiezan a surgir estudios aleatorizados que demuestran que la cistectomía robótica no es inferior a la abierta en lo que se refiere a SLP a 2 años (75). Debe considerarse pues, una opción de tratamiento quirúrgico en centros de referencia y con experiencia (76).

2.6.4. Morbilidad y mortalidad.

La tasa de mortalidad peroperatoria asociada a la cistectomía radical se cifra entre el 1,2 y el 3% durante los primeros 30 días y entre el 2,3 y el 5,7% en los primeros 90 (77). La tasa de complicaciones tempranas se sitúa en el 58% (78). La causa de morbilidad a largo plazo se debe principalmente al tipo de derivación urinaria utilizada (79). La tasa de morbilidad a corto plazo debida a cistectomía radical practicada pacientes con CVNMI de alto riesgo es similar a la registrada en los pacientes con CVMI (80). Se registran menores tasas de morbilidad y mortalidad en aquellos centros con mayor número de casos y con mayor experiencia quirúrgica (81).

2.6.5. Supervivencia.

Los pacientes afectos de CVMI tratados con cistectomía radical y linfadenectomía presentan

SLP y SCE a 5 años del 58% y 66% respectivamente (82). Los nomogramas validados de mortalidad cáncer específica muestran cifras similares, situadas alrededor del 62% (83).

La SLP a 5 años es considerablemente inferior en pacientes tratados con cistectomía que presentan afectación ganglionar linfática, con cifras entre el 34% y el 43% (84). En pacientes tratados exclusivamente con cistectomía, la SLP a 5 años es del 76% en los tumores pT1, del 74% en los pT2, del 53% en los pT3 y del 36% en los pT4 (85). La SCE a 5 años ha ido mejorando con el tratamiento quirúrgico en las últimas décadas, excepto para la enfermedad metastásica (7).

2.7. Tratamiento sistémico del tumor vesical músculo infiltrante.

Como ya se ha comentado previamente, con el tratamiento quirúrgico estándar del CVMI se obtienen cifras de supervivencia a 5 años alrededor del 50% (77). La recurrencia de la enfermedad suele ser más frecuente a distancia (20-50%) que a nivel local o regional (5-15%). La elevada tasa de mortalidad por CVMI, cuando se realiza un tratamiento quirúrgico exclusivamente, justifica el uso de quimioterapia para mejorar los resultados. La quimioterapia se puede administrar en régimen neoadyuvante, es decir, antes de realizar un tratamiento quirúrgico, o de forma adyuvante, posterior al mismo. Actualmente se recomienda el tratamiento sistémico con QNA y posteriormente tratamiento quirúrgico local y regional para los pacientes con CVMI en estadios T2-4N0M0, con el mayor nivel de evidencia por las guías clínicas.

2.7.1. Quimioterapia neoadyuvante.

2.7.1.1. Introducción a la quimioterapia neoadyuvante.

Desde hace más de dos décadas, diferentes estudios han analizado el papel de la QNA y sus resultados. Dentro de los objetivos de la misma se incluyen tanto reducir el tamaño del tumor, facilitando así la extirpación quirúrgica completa, como erradicar la presencia de micrometástasis a distancia para poder mejorar la supervivencia de los pacientes.

2.7.1.2. Quimioterapia neoadyuvante: evidencia de los estudios aleatorizados.

Inicialmente, numerosos estudios aleatorizados fase III analizaron si la QNA mejoraba la

supervivencia, con respuestas y resultados dispares. Las principales diferencias entre estos estudios radicarón tanto en el tipo de quimioterapia utilizada, cisplatino como agente único o en combinación, como en el número de ciclos planificados. Desde el punto de vista estadístico, los estudios variaron en tamaño, heterogeneidad del estadiaje de los pacientes incluidos y tipo de tratamiento empleado, incluyendo tanto la cirugía como la radioterapia. Diversas limitaciones metodológicas disminuyeron la validez externa de estos trabajos. Posteriormente, se realizaron nuevos estudios y metaanálisis que demostraron el beneficio de la quimioterapia preoperatoria, tanto para SLP, SCE como SG.

En el estudio *MRC/EORTC* se incluyeron 976 pacientes con CVMI estadio cT2-T4, N0-NX, M0. Se aleatorizaron a 3 ciclos de QNA con *CMV* vs no quimioterapia y posteriormente se realizó tratamiento local con cistectomía radical o con radioterapia. La tasa de RPc en el brazo de neoadyuvancia fue del 33%, superando en un 12% a la del brazo control. La tasa de supervivencia a 3 años fue del 55,5% en el grupo de QNA en comparación con el 50% en el de tratamiento local (85).

Tras un seguimiento de 8 años, el beneficio obtenido en supervivencia fue del 5%. Los resultados mostraron una reducción significativa del 16% sobre el riesgo de mortalidad que se correspondía con un aumento de la supervivencia a 10 años entre el 30% y el 36% tras la administración del esquema *CMV*. La tasa de mortalidad relacionada con la quimioterapia fue del 1% y de mortalidad operatoria del 3,7%. No se evidenció un aumento de complicaciones postoperatorias tras el uso de quimioterapia.

Los dos estudios aleatorizados *Nordic 1* y *2* incluyeron 620 pacientes con estadio clínico T1 y tumor de alto grado, así como T2-T4Nx. En el estudio *Nordic 1* el esquema de quimioterapia fue cisplatino más doxorrubicina y todos los pacientes recibieron radioterapia previa a la cirugía. En el estudio *Nordic 2* el esquema de quimioterapia fue cisplatino y metotrexato. El análisis combinado de ambos demostró un beneficio significativo en supervivencia a favor de la QNA, con una reducción absoluta del riesgo relativo del 8% tras 5 años de monitorización. El beneficio fue del 11% en el grupo con estadio clínico T3, que equivalía a tratar 9 pacientes para obtener un sólo beneficio (86). Se demostró una mejoría del 20% en supervivencia para los pacientes que recibieron quimioterapia. La tasa de RPc tras QNA duplicó la de los controles, un 22,7% frente a un 12,5%, respectivamente. La SG a 5 años fue del 88,2% en los pacientes con QNA comparado con el 57,1% que sólo recibieron tratamiento local.

El estudio *SWOG 8710* incluyó 317 pacientes con CVMI estadiados como T2-4N0M0 se asignaron aleatoriamente a 3 ciclos de QNA con *MVAC* seguida de cistectomía frente a sólo cistectomía. Se observó una mejoría en SG (77 vs 47 meses) y un incremento del beneficio absoluto de supervivencia a 5 años del 14% (57% vs 43%). Los pacientes que se trataron con quimioterapia y cistectomía no presentaron enfermedad residual con mayor proporción (38%) respecto a los que se trataron únicamente con cistectomía (15%). De los pacientes que recibieron QNA y posteriormente cistectomía, el 29,9% presentaron R_{Pc}, el 44,2% tenían enfermedad residual (estadio <pT2) y el resto presentaron enfermedad a nivel linfático o no fueron intervenidos (87). El beneficio fue especialmente significativo en aquellos pacientes que lograron una R_{Pc} y que mostraron una supervivencia global a 5 años de hasta el 85%, prácticamente el doble respecto a los que no la lograron (figura 8).

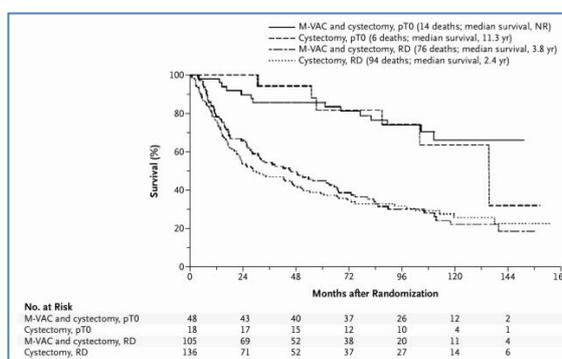


Figura 8. Supervivencia según el grupo de tratamiento y si los pacientes presentaron respuesta patológica completa (pT0) o tenían enfermedad residual (RD) en el momento de la cistectomía (87).

2.7.1.3. Metaanálisis.

Existen varios metaanálisis que demuestran un aumento de la supervivencia en pacientes tratados con QNA.

El del grupo *ABC* (88) incluyó 3.005 pacientes e informó sobre una reducción del riesgo de mortalidad del 9%, con una mejoría de la SG a 5 años del 3%. Tras excluir 3 estudios que utilizaron cisplatino en monoterapia, el incremento fue del 13% en el grupo de combinación con cisplatino, lo que equivalía a una mejora absoluta en supervivencia a 5 años del 5%, independientemente del tratamiento local recibido. La quimioterapia también se asoció a mejores SLP, supervivencia libre de enfermedad loco-regional y libre de metástasis. Posteriormente se realizó una actualización del metaanálisis *ABC* donde se mantuvieron los resultados a favor de la terapia de combinación con cisplatino.

El de Winquisit (89) incluyó 2.605 pacientes. El tratamiento en combinación con cisplatino demostró un beneficio en supervivencia del 6,5%. La respuesta patológica (pT0-1) se logró en el 43% de los casos que recibieron *MVAC* y fue el único factor predictivo independiente de SG en el análisis multivariante.

Por último, el de Yin (90) con 3.285 pacientes, también encontró un beneficio en SG a 5 años del 8%. No encontró diferencias en las tasas de RPc entre los esquemas con *MVAC* y con GC.

En resumen, estos metaanálisis demuestran que la QNA basada en esquemas con cisplatino obtienen un beneficio modesto pero significativo, con un incremento en supervivencia a 5 años entre el 5 y 8%.

2.7.1.4. Ventajas e inconvenientes de la quimioterapia neoadyuvante.

Tal y como se ha comentado en apartados anteriores, la QNA ha demostrado un buen perfil de tolerancia sin incrementar el riesgo de morbimortalidad postoperatoria. Así mismo, sus aspectos favorables más importantes a destacar son:

- una reducción de metástasis a nivel microscópico, ya que la administración temprana de quimioterapia, cuando se espera que la carga de metástasis a nivel microscópico sea menor, presupone una eficacia mayor (86).

- permite una evaluación de la potencial sensibilidad a la quimioterapia *in vivo* así como el estudio de biomarcadores asociados a respuesta (91)

- el estado general de los pacientes suele ser mejor antes de realizar la cirugía y va a suponer mayor tolerancia al tratamiento.

- incremento de la supervivencia, especialmente en pacientes que vayan a responder a la QNA. Se han descrito tasas de RPc entre el 23% y el 38%, con tasas de supervivencia a 5 años del 85% respecto al 45% si persiste enfermedad residual (87).

Entre los inconvenientes principales de la QNA se encuentran:

- la demora de la cistectomía puede comprometer el pronóstico de los pacientes que no sean sensibles a la QNA basada en platino (92). Un retraso de más de 3 meses entre el diagnóstico y la cistectomía radical se asocia a progresión de la enfermedad y peor pronóstico de la misma (93). Resulta muy importante poder identificar aquellos pacientes que no vayan a responder a la QNA para poder evitar el impacto negativo que supone retrasar la cistectomía.

- realizar un tratamiento en exceso con consecuencias negativas, especialmente en

estadios iniciales donde la cistectomía podría ser curativa (94). Deben considerarse las limitaciones de los métodos de estadio actuales, con sobre o infra estadiajes del 70% (40).

- exposición a la toxicidad, siendo la neutropenia la más frecuente (91). Cuando se han comparado los esquemas *MVAC* y *GC*, la toxicidad de este último ha resultado menor, con reducciones de cifras de sepsis por neutropenia del 12% al 1% (95).

- la QNA sólo está indicada si los pacientes son elegibles para el tratamiento con cisplatino. Otras combinaciones o monoterapias han resultado ser inferiores (87). La elegibilidad dependerá del estado basal de los pacientes, incluyendo: el aclaramiento de creatinina (>60 ml/min), el *performance status* (≥ 2) y que no presenten o fallo cardíaco grado ≥ 3 (según la *New York Heart Association*) o neuropatía grado ≥ 2 o pérdida auditiva grado ≥ 2 .

2.7.1.5. Situación actual de la quimioterapia neoadyuvante.

Las guías clínicas de la *EAU* y las de adhesión de la *ASCO* (96) así como el grupo *SOGUG* (97) recomiendan el tratamiento con QNA basada en combinación con cisplatino para el CVMI estadio T2-T4aN0M0 con el máximo nivel de evidencia.

Respecto al régimen de quimioterapia administrado, el esquema *MVAC* fue utilizado inicialmente en el estudio clínico del *SWOG* siguiendo el tratamiento estándar en enfermedad metastásica (87). Posteriormente, aunque no existan estudios aleatorizados que confirmen la eficacia del esquema *GC*, el estudio del *MSKCC* evidenció tasas de RPc en el 28% de los pacientes tratados con este esquema y respuestas con estadio $< pT2$ en el 35% de los casos. En enfermedad metastásica, se demostraron respuestas similares con una menor toxicidad (98), por lo que *GC* se convirtió en el esquema más utilizado en la práctica clínica dada su eficacia y menor toxicidad (99). En los últimos años se siguen desarrollando estrategias que intentan mejorar la eficacia y reducir la toxicidad, como por ejemplo el esquema *DDMVAC* con tasas de RPc del 32% (91).

La utilización de la QNA ha ido en aumento en las últimas décadas. En el estudio de Reardon y cols., se describió un incremento de dicho tratamiento del 10% en 2006 al 21% en 2010 (100). En el estudio de Hermans y cols., el incremento fue del 0,6% en 1995 al 21% en 2013 (101). No obstante, y pese a tener el mayor nivel de evidencia, el porcentaje de pacientes que se tratan con QNA basada en cisplatino resulta todavía insuficiente. Entre las razones que pueden limitar su utilización en la práctica clínica pueden encontrarse:

- presentar un beneficio limitado sobre la supervivencia

- no todos pacientes van a ser elegibles

- posible toxicidad

- no poder identificar a los pacientes que vayan a presentar una RPc principalmente debido a la ausencia de biomarcadores predictivos.

Los factores pronósticos clínicos y patológicos conocidos sólo pueden permitirnos predecir los resultados y el riesgo de recurrencia, pero no son adecuados para predecir la respuesta a la QNA y permitirnos identificar a aquellos pacientes que obtendrán un mayor beneficio (102). Los avances en el campo de la biología molecular pueden ayudarnos a identificar marcadores que permitan identificar a aquellos pacientes que vayan a responder de una forma más individualizada (103).

2.7.1.6. Nuevas estrategias: terapias dirigidas e inmunoterapia.

Dado que existen pacientes candidatos a la quimioterapia con cisplatino que no son elegibles para la misma, se han desarrollado otras estrategias como las terapias dirigidas y la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales.

Dentro de los tratamientos dirigidos hacia dianas terapéuticas, cabrían destacar los inhibidores del factor de crecimiento endotelial, como bevacizumab y sunitinib, utilizados en combinación con GC o *DDMVAC*, pero sin que hayan podido demostrar mejoría en las tasas de respuesta (104) (105). Los dirigidos hacia *EGFR* han demostrado respuesta parcial en 12 de 20 pacientes (106). Otra molécula sería dasatinib, dirigida hacia los receptores BCR-ABL (107). También se han estudiado otras dianas terapéuticas como PI3K-Akt-mTOR, *FGFR* (108) así como el desarrollo de vacunas contra HER2, con resultados discretos en ambos casos (109).

Quizá la inmunoterapia representa una nueva vía de acción más prometedora. Esta opción busca promover la actividad inmunitaria antitumoral, deshabilitando las vías inhibitorias sobre la actividad de los linfocitos T. Los receptores de muerte celular programada PD-1 se expresan en los linfocitos T y tienen un efecto inhibitorio cuando se unen a sus ligandos PD-L1 y PD-L2. Los tumores son capaces de expresar tanto PD-L1 como PD-L2 y escapar así a los mecanismos de vigilancia inmunológica.

Respecto a la inmunoterapia en el tumor urotelial, el objetivo se centra básicamente en la inhibición del punto de control inmunitario dirigido al eje PD-1/PD-L1 mediante moléculas

como atezolizumab, pembrolizumab, nivolumab, durvalumab o avelumab. El anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 atezolizumab ha demostrado respuesta en enfermedad metastásica con un perfil de baja toxicidad (110). Se han descrito tasas de respuesta del 43% en aquellos pacientes que expresan PD-L1 respecto al 11% que no lo expresan (111). El estudio multicéntrico *IMvigor* reclutó a pacientes con tumor de vejiga localmente avanzado o con afectación metastásica que no respondían a cisplatino y halló tasas de respuesta significativas en pacientes que expresaban PD-L1, hecho que promovió que la *FDA* aprobase su utilización como tratamiento de segunda línea (112). Pese a que las tasas de respuesta son relativamente bajas (del 15% al 24%), los respondedores pueden presentar un control duradero de la enfermedad en comparación con otros agentes sistémicos utilizados anteriormente. Posteriormente, también se ensayó en enfermedad localmente avanzada como tratamiento neoadyuvante.

Otro anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 y anti-PD-L2 como pembrolizumab también ha demostrado respuesta completa o parcial durante 10 meses en enfermedad metastásica (113).

A partir de estos resultados en tumor urotelial metastásico, se han desarrollado dos ensayos clínicos con inmunoterapia en régimen neoadyuvante para pacientes con CVMI. El primero, el estudio *PURE-01* con pembrolizumab, incluyó a pacientes con estadio clínico $\leq cT3bN0$ e histología predominante de carcinoma urotelial (114). Los pacientes recibieron tres ciclos de pembrolizumab antes de la cistectomía. El objetivo principal fue evaluar la RPc. Tras el tratamiento neoadyuvante con pembrolizumab, todos los pacientes fueron sometidos a cistectomía radical. El 42% de los pacientes presentaron una RPc y el 54% presentaron respuesta parcial, con un estadio $< pT2$. Este estudio concluyó que pembrolizumab podría ser un tratamiento neoadyuvante válido para el tratamiento del CVMI. El segundo, el ensayo fase II *ABACUS*, se realizó con atezolizumab. Pacientes estadio T2-4N0M0 realizaron 2 ciclos de atezolizumab antes de la cistectomía. Se logró una RPc en más del 29% de los casos (115).

Los esquemas combinados con quimioterapia e inmunoterapia pueden aportar actividad sinérgica contra las células tumorales. La quimioterapia puede tener un efecto modulador sobre la muerte inducida mediante mecanismos inmunitarios o sobre la disrupción de los mecanismos que tiene el tumor para huir a la vigilancia inmunitaria. La quimioterapia puede alterar la arquitectura tumoral, facilitando así la penetración de las células inmunitarias y de los agentes terapéuticos inmunológicos o de las terapias dirigidas (116).

Estrategias sinérgicas pueden ser particularmente beneficiosas en esquemas de neoadyuvancia, pero se precisan descubrir biomarcadores predictivos que permitan identificar aquellos pacientes que logren mayores tasas de respuesta para cada tratamiento.

2.7.2. Quimioterapia adyuvante.

Alrededor del 50% de los pacientes con CVMI desarrollarán enfermedad metastásica tras el tratamiento quirúrgico. La supervivencia a 5 años tras cistectomía se sitúa entre el 25 y el 35% de los pacientes con tumores pT3-T4. El objetivo principal de la quimioterapia adyuvante radica en evitar la recaída de la enfermedad. Sin embargo, el papel de la quimioterapia adyuvante sigue siendo controvertido, ya que se disponen de escasos ensayos aleatorios, que además incluyen pocos pacientes, con un tiempo de seguimiento corto o que pueden presentar defectos metodológicos (97).

Un metaanálisis del año 2005 incluyó seis ensayos con pacientes tratados de forma aleatorizada con quimioterapia basada en cisplatino en el 90% de los casos (117). Se constataron beneficios absolutos del 12% en SLP y del 9% en SG a 3 años. Sin embargo, el número de pacientes fue pequeño (n=491) y los ensayos fueron heterogéneos, por lo que los autores recomendaron la utilización de la adyuvancia sólo dentro de ensayos clínicos.

Más recientemente, tres ensayos aleatorios han comparado el tratamiento con quimioterapia adyuvante vs observación tras cistectomía en pacientes con CVMI. Un estudio italiano incluyó 194 pacientes con CVMI estadio pT2-T4 y evaluó la eficacia del tratamiento con GC, pero no pudo demostrar beneficios en SG ni SLP (118). El segundo ensayo, realizado por el *SOGUG*, evaluó el tratamiento combinado con cisplatino, gemcitabina y paclitaxel (119). Pese a que el estudio se cerró prematuramente debido al bajo reclutamiento, con los 142 pacientes incluidos, ya se demostró un beneficio en supervivencia a 5 años en el grupo tratado con quimioterapia (60% vs 31%, $p < 0,001$). El estudio *EORTC 30994* incluyó 284 pacientes de alto riesgo que fueron aleatorizados a recibir quimioterapia adyuvante inmediata tras cistectomía o recibirla sólo si presentaban una recaída de la enfermedad (120). La SLP fue superior de forma significativa para los pacientes que recibieron tratamiento inmediato, pero no se observaron diferencias en la SG. Este ensayo tampoco pudo demostrar un beneficio en la supervivencia de los pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante.

Por último, una revisión sistemática que incluía nueve ensayos aleatorizados con 945 pacientes, mostró un beneficio significativo en SG para la quimioterapia adyuvante respecto al placebo (121). También constató un beneficio significativo en SLP, que fue más evidente

en pacientes con afectación ganglionar linfática. Aunque estos hallazgos proporcionan evidencia sobre el beneficio de la quimioterapia adyuvante, deben interpretarse con precaución debido a la heterogeneidad y el pequeño tamaño de los ensayos disponibles.

2.7.3. Tratamiento de preservación vesical con quimio y radioterapia.

En pacientes altamente seleccionados y con enfermedad localizada se puede ofrecer un esquema terapéutico en combinación con quimio y radioterapia que permita la conservación de la vejiga como alternativa a la cistectomía. También puede ser una opción en pacientes dónde no se pueda realizar una cistectomía (96).

2.8. Factores pronósticos.

2.8.1. Factores pronósticos precistectomía.

La tasa de SG del CVMI se sitúa alrededor del 45%, con un período libre de recurrencia a 10 años entre el 50 y el 59%, sin que hayan existido cambios en la última década. Deben tenerse en cuenta los factores pronósticos que influirán en una posible recaída de la enfermedad, ya sea a nivel local o a distancia, de cara a realizar un seguimiento adecuado y un tratamiento precoz, en un intento de realizar una medicina personalizada (122).

2.8.1.1. Sexo.

Aunque el tumor vesical es más frecuente en hombres, posiblemente debido a la mayor adicción al tabaco, se han descrito diferencias a nivel hormonal y metabólico en la carcinogénesis del tumor de la vejiga que podrían contribuir a un pronóstico menos favorable en las mujeres. Por otra parte, el tumor vesical se suele diagnosticar en estadios más avanzados en la población femenina, hecho que podría influir sobre la peor tasa de supervivencia respecto a los hombres (8).

2.8.1.2. Edad y comorbilidades.

Tradicionalmente la edad avanzada se ha relacionado con pronóstico desfavorable. En el trabajo de Mitra, mayor edad se asoció a peor pronóstico (124). No obstante, la evaluación de la comorbilidad es un indicador más fiable que no la propia edad cronológica (125).

2.8.1.3. Presencia de hidronefrosis preoperatoria.

La presencia de hidronefrosis en el momento del diagnóstico, se asocia a enfermedad más agresiva y a peor pronóstico (124). También se ha descrito como factor pronóstico independiente asociado a peor SLP. (126).

2.8.1.4. TNM clínico.

La valoración de la afectación histológica tumoral en profundidad de la pieza de RTU se ha asociado a peor pronóstico (124). Aunque un estadio localmente avanzado se asociaría a mal pronóstico, la afectación linfática podría implicar un empeoramiento de éste. En la revisión de Kluth y cols., aproximadamente el 80% de los pacientes con afectación linfática patológica presentaron recurrencia de la enfermedad, en comparación con el 30–50% de los pacientes con enfermedad extravesical y sin afectación linfática patológica. Los pacientes clínicamente sin afectación linfática presentarían un bajo riesgo de presentar afectación linfática patológica (127).

2.8.1.5. Invasión linfovascular.

La invasión linfovascular es un factor pronóstico independiente que se puede identificar en las muestras de RTU y puede tener trascendencia sobre el riesgo de recidiva de la enfermedad (128). También puede ayudar a identificar a los pacientes que obtendrán mayor beneficio del tratamiento con quimioterapia. En pacientes con carcinoma escamoso de vejiga se ha identificado como factor pronóstico (129). Se ha asociado a mayor estadio patológico y grado tumoral, así como a menores SLP, SCE y SG (130).

2.8.1.6. Variantes histológicas uroteliales.

Respecto a las variantes histológicas uroteliales puras u otras diferenciaciones, los resultados son controvertidos. Por un lado, se ha descrito que la probabilidad de presentar una RPc tras QNA basada en cisplatino es hasta 11 veces superior para el tumor urotelial puro que para las variantes histológicas uroteliales divergentes, como la diferenciación escamosa (131). Ello implicaría un mejor pronóstico para las variantes uroteliales puras.

Por otro lado, también se ha descrito que las variantes con diferenciación escamosa o glandular podrían presentar respuestas similares al carcinoma urotelial puro (132), con una pronóstico similar.

2.8.1.7. Anemia preoperatoria.

La presencia de anemia preoperatoria (hemoglobina ≤ 12 mg/dl), se ha asociado a un mayor riesgo de recidiva tras la cistectomía radical. También se ha asociado a menores SLP, SCE y SG (122). La transfusión peroperatoria puede ser un factor predictivo independiente de recidiva (134).

2.8.1.8. Cociente entre neutrófilos y linfocitos en sangre periférica.

El cociente entre neutrófilos y linfocitos puede tener un valor pronóstico y predictivo de respuesta en pacientes tratados con QNA basada en cisplatino. En el trabajo de nuestro centro, de Buisan y cols., un cociente bajo entre neutrófilos y linfocitos en sangre periférica fue predictivo de mayor respuesta patológica al tratamiento con QNA, juntamente con la edad y el estadio clínico en pacientes con tumor urotelial puro. Un cociente inferior, también se asoció a mayores tasas de SLP, SCE y SG (135). Además, en los pacientes con tumor urotelial con diferenciación escamosa, Buisan y cols. también describieron resultados en el mismo sentido, con un incremento de hasta 4 veces en supervivencia cuando el cociente fue menor (136).

En resumen, actualmente no existe ningún marcador demográfico, clínico o patológico que pueda predecir la respuesta a la quimioterapia. Aún así se han intentado desarrollar modelos de estratificación de riesgo incluyendo diferentes variables. En el estudio de Culp y cols. se recogió que tanto la presencia de hidronefrosis, los estadios clínicos T3b y T4a, la existencia de invasión linfovascular como las variantes histológicas divergentes, incluidas la micropapilar o la neuroendocrina, podían identificar aquellos pacientes que presentaban un CVMI de mayor riesgo y de peor pronóstico (123). En dicho estudio, los pacientes con mayor riesgo presentaron una SG a 5 años menor (47,0% vs 64,8%), una menor SCE (64,3% vs 83,5%) y una SLP disminuida (62,0% vs 84,1%) (figura 9).

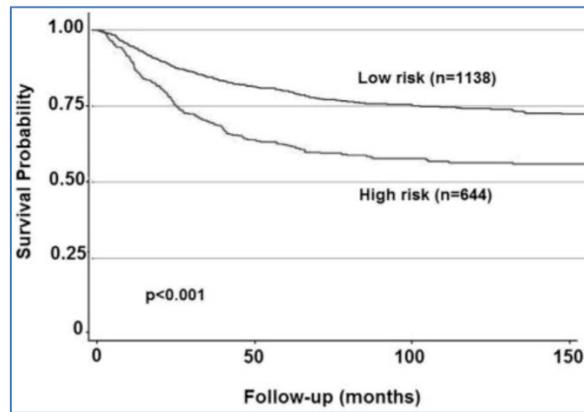


Figura 9. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra la SG de pacientes con CVMI tras cistectomía radical sin QNA basada en alto riesgo clínico vs bajo según los factores pronósticos (123).

2.8.2. Factores pronósticos postoperatorios.

2.8.2.1. Estadio patológico.

Tanto el tratamiento como el pronóstico del CVMI están determinados por el estadio patológico (49). El riesgo de recurrencia del CVMI tras la cistectomía se incrementa cuanto más avanzado sea el estadio patológico. Se han publicado tasas de recidiva de enfermedad entre el 11 y el 21% en estadios confinados a nivel vesical (pT1-pT2), entre el 32 y el 62% cuando existe afectación extravesical (pT3-pT4) y entre el 52 y el 70% en el caso de afectación linfática (pN+). En este último grupo, las recidivas se producirían generalmente de forma precoz, con una probabilidad entre el 80 y el 90% de que ocurran durante los primeros 3 años de seguimiento (137).

Los pacientes que presentan una RPC tras recibir QNA son los que presentarían mejor pronóstico, independientemente del esquema terapéutico que se haya utilizado. La supervivencia a 5 años de los pacientes con RPC se cifra en 85%. Por el contrario, para los que presentan enfermedad residual se sitúa en 45% (87).

2.8.2.2. Extensión de la linfadenectomía y afectación ganglionar.

Se acepta, de forma generalizada, que la linfadenectomía practicada durante la cirugía repercute sobre la recurrencia de la enfermedad y es, por tanto, un factor pronóstico primordial. La realización de una linfadenectomía hasta el cruce del uréter con los vasos ilíacos representa extirpar el 90% del drenaje linfático de la vejiga (138).

La presencia o ausencia de afectación tumoral linfática es un factor importante en los nomogramas que predicen el riesgo de recidiva (139). Se ha investigado sobre la expresión de algunos biomarcadores en los ganglios afectados, como FXYD3 y KRT20, sin lograr resultados definitivos respecto a su relevancia clínica (140).

2.8.2.3. Márgenes positivos y volumen tumoral.

La presencia de márgenes positivos condiciona un mayor riesgo de recidiva. Las tasas de recurrencia a 5 años en ausencia de márgenes positivos se cifran en 40%, mientras que cuando los márgenes están afectos, la cifra aumenta a un 81% (141).

El diámetro del tumor y la necrosis intratumoral se han descrito como factores correlacionados entre sí. Se asocian a una mayor agresividad tumoral y a un peor pronóstico. Un diámetro tumoral mayor de 3 cm se ha considerado como factor predictivo independiente de mortalidad cáncer específica (142).

2.9. Biología molecular del cáncer de vejiga.

2.9.1. Vías genéticas involucradas en la carcinogénesis del tumor vesical.

Aproximadamente el 70% de los tumores vesicales se presentan como tumores superficiales y están confinados a la mucosa (Ta) o no invaden más allá de la submucosa o la lámina propia (T1). Después del tratamiento mediante RTU, administrando inmunoterapia o quimioterapia intravesical si se precisa, se logra un control de la enfermedad a largo plazo en más del 75% de los casos. El 25% restante progresan hacia un CVMI.

Se debe tener en cuenta que el *Cis* está presente en el 30% de los casos de nuevo diagnóstico y se caracteriza por ser multifocal. A menudo suele acompañar a las etapas más avanzadas de la enfermedad. Es importante destacar que, si existe un *Cis* sin un tumor infiltrante asociado, se debe considerar como una enfermedad agresiva que puede evolucionar hacia un CVMI. Clásicamente la presencia de *Cis* se ha asociado a un peor pronóstico. Posteriormente se ha descrito que las vías genéticas involucradas en la carcinogénesis del *Cis* y del tumor vesical superficial son diferentes.

El 25%-30% de los tumores vesicales se presentan directamente como CVMI desde el inicio y su curso clínico suele ser más agresivo. Pese al tratamiento quirúrgico mediante cistectomía radical, se pueden desarrollar metástasis hasta en el 50% de los casos.

Sólo en el 5% de los casos la enfermedad debuta en fase metastásica.

Así pues, los tumores vesicales presentan comportamientos biológicos diferentes que pueden ser el resultado de diversas alteraciones genéticas. Actualmente se conocen dos vías de carcinogénesis para el tumor vesical (143):

- la del CVNMI, con una pérdida de heterocigosidad del cromosoma 9, que puede evolucionar desde hiperplasia urotelial a atipia y hasta tumor papilar de bajo grado. Los tumores papilares de bajo grado tienen tendencia a la recurrencia local y presentan activada la vía del receptor tirosina-quinasa-ras, con mutaciones en los genes HRAS y de FGFR3.

- la del CVMI, presentan alteraciones en los genes de regulación del ciclo celular, como TP53 y RB, que interactúan con la vía de transducción de señal proteína-quinasa activada por el mitógeno Ras (RAS-MAPK) (figura 10).

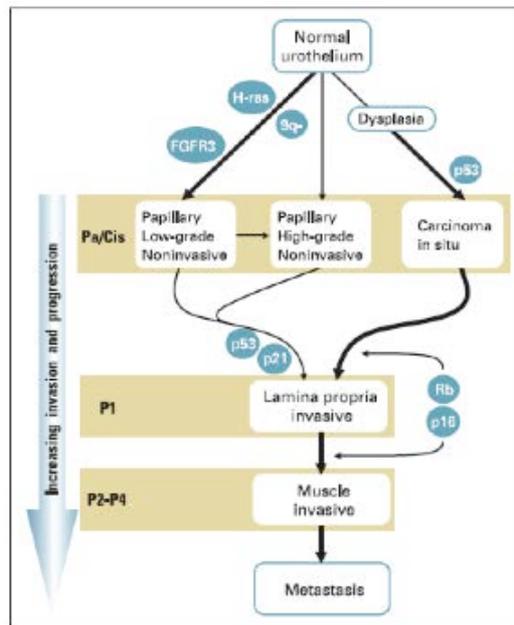


Figura 10. Modelo explicativo de la génesis del tumor vesical y su progresión (143)

2.9.1.1. Papel de los genes reguladores del ciclo celular: TP53 y RB.

Los genes alterados en el cáncer de vejiga son principalmente los que intervienen en las vías de regulación del ciclo celular, de transducción, de adherencia celular y de angiogénesis. Es importante conocer los eventos moleculares clave en las alteraciones genéticas

involucradas en dichas vías.

TP53 es un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 17p13, que codifica para la proteína p53, importante en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis y la reparación del ADN. Las deleciones o mutaciones que se producen en este gen se traducen en la presencia de una proteína más estable y resistente a la degradación, que se acumula en el núcleo y que se ha correlacionado con una mayor recurrencia tumoral y una peor supervivencia. Las proteínas que interactúan con p53, como MDM, pueden inactivarla. Mutaciones de MDM2 se han asociado a CVMI más agresivos que aparecen en edades más tempranas (144).

Las mutaciones en TP53 determinan la sobre expresión de p53. La mayoría de los estudios de expresión se han realizado mediante IHQ hecho que no permite establecer conclusiones definitivas debido a la gran heterogeneidad de los resultados. En un metaanálisis con 112 estudios incluidos, la determinación de la expresión de p53 sólo se realizó mediante análisis molecular en 5 de ellos, el resto fueron por IHQ. La expresión de p53 se asoció a mayores tasas de recurrencia, progresión y mortalidad (145).

El gen del Retinoblastoma RB está situado en el cromosoma 13q14 y se encuentra inactivado por mutación o deleción en más del 50% de los CVMI. Codifica para una proteína pRb que tiene como función bloquear el ciclo celular y facilitar la reparación del ADN, pRb se une al factor de transcripción E2F impidiendo la progresión del ciclo celular. La actividad de pRb depende de los procesos de fosforilación y desfosforilación mediados por los complejos CDK-ciclinas. La fosforilación de pRb libera el factor de transcripción E2F facilitando la progresión en el ciclo celular. Por el contrario, la desfosforilación de pRb facilitará el bloqueo del ciclo celular. Los complejos de ciclinas CDK 4/6 y E-CDK2 son activadores de la fosforilación. Otras proteínas que regulan el ciclo celular inhibiendo los complejos CDK-ciclinas son las proteínas p16INK4A, p21 y p27 (146).

Tanto la inactivación de los genes RB como TP53 son alteraciones genéticas típicas del CVMI. La inactivación de pRb se asocia generalmente a la amplificación del gen E2F, especialmente en tumores con un alto índice proliferativo. El gen TP53 interactúa con otros como el TP21, que es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas, y que previene la fosforilación de pRb, bloqueando así la progresión del ciclo celular. TP21 se ha asociado a mayor índice de recurrencia tumoral y mayor mortalidad (147). Las expresiones de p53, pRb, p21, p16 y ciclina E1s se han asociado a un mayor riesgo de recidiva tumoral (58).

No obstante, no se dispone de la evidencia suficiente para recomendar la utilidad de p53 como marcador pronóstico en el CVMI, ya que no proporciona suficiente información para individualizar un tipo de tratamiento en particular. El análisis de marcadores tumorales puede ser útil para predecir el pronóstico y seleccionar los pacientes de alto riesgo, por lo que se sigue investigando sobre el desarrollo de nuevos marcadores pronósticos (148).

2.9.2. Taxonomía biomolecular del tumor vesical.

2.9.2.1. Introducción.

A nivel molecular, el CVMI es una enfermedad heterogénea que se caracteriza por presentar una gran inestabilidad genómica con una alta tasa de mutaciones y reordenamientos cromosómicos. Se han identificado más de 50 oncogenes y genes supresores tumorales alterados. Por tanto, las vías clásicas implicadas en la carcinogénesis tanto del CVNMI (FGFR3) como del CVMI (p53 y RB) resultan demasiado simplistas y no son exclusivas para cada tipo de tumor.

Se proponen dos circuitos genéticos implicados en el tumor de la vejiga: alteraciones de los genes FGFR3/CCND1, reguladores de las fases iniciales del ciclo celular y de los RB1/E2F3, que a su vez se acompañan de diversas alteraciones genéticas asociadas. De esta forma, se definen subtipos de pacientes que poseen diversos perfiles genéticos con pronósticos diferentes (162). La primera vía de los genes FGFR3/CCND1 también presenta mutaciones en PIK3CA y alteraciones en los cromosomas 9q y 1q. A partir de este punto se establecerían dos subgrupos de tumores. La inactivación de CDKN2A definiría un subgrupo con peor pronóstico. La segunda vía de los genes RB1/E2F3, agregan la inactivación de PTEN y las amplificaciones del cromosoma 5p. Las alteraciones en el TP53 y MDM2 son típicas de CVMI y están presentes en ambos circuitos.

Estudios de secuenciación han demostrado que el tumor vesical es uno de los tumores con alteraciones genéticas más complejas (22). También se han descrito varios genes supresores tumorales y oncogenes, pero resulta complejo determinar cuáles son necesarios para desarrollar una neoplasia (26). Las mutaciones más comunes son TP53, FGFR3 y TERT. Las mutaciones de TERT están presentes en el 79% de los tumores vesicales y, a pesar de no tener valor predictivo clínico, tienen valor diagnóstico dada la elevada

especificidad para carcinoma urotelial (20).

También se registran mutaciones en los genes PIK3CA, RB1 y HRAS. Las vías habitualmente alteradas en el tumor urotelial incluyen PI3K/AKT/diana mamaria rapamicina (150), FGFR3/RAF/RAS, TP53/RB1, las de inmunomodulación (110) y las reguladoras o de remodelación de la cromatina (151). Normalmente, las mutaciones de cada vía se excluyen entre sí. Cada vía suele ser más característica de tumores de bajo o de alto riesgo. La vía del FGFR3 se encuentra alterada en el 80% de los casos de CVNMI de bajo grado y se asocia a un mayor riesgo de recurrencia, aunque no de progresión. Las mutaciones de los genes relacionados con la remodelación de la cromatina y de los modificadores de histonas se han descrito en el 89% de los CVMI (152). Conocer las vías implicadas en el desarrollo de estos tumores permitirá identificar potenciales marcadores pronósticos y predictivos (153).

2.9.2.2. Clasificaciones biomoleculares según el perfil de expresión.

Más allá de la descripción de estas alteraciones, se han propuesto clasificaciones moleculares según los análisis de expresión genética y se han definido diferentes subtipos intrínsecos para el tumor vesical. Varios grupos han definido subtipos moleculares que recuerdan a los del cáncer de mama (154). Las comparaciones directas de los subtipos se han realizado principalmente por cuatro grupos de trabajo y han mostrado grandes similitudes entre sí. Los subtipos moleculares descritos podrían tener implicaciones sobre el pronóstico y la respuesta al tratamiento (figura 11).

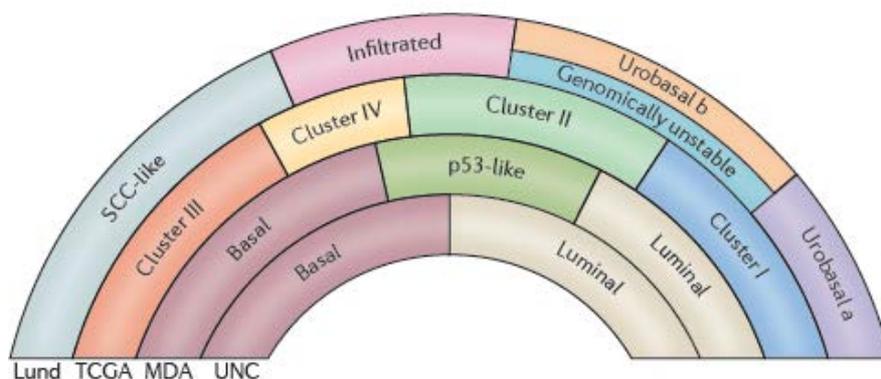


Figura 11. El CVMI es heterogéneo y se pueden definir diferentes subtipos según los perfiles de expresión del ARN. Correspondencias de los diferentes subtipos descritos por los grupos de Lund, TCGA, MDA y UNC (91).

El grupo de Lund describió 5 subgrupos: *Urobasal A*, *Urobasal B*, *SCC-like*, *genómicamente inestable* e *infiltrado* (155). Se observó que los *Urobasal B* y los *SCC-like* (con mayor

expresión de queratinas) presentaban un mayor riesgo de recidiva tumoral, mientras que los *Urobasal A* presentaban un mejor pronóstico y correspondían mayoritariamente a los tumores pTa de grado bajo. Estos resultados demostraron que la estratificación de los tumores vesicales según el perfil molecular podía ser útil para establecer con mayor precisión el pronóstico y definir un tratamiento más adecuado.

El grupo *TCGA* inicialmente definió 4 subtipos según la presencia de mutaciones recurrentes (*clúster I a IV*). Se incluyeron 32 genes, la mayoría de los cuales estaban implicados en la regulación del ciclo celular, en la regulación de la cromatina y en las vías de señalización de la quinasa. Además se identificaron diversas dianas terapéuticas como la vía fosfatidilinositol-3-OH quinasa/AKT/mTOR, ERBB2 en la vía RTK/MAPK y los genes remodeladores de la cromatina (22).

El grupo del *MDA* definió 3 subgrupos. Los basales que expresan CD44, KRT5, KRT6, KRT 14 y CDH. Los luminales que expresan CD24, FOXA1, GATA3, ERBB2, ERBB3, XBP1 y KRT 20. Y los *p53-like* que expresan las características del fenotipo luminal y además la del gen *P53 wild type*.

El grupo de la *UNC* identificó dos subtipos moleculares intrínsecos principales de cáncer vesical de alto grado en base a una firma genética: el luminal y el basal (156). El fenotipo basal presentaba características sarcomatoides y expresaba niveles elevados tanto de EGFR como de sus ligandos. Se asociaba a una mayor tasa de enfermedad metastásica y presentaba una menor SG y SCE. El fenotipo luminal expresaba predominantemente biomarcadores epiteliales (E-cadherina/CDH1 y miR-200) y receptores como FGFR3. También presentaban mutaciones en FGFR3. La presencia de mutaciones en el gen TP53 eran similares en todos los subtipos.

2.9.2.3. Implicación de la taxonomía sobre la estrategia terapéutica.

En la práctica clínica actual, la elección del tipo de tratamiento del CMVI continúa dependiendo únicamente de la estadificación clínica y patológica, que lamentablemente es imprecisa, y puede conllevar un tratamiento inapropiado. Además, el 30-40% de los pacientes que responden a la QNA basada en cisplatino no pueden identificarse prospectivamente. A partir del modelo desarrollado para el cáncer de mama, se han identificado diferentes firmas moleculares en CVMI que pueden permitir la identificación de diferentes subtipos según su heterogeneidad molecular (147).

Las evidencias sobre morfología y genotipado molecular en CVMI pueden servir para realizar una clasificación jerárquica o taxonómica según las descritas por los principales grupos (*Lund, MDA, TCGA* y *UNC*). Estas clasificaciones comparten la descripción de subgrupos de tumores con un fenotipo basal o escamoso (*SCC-like* o *BASQ-like*) que se asocian a peores tasas de supervivencia (157). Los fenotipos basales comparten marcadores moleculares con fenotipos basales descritos en cáncer de mama. Estos fenotipos se caracterizan por la activación de p63, por tener una diferenciación escamosa y por presentar una evolución más agresiva. Los tumores con características luminales expresan PPAR γ y el receptor estrogénico de transcripción. Además, presentan mutaciones del gen FGFR3, confiriendo mayor sensibilidad a la terapia con inhibidores del FGFR.

Mediante IHQ se pueden definir 3 subgrupos principales de CVMI: basales o *BASQ-like* (intensidad de tinción FOXA1 y GATA3 baja y KRT 5/6 y 14 alta), luminales (intensidad FOXA1 y GATA3 alta y KRT 5/6 y 14 baja) y un patrón mixto (intensidad FOXA1, GATA3 y KRT 5/6 alta y KRT 14 baja) (158,159) (figura 12).

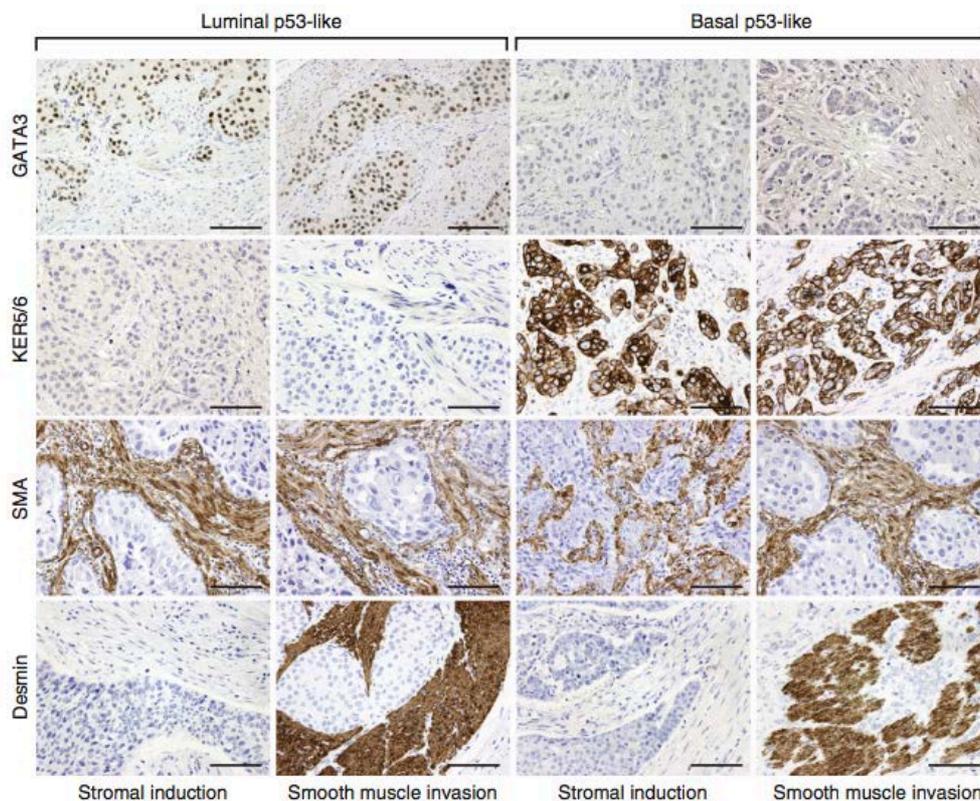


Figura 12. Análisis IHQ básico de los fenotipos basal y luminal según la tinción de GATA3 y KRT 5/6 entre otros. Las barras de escala indican 100 μ m (158).

El CVMI se podría agrupar en diversos subtipos con diferentes sensibilidades a la quimioterapia (158). El fenotipo basal o *BASQ* se asociaría inicialmente tanto a enfermedad más avanzada como a un peor pronóstico. No obstante, el trabajo de McConkey y cols. describió que el fenotipo basal tratado con *DDMVAC* asociado a bevacizumab presentaba un beneficio mayor en supervivencia a 5 años (91%) respecto al fenotipo luminal (73%) y *p53-like* (36%) (104). Además, estos resultados se confirmaron en una serie independiente, con supervivencias a 5 años del 77% para los basales y del 56% para los luminales y *p53-like*.

Las características basales se asocian a una mayor infiltración de células pertenecientes al sistema inmunitario, con mayor expresión de marcadores inmunológicos y con una mayor respuesta a la QNA con cisplatino. Ello podría indicar que una mayor infiltración de células inmunitarias y una mayor respuesta inflamatoria asociadas al fenotipo basal favorecerían una mejor respuesta a la QNA con cisplatino. De esta manera se mejoraría el pronóstico respecto a los otros subtipos tumorales. La identificación de este fenotipo podría permitir seleccionar aquellos pacientes con mayor probabilidad de respuesta y beneficio a la quimioterapia basada en cisplatino.

En el estudio de Choi y cols. también se describió que los tumores *p53-like* se asociaban a peores resultados y mayor resistencia a la quimioterapia con metotrexato, vinblastina, doxorubicina y cisplatino (157). Además, el análisis de las muestras de cistectomía tras QNA con cisplatino pudo evidenciar que los tumores vesicales resistentes a la quimioterapia se encontraban enriquecidos por el subtipo *p53-like* (104). Así pues, se precisa considerar cómo tratar el fenotipo *p53-like* dada su relación con la resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino.

Un análisis más exhaustivo del CVMI, mediante diferentes plataformas como las de *TCGA*, han permitido identificar subclasificaciones más refinadas dentro de los fenotipos basal y luminal, describiendo un subtipo neuronal con peor supervivencia. Las subdivisiones han permitido identificar 5 subtipos que se podrían estratificar según su respuesta a diferentes tratamientos (160). A partir de cada perfil de expresión, incluyendo una firma genética con un perfil de mutaciones y de expresión de ARN, se propondría un esquema de tratamiento específico que lograría tasas de supervivencia a 5 años del 75% (figura 13). Estos hallazgos podrían proporcionar potencialmente la selección de tratamientos dirigidos y específicos según la discriminación de los diferentes subtipos.

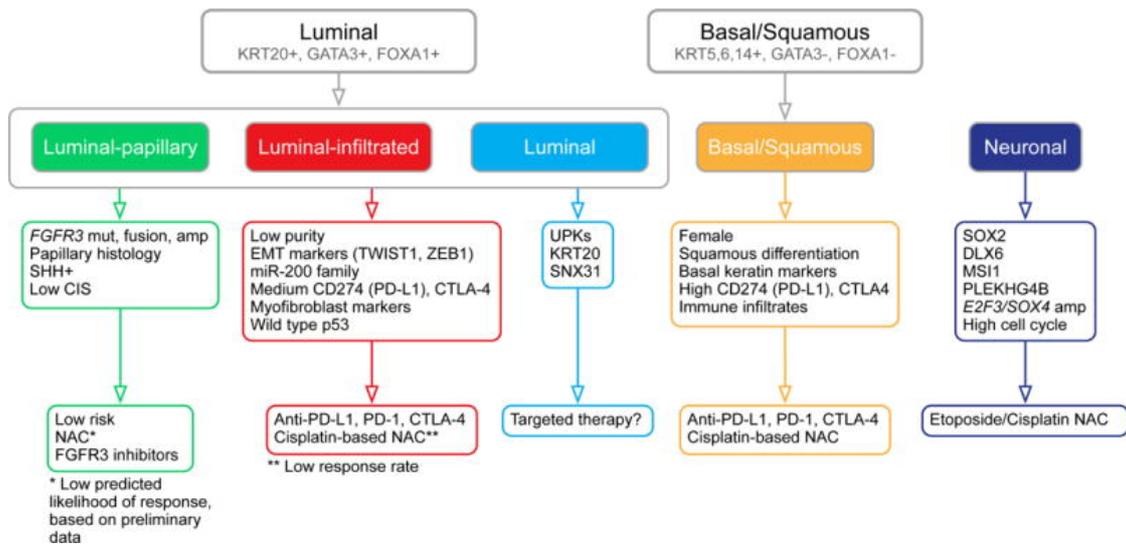


Figura 13. Esquema del enfoque terapéutico estratificado propuesto según el subtipo basado en la expresión para realizar ensayos clínicos prospectivos (160).

A pesar de las crecientes evidencias sobre la implicación clínica y pese a su valor pronóstico, la clasificación taxonómica aún no constituye una herramienta rutinaria dentro de la práctica clínica. Actualmente, se ha alcanzado un consenso internacional sobre la clasificación, con la descripción de seis subtipos: luminal papilar (24%), luminal no especificado (8%), luminal inestable (15%), rico en estroma (15%), basal/escamoso (35%) y neuroendocrino (3%). Esta clasificación de consenso difiere respecto a los mecanismos oncogénicos subyacentes, la infiltración por células inmunes y estromales, así como sobre las características histológicas y clínicas. Las respuestas a la quimioterapia e inmunoterapia podrían variar según cada subtipo específico.

La diversidad de las subclasificaciones publicadas ha dificultado la transferencia de subtipos a la práctica clínica. Reconciliar las clasificaciones moleculares del CVMi en seis esquemas de clasificación, según un transcriptoma público que contiene 1750 tumores, podría ayudar a dicha transferencia. Se encuentra disponible de forma gratuita el mencionado clasificador transcriptómico que permite identificar las muestras individualmente según dicho consenso (<https://github.com/cit-bioinfo/consensusMIBC>) (161).

No obstante, un método de subclasificación más simple basado en IHQ sería una alternativa más rápida y menos costosa que podría tener aplicación en la práctica clínica (162).

2.9.3. Biomarcadores predictores de respuesta a quimioterapia.

La caracterización de biomarcadores fiables que permitan identificar a los pacientes que realmente se beneficiarán de la QNA constituye un reto importante. Esta identificación podría conducir a una medicina de precisión, con la administración de una terapia individualizada para poder optimizar la respuesta y evitar así el impacto negativo del tratamiento neoadyuvante que supone retrasar la cistectomía en pacientes que no vayan a responder.

2.9.3.1. Descripción de las vías de reparación del ADN.

El cisplatino es el fármaco principal de la QNA y actúa formando aductos que causan daño en el ADN, induciendo así la muerte celular o apoptosis. No obstante, las células pueden presentar diversos mecanismos para reparar el daño causado sobre el ADN y poder sobrevivir. Conocer los marcadores implicados en las vías de reparación de daño del ADN puede ayudarnos a conocer los mecanismos alterados y de compensación que presentan las células neoplásicas. Cada vía incluye diferentes genes implicados en reparación, en señalización, en mediación y en codificación de proteínas efectoras (figura 14).

Entre las principales vías implicadas en la reparación de doble cadena del ADN se encuentran (163):

- la recombinación homóloga (*HR*): relativamente lenta y restringida a la fase S tardía/G2, se basa en una cadena de ADN de la cromátida hermana homóloga para su reparación.

- la vía clásica de unión no homóloga (*cNHEJ*): es la ruta de reparación predominante de las roturas de doble cadena del ADN. Implica la unión relativamente rápida de los extremos del ADN rotos.

- la vía alternativa de unión no homóloga (*altNHEJ*): implicada en la unión de los extremos del ADN rotos cuando la vía *cNHEJ* se halla comprometida.

Para las vías de reparación de cadena simple las principales corresponden a:

- la vía de reparación por escisión de nucleótidos (*NER*): elimina las lesiones que distorsionan las hélices del ADN.

- la vía de reparación de ajustes (*MMR*): reconocen y reparan los desajustes de los pares de bases, así como la inserción o delección de bucles.

- la vía de reparación por escisión de bases (*BER*): las glicosilasas del ADN reconocen y eliminan las bases dañadas.

- la vía de la anemia de Fanconi (*FA*): implica la reparación del entrecruzamiento intercatenario mediante enlaces covalentes que unen las cadenas de ADN y evitan su separación durante la transcripción y la replicación.

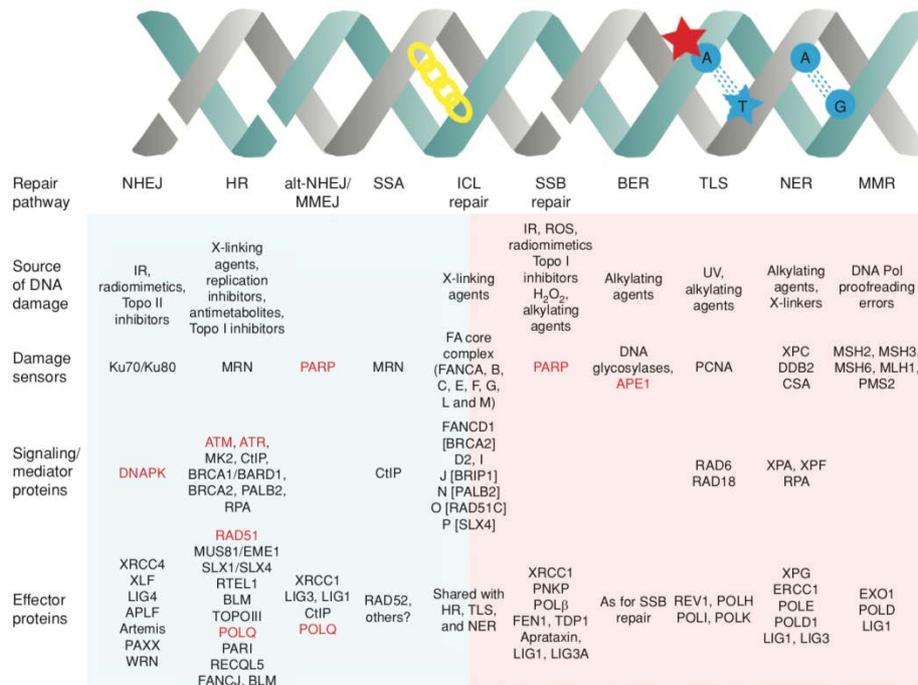


Figura 14. Principales vías de reparación del ADN. Las vías de reparación de DSB están en el área sombreada en azul. Las vías de reparación de rSSB se encuentran en el área sombreada en rojo. Los principales objetivos del desarrollo de fármacos están en rojo (163).

2.9.3.2. Deficiencias en las vías de reparación del ADN en diversos tumores.

La prevalencia de las deficiencias de reparación del ADN mediante recombinación homóloga todavía no está bien caracterizada en los diferentes tipos de tumores. Los análisis exhaustivos sobre estas deficiencias están limitados en parte por la falta de métodos uniformes y rentables. En el estudio de Heeke y cols., se realizó una revisión de perfiles moleculares correspondientes a 52.426 tumores sólidos, donde se pudieron identificar mutaciones en genes implicados en *HR-DDR* como ARID1A, ATM, ATRX, BAP1, BARD1, BLM, BRCA1/2, BRIP1, CHEK1/2, FANCA/C/D2/E/F/G/L, MRE11A, NBN, PALB2, RAD50, RAD51, RAD51B y WRN (164). La frecuencia global de presencia de mutaciones fue del 17,4% en el total de los 21 tumores sólidos diferentes analizados. El tercer tumor con mayor porcentaje de mutaciones fue el de vejiga (23,9%) (figura 15). ARID1A fue el gen mutado más frecuente (7.2%), seguido de BRCA2 (3.0%), BRCA1 (2.8%), ATM (1.3%), ATRX (1.3%) y CHEK2

(1.3%). Dichos hallazgos proporcionan un camino para explorar el papel de nuevas terapias dirigidas según las mutaciones en *HR-DDR*, más allá de la propia quimioterapia clásica con cisplatino.

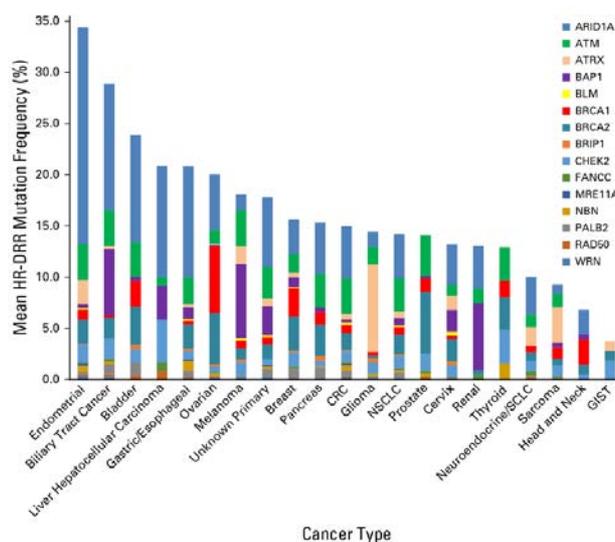


Figura 15. Frecuencia de mutaciones de genes HD-DDR en diferentes tumores sólidos (164).

Las alteraciones germinales en los genes críticos de reparación del ADN pueden causar predisposición al cáncer. Varios tumores presentan mutaciones somáticas que causan reparaciones defectuosas del ADN. La letalidad sintética sucede cuando la combinación de deficiencias de dos o más genes conduce hacia la muerte celular, mientras que la deficiencia en sólo uno de estos genes no lo hace. El concepto de letalidad sintética se puede explotar en tumores malignos, como sucedió en la aprobación de inhibidores PARP para tratar el cáncer de ovario con mutaciones en BRCA 1/2. Los procesos celulares de *DDR* involucran varias proteínas que detectan el daño e inician las vías de señalización para promover la activación del punto de control del ciclo celular y coordinar la reparación del ADN. El desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas dirigidas a objetivos de *DDR* es prometedor. La selección de los pacientes que puedan obtener un beneficio resulta un desafío también para el desarrollo de combinaciones terapéuticas (163).

2.9.3.3. Biomarcadores predictivos de respuesta.

Aunque todavía ningún biomarcador molecular predictivo ha demostrado su utilidad clínica, actualmente se disponen de datos sobre algunos de ellos y sus implicaciones en la respuesta a la QNA. En las últimas 2 décadas los biomarcadores que más se han estudiado en CVMI pertenecen principalmente a los siguientes grupos (tabla 2)(165): regulación del ciclo celular y de la apoptosis: p53 y Bcl-2, *DDR*, relativos al receptor de la tirosina quinasa,

implicados en patrones de expresión genética, relacionados con mecanismos de captación y transporte de fármacos así como el estudio de biomoléculas del microambiente celular.

Biomarcador	Autor	Método	Resultados principales
p53	Plimack 2014 (166)	secuenciación	Ausencia de correlación entre la alteración de p53 y la respuesta a la QNA
	Qureshi 1999 (167)	IHQ	Ausencia de correlación entre la positividad por IHQ de p53 y la respuesta a la QNA
	Watanabe 2004 (168)	secuenciación	El 85,7% de los pacientes que respondieron a QNA tenían mutaciones de p53
	Takehi 1998 (169)	IHQ	La capacidad de respuesta a la QNA se correlacionó con la tinción negativa para p53
	Sarkis 1995 (170)	IHQ	La sobreexpresión de p53 se correlacionó como factor pronóstico de forma independiente de forma significativa
Bcl-2	Duggan 2000 (171)	IHQ	Los pacientes negativos para BCL-2 que recibieron QNA tuvieron mejor pronóstico y supervivencia media: 72 vs 17 meses
BRCA1	Font 2011 (172)	PCR	El 60% de los pacientes con niveles de expresión de BRCA1 bajos/intermedios presentaron respuesta patológica (pT0-pT1) vs el 22% con niveles altos
ERCC1	Choueri 2014 (173)	IHQ	El 43% de los pacientes con ERCC1 positivo y el 60% con ERCC1 negativo lograron una RPC
ERCC2	VanAllen 2014 (174)	WES	ERCC2 fue el único gen mutado de forma significativa en respondedores a cisplatino en comparación con los no respondedores
	Liu 2016 (175)	WES	Se identificaron mutaciones no sinónimas de ERCC2 en el 7% de los que no respondieron y en el 40% que respondieron
ERBB2	Groenendijk 2016 (176)	NGS	Las mutaciones ERCC2 fueron más comunes en pacientes con RPC, pero no alcanzaron significación estadística
			9 de 38 respondedores completos frente a 0 de 33 no respondedores tuvieron mutaciones de ERBB2
ATM, RB y FANCC	Plimack 2015 (177)	secuenciación	Las alteraciones de ATM, RB1 y FANCC se relacionaron con respuesta patológica en la serie de descubrimiento y de validación
MCT1 y CD147	Afonso 2015 (178)	IHQ	El pronóstico fue peor en pacientes con tumores MCT1 o CD147 positivo: SG 42,2 vs 12,4 meses
CTR-1	Kilari 2016 (179)	IHQ	La mayor expresión CTR-1 se correlacionó con la respuesta patológica
Subtipos moleculares	Choi 2014 (157)	WES y expresión de ARNm	La respuesta a la QNA fue del 0% en <i>p53-like</i> , 40% en <i>basal-like</i> y 67% en <i>luminal-like</i>

Tabla 2. Biomarcadores y modelos genéticos predictivos de respuesta a quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de vejiga con invasión muscular (165).

Se han elaborado perfiles de expresión genética de forma conjunta para evaluar la respuesta. En un estudio donde se analizaron biopsias de 18 pacientes con CVMI, los pacientes que lograron un estadio patológico $\leq pT1$ o radiológico $\leq cT1$, tras 2 ciclos de QNA con *MVAC*, se clasificaron como respondedores. Mediante el análisis de catorce genes se logró discriminar el grupo de respondedores (180). En otro estudio, se analizaron los perfiles de expresión genética de 37 pacientes con CVMI y se encontraron 12 genes expresados de manera significativamente diferente entre pacientes respondedores y no respondedores (181).

2.9.3.4. Genes de las vías reparadoras del ADN descritos en el tumor vesical músculo infiltrante.

En los últimos años, dados los discretos resultados sobre el incremento en supervivencia de la QNA basada en cisplatino y el propio mecanismo de acción de ésta, el estudio de los genes implicados en las vías de reparación del ADN ha suscitado un gran interés.

Entre ellos, el gen *BRCA1*, implicado en la vía de la *HR*, ha sido motivo de estudio. En el trabajo de nuestro grupo de Font y cols., los niveles bajos de expresión de *BRCA1* se asociaron a mayor sensibilidad a cisplatino (172). Se analizaron retrospectivamente muestras de RTU de pacientes tratados con QNA (*CMV* o *GC*) mediante PCR. Los pacientes con niveles de expresión de *BRCA1* bajos o intermedios alcanzaron mayor proporción de respuesta patológica ($pT0$ - $T1$) en comparación con los que presentaban niveles altos (66% vs 22%). La supervivencia media fue mayor cuando la expresión de *BRCA1* era baja o intermedia (168 vs 34 meses). En el análisis multivariante, sólo la invasión linfocelular y los niveles de expresión de *BRCA1* surgieron como factores pronósticos independientes de SG.

Otro gen importante es *ERCC2*, que pertenece a la vía *NER*. El estudio retrospectivo de Van Allen y cols. analizó la relación entre las mutaciones de *ERCC2* y la respuesta al tratamiento con QNA basada en cisplatino. Se comparó el perfil genético de los respondedores ($T0/Tis$) frente al de los no respondedores ($\geq pT2$) (174). *ERCC2* fue el único gen mutado enriquecido significativamente en las muestras de los pacientes respondedores. Mientras que las mutaciones de *ERCC2* se producían aproximadamente en el 12% de los casos, el 36% de los que respondieron presentaron mutaciones somáticas de *ERCC2*. Además, todos los tumores con mutaciones de *ERCC2* respondieron a la QNA, lo que sugiere que las mutaciones de

ERCC2 pueden causar la pérdida de su función reparadora normal y conllevar una mayor sensibilidad a los agentes que dañan el ADN como el cisplatino.

El estudio de Liu y cols. valoró la asociación de mutaciones somáticas de ERCC2 y la respuesta patológica a la QNA (175). El 40% de los pacientes que respondieron a cisplatino presentaron mutaciones de ERCC2 frente al 7% de los que no respondieron. Tanto en la serie de descubrimiento como en la de validación, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en SG entre los pacientes con mutaciones de ERCC2 en comparación con aquellos que no las presentaron (figura 16).

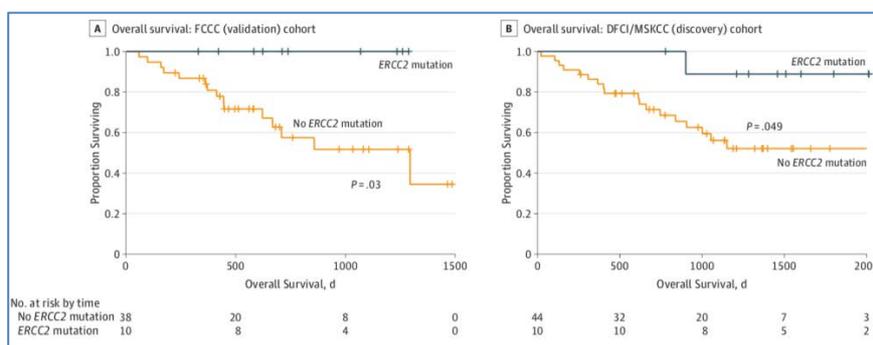


Figura 16. A. SG en presencia o ausencia de mutaciones de ERCC2 en la cohorte de validación (FCCC) B. SG en presencia o ausencia de mutaciones de ERCC2 en la cohorte de descubrimiento (DFCI/MSKCC) (175).

La presencia de mutaciones en genes de reparación de daño del ADN como ERCC2, BRCA2 y ATR también se ha relacionado con mayores tasas de respuesta a QNA basada en cisplatino de forma estadísticamente significativa. (182).

Dentro de la misma vía de reparación *NER*, el estudio de Bellmunt y cols. describió que los niveles bajos de expresión de ARN del gen ERCC1 se asociaban a mayor supervivencia en pacientes con tumor vesical metastásico tratados con cisplatino (25 vs 14 meses) (183).

El trabajo de Plimack y cols., estudió prospectivamente las mutaciones de genes de reparación del ADN y la respuesta a la QNA basada en cisplatino (177). En la serie de descubrimiento, el 87% de los pacientes con una o más mutaciones en genes de reparación como ATM, RB i FANCC se asociaron a mayor respuesta, mientras que ninguno de los no respondedores presentó alteraciones en los mismos ($p < 0,001$). En la serie de validación, la presencia de una o más alteraciones de estos tres genes también se asoció a respuesta patológica en el 64% de los casos, mientras que el 15% de los no respondedores presentaron alguna alteración. La presencia de mutaciones también se asoció a mayor SG

de forma estadísticamente significativa en ambas series (figura 17). De esta manera los autores concluyeron que la presencia de mutaciones en ATM, RB i FANCC podían predecir tanto respuesta a QNA basada en cisplatino como mejor SG.

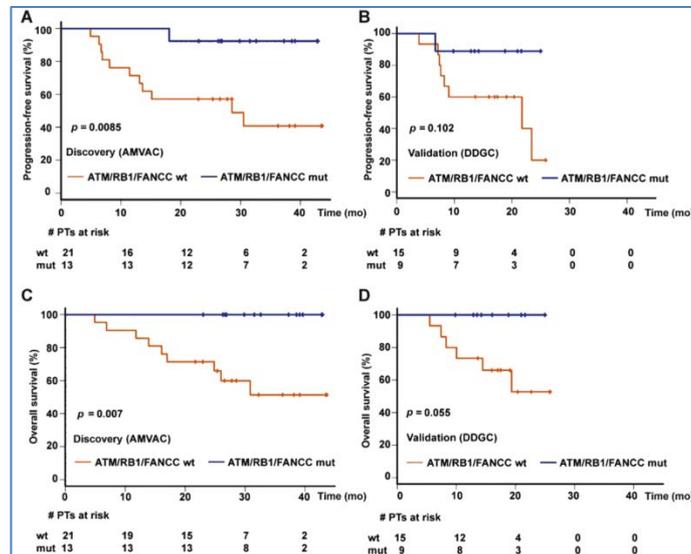


Figura 17. SLP y SG para ATM/RB1/FANCC según mutación para la serie descubrimiento del AMVAC (A y C) y validación del DDGC (B y D). La alteración en cualquiera de los 3 genes predijo mejor SLP y SG. wt = tipo salvaje; mut = mutación; PTs = pacientes (177).

El trabajo de Pitroda y cols., estudió la asociación de las expresiones de genes implicados en las vías *HR* y *NHEJ* con la respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en líneas celulares de cáncer de pulmón de célula no pequeña y de mama. Los autores analizaron la capacidad de reparación basada en niveles de expresión de cuatro genes: Rif1, PARI, RAD51 y Ku80 (184). La expresión elevada de estos genes se asociaría a una baja capacidad de reparación, con la presencia de deficiencias en la vía de la *HR* y mayor acumulación de alteraciones del ADN. Los tumores con baja capacidad de reparación se asociarían a un peor pronóstico clínico y menor supervivencia. El tratamiento con QNA basada en cisplatino podría mejora el pronóstico. Se estudiaron pacientes con tumor de pulmón y baja capacidad de reparación que recibieron tratamiento combinado con cisplatino y cirugía o sólo con cirugía. La SG a 5 años aumentó del 15%, en los pacientes que sólo recibieron tratamiento quirúrgico, al 77% cuando el tratamiento fue combinado. Los autores concluyeron que la capacidad de reparación del ADN, según las expresiones de los genes Rif1, PARI, RAD51 y Ku80, podría ayudar a seleccionar el tipo de tratamiento más eficaz (figura 18).

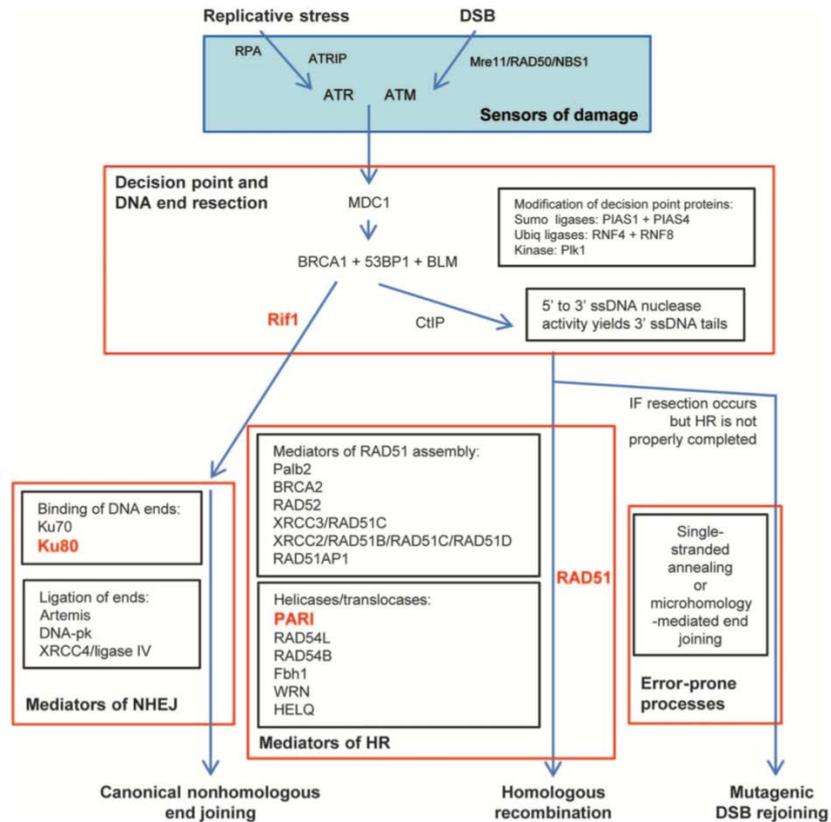


Figura 18. Vías y genes implicados en la reparación de ADN y tolerancia al estrés replicativo. Los cuatro genes en rojo fueron los que finalmente se escogieron (184).

El estudio de Teo y cols., analizó la presencia de mutaciones en diferentes genes implicados en vías de reparación del ADN (185). El trabajo se realizó tanto en pacientes con tumor urotelial localmente avanzado como metastásico que fueron tratados con quimioterapia basada en platino. Se analizó la presencia de mutaciones según un panel de 34 genes relacionados con reparación del ADN (tabla 3).

MMR (9%)	NER (15%)	HR (11%)	FA (16%)	Checkpoint (23%)	Otros
MLH1	ERCC2	BRCA1	BRCA2	ATM	POLE (6%)
MSH2	ERCC3	MRE11A	BRIP1	ATR	MUTYH
MSH6	ERCC4	NBN	FANCA	CHECK1	PARP1
PMS1	ERCC5	RAD50/51	FANCC	CHECK2	RECQL4
PMS2		RAD51B	PALB2	MDC1	
		RAD51D	RAD51C		
		RAC52-54L			

Tabla 3. Genes implicados en diferentes vías de respuesta y reparación de daño del ADN y porcentaje de afectación de cada vía en los pacientes con alteraciones (185).

Se estudiaron 100 pacientes de los cuales 47 presentaban como mínimo una alteración en genes de reparación del ADN. Los pacientes con alteraciones en estos genes presentaron una mejor SLP (9 vs 6 meses) y SG (24 vs 13 meses) de forma estadísticamente significativa. Las alteraciones en genes de reparación también se asociaron a mayor número de mutaciones y presencia de alteraciones en números de copias. También se observó una correlación positiva entre la alteración de estos genes y la presencia de afectación de enfermedad a nivel ganglionar, así como una correlación inversa con las metástasis viscerales. El análisis por separado de la presencia de alteraciones de las diferentes vías *NER*, *MMR*, *HR*, *AF*, punto de control de respuesta al *DDR* (*checkpoint*) y el gen *POLE* también se relacionó, de forma estadísticamente significativa en algunas de ellas, tanto con SLP como con SG (figura 19). Los autores concluyeron que la presencia de alteraciones en los genes de reparación se asoció a mejores resultados clínicos en pacientes con carcinoma urotelial avanzado tratados con platino.

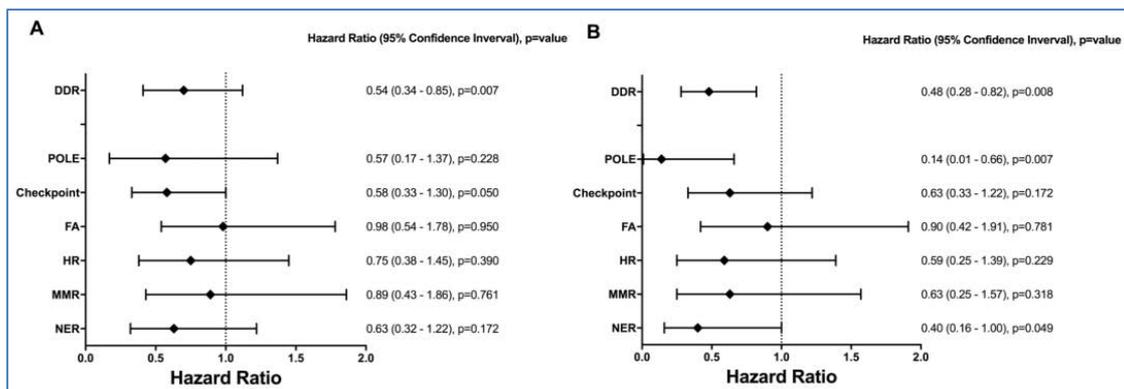


Figura 19. Asociación de las alteraciones en vías *DDR* de forma individual tanto a SLP (A) como a SG (B) (185).

En la línea de la medicina traslacional y el avance hacia una medicina de precisión, se siguen desarrollando ensayos clínicos con biomarcadores. Se está llevando a cabo un ensayo clínico con QNA para comparar la eficacia clínica de los dos regímenes de primera línea (GC vs *MVAC*) y la capacidad predictiva de R_{Pc} de un algoritmo basado en perfiles de expresión genética (*CoXEN*). Este algoritmo trata de identificar genes relacionados con la sensibilidad a la quimioterapia según comparaciones realizadas entre líneas celulares tumorales y células pertenecientes a pacientes con CVMI. Posteriormente, se utilizan los genes concordantes para definir los biomarcadores de expresión genética que pueden ser predictivos de respuesta a la QNA. Actualmente el ensayo *SWOG S1314* (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02177695>) está evaluando prospectivamente la hipótesis de que *CoXEN* pueda predecir la eficacia de la QNA según los esquemas *MVAC* o GC en pacientes con CVMI (186).

Por el momento, diferentes estudios han evaluado tanto la presencia de mutaciones como la expresión de genes implicados en reparación del ADN respecto a la predicción de respuesta a la QNA con cisplatino y al pronóstico. Puesto que el cisplatino es el eje principal del tratamiento quimioterápico de varios tumores, incluyendo el del CVMI, la realización de nuevos trabajos que analicen los genes de reparación del ADN y que sean capaces de predecir la respuesta al tratamiento pueden ser de máximo interés para poder seleccionar la terapia más adecuada.

2.9.3.5. Diferencias genómicas entre el tumor vesical músculo infiltrante primario y el secundario.

Recientemente, se ha estudiado si existen diferencias clínicas y genómicas entre los pacientes con CVMI de debut primario y los que son secundarios a la progresión del CVMI (187). El estudio de Pietzak y cols. comparó los resultados clínicos y patológicos entre 245 pacientes con CVMI primario y 43 con CVMI secundario. Todos fueron estadiados como T2-4aN0M0 y tratados con QNA basada en cisplatino. Se analizaron las diferencias genómicas respecto a una cohorte retrospectiva de 385 muestras de pacientes con CVMI antes de que recibieran quimioterapia. Los pacientes con CVMI secundario tuvieron tasas de respuesta patológica significativamente menores tras la QNA respecto a los que presentaron un CVMI primario (26% vs 45%). También presentaron peores tasas de SLP, SCE y SG. Además, los pacientes con CVMI secundario tratados con QNA presentaron peor SCE respecto a los que se trataron con cistectomía exclusivamente. Los hallazgos se confirmaron en una cohorte de validación independiente de 94 pacientes estudiados mediante secuenciación genética. La presencia de mutaciones de ERCC2 fue superior en los pacientes con CVMI primarios respecto a los secundarios y, además, fueron capaces de predecir una mayor sensibilidad al tratamiento quimioterápico (figura 20). Las mutaciones en los genes de reparación del ADN que aumentan la sensibilidad a la QNA se presentaron predominantemente en los tumores primarios. Las mutaciones de estos genes pueden ser la base de la mayor sensibilidad de los CVMI primarios a la QNA. Aunque se necesita una validación prospectiva, los pacientes con CVMI secundario podrían obtener un mayor beneficio si se someten a cistectomía directamente o si realizan otros tratamientos dentro de un ensayo clínico en lugar de realizar QNA estándar con cisplatino.

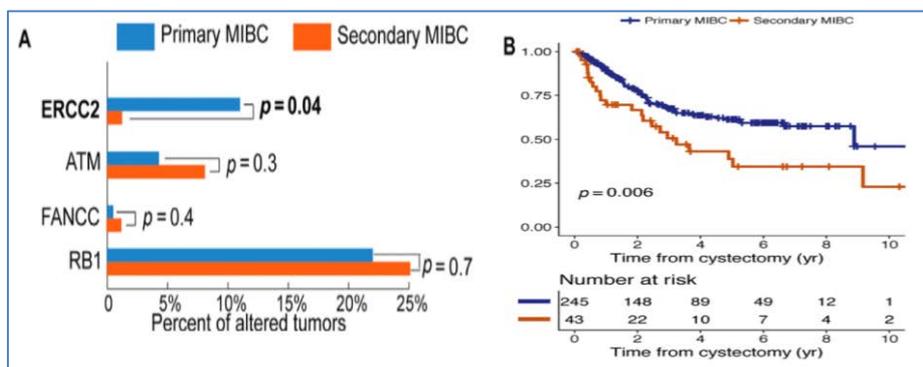


Figura 20. Análisis genómicos de los CVMI. (A) Frecuencia de alteraciones de genes asociados con respuesta a quimioterapia en tumores primarios vs secundarios. (B) Comparación de la SG en pacientes con CVMI primario respecto a secundario tratados con QNA y cistectomía radical (187).

2.9.4. Biomarcadores relacionados con las dianas terapéuticas.

La mejor comprensión de la biología del CVMI y su caracterización molecular puede ayudar a identificar aquellos pacientes que vayan a responder mejor a un tipo de terapia determinada. El grupo TCGA ha descrito diversas mutaciones en *EGFR*, *FGFR-3*, MAP quinasa, vía PI3K-Akt-mTOR, genes reguladores del ciclo celular y remodeladores de la cromatina (22). Hasta el 70% de los CVMI podrían presentar dianas terapéuticas.

Entre estas dianas se encuentran los inhibidores de la PARP. Esta terapia es eficaz en los tumores con reparación defectuosa del ADN mediante la vía de la HR. Se ha evaluado la actividad de los inhibidores de la PARP, como olaparib, en xenoinjertos de tumores derivados de pacientes con cáncer de mama y se han investigado los mecanismos de sensibilidad mediante la secuenciación del exoma, el análisis de metilación del promotor BRCA1 y la tinción por IHQ de las proteínas implicadas en la HR, incluido RAD51. Se comparó la capacidad predictiva de la puntuación de RAD51 y la deficiencia en la vía de la HR. La puntuación de RAD51 fue altamente discriminativa para la sensibilidad a los inhibidores de la PARP en comparación con la resistencia a los mismos. RAD51 permitió la identificación de tumores de mama sensibles a inhibidores de la PARP, por lo que algunos pacientes se podrían beneficiar de este tipo de tratamiento (188).

Por otra parte, el análisis combinado de varios marcadores genéticos puede ayudar a seleccionar a los pacientes de alto riesgo después de la cistectomía. La sobre expresión del protooncogen c-MET se ha relacionado con peor pronóstico en pacientes con CVMI (189). La expresión de c-MET y Axl en pacientes con tumor vesical avanzado también se ha asociado a peor pronóstico (190). La identificación de la interferencia entre c-MET y otros receptores

de las TK como AXL y PDGFR sugiere que los genes de la vía c-MET (c-MET-AXL-PDGFR) podrían ser clínicamente relevantes para el CVMI. La expresión de los genes de la vía c-MET podrían utilizarse para identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar un CVMI más agresivo. En un análisis *in vitro*, la eliminación de c-MET suprimió la proliferación, invasión y migración de células tumorales, aumentando además la sensibilidad a la apoptosis inducida por cisplatino. Además, la expresión de la vía c-MET fue capaz de predecir una peor SG (191). Estos resultados sugerirían que la expresión de la vía c-MET podría resultar ser un marcador pronóstico. Los inhibidores de la TK y de c-MET podrían afectar simultáneamente tanto a las células tumorales como a su microentorno (192).

En otro estudio, el receptor 1 de la TK que estimula a los macrófagos (también conocido como RON) contribuyó a la transformación y a la progresión maligna de células epiteliales. Su expresión se ha asociado a mayor número de tumores vesicales por paciente, mayor grado histológico, peor estadio patológico y presencia de metástasis a distancia. La inhibición de RON induce a la detención del ciclo celular y por ello se ha evaluado como potencial diana terapéutica en el cáncer de vejiga (193).

Por último, se ha descrito que hasta el 70% de los cánceres de vejiga pueden presentar mutaciones del gen *TERT*. El gen *TERT* está involucrado en la protección del ADN, los procesos de envejecimiento celular y el cáncer. Las mutaciones del gen *TERT* se producen durante la carcinogénesis y dichas mutaciones podrían estar presentes en cualquier etapa del proceso de la tumorigénesis urotelial. Ello sugeriría que dichas mutaciones podrían ocurrir en fases tempranas de la carcinogénesis. El gen *TERT* codifica para una proteína que aumenta la longitud de los telómeros, estructuras que se ubican al final de los cromosomas, protegen el material genético y también están asociadas al proceso de envejecimiento celular. *TERT* se ha utilizado para detectar mutaciones genéticas en muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga, tanto en fase de diagnóstico como en fase de monitorización de respuesta a fármacos (194).

2.9.5. Biomarcadores relacionados con la inmunoterapia.

Otro factor a tener en cuenta es el papel de las biomoléculas relacionadas con el microentorno del CVMI y la respuesta inmunitaria. La identificación de biomarcadores

clínicamente útiles que permitan identificar a los pacientes con mayores probabilidades de beneficiarse de la inmunoterapia también constituye un motivo de estudio en la actualidad.

La expresión de PD-L1 evaluada por IHQ no constituye un biomarcador predictivo suficientemente robusto. Se han evaluado otros biomarcadores predictivos de respuesta a la inmunoterapia como las características del huésped (linfocitos que infiltran el tumor y clonalidad del receptor de células T) o del tumor (subtipos moleculares y cantidad de mutaciones). Dentro del ensayo *IMvigor* el porcentaje de células inmunitarias positivas para PD-L1 se relacionó con mayores tasas de respuesta objetiva. Además, la respuesta a atezolizumab se relacionó con la clasificación taxonómica del grupo *TCGA*, encontrando respuestas significativamente mayores en los subtipos luminales del grupo II respecto al resto de subtipos (112).

La cantidad de mutaciones acumuladas por el tumor también se han asociado a respuesta en pacientes tratados con atezolizumab (195). Las alteraciones en los genes *DDR* se asocian a un mayor número de mutaciones acumuladas, a un aumento de linfocitos que infiltran el tumor y a una mayor respuesta al tratamiento con platino. Este hecho implica una mayor probabilidad de respuesta patológica del CVMI tratado con QNA y una mejor supervivencia en el tumor vesical metastásico. Se ha planteado que la presencia de estas mutaciones pueda asociarse a un beneficio clínico de la inmunoterapia con inhibidores del punto de control inmunitario anti-PD-1/PD-L1 en pacientes con tumor urotelial metastásico. En un ensayo prospectivo, se ha observado que la presencia de cualquier alteración en los genes de *DDR* se asocia a mayor tasa de respuesta y supervivencia. La presencia de mutaciones de genes de *DDR* se asocia de forma independiente con la respuesta al bloqueo de PD-1/PD-L1 en pacientes con carcinoma urotelial metastásico (196).

Respecto a los genes relacionados con la respuesta inmune, en el estudio *PURE-01* (113) se analizaron biomarcadores de expresión como PD-L1, de secuenciación genética y un panel de expresión de genes relacionados con la inmunidad, entre ellos los de la vía del INF (como INFG), quimiocinas y receptores de quimiocinas (como CXCL9) e inhibidores de receptores y ligandos (como LAG3). La expresión de varios de estos genes previa al inicio de la inmunoterapia se asoció a tasas de respuestas significativamente diferentes entre las cohortes con RPc y el resto (54% vs 13%). También se describieron cambios significativos en la carga de mutaciones a nivel tumoral tras el tratamiento y se evidenciaron mecanismos adaptativos de resistencia inmune dentro de los tumores residuales. Este estudio concluyó que pembrolizumab podría ser un tratamiento neoadyuvante válido para el tratamiento del

CVMI en pacientes con tumores PD-L1 positivos o con tumores con alta carga de mutaciones.

En el estudio de Ayers y cols. se analizaron perfiles de expresión genética utilizando ARN de muestras basales de diferentes tumores de pacientes tratados con pembrolizumab (197). Se han identificado firmas genéticas relacionadas con el sistema inmunitario que se asocian a un beneficio clínico en pacientes tratados con pembrolizumab. Se ha definido un perfil de expresión genética relacionado con la infiltración a nivel tumoral por parte de los linfocitos T. El valor predictivo se ha confirmado de forma independiente y se ha comparado con la expresión de PD-L1 mediante IHQ. El perfil de expresión genética relacionado con la infiltración a nivel tumoral de linfocitos T contenía genes relacionados tanto con IFNG como con la presentación de antígenos, la expresión de quimiocinas, la actividad citotóxica y la resistencia inmune adaptativa (figura 21). El perfil de expresión genética relacionado con la inflamación tumoral por linfocitos T se está evaluando en los ensayos que se están llevando a cabo con pembrolizumab.

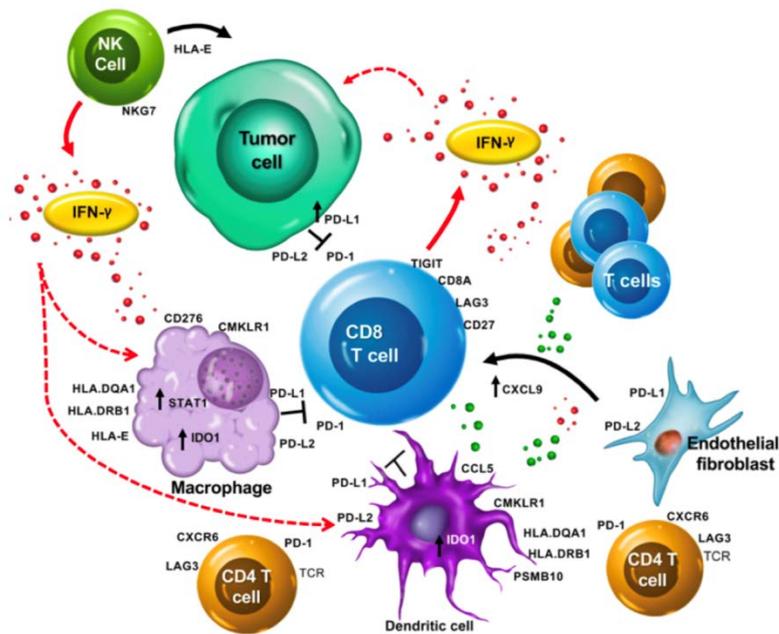


Figura 21. La firma relacionada con la expresión de genes relacionados con la inflamación por células T denota una biología compleja en el microambiente inmune del huésped (197).

3. Hipótesis

3. Hipótesis.

La QNA basada en cisplatino seguida de cistectomía representa el tratamiento recomendado para el CVMI con el mayor nivel de evidencia. Para la cistectomía radical las cifras de SG a 5 años son del 50%. Cuando se combina con QNA basada en cisplatino, la SG puede incrementarse entre un 5 y un 8%. Los esquemas basados en cisplatino obtienen tasas de RPc entre el 25 y el 38%, siendo estos casos los que obtienen el mayor beneficio. Debe tenerse en cuenta que la incapacidad para seleccionar aquellos pacientes que vayan a beneficiarse de la QNA ha limitado su uso, pues puede suponer el retraso de una cistectomía potencialmente curativa y un derivado impacto negativo en supervivencia.

Actualmente no se dispone de marcadores predictivos de respuesta para poder seleccionar a los pacientes. El uso de parámetros clínicos y patológicos por sí solos no van a ser capaces de predecir ni la respuesta ni la evolución tumoral de forma adecuada. Así pues se precisa de otros parámetros que aumenten la capacidad predictiva de respuesta. Por una parte, la identificación de las subclasificaciones jerárquicas o de taxonomía del CVMI pueden aumentar la capacidad predictiva. Por otra, la expresión de genes implicados en vías de reparación del ADN que se asocian a mayor sensibilidad al tratamiento con cisplatino también puede permitir predecir la respuesta. Incluso otros marcadores relacionados con dianas terapéuticas o con respuesta inmune podrían estar relacionados.

Se precisa identificar tanto a aquellos pacientes en los que el tratamiento quirúrgico vaya a ser insuficiente y se puedan beneficiar de la QNA basada en cisplatino como los que no vayan a responder.

Este trabajo pretende analizar si los parámetros clínicos y patológicos en combinación a los biomarcadores relacionados con taxonomía y expresión genética pueden permitir identificar una firma conjunta que aumente la capacidad predictiva de RPc al tratamiento. Dado que la RPc se asocia a mayor supervivencia, la propia firma predictiva podría estar también relacionada con supervivencia.

Disponer de firmas que aumenten la capacidad predictiva de respuesta nos podría permitir planificar un tratamiento individualizado más preciso y adecuado en un futuro.

4. Objetivos

4. Objetivos.

4.1. Objetivo principal.

Estudiar si la valoración conjunta de variables clínicas, patológicas, taxonómicas y de expresión genética incluidas en una firma aumenta la capacidad predictiva de respuesta patológica completa en pacientes con CVMI candidatos a recibir quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino.

Para poder demostrar dicho objetivo, técnicamente primero se estudiará la capacidad predictiva de la información aportada por las variables clínicas y patológicas prequirúrgicas. Posteriormente se estudiará la capacidad predictiva cuando se añade la información que aporta la clasificación sobre taxonomía. Por último se estudiará la capacidad predictiva cuando se analizan todas las variables previamente mencionadas en combinación con las de expresión genética para poder demostrar una mayor capacidad predictiva de respuesta patológica completa.

4.2. Objetivos secundarios.

Se estudiarán qué variables selecciona el modelo estadístico para la firma predictiva y su relación con la respuesta patológica completa:

- variables clínicas y patológicas
- variables de taxonomía
- variables de expresión genética

Se estudiará la asociación de la respuesta patológica completa con la supervivencia libre de progresión, la global y la cáncer específica.

Se estudiará la asociación entre la firma predictiva de respuesta patológica completa y las variables seleccionadas con la supervivencia libre de progresión, la global y la cáncer específica.

5. Material y métodos

5. Material y métodos.

5.1. Diseño.

Estudio retrospectivo de una serie multicéntrica de pacientes con CVMI tratados con QNA basada en platino.

5.2. Población.

El estudio incluyó a pacientes tratados en dos centros: *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol – Institut Català d'Oncologia* de Badalona y *Fundació Althaia* de Manresa.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- CVMI identificado mediante RTU con histología urotelial pura u otra diferenciación
- estadiaje clínico con TC abdominal y pélvica, así como con radiografía de tórax
- los pacientes se estadiaron clínicamente como T2-4aN0-2M0 y se consideró que fueran candidatos a cistectomía tras realizar tratamiento con QNA basada en platino

Los criterios de exclusión correspondieron a que:

- los pacientes no fuesen elegibles para ningún tratamiento con QNA
- expresaran su negativa a recibirlo.

La RPc se definió como ausencia de tumor detectable en la muestra de cistectomía (pT0N0M0), la respuesta parcial se definió como descenso de la estadificación a CVNMI (<pT2N0M0), los casos restantes fueron considerados como no respondedores.

El estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación clínica institucional con el número de registro correspondiente (REF.CEI PI-15-072, apéndices 1 y 2). Los pacientes proporcionaron su consentimiento al estudio.

5.3. Información clínica, patológica y de seguimiento.

La información se recogió a través de la revisión de las historias clínicas de los pacientes, tanto a nivel clínico como a nivel de anatomía patológica. Se creó una base de datos en

Excel® con las variables clínicas y patológicas: edad, sexo, presencia de tumor vesical superficial previo, presencia de invasión linfovascular en la RTU, morfología histológica del tumor, TNM clínico, presencia de hidronefrosis y esquema de QNA utilizado. Se recogió la variable objetivo principal: la RPc en la pieza de cistectomía. Además, se recogieron las variables de tiempo de seguimiento específico para SLP, SCE y SG con formato cuantitativo continuo en meses y se registraron las variables censuradas. La edad se calculó según la fecha de nacimiento y se consideró como fecha de diagnóstico del CVMI la misma en la que se realizó la RTU, ambas con formato cuantitativo continuo. El resto de las variables se recogieron con formato categórico nominal, se agruparon y se codificaron numéricamente para su análisis posterior.

5.4. Obtención y procesamiento de las muestras para el estudio.

Se realizó una RTU del tumor vesical con un resector monopolar, tanto de su parte exofítica como de su base. Se envasaron las muestras de RTU en recipientes estériles con formol. Posteriormente se procedió a la fijación del tejido en parafina como muestras *FFPE*. Se realizaron cortes de tejido de 10 µm, se fijaron en un portaobjetos con formalina, se realizó la tinción del tejido con hematoxilina eosina y se procedió a su protección con el cubreobjetos para su posterior análisis anatomopatológico.

Tras la evaluación microscópica por parte del anatomopatólogo, se procedió al marcaje de la zona correspondiente al tejido tumoral propiamente dicho en la laminilla teñida con hematoxilina eosina del portaobjetos con su cubreobjetos. Se realizó un marcaje de la zona tumoral de los cortes contiguos del tejido parafinado, también de 10 µm, que se habían fijado en el portaobjetos con formalina según el patrón seguido en la laminilla evaluada previamente. Se repitió el proceso con los cortes consecutivos pudiendo obtener así tejido tumoral suficiente para su análisis posterior.

5.4.1. Extracción del ARNm mediante *Covaris*®.

5.4.1.1. Obtención del material de muestras parafinadas.

Se precalentó el tejido parafinado del portaobjetos, previamente fijado y marcado, mediante el *section warmer* a 40°C. Se obtuvo el material de las áreas marcadas utilizando un *tissuepick* y un reactivo (*tissue SDS*). Con 2 µl del reactivo fue suficiente para recoger hasta 30 mm² de muestra. El volumen máximo de muestra obtenido por cada *tissuepick* fue de

100 mm² de 5 µm de grosor. Una vez se obtuvo la muestra necesaria, se colocó con el *tissuepick* dentro del tubo *Covaris Microtube*® y se cerraron para su almacenamiento.

5.4.1.2. Preparación de reactivos para la purificación del ARNm.

Se prepararon los reactivos basados por una parte en nucleasa libre de agua más ADNasa I y por otra en etanol. Así se pudo proceder a la realización de la purificación del ARNm de las muestras. Se comprobó la ausencia de ningún precipitado para poder realizar su procesamiento posteriormente.

5.4.1.3. Extracción del ARNm del tejido parafinado.

Se añadieron los reactivos de lisis de ARN a cada *Covaris Microtube*® con las muestras de ARNm previamente purificado y se cerraron nuevamente. Las muestras se procesaron posteriormente dentro de cada microtubo en el sonicador. A continuación, se abrieron los microtubos, se añadió proteinasa K para realizar una digestión y se cerraron nuevamente para volverlos a procesar en el sonicador. Las muestras se incubaron para revertir la formación de puentes de formaldehído y posteriormente se transfirieron a un tubo nuevo para su posterior centrifugado. Finalmente se volvieron a transferir a otro tubo diferente.

5.4.1.4. Tratamiento con ADNasa.

Se preparó una nueva solución de ADNasa para eliminar restos de ADN. Posteriormente, se pudo realizar una nueva purificación del ARNm de nuestras muestras con columnas.

5.4.1.5. Purificación con columnas.

Se añadió primero la ADNasa preparada a nuestras muestras y posteriormente el etanol. Se transfirieron las muestras con los reactivos de ADNasa y etanol a unos tubos nuevos con columnas y se centrifugaron. Posteriormente se realizaron dos lavados con *RNAwash*. Se descartaron los colectores con los fluidos y las columnas restantes se depositaron en unos tubos nuevos con columnas para otro centrifugado. Se realizó la elución del ARNm. Se retiraron las columnas de los tubos. Finalmente, el ARNm extraído y purificado de nuestras muestras se guardó congelado a una temperatura de -80°C.

5.4.2. Cuantificación del ARNm por fotometría mediante *Qbit*®.

Se realizó una cuantificación del ARNm extraído mediante *Qbit*®. Para ello, se realizó una mezcla de los reactivos del *kit* que contiene *SyberGreen* y que se intercala con el ARNm. Así, sólo se realizó la lectura de *SyberGreen* que quedó intercalado y, por tanto, dio una medida real de la cantidad de ARNm que estaba presente en cada muestra. Se comprobó que se dispusiera como mínimo de un total de 250ng de ARNm en cada una de las muestras.

5.4.3. Metodología utilizada para la selección de los biomarcadores.

Se realizó una búsqueda bibliográfica y se incluyeron en la revisión diversos trabajos relacionados con genes implicados en diferentes vías de reparación del ADN relacionadas con la sensibilidad o la resistencia al cisplatino. Se procedió a la selección de los genes que se consideraron más relevantes. La mayoría de los trabajos seleccionados analizaron los genes según la expresión del ARN mediante técnicas de IHQ y/o cuantitativas como *RT-PCR*. Otros trabajos realizaron un análisis de mutaciones presentes en dichos genes (tabla 4).

Mecanismo/Vía	Gen	Referencia bibliográfica
<i>NER</i>	ERCC1	(185)(198)(199)(200)
	ERCC2	(185)(201)
	ERCC5	(185)(202)(203)
	ERCC6	(204)
	eIF3a	(205)
<i>NHEJ</i>	Ku80	(184)(206)
	CHEK1	(185)(206)(207)
	CHEK2	(185)(206)
	REV7/ MAD2L2	(206)(208)
	PARP	(184)(206)
	Rif1	(184)(206)
ANEMIA FANCONI	FANCC	(185)(206)
	FANCA	(185)(206)
	FANCD2	(206)
<i>HR</i>	BRCA1	(185)(198)(172)(198)(206)
	BRCA2	(199)(206)
	NBN	(206)
	PALB2	(185)(206)
	RAD50	(209)(185)(210)(206)

	RAD51	(177)(185)(199)(206)
	POLθ	(206)(211)
	PTIP	(206)(212)
	RNF8	(213)
	RNF168	(213)
	HERC2	(214)
	53BP1	(215)(206)
	ATR	(185)(207)
	ATM	(185)(206)

Tabla 4. Inclusión de genes para el análisis de expresión de ARN según las vías de reparación a las que pertenecen.

Así mismo se incluyeron genes relacionados con respuesta al cisplatino en CVMI en relación con los receptores de la TK y la remodelación de la cromatina (Tabla 5):

Mecanismo	Gen	Referencia bibliográfica
TK	Axl	(191)
	c-MET	(191)(192)
	RON	(193)
Remodelación cromatina	TERT	(194)

Tabla 5. Genes de dianas terapéuticas y remodelación de la cromatina.

En el análisis de expresión, también se incluyeron los principales marcadores relacionados con la clasificación taxonómica, tanto los basales como los luminales (tabla 6):

Clúster	Gen	Referencia bibliográfica
Luminal	FOXA1	(158)
	GATA3	(158)
Basal	KRT 5/6	(158)
	KRT14	(158)

Tabla 6. Genes de clasificación taxonómica.

Por último, se seleccionaron genes implicados en diferentes vías de respuesta inmune o que se hubieran incluido en algunas firmas predictivas inflamatorias (tabla 7):

Mecanismo	Gen	Referencia bibliográfica
Muerte programada	PD1	(110)(114)(197)
	PDL1	(110)(114)(197)
Quimiocinas	CXCL9	(197)
Vía INF	INFG	(197)

Inhibidores receptores/ligandos	LAG3	(197)
------------------------------------	------	-------

Tabla 7. Genes relacionados con respuesta inmunológica.

5.4.4. Metodología utilizada para la clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica se realizó en el CNIO por el Dr. F.X.Real, quien es miembro del comité científico de dicha institución y *Senior Group Leader* del departamento de carcinogénesis epitelial.

Se revisaron los bloques incluidos en *FFPE* de las muestras de tumor vesical obtenidas previamente mediante RTU. Se seleccionaron las áreas tumorales representativas para extraer 3 núcleos de tejido y construir *microarrays* de tejido o TMA. Los núcleos se colocaron de forma no consecutiva para evitar artefactos. Los TMA se construyeron siguiendo pautas establecidas y se seccionaron. El material sobre el portaobjetos se fijó en parafina y se almacenó. Posteriormente se utilizaron los siguientes anticuerpos: KRT5/6 (*PRB-160P, Covance; 1/2000*), KRT14 (*PRB-155P, Covance, 1/2000*), GATA3 (*CM405 A, Biocare Medical, 1/300*) y FOXA1 (*ab170933*). Tras la desparafinización, la recuperación de antígenos y el bloqueo de peroxidasa endógena, las secciones se incubaron con anticuerpos. Posteriormente, se lavaron y se agregaron los reactivos secundarios *Envision (Agilent, Santa Clara, CA)*. Después del lavado, las reacciones se desarrollaron con 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), se tiñeron con hematoxilina y se montaron.

La puntuación fue ciega a la información clínica y patológica. Se registró la proporción de células reactivas (0-100%) y la intensidad de la tinción (0-3). Posteriormente se calculó una puntuación histológica como el producto de la intensidad de la tinción multiplicado por el porcentaje de células reactivas (rango 0-300). El promedio de las puntuaciones se utilizó para el análisis.

Para la agrupación jerárquica taxonómica se aplicó el método de varianza mínima de Ward (216) y se investigó la evidencia de agrupaciones naturales de tumores (subtipos) en función de las correlaciones entre los perfiles de expresión (figura 22). La puntuación histológica se estandarizó a 0-1 y se consideró como una variable. Se generaron mapas utilizando la herramienta *pHeatmap* (217). Para investigar la estabilidad de cada grupo, se realizó un *bootstrap* con los valores de la puntuación histológica para su reagrupación. Posteriormente se evaluó su similitud con la clasificación original mediante el coeficiente de Jaccard (218). El modelo *CART* fue entrenado, considerando los 3 subfenotipos y los 4

marcadores utilizando los paquetes *caret* y *rpart*. Se utilizó el método *leave-one-out cross validation* para evaluar el mejor escenario de predicción.

La variable de taxonomía o *cluster* se registró en la base de datos clínica y patológica como cualitativa nominal, codificada de forma numérica.

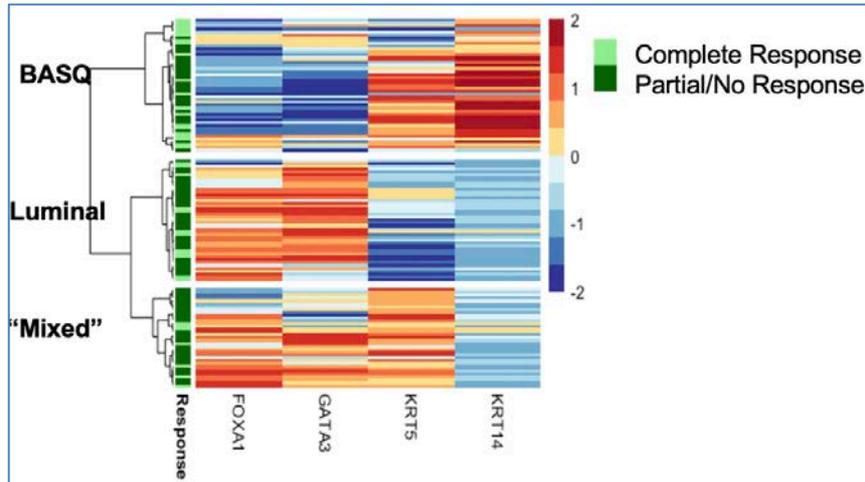


Figura 22. Clasificación según *pHeatmap* respecto a los 4 marcadores utilizados para la clasificación y asociación según su respuesta patológica a los 3 subfenotipos.

5.4.5. Análisis de la expresión del ARNm mediante *nCounter*®.

Esta plataforma de análisis permitió un reconocimiento múltiple de etiquetas específicas del ARNm, con una reacción previa de unión y otra de purificación enzimática que eliminó las etiquetas no ligadas. Previamente se informó a la empresa *Nanostring Technologies*® de los genes seleccionados a incluir en nuestro estudio, para el diseño de las sondas de captura y de información. Ambas sondas fueron específicas para secuencias estables de cada gen y se encontraban ya validadas (apéndice 3). Se incluyó ARNm de control en el mismo *Kit nCounter*®, permitiendo controlar así la eficacia y la especificidad de la unión a través de cada paso de la reacción. El sistema permitió la cuantificación precisa de cada ARNm correspondiente a cada gen y su expresión se relativizó mediante la realización de una media geométrica respecto a 4 genes constituyentes o *housekeeping* (figura 23).

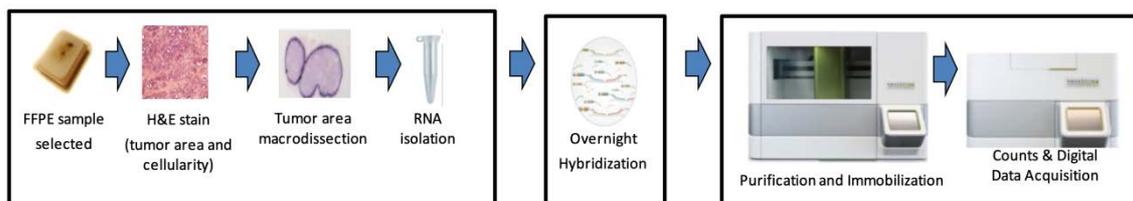


Figura 23. Proceso de obtención y purificación de ARN, hibridación con las sondas y adquisición digital de los datos de expresión mediante el sistema *nCounter*® de *Nanostring Technologies*®.

5.4.5.1. Preparación de las muestras de ARNm.

El sistema *nCounter*® requería ARNm purificado como el que ya teníamos previamente disponible. *Nanostring*® recomienda al menos un total de 100ng de ARNm, ya que dicha cantidad genera una señal robusta para la mayoría de las muestras obtenidas y aisladas a partir de tejidos. No obstante, se procesaron 250ng de ARNm de cada una de nuestras muestras siguiendo los criterios cuantitativos durante el diseño de la firma genética pronóstica para el cáncer de mama (*Prosigna*®), ya validada y aprobada por la FDA.

Para la normalización de las muestras de ARNm, primero se preparó una dilución del material de ARNm en cada muestra. Para ello se prepararon tanto las mezclas los reactivos como las alícuotas y posteriormente se añadieron a nuestras muestras de ARNm dentro de unos tubos. Se colocaron en un termociclador y se procesaron. Posteriormente se procedió a añadir ligasa a cada tubo e inmediatamente después se recogieron, se alojaron en el bloque térmico, se cerraron en el termociclador y se inició un protocolo de ligación. Tras completar el protocolo de unión, se añadió una enzima de limpieza de unión a cada tubo con la muestra, se realizó una mezcla y dentro del termociclador se inició el protocolo de purificación. Tras completar el protocolo de purificación, se añadió *DEPC H2O (sense RNAase)* a cada muestra. Se aseguró el desnaturalizado antes de añadir la muestra preparada al protocolo de hibridación *CodeSet* del ARNm, al cual se procedió inmediatamente.

5.4.5.2. Hibridación del ARNm.

Durante el proceso de hibridación, los pares de sondas se emparejaron con el ARNm diana. Las sondas estaban presentes en exceso para garantizar que cada objetivo encontrase su diana correspondiente. La reacción final de hibridación contenía las sondas de información, el tamponamiento de hibridación, las muestras de ARNm y las sondas de captura. Se respetó estrictamente el orden de adición de los componentes siguiendo el protocolo. Se descongelaron los reactivos de las sondas de información y las de captura. Se realizó una mezcla maestra que contenía las sondas de información y el tampón de hibridación añadiendo el reactivo de hibridación al tubo que contenía las sondas de información. Se añadieron las sondas de captura a la combinación maestra y se mezclaron. Se etiquetó una cinta de 12 canales. Se añadió la mezcla maestra a cada uno de los 12 tubos. Se muestreó el material del protocolo de preparación de ARNm a 85 °C y se depositó en hielo. Se añadió una alícuota del protocolo de preparación de muestras de ARNm a cada tubo. Se precalentó

el termociclador y se programó. Se añadieron las sondas de captura a cada tubo inmediatamente antes de incubarlas y se mezclaron. Las muestras se centrifugaron brevemente a <1000 rpm e inmediatamente se colocaron en la tira de tubos del termociclador a 65 °C. Se minimizó el tiempo entre la adición de las sondas de captura y la ubicación de la reacción a 65 °C para aumentar la sensibilidad de nuestro ensayo. Las muestras de hibridación se incubaron durante más de 12 horas (figura 24). Una vez se retiraron del termociclador, se procedió inmediatamente a su posterior procesamiento con el *nCounter Prep Station*®.



Figura 24. Hibridación del ARN de cada gen con las sondas de captura y de codificación (219).

5.4.5.3. Purificación e inmovilización.

La purificación y la inmovilización se realizaron en el primer instrumento del *nCounter*®: la estación de preparación. Tras la hibridación, se descartó el exceso de sondas utilizando una purificación basada en un compuesto magnético de dos pasos. Las bolas magnéticas con las secuencias de ácidos nucleicos cortos, que son complementarias a las sondas de captura, y con las sondas informativas fueron utilizadas secuencialmente. En primer lugar, la mezcla de hibridación que contenía los complejos objetivo-sonda se podían unir a las cuentas magnéticas complementarias a las secuencias de la sonda de captura. Se realizó un lavado para eliminar el exceso de las sondas de información y de las transcripciones celulares no destinadas. Tras el lavado, las sondas de captura y los complejos objetivo-sonda se eliminaron de las bolas magnéticas y se hibridaron a las cuentas magnéticas complementarias a las secuencias de las sondas de información. Se realizó un lavado adicional para eliminar el exceso de sondas de captura. Finalmente, se obtuvo el complejo objetivo-sonda purificado. Los complejos se aislaron de las bolas magnéticas y se inmovilizaron en un cartucho para poder recoger los datos (figura 25).

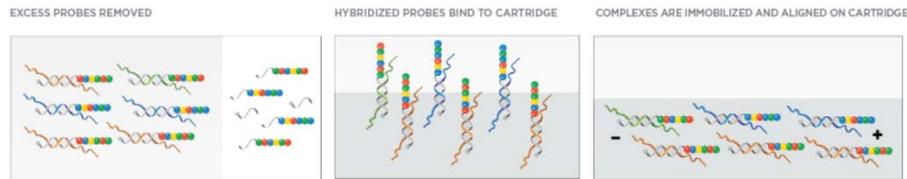


Figura 25. Eliminación del exceso de sondas, unión al cartucho, inmovilización y alineación (219).

5.4.5.4. Cuantificación y adquisición digital de datos de expresión de ARNm.

El análisis de expresión del ARNm se realizó en el segundo instrumento del sistema *nCounter*®: el analizador digital, utilizado para la recogida y recopilación de datos. El procedimiento se basa en la codificación de barras moleculares y en la detección digital de estas moléculas diana mediante el uso de un código de color de una de las sondas emparejadas. La complejidad de cada uno de los códigos de color, compuesto de cuatro colores en seis posiciones, permitió identificar los objetivos presentes en la misma muestra de forma simultánea. Así se identificó y cuantificó cada gen de forma individual en cada muestra durante la recogida de datos (figura 26). Las imágenes digitales se procesaron y las cuentas del código de barras se tabularon en un formato separado.

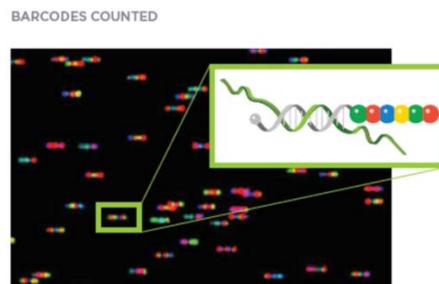


Figura 26. Contaje específico de ARN de cada gen mediante la lectura del código correspondiente (219).

5.5. Metodología estadística.

Para cumplir con el objetivo principal del estudio, se pretendía medir la capacidad predictiva de respuesta a cisplatino de la firma clínica y molecular. Primero se identificaron las variables clínicas y patológicas y se estudió su capacidad predictiva. Posteriormente se añadieron las de taxonomía y se volvió a calcular su capacidad. Para ello primero se siguió una estrategia de modelización condicional para las variables clínicas, patológicas y de taxonomía (*non-omic*), siguiendo la metodología *stepwise selection*.

Posteriormente se añadió la información de expresión genética. Se realizaron regresiones logísticas penalizadas mediante los métodos *Lasso* y *elastic-net* para valorar la capacidad predictiva añadiendo las variables de expresión de ARNm (*omic*). Para ello, primero debían normalizarse los datos de expresión siguiendo las guías establecidas y recogidas en el *Gene Expression Data Analysis Guidelines* de *Nanostring Technologies*® (https://www.nanostring.com/application/files/7715/1251/5220/Gene_Expression_Data_Analysis_Guidelines.pdf).

Una vez se seleccionó el método que aportaba mayor capacidad predictiva (*Lasso*) con las variables correspondientes, se comprobó su robustez mediante el procedimiento *cross-validation*. Se calculó la capacidad predictiva mediante el área bajo de la curva ROC (*AUC*) para cada modelo, añadiendo las variables según el orden de selección previo.

Dado que el método *Lasso* no permite la inclusión de casos que no dispongan de la totalidad de las variables (*missing*), la población del estudio se dividió en 2 grupos: el que tenía todas las variables completas y el que no. Se compararon los 2 grupos con los datos clínicos y patológicos disponibles, correspondientes al mismo período de inclusión. Se utilizaron los estadísticos *chi cuadrado* para comparar las variables cualitativas nominales y *t de student* para las cuantitativas continuas.

Se realizó un análisis univariante independiente para valorar la asociación de variables tanto clínicas, patológicas y taxonómicas como genéticas con la RPc.

Se estudió la asociación de la variable objetivo principal, RPc, con SLP, SCE y SG mediante curvas de *Kaplan-Meier* y pruebas *log-rank test*.

Por último, se valoró la asociación de diferentes modelos predictivos seleccionados con SLP, SCE y SG también mediante curvas de *Kaplan-Meier* y pruebas *log-rank test*.

Los cálculos se realizaron utilizando los programas R versión 3.3 ®, SPSS v23.0 de IBM® y Excel versión 16.24 de Microsoft® con paquete estadístico.

6. Resultados

6. Resultados.

6.1. Análisis descriptivo, comparación de las variables clínicas y patológicas de los grupos.

En el estudio retrospectivo se incluyeron un total 213 pacientes, que cumplieron con los criterios de inclusión, en los dos centros participantes: 166 correspondientes al *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol – Institut Català d'Oncologia* de Badalona y 47 a la *Fundació Althaia* de Manresa.

Todos los casos se valoraron previamente en el comité multidisciplinar del centro correspondiente, se valoró tanto la información clínica como la patológica y se propuso el esquema terapéutico más adecuado.

El periodo de inclusión, según la fecha de diagnóstico, fue desde abril del 1990 hasta julio del 2014 para los pacientes de Badalona y desde noviembre del 2003 a agosto del 2014 para los de Manresa. La media de edad de los pacientes fue de 64,72 años (rango 35–83 años). Predominó el género masculino (n=197, 92,49%) respecto el femenino (n=16, 7,51%).

Respecto a la presencia de tumor vesical superficial previo, la mayoría se presentaron ya de inicio como CVMI primario (n=176, 82,63%). Una menor proporción tenía historia previa de CVNMI (n=37, 17,37%) que progresó a CVMI como tumor secundario.

En el análisis de la anatomía patológica de las muestras de RTU, la variante histológica más frecuente fue la urotelial pura (n=181, 84,97%), seguida de la diferenciación escamosa (n=23, 10,80%) y se contabilizaron en menor proporción otras variantes uroteliales diferentes (n=9, 4,23%). Por lo que se refiere a la invasión linfovascular presente en la muestra de la RTU, la mayoría de los pacientes no presentaban invasión (n=187, 88,63%). En 2 casos no se pudo valorar este último parámetro.

El estadio clínico se realizó mediante TC abdominal y pélvica más radiografía de tórax. Los pacientes que presentaron exclusivamente afectación muscular o menor correspondieron a una menor proporción del total (\leq T2N0M0, n=15, 7,04%). La mayoría tenían afectación de la grasa perivesical o de órganos vecinos (T3-4aN0M0, n=83, 73,71%) y otros mostraron

afectación regional (>N1M0, n=41, 19,72%). La presencia de hidronefrosis también se valoró mediante la misma TC. La mayoría de los pacientes no presentaron hidronefrosis (n=129, 60,85%). En un caso no se disponía del registro de este último parámetro.

En nuestro centro (Badalona), el esquema de QNA más utilizado hasta el año 2000 fue la combinación *CMV*. A partir de entonces, tras el estudio de von der Maase y cols. (95) que publicó resultados equivalentes de respuesta en pacientes con tumor vesical metastásico y menor toxicidad para GC, se cambió a dicho esquema también en QNA. Del total de pacientes, la mayoría se trataron con GC (n=122, 57,82%). En segundo lugar, se utilizó la combinación *CMV* (n=64, 30,33%). Un porcentaje minoritario de pacientes, que se consideraron tributarios de QNA, pero no eran elegibles para cisplatino, recibieron la combinación de carboplatino con gemcitabina (CaG) (n=20, 9,48%). Por último, excepcionalmente se realizaron otros esquemas diferentes (n=5, 2,37%). En 2 casos no se disponía de los datos de la quimioterapia que se utilizó.

Tras completar la quimioterapia se realizó el tratamiento quirúrgico. La cistectomía fue practicada mediante cirugía abierta y se siguieron las recomendaciones técnicas descritas en las guías clínicas tanto para varones como mujeres. Se realizó una linfadenectomía estándar hasta el uréter, incluyendo los ganglios linfáticos internos, los presacos, los obturadores y los ilíacos externos. En 107 pacientes (50,23%) se contabilizaron 10 o más ganglios extraídos. El tratamiento quirúrgico no se pudo realizar en 12 pacientes debido a la progresión de la enfermedad o al empeoramiento clínico. En el resto de los casos donde se pudo completar el tratamiento quirúrgico (n=201), se constató la RPc en 71 casos (35,32%). La respuesta parcial (<pT2) al tratamiento se observó en 24 casos (11,94%) y en 106 pacientes (52,74%) se constató la ausencia de respuesta (>pT2N+). Tanto la respuesta parcial como la ausencia de respuesta se agrupó en una misma variable, correspondiendo finalmente a 130 los casos que no presentaron RPc (64,68%).

De los 201 pacientes que completaron el tratamiento quirúrgico, se dispuso de material de la RTU previa válido para la extracción de ARN en 143 casos. En los casos restantes no se dispuso del mismo, bien porque el tejido no estaba disponible en los centros de origen o bien porque el material era insuficiente para realizar la extracción. Al final, tras el análisis definitivo de clasificación taxonómica mediante IHQ y de expresión del RNA, se dispuso de un total 112 casos donde todas las variables incluidas en el estudio estaban completas.

Por tanto, los 213 pacientes incluidos se dividieron en dos grupos: uno con todas las variables completas para proceder a los análisis de expresión del ARN y otro en el que no se pudo realizar dicho análisis. Para asegurar que no existieran diferencias clínicas y patológicas significativas entre ambos grupos se procedió a compararlos entre sí. Para las variables cualitativas se realizó una prueba de *chi cuadrado* y para las continuas una de *t-student*. En ninguno de los parámetros clínicos y patológicos se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (tabla 8).

N	TOTAL		ANÁLISIS RNA		NO ANÁLISIS RNA		p valor
	213		112	52,58%	101	47,12%	
SEXO							0,82970122
	mujer	16	7,51%	8	7,14%	8	8,05%
	hombre	197	92,49%	104	92,86%	93	91,95%
EDAD							0,29671023
	min	35		41		35	
	media	64,72		65,33		64,01	
	max	83		80		83	
CANCER SUPF							0,86898862
	si	37	17,37%	19	17%	18	17,82%
	no	176	82,63%	93	83%	83	82,18%
INVASION LV							0,58387445
	si	24	11,37%	14	87,50%	10	10,10%
	no	187	88,63%	98	12,50%	89	89,90%
MORFOLOGIA		NA=2				NA=2	0,87998338
	urotelial	181	84,97%	96	85,71%	85	84,16%
	escamoso	23	10,80%	12	10,71%	11	10,89%
	otro	9	4,23%	4	3,60%	5	4,95%
cTNM							0,39873195
	<T2N0M0	15	7,04%	10	8,93%	5	4,95%
	T3-4aN0M0	157	73,71%	83	74,11%	74	73,27%
	>N1M0	41	19,72%	19	16,94%	22	21,78%
HIDRONEFROSIS							0,74561599
	no	129	60,85%	67	59,82%	62	62,00%
	si	83	39,15%	45	40,18%	38	38,00%
ESQUEMA QMT						NA=1	0,21931765
	CDDP+GMZ	122	57,82%	68	60,71%	54	54,55%
	CARBO+GMZ	20	9,48%	12	10,71%	8	8,08%
	CMV	64	30,33%	28	25,00%	36	36,36%
	otro	5	2,37%	4	3,57%	1	1,01%
RESPUESTA		NA=2				NA=2	0,28992159
	completa	71	35,32%	36	32,14%	35	39,36%
	parcial/no resp	130	64,68%	76	68,86%	54	60,64%
		NA=12				NA=12	

Tabla 8. Características clínicas descriptivas de los pacientes según la disponibilidad de material y datos completos para realizar el estudio de expresión genética (ANÁLISIS RNA) y los que no (NO ANÁLISIS RNA).

6.2. Análisis de los pacientes según su clasificación taxonómica y asociación de ésta con la expresión del ARN.

Se comparó la cuantificación de la expresión de ARNm por *Nanostring*® de los cuatro marcadores de clasificación taxonómica con la propia clasificación taxonómica realizada

previamente en el CNIO mediante IHQ. Se encontraron coeficientes de correlación altamente significativos para GATA3, FOXA1 y KRT14 y una buena correlación para KRT5/6 (figura 27). La expresión por IHQ para FOXA1 y GATA3 mostró una correlación positiva significativa (prueba de Pearson $r=0,68$). Para las expresiones de KRT5/6 y KRT14 se halló una correlación directa de forma significativa ($r=0,45$). FOXA1 y GATA3 se correlacionó negativamente con KRT14 de forma significativa ($r=-0,53$ y $r=-0,62$, respectivamente). La expresión de GATA3, pero no de FOXA1, se correlacionó negativamente con KRT5/6 ($r=-0,33$). El análisis de concordancia de la puntuación histológica reveló un moderado (0,4-0,6) o un acuerdo sustancial ($>0,6$) para todos los marcadores. La concordancia fue mayor para el grupo *BASQ* que para los grupos luminales o mixtos.

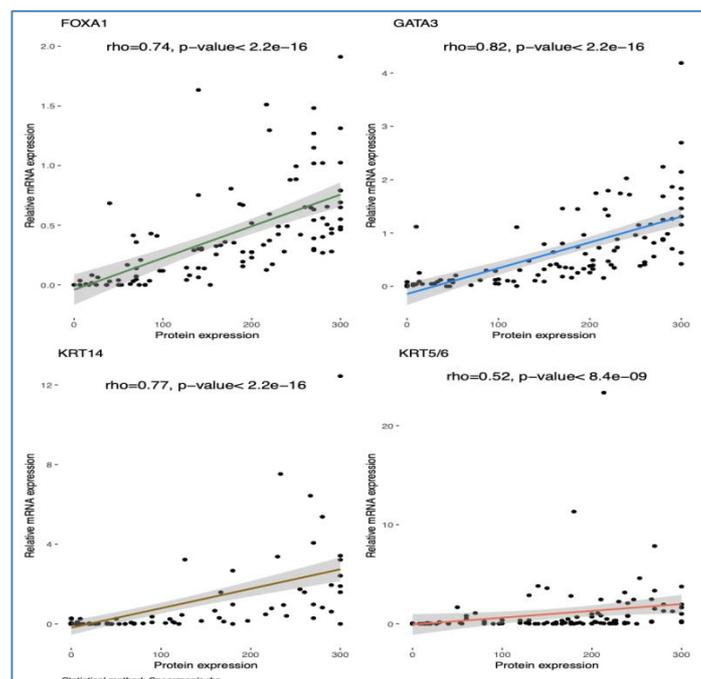


Figura 27. Correlación de los 4 marcadores según su expresión de ARNm y la expresión por IHQ.

Según el agrupamiento jerárquico taxonómico se identificaron tres grupos mediante IHQ (Figura 28). El subgrupo *BASQ* ($n=44$) se caracterizó por la alta expresión de KRT5/6 y KRT14 y la baja de FOXA1 y GATA3. El subgrupo luminal ($n=38$) se caracterizó por la alta expresión de FOXA1 y GATA3 y la baja de KRT 5/6 y KRT14. El subgrupo mixto ($n=30$) se caracterizó por la alta expresión de FOXA1, GATA3 y KRT5/6 y la baja de KRT14. El reagrupamiento de la expresión mostró que el subgrupo *BASQ* fue el más estable (estabilidad=0,84).

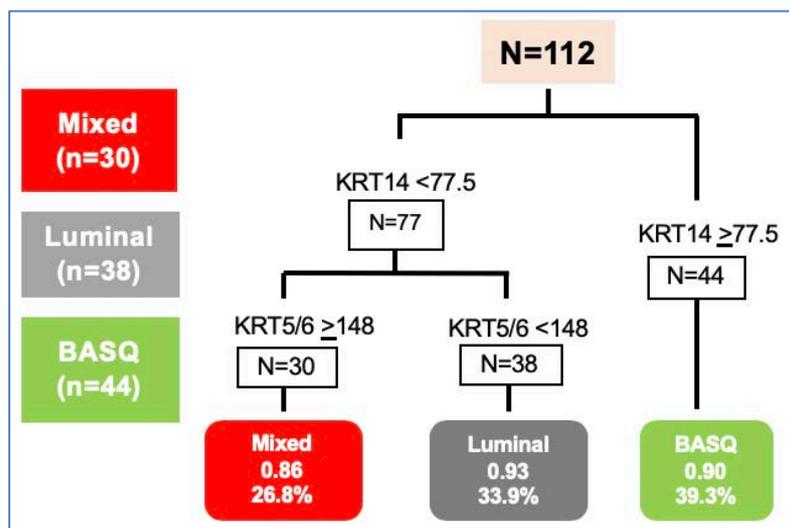


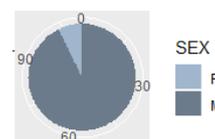
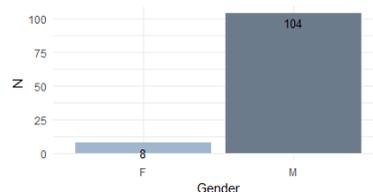
Figura 28. Clasificación taxonómica de los pacientes en 3 grupos según los 4 marcadores utilizados y su puntuación. Mixto (mixed), luminal (luminal) y basal (BASQ)

6.3. Análisis de variables clínicas, patológicas y de taxonomía del grupo de análisis de expresión de ARN.

Del conjunto de los 112 pacientes de los que se disponía de todos los datos completos, se analizaron un total de 10 variables incluyendo las clínicas, las patológicas y las de taxonomía. La descripción de éstas se muestra a continuación:

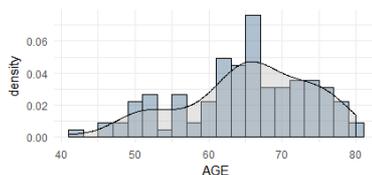
- Sexo

	N	%
Mujer	8	7,14%
Hombre	104	92,86%



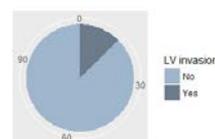
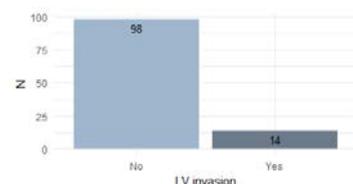
- Edad

Mínimo	41
Media	65,33
Máximo	80



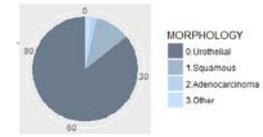
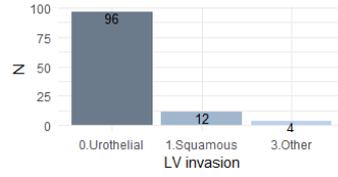
- Invasión linfovascular RTU

	N	%
No	98	87,5%
Si	14	12,5%



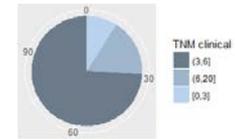
- Histología urotelial

	N	%
0.Urotelial	96	85,71%
1.Escamosa	12	10,71%
2.Otra	4	3,6%



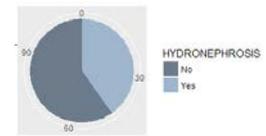
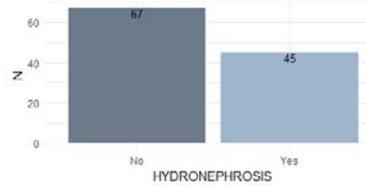
- TNM clínico

	N	%
(0,3).T2N0M0	10	8,93%
(3,6).T3a4aN0M0	83	74,11%
(6,20).>N1Mx	19	16,94%



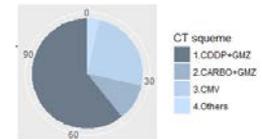
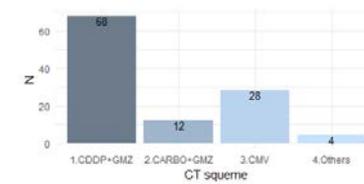
- Hidronefrosis

	N	%
No	67	59,82%
Si	45	40,18%



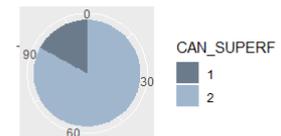
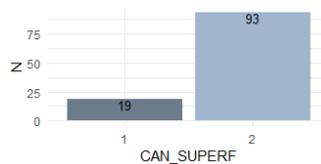
- Esquema QNA

	N	%
1.CDDP+GMZ	68	60,71%
2.CARBO+GMZ	12	10,71%
3.CMV	28	25,00%
4.Otros	4	3,57%



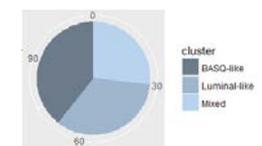
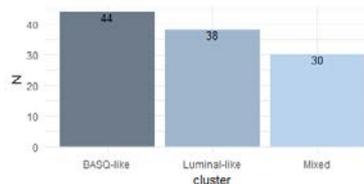
- Tumor vesical superficial previo

	N	%
1.Si	19	17%
2.No	93	83%



- Taxonomía o cluster

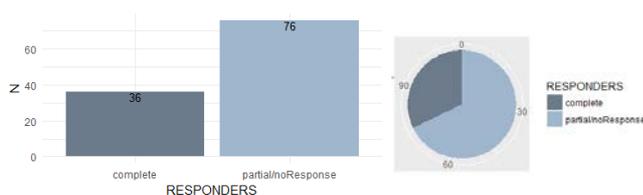
	N	%
BASQ-like	44	39,29%
Luminal-like	38	33,93%
Mixed	30	26,78%



Posteriormente se realizarán los análisis respecto a la variable objetivo principal del estudio: la R_{Pc} tras QNA con cisplatino en la pieza quirúrgica de cistectomía.

- Respuesta completa patológica

	N	%
Complete	36	32.14%
Partial/NoResponse	76	67.86%



6.4. Análisis univariante clínico, patológico y taxonómico.

En el análisis univariante ningunas de las variables clínicas y patológicas lograron alcanzar resultados estadísticamente significativos. En cambio, la variable de taxonomía sí mostró una asociación estadísticamente significativa con RPc (tabla 9).

Análisis univariante	Odds Ratio	Intervalo Confianza	p-value
Edad	1,01	0,96-1,05	0,72
Sexo	3,55	0,42-30,01	0,25
cTNM	3,25	0,66-15,87	0,15
Hidronefrosis	0,54	0,23-1,26	0,15
Tumor superficial previo	0,71	0,23-2,16	0,55
Esquema QNA	0,69	0,06-7,08	0,76
Morfología histología urotelial	4,20	0,55-32,07	0,17
Invasión linfovascular	0,53	0,14-2,05	0,37
Taxonomía o cluster	0,20	0,06-0,68	0,01

Tabla 9. Análisis univariante para variables clínicas, patológicas y taxonómicas. Se muestra el odds ratio, intervalo de confianza y el p-value para cada una de ellas.

El porcentaje de RPc para los tumores *BASQ* se correspondió con el 40,91% de los casos, para los luminales con el 34,21% y para los mixtos sólo con el 13,33%.

6.5. Normalización y transformación logarítmica de la expresión del ARN.

Pese a seguir todas las recomendaciones y protocolos de *Nanostring®*, se realizaron comprobaciones adicionales para dar mayor validez y robustez a los resultados obtenidos:

- se utilizó una muestra control (correspondiente al paciente codificado como 16C) en el mismo pase de lectura repetido 7 veces y se obtuvieron prácticamente los mismos resultados, con una desviación menor a 0,01.

- para cada lectura se utilizó una misma muestra control, con diversos ARNm negativos (ARNm no humano con el que no se esperaba ninguna hibridación) y diversos ARNm positivos (con los cuales si que se esperaba hibridación).

- para los ARNm positivos se utilizaron muestras con una dilución proporcional y se obtuvo una relación logarítmica proporcional en línea recta.

Tras la cuantificación del ARNm extraído, se procedió al análisis mediante *Nanostring*® de la expresión de los 41 genes seleccionados previamente (Tablas 5, 6, 7 y 8). Se utilizaron 4 genes constituyentes o *housekeeping* que se expresaban de forma constante en el tejido (β -actina, GAPDH, HPRT1 y LDHA). Se obtuvo una media geométrica de expresión del ARNm de forma relativa a dichos genes constituyentes. Todos los resultados crudos con medias geométricas inferiores a 300 fueron eliminados para poder obviar factores de confusión, ya que no se podía asegurar si ese gen en cuestión estaba escasamente expresado o correspondía a una contaminación o a restos de sondas no hibridadas que podían permanecer después de haber realizado el lavado de las muestras.

Tras utilizar los controles negativos, los controles positivos y los genes endógenos, se descartaron aquellas muestras en las que todos sus valores eran inferiores a los controles negativos. Se registró un alto número de ceros (valores por debajo del control negativo de *Nanostring*®) sobre todo para el gen PD1, aunque también para FANCC e IFNG (tabla 10). De esta forma, dispusimos de 112 muestras válidas para el análisis con 40 genes incluidos, ya que desde el inicio se eliminó el gen PD1. Todos los valores de PD1, excepto el de un paciente, tenían valores por debajo de control negativo.

Posteriormente se optimizó el modo de normalizar los datos de expresión de *Nanostring*® siguiendo las guías *Gene Expression Data Analysis Guidelines*. Tras la normalización de la expresión se aplicó una transformación logarítmica para asegurar que nuestros datos siguieran una distribución normal. Este paso fue crucial para continuar con la regresión logística posterior y la selección de la firma con mayor capacidad predictiva

	% de ceros	N (Completa)	N (Parcial/No resp.)
PD1	99.10	1	0
FANCC	83.92	6	12
IFNG	83.03	9	10
TERT	78.57	9	15
PDL1	75.00	10	18

Tabla 10. Genes con mayor porcentaje de valores por *Nanostring*® inferiores al control negativo y número de pacientes con valores superiores según su respuesta al tratamiento.

Para verificar que los datos estuvieran correctamente normalizados, se realizó un *boxplot* de las réplicas correspondientes a los genes de normalización de 2 pacientes (16C y 25C) (Figura 29). Se observó que las réplicas tenían un coeficiente de variación muy bajo para cada gen constituyente (tabla 11).

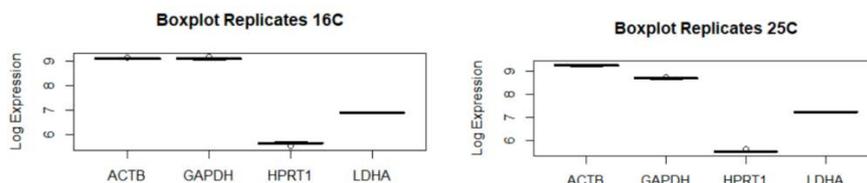


Figura 29. Boxplot de la expresión normalizada de los genes de normalización para la muestra 16C (7 réplicas) y la muestra 25C (6 réplicas). La dispersión para estas muestras prácticamente fue nula.

	ACTB	GAPDH	HPRT1	LDHA
16C	0,0032	0,0045	0,0107	0,0033
25C	0,0037	0,0041	0,0099	0,0018

Tabla 11. Coeficiente de variación de los genes de normalización para las réplicas 16C y 25C.

Se encontró una dispersión muy baja para los datos de expresión correspondientes a las 2 muestras seleccionadas (figura 30).

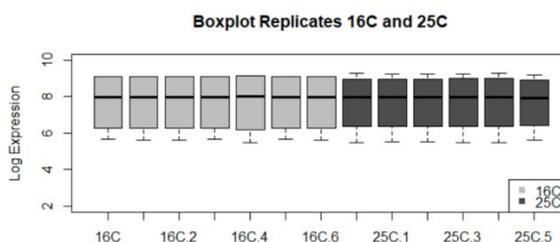


Figura 30. Boxplot de la expresión de los genes de normalización para cada una de las réplicas. Se observan perfiles de expresión similares en todas las réplicas de la muestra 16C y 25C.

6.6. Estrategia y análisis estadístico desarrollado para la firma predictiva de respuesta.

Se consideró la regresión logística multivariante para modelizar el riesgo de no RPc (los coeficientes positivos del modelo se asociaron a mayor riesgo de no respuesta). Se siguieron dos estrategias para la selección de variables y un proceso de validación cruzada para medir la capacidad predictiva de los modelos.

Inicialmente se siguió una estrategia multivariante (regresión logística con selección *stepwise*) para poder construir un modelo con variables clínicas y patológicas (modelo 1). A continuación, se realizó otro modelo que consideraba las variables clínicas, patológicas y de clasificación taxonómica (modelo 2).

Posteriormente se siguió una estrategia multivariante (regresión logística penalizada) tanto para el modelo clínico, patológico y genético sin considerar la clasificación taxonómica o *cluster* (modelo 3) y otro incluyéndola (modelo 4). Las regresiones penalizadas (*Lasso* y *elastic-net*) se utilizaron para identificar conjuntamente los marcadores de expresión asociados a la RPc.

Como se encontró que para los genes FANCC e IFNG también se observaban datos con valores de expresión inferiores al negativo, o iguales a 0, en un porcentaje superior al 80%, se realizó otro modelo que excluía dichos genes. Así, se construyeron los siguientes modelos a partir de lo anteriormente descrito:

- modelo 1: parámetros clínico-patológicos (sin *cluster*)
- modelo 2: parámetros clínico-patológicos + clúster
- modelo 3: parámetros clínico-patológicos (sin *cluster*) + genes
 - o modelo 3.1: eliminando PD1, FANCC e IFNG
 - o modelo 3.2: eliminando PD1
- modelo 4: parámetros clínico-patológicos + *cluster* + genes
 - o modelo 4.1: eliminando PD1, FANCC e IFNG
 - o modelo 4.2: eliminando PD1

De forma paralela, mediante *Lasso*, se determinaron tanto los parámetros de penalización como el número óptimo de genes a seleccionar por el modelo predictivo, que resultaron ser entorno a 9 genes (figura 31).

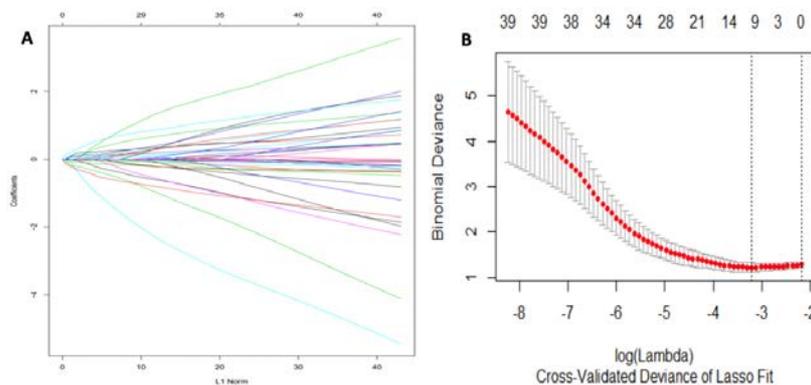


Figura 31. Gráficas penalización (A) y de Lasso (B) para calcular el parámetro de penalización lambda, así como el número de variables óptimo. (Lambda min = 0.0403, 9 variables).

Una vez se determinó el número óptimo de genes, se identificaron los mismos. Se realizó un cálculo de la capacidad predictiva mediante curvas ROC y el cálculo del área bajo la curva (AUC) para los seis modelos analizados (tabla 12).

Modelos		Variables	AUC	Genes seleccionados por Lasso
1	parámetros clínico-patológicos (sin clúster)	LV_INVASION, MORPHOLOGY, TNM_CLIINICAL_CAR	0.52	
2	parámetros clínico-patológicos + clúster	<i>MORPHOLOGY,</i> <i>HYDRONEPHROSIS,</i> <i>CLUSTER</i>	0.58	
3.1	parámetros clínico-patológicos (sin clúster) + genes (eliminando PD1, FANCC, IFNG)	LV_INVASION, MORPHOLOGY, TNM_CLIINICAL_CAR	0.642	RAD51, CXCL9, PARP, HERC2, 53BP1, ERCC2, RNF168, Ku80, ATR
3.2	parámetros clínico-patológicos (sin clúster) + genes (eliminando PD1)	LV_INVASION, MORPHOLOGY, TNM_CLIINICAL_CAR	0.637	RAD51, CXCL9, PARP, HERC2, 53BP1, IFNG, RNF168, ERCC2, ATR
4.1	parámetros clínico-patológicos + clúster + genes (eliminando PD1, FANCC, IFNG)	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, CLUSTER	0.663	RAD51, CXCL9, PARP, 53BP1, HERC2, ERCC2, CHEK1, Ku80, RNF168
4.2	parámetros clínico-patológicos + clúster + genes (eliminando PD1)	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	0.658	RAD51, CXCL9, PARP, HERC2, 53BP1, IFNG, FANCC, ERCC2, Ku80

Tabla 12. Modelos analizados y sus capacidades predictivas. Se destaca en negrita el modelo con mayor capacidad predictiva de respuesta.

La selección de las variables que forman parte de los modelos 1 y 2 se realizó a partir de la estrategia multivariante *stepwise*, mientras que para los modelos que incluyen las variables genéticas (3.1, 3.2, 4.1, 4.2) la selección se obtuvo a través del método *Lasso*. Para estos últimos también se realizó *elastic-net*, pero no se muestran resultados ya que la capacidad predictiva resultó ser menor.

El modelo 4.1 (clínico-patológico + *cluster* + genes, eliminando PD1, FANCC e IFNG) fue el modelo con mayor capacidad predictiva, por lo que para el posterior análisis de supervivencia se tomó como modelo óptimo.

En la tabla 13 se muestran los resultados mediante *stepwise* para el modelo clínico-patológico incluyendo el *cluster* seleccionado (modelo 2):

	Coeficiente estimación	Error estándar	z valor	p-valor
MORPHOLOGY1.Squamous	1.6555706	0.8743473	1.8934931	0.0582923
HYDRONEPHROSIS_2Yes	0.6981634	0.4700575	1.4852722	0.1374717
Cluster Luminal-like	0.9386268	0.5095680	1.8420051	0.0654744
ClusterMixed	2.2177103	0.6652584	3.3336072	0.0008573

Tabla 13. Modelo clínico-patológico + cluster (*stepwise*)

En la tabla 14 se muestran los genes seleccionados por el método *Lasso* para el modelo 4.1, según el porcentaje de selección de cada gen por las 100 iteraciones realizadas mediante *cross-validation*, así como las medias y medianas de expresión para cada uno. Para los genes con coeficiente negativo, mayor expresión se asoció con mayor probabilidad de respuesta, mientras que para los genes con coeficiente positivo la asociación fue en sentido inverso.

	Lasso		Mean		Median	
	%Sel	Coef	Compl	partial/noResp	Compl	partial/noResp
RAD51	92	-0.257	0.976	0.569	0.00	0.00
CXCL9	88	-0.108	4.748	3.606	5.25	4.02
PARP	70	-0.198	5.716	5.483	5.70	5.71
53BP1	51	0.102	5.206	5.618	5.60	5.68
HERC2	51	0.149	5.514	5.816	5.54	5.74
ERCC2	44	0.099	2.944	3.375	3.63	3.59
CHEK1	37	-0.078	3.724	3.404	4.00	3.84
Ku80	37	-0.339	7.379	7.335	7.42	7.24
RNF168	33	0.105	3.910	4.255	4.60	4.57

Tabla 14. Coeficientes de los genes seleccionados tras el análisis mediante *Lasso*. La tabla describe el porcentaje de selección en *Lasso*, el coeficiente e incluye la media y la mediana de la expresión de cada gen para cada grupo de respuesta al tratamiento: Mean: media; Median: mediana; %Sel: porcentaje de selección; Coef: coeficiente; Compl, respuesta completa; partial/noResp: respuesta parcial o no respuesta al tratamiento.

La variable única que contenía la información clínica, patológica y de taxonomía se seleccionó en el 100% de los casos por dicha metodología y no se muestra en la tabla. Las diferencias en la expresión de estos genes respecto a los pacientes con R_{Pc} y los que no respondieron o lo hicieron parcialmente se pueden observar en la figura 32. Se debe considerar que *Lasso* realiza una estrategia de selección conjunta multivariante, a diferencia

de la estrategia univariante, por los que las diferencias individuales resultan menores y su mayor valor reside en el aporte conjunto.

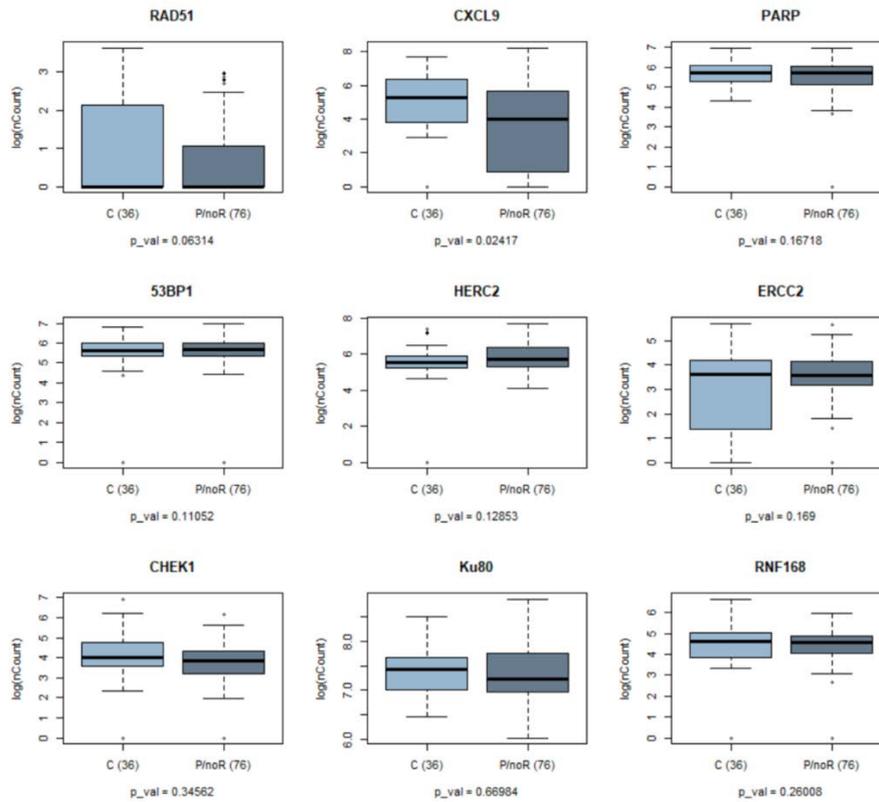


Figura 32. Boxplot del logaritmo de la expresión genética de los genes seleccionados por Lasso. En claro están aquellos pacientes con R_{Pc} y en oscuro, los pacientes con respuesta parcial o sin respuesta. Entre paréntesis se muestra el número de muestras que contiene cada grupo para cada gen (n). Debajo de cada gráfico se especifica el p-valor obtenido en el análisis univariante.

Se estimó la capacidad predictiva mediante el cálculo del área bajo la curva ROC (AUC). Inicialmente se calculó el AUC para las variables clínicas y patológicas seleccionadas por el modelo 2 (morfología e hidronefrosis), resultando un AUC=0.52. Cuando se añadió la información de taxonomía, el AUC aumentó a 0.58. Con los 9 genes añadidos el AUC fue de 0,663. No obstante, se calculó el AUC para cada gen, añadiéndose éstos hasta llegar a los 9 genes siguiendo el orden de selección. Así se pudo valorar la capacidad predictiva cada vez que añadía un gen (figura 33).

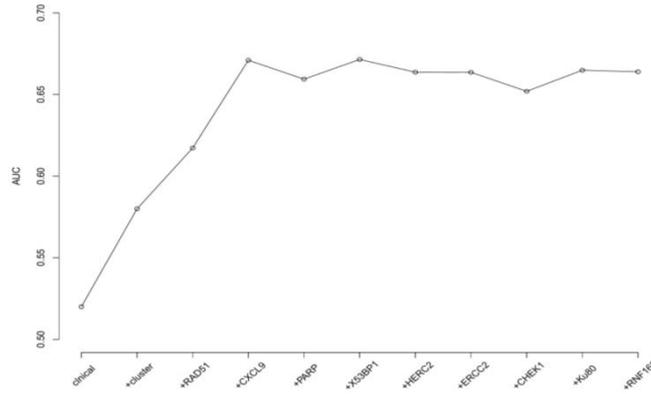


Figura 33. Incremento de la capacidad predictiva de R_{Pc}. El primero modelo (clinical) pertenece al modelo clínico y patológico. El segundo modelo (+cluster) añade la variable de taxonomía. Posteriormente se añaden la información de los genes uno a uno.

Se observó que el mayor incremento de la capacidad predictiva se consiguió ya con los dos primeros genes seleccionados por *Lasso* (RAD51 y CXCL9), con un AUC=0.671. La suma de los genes siguientes en la clasificación según la selección no fue capaz de aumentar la capacidad predictiva (tabla 15).

	AUC
Clinical (MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS)	0.52
+CLUSTER	0.58
+RAD51	0.617
+CXCL9	0.671
+PARP	0.659
+53BP1	0.671
+HERC2	0.664
+ERCC2	0.664
+CHEK1	0.652
+Ku80	0.665
+RNF168	0.664

Tabla 15. Incremento de la capacidad predictiva (AUC) de R_{Pc} al añadir cada variable. Se obtiene la máxima capacidad predictiva con 2 genes (RAD51 y CXCL9) y también con 4 genes (RAD51, CXCL9, PARP y 53BP1).

6.7. Análisis univariante genético.

En el análisis univariante, incluyendo los 38 genes que mostraron un nivel de expresión de ARN igual a 0 en menos del 80% de las muestras, sólo CXCL9 se asoció con R_{Pc} de forma estadísticamente significativa ($p=0,024$). No obstante, RAD51 mostró una tendencia a alcanzar también resultados estadísticamente significativos ($p=0,063$). El análisis con la totalidad de genes se muestra en la tabla 16.

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
53BP1	0.274	0.172	1.596	0.111
ATM	0.045	0.122	0.370	0.711
ATR	0.325	0.316	1.028	0.304
Axl	-0.098	0.142	-0.686	0.493
BRCA1	-0.083	0.127	-0.651	0.515
BRCA2	-0.079	0.123	-0.641	0.522
CHEK1	-0.121	0.128	-0.943	0.346
CHEK2	-0.016	0.121	-0.135	0.892
CXCL9	-0.209	0.093	-2.254	0.024
ERCC1	0.212	0.248	0.856	0.392
ERCC2	0.177	0.129	1.375	0.169
ERCC5	0.057	0.133	0.425	0.671
ERCC6	-0.035	0.142	-0.247	0.805
FANCA	-0.033	0.131	-0.252	0.801
FANCD2	0.032	0.119	0.272	0.786
FOXA1	0.105	0.080	1.310	0.190
GATA3	-0.007	0.093	-0.080	0.936
HERC2	0.359	0.236	1.520	0.129
KRT14	-0.037	0.056	-0.667	0.505
KRT5/6	0.016	0.060	0.259	0.795
Ku80	-0.170	0.399	-0.426	0.670
LAG3	-0.090	0.107	-0.848	0.396
NBN	0.000	0.109	-0.004	0.997
PALB2	-0.027	0.124	-0.220	0.826
PARP	-0.440	0.319	-1.381	0.167
PDL1	-0.096	0.146	-0.660	0.509
POL theta	-0.027	0.112	-0.242	0.809
PTIP	0.004	0.117	0.034	0.973
RAD50	0.074	0.109	0.675	0.500
RAD51	-0.343	0.185	-1.858	0.063
REV7 (MAD2L2)	0.105	0.112	0.937	0.349
RNF168	0.146	0.129	1.126	0.260
RNF8	-0.073	0.161	-0.454	0.650
RON	0.052	0.100	0.514	0.607
Rif1	0.050	0.151	0.334	0.739
TERT	-0.186	0.150	-1.240	0.215
c-Met	0.000	0.137	0.002	0.998
eIF3a	0.079	0.154	0.514	0.607

Tabla 16. Modelo univariante de cada uno de los 38 genes con la variable R_{Pc}.

De los pacientes con una expresión superior a la media para RAD51, la tasa de R_{Pc} fue del 37,84% respecto al 29,3% con una expresión inferior. Para CXCL9, el porcentaje de R_{Pc} fue del 42,42% para los pacientes con expresión superior y del 27,84% para la inferior.

6.8. Análisis de supervivencia según la respuesta.

Se analizó la relación entre la R_{Pc} y la respuesta incompleta o la no respuesta mediante curvas de *Kaplan-Meier*, se compararon los grupos aplicando un *Log-rank test* para:

- SLP
- SG
- SCE

6.8.1. Supervivencia Libre de Progresión.

La RPc se asoció a mayor SLP de forma estadísticamente significativa ($p=0.001$). La SLP a 5 años para los pacientes con RPc alcanzó prácticamente el 95% mientras que para los no respondedores fue inferior al 35% (figura 34).

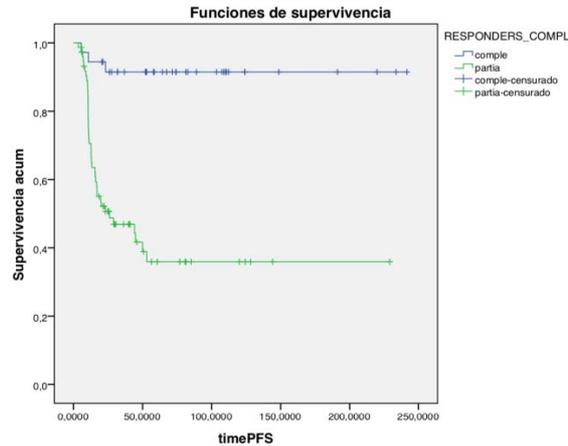


Figura 34. La RPc se asoció a mayor SLP de forma estadísticamente significativa ($p=0.001$). En azul se muestran los pacientes con RPc y en verde los que no presentaron respuesta o fue parcial.

6.8.2. Supervivencia Global.

La RPc también se asoció a mayor SG de forma estadísticamente significativa ($p=0.001$). La SG a 5 años para los pacientes con RPc se situó entorno al 85% mientras que para los no respondedores fue inferior al 25% (figura 35).

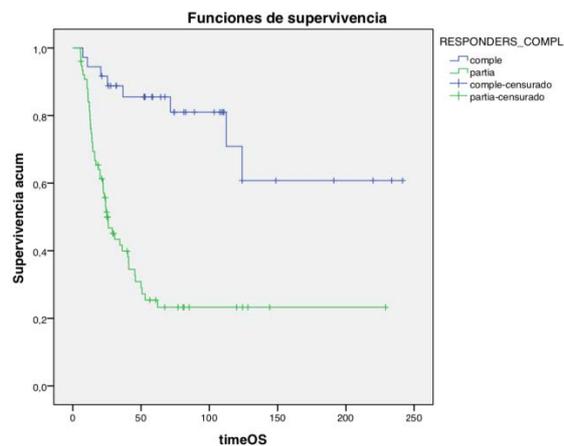


Figura 35. La RPc se asoció a mayor SG de forma estadísticamente significativa ($p=0.001$). En azul se muestran los pacientes con RPc y en verde los que no presentaron respuesta o fue parcial.

6.8.3. Supervivencia Cáncer Específica.

Por último, la RPc se asoció a mayor SCE significativamente ($p=0.001$). La SCE a 5 años para los pacientes con RPc también alcanzó prácticamente el 95% mientras que para los no respondedores fue inferior al 38% (figura 36).

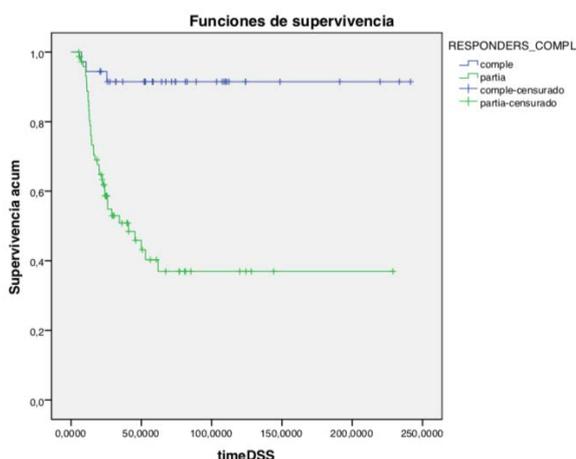


Figura 36. La RPc se asoció a mayor SCE de forma estadísticamente significativa ($p=0.001$). En azul se muestran los pacientes con RPc y en verde los que no presentaron respuesta o fue parcial.

6.9. Análisis de supervivencia para la firma seleccionada.

Se estudiaron las curvas de supervivencia en función de las variables seleccionadas por el modelo 4.1 con mayor predicción mediante las curvas de *Kaplan-Meier* y se compararon los grupos aplicando el *Log-rank test*.

Se comparó el modelo clínico, patológico y de taxonomía con el incremento de la información que aportaba cada gen para poder evaluar la discriminación que añadía cada uno de los genes sobre la SLP, SG y SCE. Para ello, se estudiaron una totalidad de 10 modelos (tabla 17).

Modelo	Variables clinico-patologicas	Genes
CPT	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, CLUSTER	NA
CPT+1 gen	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, CLUSTER	RAD51
CPT + 2 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, CLUSTER	RAD51 +CXCL9

CPT + 3 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	RAD51 +CXCL9 +PARP
CPT + 4 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	RAD51 +CXCL9 +PARP +X53BP1
CPT + 5 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	RAD51 +CXCL9 +PARP +X53BP1 +HERC2
CPT + 6 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	RAD51 +CXCL9 +PARP +X53BP1 +HERC2 +ERCC2
CPT + 7 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	RAD51 +CXCL9 +PARP +X53BP1 +HERC2 +ERCC2 +CHEK1
CPT+ 8 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	RAD51 +CXCL9 +PARP +X53BP1 +HERC2 +ERCC2 +CHEK1 +Ku80
CPT + 9 genes	MORPHOLOGY, HYDRONEPHROSIS, <i>CLUSTER</i>	RAD51 +CXCL9 +PARP +X53BP1 +HERC2 +ERCC2 +CHEK1 +Ku80 +RNF168

Tabla 17. Modelos según inclusión de información clínica, patológica y de taxonomía (CPT) así como la adición de genes por orden de selección mediante Lasso.

Se crearon dos grupos de pacientes según si estaban por encima o por debajo de la mediana de la puntuación o *score* de predicción de R_{Pc} de la firma:

- *Firm1*: pacientes con valores clínicos, patológicos, taxonómicos y genéticos favorables para R_{Pc} [*score* < mediana]
- *Firm2*: pacientes con valores clínicos, patológicos, taxonómicos y genéticos desfavorables para la respuesta al tratamiento [*score* > mediana]

Se estimaron las curvas de supervivencia *Kaplan-Meier* y el *Log-rank test* (figuras 37, 38 y 39) según los dos grupos de pacientes y cada modelo para:

- SLP
- SG
- SCE

6.9.1. Supervivencia Libre de Progresión.

En el análisis de la SLP no se alcanzó una significación estadística en ninguno de los modelos. El modelo más cercano a la significación correspondió al de los 9 genes ($p=0,056$) y la firma con 3 genes se quedó relativamente cercana ($p=0,059$). La SLP a 5 años de los pacientes con una firma favorable con la inclusión de 3 genes se situó entorno al 63%, mientras que para la firma desfavorable fue del 50%.

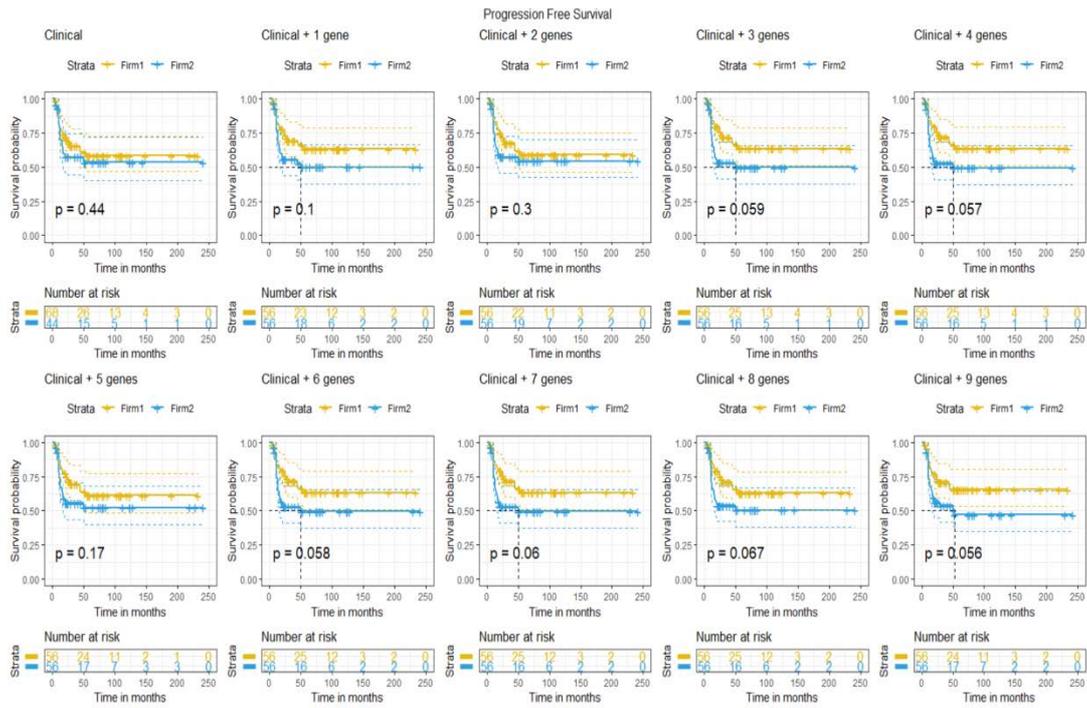


Figura 37. Curvas Kaplan-Meier para Supervivencia Libre de Progresión (SLP) de pacientes de cáncer de vejiga para cada modelo. El color amarillo representa pacientes con una firma favorable, mientras que el color azul representa pacientes con firma desfavorable.

6.9.2. Supervivencia Global.

Se calculó la asociación de la firma clínica, patológica y de taxonomía con la SG y posteriormente se fue calculando la asociación añadiendo los genes uno a uno. La mayor significancia estadística se obtuvo con 7 genes ($p=0,0058$), pese a que con 3 genes ya se logró la misma ($p=0,01$). La SG a 5 años de los pacientes con una firma favorable con la inclusión de 3 genes se situó entorno al 70%, mientras que para la firma desfavorable fue inferior al 37%.

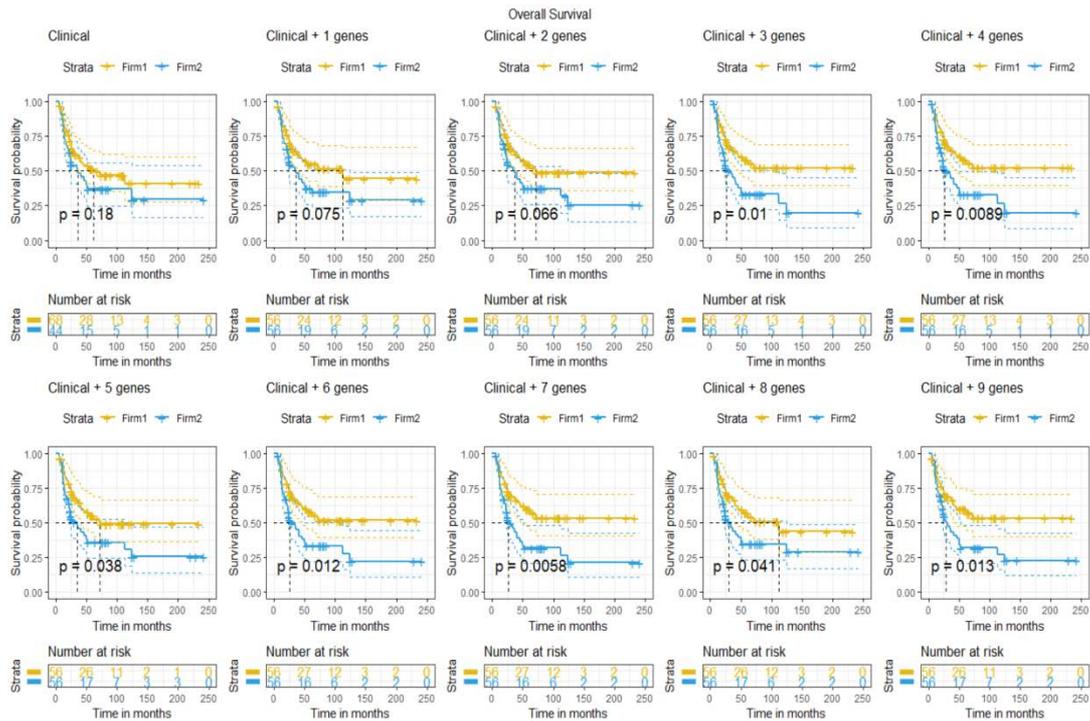


Figura 38. Curvas Kaplan-Meier para Supervivencia Absoluta (SG) de pacientes de cáncer de vejiga según cada firma. El color amarillo representa pacientes con una firma favorable, mientras que el color azul representa pacientes con firma desfavorable.

6.9.3. Supervivencia Cáncer Específica.

Para la SCE, la mayor significancia estadística se alcanzó con los 9 genes ($p=0,026$), pero con 3 genes también se logró la misma ($p=0,033$). La SCE a 5 años de los pacientes con una firma favorable con 3 genes se situó entorno al 70%, mientras que para la firma desfavorable fue inferior al 50%.

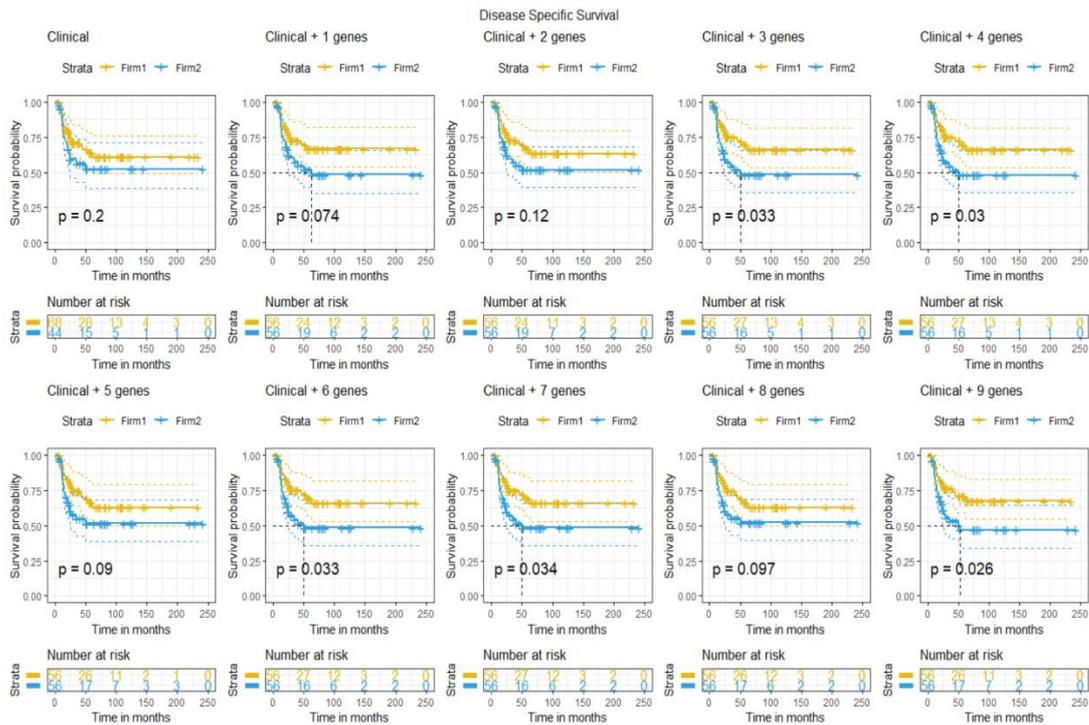


Figura 39. Curvas Kaplan-Meier para Supervivencia Específica de Enfermedad (SCE) de pacientes de cáncer de vejiga, estratificado por cada firma. El color amarillo representa pacientes con una firma favorable, mientras que el color azul representa pacientes con una firma desfavorable.

En resumen, en las gráficas se observó un incremento en la discriminación entre los dos grupos de pacientes cuando se añadió la información que aportaban los genes. El modelo con los primeros 3 genes añadidos (RAD51 + CXCL9 +PARP) obtuvo la mayor discriminación con un menor número de genes incorporados al análisis. El p-value del *Log-rank test* fue significativo para SG y SCE.

7. Discusión

7. Discusión.

El cáncer de vejiga representa en España y en Cataluña un importante problema de salud tanto por su morbilidad como por su mortalidad.

El tratamiento de referencia para los pacientes con CVMI es la cistectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral, pero hasta un 50% de los pacientes morirán por la enfermedad debido a la presencia de enfermedad metastásica a nivel microscópico no detectada en el momento del diagnóstico (63).

En otros cánceres, como el de mama o el de pulmón, el valor de la QNA está bien establecido, con una clara mejoría en supervivencia. Sin embargo, en el tumor vesical el beneficio demostrado es modesto. El estudio de la *EORTC/MRC* demostró un beneficio en supervivencia a 5 años del 6% con el esquema *CMV* (85). El estudio *SWOG* demostró un beneficio con una reducción del riesgo de mortalidad del 25% con el esquema *MVAC* (87). Posteriormente, diversos metaanálisis mostraron una mejoría absoluta en supervivencia a 5 años entre el 5 y el 8% (88) (89) (90).

Los pacientes con uno o varios factores pronósticos clínicos y patológicos desfavorables deberían poder identificarse como de alto riesgo, por lo que podrían considerarse candidatos a obtener mayor beneficio del tratamiento con QNA. Pese a ello, los parámetros clínicos y patológicos no son capaces de realizar una predicción adecuada de respuesta al tratamiento. El conocimiento genómico y molecular ha generado una gran cantidad de hipótesis que podrían impactar en el manejo del CVMI (160). A pesar de estos avances, se precisa mejorar la identificación de los pacientes que vayan a responder y los que no, especialmente con el advenimiento próximo de la inmunoterapia (197). Esta necesidad es todavía más obvia para la QNA, donde el riesgo de progresión tumoral en personas que no responden sigue subrayando un enfoque cauteloso para su aplicación. Pese a las evidencias, la QNA basada en cisplatino puede que todavía no sea el tratamiento estándar habitual en algunas instituciones. En los últimos años se ha incrementado su utilización, pero el porcentaje de pacientes que realizan QNA previa a la cistectomía por CVMI no supera el 21% (100) (101). Las razones pueden deberse tanto a su toxicidad como al impacto negativo que puede representar retrasar la cistectomía en pacientes que no vayan a responder. También contribuye la ausencia de marcadores predictivos validados para su identificación, como podrían ser los moleculares de taxonomía y los genéticos (92) (91).

En nuestro estudio hemos analizado de forma retrospectiva un total de 213 pacientes con CVMI hasta agosto del 2014 en dos hospitales: *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* de Badalona y *Fundació Althaia* de Manresa. La inmensa mayoría (94,37%) fueron tratados con QNA y posterior cistectomía. La mayor proporción correspondía a varones (92,49%), similar a la proporción informada para incidencia a nivel global (1). La media de edad fue de 64,72, cercana a los 67 años descrita mundialmente (6). Se administró QNA basada en cisplatino en la mayoría (88,15%). La utilización de esquemas quimioterápicos con GC han demostrado una eficacia equivalente a otros esquemas que incluyen cisplatino, metrotexato y vinblastina, pero con una toxicidad menor (220). El 30,33% recibió el esquema *CMV* y el 57,82% GC. Una menor proporción (11,85%) recibió carboplatino u otro esquema debido principalmente a un estado general subóptimo. El objetivo de la QNA fue tener el mayor impacto positivo tanto en RPc como en supervivencia. Pese a que la mayor evidencia corresponde a los esquemas de QNA basados en cisplatino, otros esquemas de QNA, como los que incluyen carboplatino, también han demostrado beneficio, por lo que se han incluido en el estudio (221).

La QNA se recomienda con el mayor nivel de evidencia para los pacientes estadiados como T2-4aN0M0. No obstante, en pacientes con CVMI y afectación linfática regional, se ha demostrado mayor SG a 5 años para esquemas terapéuticos que combinan QNA y tratamiento quirúrgico (31%) sobre otros esquemas que utilizan exclusivamente tratamiento quimioterápico (14%) o quirúrgico (19%) (222). En nuestro estudio, se incluyeron en el análisis pacientes estadiados clínicamente como >N1M0 y con buen estado general. Posteriormente, se constató una respuesta clínica a la QNA basada en cisplatino mediante TC. La respuesta de la afectación ganglionar regional supuso que se siguiera con el esquema terapéutico quirúrgico, el cual constituye la práctica clínica habitual en la mayoría de los centros.

En 112 pacientes se pudieron analizar la totalidad tanto de las variables clínicas, patológicas y de clasificación taxonómica, así como de expresión de ARN de genes implicados en la reparación del ADN, en la propia clasificación taxonómica, en dianas terapéuticas y en respuesta inmune. Las razones principales de no disponer de la totalidad de los datos de los 101 pacientes restantes fueron no disponer del tejido de la RTU o que el material fuera insuficiente o que no se hubieran podido realizar la cistectomía por progresión de la enfermedad o mal estado general. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo de pacientes que no se incluyó en el estudio para la firma y el

que sí se incluyó, para ninguna de las variables clínicas o patológicas. De esta manera se pudo descartar razonablemente que existiera un sesgo de selección asociado.

Del grupo de 112 pacientes en el que se dispuso de la totalidad de las variables, la proporción de RPc fue del 32,14 % y la respuesta parcial o no respuesta fue del 67,86%. Ello sugiere que casi un tercio de los pacientes obtuvieron el mayor beneficio de la QNA y consiguieron así el mayor impacto positivo en supervivencia (87). Nuestro objetivo fue construir una firma que permitiera aumentar la capacidad predictiva de RPc, de esta manera se podría identificar la subpoblación de pacientes que obtiene mayor beneficio para la QNA basada en cisplatino

Disponiendo de la información clínica y patológica de la RTU, se podría disponer con cierta celeridad tanto de la información de clasificación taxonómica por IHQ como de la expresión de ARN mediante la tecnología adecuada. Así se obtendría una firma predictiva conjunta para RPc que se podría implementar en la práctica clínica.

Para poder realizar un análisis integrado de las variables clínicas y patológicas junto con las moleculares se requerían estrategias estadísticas de modelización. Los datos clínicos y patológicos tienden a explicar la mayor parte de la variación de los rasgos relacionados con la enfermedad, requiriendo una interpretación o una evaluación previa. La integración del conjunto de los datos debe tener en cuenta la naturaleza y la heterogeneidad de las variables clínicas y patológicas, así como la precisión y el alto rendimiento de los datos moleculares. También se deben considerar otros aspectos como la existencia de relaciones o interacciones entre los datos y la presencia de sesgos de verificación. El modelado conjunto, incluyendo los datos moleculares, es crucial para poder calcular la capacidad predictiva de respuesta. Pocos estudios publicados hasta la fecha realizan una integración real de los datos moleculares junto con los clínicos y/o patológicos. La mayoría de estos estudios están relacionados con la predicción de resultados oncológicos en base a la integración de datos obtenidos mediante expresión de ARN (223).

La integración es compleja ya que se tratan datos de naturaleza muy diferente. Los datos clínicos o patológicos suelen ser más heterogéneos entre sí y de una dimensión menor. Las escalas de las variables clínicas o patológicas son muy diferentes a las genéticas. Para el análisis de las variables genéticas, la metodología está más estandarizada y además se trata de variables más homogéneas entre sí.

Existen diferentes estrategias de modelización estadística para integrar dichas variables en un mismo modelo (figura 40):

- modelización independiente: se evalúan e identifican de forma independiente tanto las variables clínicas y patológicas como las genéticas que están asociadas a la respuesta a cisplatino. Se trata de la estrategia más simple y también la más utilizada habitualmente, pero no la óptima ya que no tiene en cuenta posibles correlaciones que puedan tener entre sí diferentes variables clínicas, patológicas o moleculares.
- modelización condicional: primero se construye un modelo clínico y patológico, identificando aquellas variables que se relacionan con la respuesta a cisplatino. De esta manera se prioriza esta información en una única variable, que será la puntuación correspondiente a la información no molecular, o *non-omic score*, y que ya puede aportar cierta capacidad predictiva sobre la respuesta. Posteriormente esta variable de puntuación se combina con la información que aportan los genes. Se identifican y se seleccionan aquellos genes que aumentan la capacidad predictiva del modelo clínico y que permiten una mejor discriminación. Esta ha sido la estrategia que se ha seguido en nuestro estudio, añadiendo previamente como *non-omic score* la información de taxonomía dada su naturaleza cualitativa nominal.
- modelización conjunta: se mezclan tanto las variables clínicas como las genéticas en un mismo modelo y se seleccionan aquellas que están relacionadas con la respuesta a cisplatino. Se trata de una estrategia compleja ya que la escala de medida de los dos tipos de variables es muy diferente. Pese a que podría ser la estrategia con mayor integración, pueden entrar en competencia los dos tipos de variables y que desaparezcan variables clínicas que están claramente relacionadas, razón por la cual no se ha seguido dicha estrategia en el presente estudio.

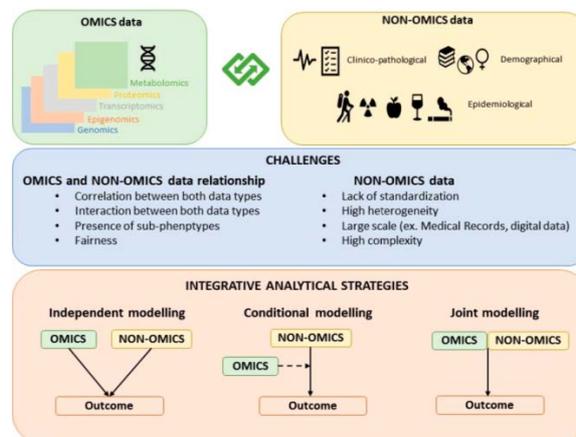


Figura 40. Clasificación de las estrategias a seguir para la integración de datos moleculares (omics) y clínicos o patológicos (non-omics) (223).

Siguiendo la estrategia de modelización condicional, primero se seleccionaron las variables clínicas y las patológicas. Dado que la variable RPC era binaria se planteó una regresión logística. Para poder identificar estas variables se siguió la metodología *stepwise selection* que consiste en probar todas las combinaciones posibles de las variables y seleccionar el modelo con menor error y mayor capacidad predictiva. Esta metodología se puede utilizar cuando el número de variables a analizar es pequeño, como era el caso de las 8 variables clínicas y patológicas o de las 9 si se incluye la de taxonomía. Esta metodología no resultaría válida si posteriormente la quisiéramos aplicar a un número mayor, como correspondería a los 41 genes seleccionados para el análisis de nuestro estudio.

Las variables que incluía el primer modelo clínico y patológico correspondían a la invasión linfovascular, histología (diferenciación urotelial escamosa) y TMN clínico (tabla 18). Si los pacientes presentaban una puntuación positiva y elevada significaba que tenían un mayor riesgo de no respuesta al tratamiento. Si la puntuación era negativa y menor significaba que tenían una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento.

	Coefficiente estimación	Error estándar	z valor	p-valor
LV_invasion_2Yes	1.2508127	0.7171229	1.7442096	0.0811226
MORPHOLOGY1.Squamous	0.9788039	0.8123652	1.2048817	0.2282490
TNM_clinical_cat T2	-1.5059357	0.6418732	-2.3461576	0.0189681

Tabla 18. Modelo clínico y patológico seleccionado por *stepwise*, con el coeficiente de estimación, error estándar, valor z y p-valor

La única variable que presentaba una asociación estadísticamente significativa fue el TNM clínico con estadiaje T2 ($p=0,019$). En la literatura todavía existen discrepancias entre el estadio clínico y el patológico, con cifras de sobre estadiaje e infra estadiaje del 42% y del 22%, respectivamente (224). Hasta un 66% de los pacientes con estadio pT2 pueden estar incorrectamente estadiados, con un 42% de sobre estadiaje tras la cistectomía. Además hasta un 40% de los CVNMI estadiados como tal pueden resultar CVMI estadio pT2 o superior (33). Por otro lado, hasta el 5-15% de los pacientes a los que se les ha practicado una RTU pueden presentar un pT0 en la pieza de cistectomía sin haber recibido QNA. Las técnicas de imagen actuales no permiten la identificación de micrometástasis y hasta un 25% de los pacientes con CVMI tienen afectación linfática ganglionar en el momento de la cistectomía (225). En nuestro estudio, los pacientes que se estadiaron clínicamente mediante TC como T2N0M0 (8,93%) se asociaron a RPC (coeficiente =-0,106 de asociación con la RPC) respecto a los que presentaban estadios más avanzados. No obstante, en la

clínica no se puede establecer ninguna predicción de respuesta basándose en el estadiaje clínico, ya que además presenta un porcentaje elevado de discrepancias con el patológico.

Pese a que la variable de invasión linfovascular no resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,081$), fue seleccionada por *stepwise* para el modelo clínico y patológico conjunto. La presencia de invasión linfovascular en el momento del diagnóstico de la RTU se ha asociado a peor pronóstico (123). Sin embargo, su papel como factor pronóstico es controvertido en algunos estudios, debido a la falta de estandarización para su evaluación y a la validación insuficiente en estudios prospectivos (226). Hasta un 60% de los pacientes con enfermedad localizada (T2) pueden presentar invasión linfovascular en la RTU en el momento del diagnóstico y presentar un pronóstico similar a los pacientes con estadio T3-4, lo que sugiere que la invasión linfovascular podría identificar un grupo de pacientes de aparente menor riesgo pero con peor pronóstico (227). En nuestro estudio la presencia de invasión linfovascular estaba presente en el 12,5% de los casos, y el coeficiente de asociación a no RPC fue del 1,281. Por ello, pese a que la invasión linfovascular puede indicar peor pronóstico, aún no puede establecerse como marcador predictivo de respuesta.

La variable de morfología histológica de carcinoma urotelial con diferenciación escamosa, que correspondía tan sólo al 10,71% de los pacientes, también resultó ser seleccionada pese a no alcanzar la significación estadística ($p= 0.228$) y se relacionó con no RPC (coeficiente= 0.979).

No obstante, la capacidad predictiva de RPC según el modelo que incluía sólo las variables clínicas y patológicas fue muy bajo (AUC=0,52). Para mejorar la capacidad predictiva se añadió la variable de taxonomía y se recalculó mediante *stepwise* el mejor modelo predictivo que se relacionaba con la variable RPC (tabla 19).

	Coficiente estimación	Error estándar	z valor	p-valor
MORPHOLOGY1.Squamous	1.6555706	0.8743473	1.8934931	0.0582923
HYDRONEPHROSIS_2Yes	0.6981634	0.4700575	1.4852722	0.1374717
Cluster Luminal-like	0.9386268	0.5095680	1.8420051	0.0654744
Cluster Mixed	2.2177103	0.6652584	3.3336072	0.0008573

Tabla 19. Modelo *stepwise* incluyendo la variable de taxonomía junto a las clínicas y patológicas.

Nuevamente también fue seleccionada por el modelo con mayor capacidad predictiva la variable de morfología histológica de carcinoma urotelial con diferenciación escamosa ($p=0,058$, esta vez más cercana a la significación estadística). El coeficiente

correspondiente fue de 1,656 de asociación a no RPc. Se ha publicado que el carcinoma urotelial con diferenciación escamosa presenta una menor proporción de RPc o respuesta parcial respecto al carcinoma urotelial puro, por lo que es menos sensible a la QNA basada en cisplatino y se asocia a un peor pronóstico (228). La probabilidad de presentar RPc tras QNA basada en cisplatino es hasta 11 veces superior para el tumor urotelial puro que para otras variantes histológicas como la diferenciación escamosa. No obstante, otros trabajos también han observado que variantes como el carcinoma urotelial con diferenciación escamosa o glandular presentan respuestas patológicas similares al carcinoma urotelial puro (132), por lo que se sigue dando soporte a la utilización de la QNA con cisplatino en pacientes con variantes uroteliales con diferenciación escamosa, sin que se pueda establecer como factor predictivo de respuesta al tratamiento.

En este modelo también emergió como variable seleccionada la presencia de hidronefrosis, pese a no resultar estadísticamente significativa ($p=0,137$). La presencia de hidronefrosis correspondió al 40,18% de los pacientes del estudio y se asoció a no respuesta (coeficiente=0,698). La incidencia de hidronefrosis preoperatoria en pacientes con cáncer de vejiga varía desde el 7% al 54%. La hidronefrosis ha sido identificada como factor predictor independiente de enfermedad más avanzada y se ha asociado a peor pronóstico (126). La presencia de hidronefrosis preoperatoria se ha asociado a peores resultados en pacientes con CVMI que se someten a cistectomía radical y podría predecir la existencia de enfermedad a nivel extra vesical y/o afectación linfática. La detección de la presencia de hidronefrosis podría ser de utilidad para seleccionar a los pacientes candidatos a QNA, pero no se puede establecer claramente su valor predictivo (229).

Al añadir la información de taxonomía, identificada mediante IHQ y considerada como variable cualitativa nominal, al modelo clínico y patológico el poder predictivo se incrementó cuando se calculó mediante *stepwise* ($AUC=0,58$). De esta manera se observó que la información taxonómica podía aportar información predictiva adicional. Además, en el análisis univariante fue el único parámetro que mostró una asociación estadísticamente significativa para RPc, mientras que el resto de las variables clínicas y patológicas no la logró.

La mejor comprensión de la heterogeneidad molecular del CVMI ha permitido identificar varios subtipos de tumores y realizar diversas clasificaciones según su taxonomía (157). Se ha alcanzado un consenso sobre la existencia de un subtipo *BASQ* (161), inicialmente definido mediante transcriptómica, pero que también puede ser identificado de manera

fiable mediante IHQ. Este subtipo se puede caracterizar por la expresión elevada de KRT5/6 y KRT14 y baja de GATA3 y FOXA1 (230).

En nuestro estudio se realizó el análisis de la información taxonómica, identificada previamente mediante IHQ en el CNIO, como variable cualitativa nominal y se consideró como un dato *non-omic*. La clasificación taxonómica se seleccionó por el modelo que la incluía y se observó un incremento en la capacidad predictiva (AUC=0.58). Los análisis de expresión de ARNm mostraron coeficientes de correlación altamente significativos para GATA3, FOXA1 y KRT14 y una buena correlación para KRT5/6. No obstante, se observó que si no se incluía la información taxonómica identificada mediante IHQ en el modelo *non-omic*, el modelo predictivo sólo con variables clínicas, patológicas y genéticas no escogía ninguno de los 4 genes relacionados con taxonomía en los 9 genes seleccionados como óptimos por el método Lasso. Una posible explicación correspondería a que, pese existir una elevada correlación entre los 4 marcadores de IHQ y su expresión de ARN, esta no resultó ser del todo homogénea. Ello implicaría menor robustez sobre la clasificación taxonómica. También debe tenerse en cuenta la competencia entre las diferentes variables de expresión. Si la variable de taxonomía se considera como un dato *omic* según la expresión de ARN, puede suponer que el propio método *Lasso* la descarte frente a las demás variables.

Pese a que los subtipos taxonómicos inicialmente se definieron mediante análisis transcriptómicos, también se han podido identificar de forma fiable por IHQ, metodología que se empleó en nuestro estudio (158) (159). La combinación de las técnicas de IHQ utilizadas en este trabajo pueden ser aplicadas por la mayoría de los servicios de anatomía patológica, facilitando así su traducción clínica.

En nuestra serie, pese a que no alcanzó la significación estadística ($p=0,655$), la variable *luminal-like* se correlacionó con peor respuesta (coeficiente=0,938). Más llamativa fue la variable de clasificación mixta (*mixed*), que se relacionó todavía de forma más intensa con respuesta incompleta o no respuesta (coeficiente=2,218) y además resultó alcanzar la significación estadística ($p=0,009$). De hecho, el porcentaje de R_{Pc} dentro de los tumores mixtos fue tan sólo del 13,33% frente al 40,91% de los *BASQ*.

Los CVMI clasificados como *BASQ* son tumores con mayor agresividad, presentándose inicialmente como enfermedad más avanzada y con peor pronóstico (156). No obstante, el subtipo *BASQ* puede corresponder al grupo de pacientes que obtienen mayor respuesta a la QNA (231). Los tumores luminales tienden a responder peor al tratamiento con cisplatino. Los CVMI clasificados como mixtos presentan una peor respuesta a la QNA basada en

cisplatino y se podrían corresponder a los *p53-like* que son más resistentes a la quimioterapia (157). La subclasificación molecular de taxonomía del CMVI puede aportar un valor predictivo adicional de respuesta al cisplatino.

Mediante la metodología estadística de *stepwise* se calculó una puntuación en una única variable (*non-omic score*). Una vez dispusimos de toda esta información en una sola variable de puntuación, se añadió la información que nos aportaban los genes para valorar si se aumentaba la capacidad predictiva. Estudios previos han analizado la combinación de la información sobre taxonomía y los genes implicados en reparación del ADN para poder predecir la supervivencia de pacientes con CMVI tratados con QNA (232).

En nuestro estudio se plantearon dos estrategias de análisis para la selección de las variables de expresión genética:

- un análisis univariante: que consiste en evaluar la asociación de la variable calculada a partir del *non-omic score* más la de cada gen, uno a uno, con la RPC. Posteriormente se deben seleccionar aquellos que, combinados con el *non-omic score*, presenten una asociación estadísticamente significativa, previa realización de una regresión logística y ajuste mediante *multiple testing*. Esta estrategia es poco eficiente cuando se debe tratar un gran número de variables como corresponde a nuestro estudio. Además, la estrategia univariante en sí analiza cada gen por separado. Posiblemente cada gen por separado aporta una información limitada, pero el conjunto del grupo de genes, que pueden pertenecer a una misma vía, puede ser el que aporte una mayor información predictiva de forma conjunta, por lo que conviene otro tipo de estrategia.
- un análisis multivariante: que evalúa la asociación de todos los genes de forma conjunta, considerando también la variable *non-omic score*. Selecciona los genes que, conjuntamente, aportan una mayor capacidad predictiva. No se limita sólo a evaluar la asociación de genes con respuesta según su *p-value*, sino que se valoran según su ganancia en capacidad predictiva de respuesta. Es la estrategia más apropiada ya que considera un conjunto de genes y selecciona aquel grupo que aporta la mayor información predictiva, por lo que se escogió para nuestro estudio.

Para abordar la estrategia multivariante se siguió una metodología estadística de regresión penalizada. Dentro de este apartado se plantearon dos opciones:

- *Lasso*: que parte de un modelo lineal o de regresión logística donde se dispone de una serie de variables clínicas y genéticas que se desean relacionar con la variable

RPC. Cada una de las variables tiene un coeficiente (β) de relación con la respuesta, que se estima minimizando los residuos. Con esta metodología se añade una restricción adicional, dado que la suma de dichos coeficientes debe estar restringida por un valor determinado. Ello equivale a minimizar los residuos con un parámetro de penalización o encogimiento (λ) que se multiplica por la suma de los coeficientes (β). De esta manera, aumentando la penalización (λ) conseguimos descartar aquellas variables que no intervienen de forma determinante sobre el modelo predictivo, dado que coeficientes tenderán a cero. Así podremos discriminar qué genes no intervienen y podemos acabar descartándolos. Por otra parte, esta metodología permite calcular el número óptimo de variables a seleccionar asumiendo el mínimo error posible.

- *elastic-net*: es similar al método Lasso, pero añade a la penalización la suma de los coeficientes al cuadrado (β^2). Esta cuestión técnica se ha observado que es útil cuando las variables pueden estar correlacionadas.

Pese a que nuestros resultados con *Lasso* y *elastic-net* fueron similares se escogió la estrategia *Lasso* dado que presentaba una capacidad predictiva superior.

Tras la selección óptima de todas las variables, se necesitaba que esa selección fuese robusta, es decir, que no tuviese poder predictivo tan sólo con nuestros datos, sino que también mantuviese dicha capacidad predictiva con otros datos diferentes. Mediante el procedimiento de *cross-validation* se consiguieron crear diferentes modelos, subdividiendo los datos en diferentes partes. Se construyó un modelo predictivo utilizando la mayor parte de los datos (*training data set*) y se midió la capacidad predictiva del modelo sobre la parte de datos que no se habían utilizado (*validation data set*). Este procedimiento de *cross-validation* se repitió en cien ocasiones, utilizando cada vez una parte diferente de los datos seleccionados para el proceso de construcción del modelo predictivo y midiendo la capacidad predictiva sobre los datos restantes (figura 41). Se pueden utilizar diferentes modelos de selección y validación para poder repetirlos posteriormente en múltiples ocasiones. De esta forma podemos obtener el número de veces que el modelo selecciona las variables según el número óptimo calculado y obtener un porcentaje de selección.

Según el número óptimo determinado de variables, ordenadas por su mayor porcentaje de selección, obtuvimos el mejor modelo predictivo y pudimos calcular su capacidad predictiva según el área bajo la curva ROC (AUC). Además, al no medir la capacidad predictiva sobre

la muestra con la que se construyó el modelo predictivo, sino sobre la muestra de validación restante, no se estuvo sobre estimando dicha predicción.

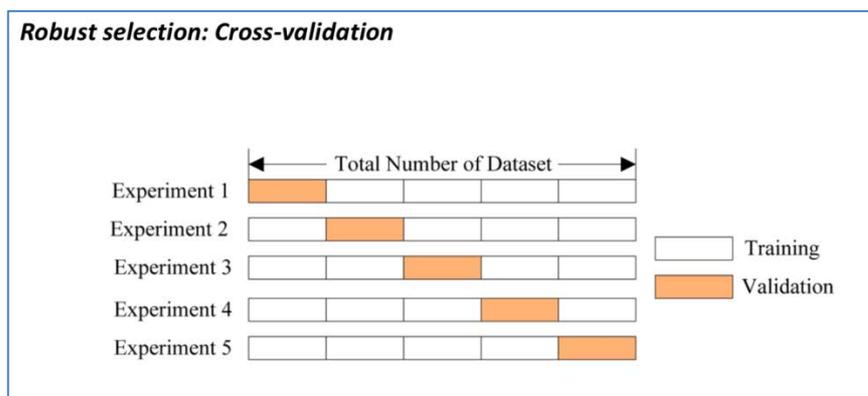


Figura 41. Ejemplo de cross-validation. Se subdividen los datos en 5 partes y se construye el modelo predictivo utilizando 4 partes de los datos. Se realiza una validación posterior sobre la parte restante. Este procedimiento se repite en varias ocasiones, realizando 5 experimentos diferentes.

En nuestro caso se probaron diferentes modelos clínicos y genéticos. Se calcularon tanto los coeficientes β como los valores de penalización λ para cada variable, así como el número de variables óptimas con el mínimo error posible, que resultó ser 9. Se calculó el valor predictivo de cada modelo mediante el AUC con la información aportada por la expresión genética, incrementando la capacidad predictiva respecto al modelo clínico, patológico y taxonómico con el modelo que añadía el total de los 9 genes (AUC=0,663).

Previamente, el análisis de expresión de ARNm de las muestras se había realizado mediante el sistema *nCounter*®. Se previó un método ultrasensible y reproducible que, además permitiese un análisis de múltiples genes de forma simultánea. No precisaba de transcripción inversa (ADNc) o de amplificación como otras técnicas clásicas de PCR, pues utilizaba unos códigos de barras moleculares específicos. También permitía analizar el ARN extraído de cualquier fuente, incluida la de muestras de parafina fijadas en formalina o FFPE. Otra ventaja, si se comparaba con técnicas como la PCR, era poder eliminar el riesgo de contaminación de muestras ya que no se tenían que manipular para su amplificación.

Posteriormente, para poder procesar la información genética como variable continua, se realizó una normalización y una transformación logarítmica estandarizada de los datos.

Pese a ello, y debido al alto número de resultados por debajo del control correspondientes a la expresión de PD1, inicialmente ya se eliminó dicho gen para realizar el análisis de *Lasso*.

En nuestro caso se detectó una expresión muy baja por conteo crudo mediante *nCounter*® y tras la normalización de los datos, el 99,1% obtuvieron un valor igual a 0. No obstante, la tasa cruda de conteos no normalizada detectó cuentas de expresión, por lo que las sondas diseñadas para la unión se llegaron a unir pero en una proporción muy baja, lo que sugiere que se siguió la metodología correcta y que la normalización estandarizada que se utiliza habitualmente puede influir en los resultados. La detección de la expresión de ARN de PD1 puede ser inferior a la prevista y actualmente firmas predictivas de inflamación que utilizan la plataforma *nCounter*® no incluyen PD1, como la que se ha utilizado para el tratamiento del melanoma avanzado con pembrolizumab (197). Trabajos que utilizan la plataforma *nCounter*® también han encontrado una menor expresión de ARNm para PD1 en muestras de tumor vesical (233).

A parte de PD1, en nuestro estudio también se encontraron otros 2 genes relacionados con respuesta inmune que mostraron un alto porcentaje de 0 tras su normalización: INFG (80%=0) y PDL1 (75% =0). Aunque dicha circunstancia pudiera ser debida a la propia calidad del ARNm (material antiguo que aportase una menor detección), la metodología utilizada para la normalización de la expresión de firmas relacionadas con la respuesta inmune continúa implementándose mediante nuevas estrategias técnicas.

No sólo se obtuvieron resultados de baja expresión para INFG, sino también para FANCC, con porcentajes de resultados igual a 0 tras la normalización entre el 83 y el 84%. Pese a que inicialmente el método *Lasso* seleccionaba los 2 genes citados cuando se incluían en el análisis global (AUC=0,658), se consideró que los porcentajes de expresión tras la normalización iguales a 0 superiores al 80% de los casos fuesen motivo de exclusión para el análisis. Al realizar nuevamente el análisis sin los 3 genes con un porcentaje de ceros superior al 80% (PD1, INFG y FANCC) se obtuvo un modelo aún con mayor poder predictivo (AUC=0,663).

Por otro lado, la expresión del gen RAD51 fue seleccionada por el método *cross-validation* en el 92% de los casos. Sólo con la información que aportaba este gen, el poder predictivo ya aumentó (AUC=0,617). La sobre expresión de RAD51 se correlacionó con la respuesta al tratamiento (coeficiente de -0,257). En la literatura, la sobre expresión de RAD51 se ha relacionado con deficiencias en reparación del ADN, como las de la vía de la *HR*. La presencia de mutaciones de BRCA1 también se han relacionado con RAD51, ya que inducirían a la sobre expresión de RAD51 como mecanismo compensador de las deficiencias en reparación del ADN mediante la vía de la *HR* (184). Los tumores con deficiencias de la vía de la *HR* se

asociarían inicialmente a mayor agresividad clínica y menor supervivencia. No obstante, estas características se contrarrestarían con la administración de QNA basada en cisplatino, lo que sugeriría que las deficiencias en la vía de la *HR* podrían predecir una mejor respuesta. Dado que el cisplatino actúa como agente alquilante, creando enlaces cruzados e interfiriendo en la replicación del ADN, las deficiencias en la reparación del ADN conferirían una mayor sensibilidad y una mejor respuesta al tratamiento.

La sobre expresión de RAD51 puede ser un marcador subrogado de presencia de deficiencias en la reparación de la *HR*. En cáncer de mama, pacientes que no sobre expresan RAD51 pueden no tener deficiencias en la vía de la *HR* y responder a otros tratamientos como los inhibidores de la PARP (188).

Habitualmente, la sobre expresión de RAD51 se ha asociado a mayor respuesta al cisplatino, aunque existen trabajos que indican que su sobre expresión en combinación con otros genes podría indicar lo contrario. No obstante, los autores de este estudio concluyen que se deben realizar más trabajos para entender el papel de RAD51 en la sensibilidad al cisplatino (199).

En nuestro estudio, la expresión de CXCL9 fue seleccionada en segundo lugar por el método de *cross-validation* (88% de selección). Su sobre expresión se asoció a la R_{Pc} con un coeficiente de -0,108. Además, CXCL9 fue el único gen que se relacionó con la R_{Pc} de forma estadísticamente significativa en el análisis univariante ($p=0,024$).

CXCL9 es una quimiocina que se relaciona con la infiltración linfocitaria y la respuesta inmunitaria antitumoral. Una mayor carga de mutaciones acumuladas en el tumor y una mayor expresión de neoantígenos por parte de las células tumorales se relaciona con una mayor respuesta por parte del sistema inmune. La identificación de una mayor expresión de CXCL9 mediante ARN se ha asociado tanto a una mejor respuesta a quimioterapia con cisplatino como a mejor SG y SCE en el CVMI (234). El cisplatino puede potenciar los mecanismos antitumorales mediante un efecto inmunomodulador, como sería el reclutamiento y la estimulación de la proliferación de los linfocitos T.

Se ha demostrado que combinando tanto la expresión de CXCL9, como gen de respuesta inmune, como la clasificación de taxonomía se puede identificar una mayor proporción de expresión de genes inflamatorios en los tumores con fenotipo basal, que presentan una mayor sensibilidad al cisplatino. Los tumores que presentan mayor respuesta inflamatoria presentan una mayor expresión de CXCL9, hallazgos que han sido validados en cohortes del

grupo *TCGA*. Una mayor expresión de CXCL9 se relacionaría con una mayor actividad antitumoral en el microambiente inmunitario tumoral y posiblemente con una mayor respuesta al tratamiento con cisplatino, además de los agentes inmunomoduladores (234). CXCL9 se ha relacionado con mayor respuesta antitumoral en tratamientos con cisplatino debido al aumento de los efectos apoptóticos, antiangiogénicos y citotóxicos (235).

Paneles de expresión de genes relacionados con respuesta inmune mediante la plataforma *nCounter*® de *Nanostring*® han incluido CXCL9 como un marcador fiable. Mediante dichos paneles se pretende evaluar la respuesta de diferentes tumores, incluido el de vejiga, a agentes inmunoterápicos como pembrolizumab (197). Genes de reparación del ADN, como RAD51, y de respuesta inmune, como CXCL9, también han sido evaluados en ensayos clínicos con inmunoterapia (114). La incorporación de marcadores de respuesta inmune a paneles de respuesta a QNA con cisplatino también puede aportar mayor valor predictivo.

El método *Lasso* proporcionó el número óptimo de genes que, de forma aproximada, sirvió para evaluar el número de variables en cada paso del *cross-validation*. Una vez se seleccionaron los 9 mejores genes, pudimos comprobar que con los 2 primeros, uno de daño de ADN y otro de respuesta inmune, ya se alcanzó la máxima capacidad predictiva. Con los 2 genes que se seleccionaron a continuación por *Lasso* (PARP y 53BP1) también implicados en respuesta al daño del ADN, se logró alcanzar la misma máxima capacidad de predicción (AUC=0,671).

La sobre expresión de PARP se seleccionó en tercer lugar, con un porcentaje del 70% y se relacionó también con mejor respuesta al tratamiento. PARP está implicado en la reparación de ADN de roturas de cadena simple a través de la vía *BER*. La sobreexpresión de PARP se ha relacionado con mayor daño del ADN (236). 53BP1 se seleccionó en cuarto lugar, con un mayor salto en el porcentaje de selección respecto a los 3 genes previos, en el 51% de los casos. Su expresión se ha relacionado con tumores más agresivos por su relación con mayor inestabilidad genética (237).

La mayoría del global de los 9 genes que se seleccionaron a través del método *Lasso* correspondían a genes de reparación de la vía de la *HR*, aunque también se incluían las vías de la *NER* y de la *NHEJ*. La presencia de alteraciones en los genes de reparación de ADN se ha relacionado con una mayor respuesta a cisplatino en pacientes con tumor vesical metastásico (185), por lo que es de esperar que la información que aportan dichos genes pueda aumentar el poder predictivo de respuesta también en los pacientes candidatos a

QNA. Ensayos prospectivos como CoXEN incluyen paneles de genes implicados en diferentes vías y podrían aportar información sobre la capacidad predictiva de respuesta al tratamiento basado en cisplatino en un futuro (186).

A continuación, en nuestro estudio se analizó la relación entre RPc y la supervivencia de los pacientes. Se acepta que habitualmente la RPc posee un gran valor pronóstico sobre la SLP, la SG y la SCE (87). La asociación entre RPc y SLP, SG y SCE fue estadísticamente significativa en todos los casos cuando se calcularon las curvas de supervivencia correspondientes mediante Kaplan-Meier y *Log-rank test* ($p=0.001$).

Finalmente, y en base a la asociación entre RPc y SG, SCE y SLP, se analizaron los modelos predictivos de respuesta según las variables de expresión genética añadidas a la información clínica, patológica y de taxonomía. Los pacientes se subdividieron en 2 grupos, según si el *score* de la firma predictiva estaba por encima o por debajo de la mediana de puntuación. Al calcular las curvas de supervivencia se valoraron las diferencias entre sí y se observó que la firma con los 3 primeros genes (RAD51, CXCL9 y PARP) presentaba una mayor discriminación incorporando el menor número de genes.

La SLP se calculó según el tiempo durante el cual la enfermedad no progresó tras el tratamiento con QNA y cistectomía. En nuestro estudio ninguna de las firmas predictivas alcanzó la significancia estadística sobre este ítem, si bien las diferencias entre la firma que incluía 3 genes y la que incluía 9 eran similares y quedaron cerca de ser estadísticamente significativas ($p=0,059$ vs $p=0,056$).

La SG se calculó según la tasa de personas que seguían vivas tras el tratamiento con QNA y cistectomía. Observamos que con la firma que incluía los 3 primeros genes ya se observaba una discriminación estadísticamente significativa ($p=0,01$).

La SCE no incluía los pacientes que habían fallecido por otras causas diferentes al cáncer, a diferencia de la global. Para dicho parámetro la firma con 3 genes también alcanzaba una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,033$), pese a que la firma con los 9 genes lograba la mayor significancia ($p=0,026$).

Las firmas predictivas de RPc pueden poseer cierto valor pronóstico, ya que la supervivencia es una variable que va a estar condicionada por la propia RPc. La incorporación de biomarcadores en la toma de decisiones clínicas para predecir la

respuesta a la QNA podría evitar dicho tratamiento en pacientes con pocas probabilidades de responder. Además de mejorar la supervivencia, se puede disminuir el coste y la toxicidad asociados a la QNA en los casos que tengan poca probabilidad de respuesta. Se han desarrollado incluso modelos de análisis de decisión para evaluar la rentabilidad coste eficacia de la QNA utilizando paneles de genes de reparación de ADN. El enfoque basado en paneles de genes de reparación de ADN podría resultar una estrategia rentable en términos de eficiencia (225). Las firmas predictivas también podrían evitar la utilización de la QNA basada en cisplatino en aquellos pacientes con baja probabilidad de responder y plantear directamente el tratamiento quirúrgico u otras opciones terapéuticas dirigidas o de inmunoterapia.

No obstante, se necesitan validar estos resultados en series independientes. Especialmente se precisan estudios prospectivos para establecer de forma concluyente la contribución conjunta de las variables clínicas, patológicas, de taxonomía y genéticas como biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento basado en cisplatino de pacientes con CVMI localmente avanzado. Si se logra una implementación óptima en la práctica clínica, se hallará una estrategia terapéutica adecuada, precisa y personalizada.

Este estudio presenta varias limitaciones derivadas de su naturaleza retrospectiva y un período de reclutamiento relativamente largo, al no tratarse de un ensayo clínico. La inclusión de pacientes con afectación ganglionar y/o tratados con carboplatino así como la posible variabilidad en el manejo clínico pueden constituir otras de las limitaciones.

8. Conclusiones.

8. Conclusiones.

8.1. Conclusión del objetivo principal.

1. La firma predictiva que integra las variables clínicas, patológicas, de clasificación taxonómica y de expresión genética logra una mayor capacidad predictiva (AUC=0,663).

La firma predictiva que integra exclusivamente las variables clínicas y patológicas presenta una baja capacidad predictiva de respuesta patológica completa al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante basada en platino (AUC=0,52). Cuando estas variables se combinan sólo con las de clasificación taxonómica la capacidad predictiva de respuesta patológica completa aumenta (AUC=0,58).

Hemos podido demostrar que la capacidad predictiva de la firma aumenta con en análisis conjunto de las variables clínicas, patológicas, taxonómicas y de expresión genética.

8.2. Conclusiones de los objetivos secundarios.

2. La presencia de hidronefrosis y las variantes histológicas uroteliales con diferenciación escamosa pueden asociarse a peor respuesta patológica completa al tratamiento neoadyuvante.

3. La identificación taxonómica mediante inmunohistoquímica del subgrupo basal/escamoso puede ayudar a identificar a los pacientes con mayor posibilidad de respuesta patológica completa.

4. La sobre expresión de genes como RAD51, relacionado con deficiencias en la vía de reparación del ADN por la recombinación homóloga, puede asociarse a una mayor respuesta patológica completa.

5. La sobre expresión de quimiocinas como CXCL9, relacionada con la respuesta inmunitaria tumoral, puede asociarse a una mayor respuesta patológica completa.

6. La firma que integra conjuntamente variables clínicas (hidronefrosis), patológicas (histología urotelial), de taxonomía (BASQ) y genéticas (RAD51 y CXCL9) aporta el mayor poder predictivo (AUC=0,671).

7. La respuesta patológica completa se asocia a mejor supervivencia libre de progresión, global y cáncer específica de forma estadísticamente significativa (p=0.001).

8. La firma predictiva conjunta con variables clínicas (hidronefrosis), patológicas (histología urotelial), de taxonomía (BASQ) y genéticas (RAD51, CXCL9 y PARP) se asocia de forma estadísticamente significativa a supervivencia global (p=0,01) y cáncer específica (p=0,033).

En global, estos resultados nos permiten seguir desarrollando, dentro del proyecto hacia una medicina predictiva personalizada, nuevas vías de investigación de una forma más dirigida.

Como ideas de futuro, nuevos estudios prospectivos y de validación que incluyan firmas predictivas de respuesta al tratamiento neoadyuvante podrán estar basadas en la información de taxonomía y de expresión de los genes RAD51 y CXCL9. Así estas firmas podrán ser evaluadas y propuestas de manera traslacional para su utilización en la práctica clínica con un menor coste que si se incluyera un mayor número de genes.

Incluso puede permitir el desarrollo de nuevos estudios prospectivos que incluyan firmas con valor pronóstico basadas en la información de taxonomía y de expresión de los genes RAD51, CXCL9 y PARP. Así se podrán evaluar los resultados con la inclusión de un menor número de genes y reducir los costes asociados para poder ser propuestos en la práctica clínica con una mayor eficiencia.

9. Bibliografía

9. Bibliografia.

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2013 Apr;49(6):1374–403.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013 Jan;63(1):11–30.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–386.
4. Càncer [Internet]. Canal Salut. [cited 2019 Apr 21]. Available from: <http://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer>
5. 2017_bufeta.pdf [Internet]. [cited 2019 Apr 21]. Available from: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_A-Z/C/cancer/recursos_prof/estadistiques/2017_bufeta.pdf
6. Malats N, Real FX. Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Apr;29(2):177–89, vii.
7. Abdollah F, Gandaglia G, Thuret R, Schmitges J, Tian Z, Jeldres C, et al. Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis. *Cancer Epidemiol*. 2013 Jun;37(3):219–25.
8. Zhang Y. Understanding the gender disparity in bladder cancer risk: the impact of sex hormones and liver on bladder susceptibility to carcinogens. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2013;31(4):287–304.
9. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011 Aug 17;306(7):737–45.
10. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1–1438.
11. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*. 2002 Dec;10(6):311–22.
12. Saint-Jacques N, Parker L, Brown P, Dummer TJ. Arsenic in drinking water and urinary tract cancers: a systematic review of 30 years of epidemiological evidence. *Environ Health*. 2014 Jun 2;13:44.
13. Murta-Nascimento C, Schmitz-Dräger BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, et al. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol*. 2007 Jun;25(3):285–95.
14. Daugherty SE, Pfeiffer RM, Sigurdson AJ, Hayes RB, Leitzmann M, Schatzkin A, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and bladder cancer: a pooled analysis. *Am J Epidemiol*. 2011 Apr 1;173(7):721–30.
15. Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GFM, Pellegrini F, Nicolucci A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PloS One*. 2013;8(8):e71583.
16. Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol*. 2005 Jul;174(1):107–10; discussion 110–111.
17. 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 2009–2010.
18. Turati F, Pelucchi C, Galeone C, Decarli A, La Vecchia C. Personal hair dye use and bladder cancer: a meta-analysis. *Ann Epidemiol*. 2014 Feb;24(2):151–9.
19. Keimling M, Behrens G, Schmid D, Jochem C, Leitzmann MF. The association between physical activity and bladder cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014 Apr 2;110(7):1862–70.
20. Amaral AFS, Méndez-Pertuz M, Muñoz A, Silverman DT, Allory Y, Kogevinas M, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D(3) and bladder cancer risk according to tumor stage and FGFR3 status: a mechanism-based epidemiological study. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Dec 19;104(24):1897–904.
21. Zamora-Ros R, Sacerdote C, Ricceri F, Weiderpass E, Roswall N, Buckland G, et al. Flavonoid and lignan intake in relation to bladder cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Cancer*. 2014 Oct 28;111(9):1870–80.
22. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):315–22.
23. Gouda I, Mokhtar N, Bilal D, El-Bolkainy T, El-Bolkainy NM. Bilharziasis and bladder cancer: a time trend analysis of 9843 patients. *J Egypt Natl Cancer Inst*. 2007 Jun;19(2):158–62.
24. Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in

the world. *World J Urol.* 2009 Jun;27(3):289–93.

25. Murta-Nascimento C, Silverman DT, Kogevinas M, García-Closas M, Rothman N, Tardón A, et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2007 Aug;16(8):1595–600.
26. Rothman N, Garcia-Closas M, Chatterjee N, Malats N, Wu X, Figueroa JD, et al. A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Nov;42(11):978–84.
27. García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet Lond Engl.* 2005 Aug 20;366(9486):649–59.
28. Kiemeny LA, Thorlacius S, Sulem P, Geller F, Aben KKH, Stacey SN, et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet.* 2008 Nov;40(11):1307–12.
29. Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, et al. Sequence variants at the *TERT-CLPTMIL* locus associate with many cancer types. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):221–7.
30. Stern MC, Lin J, Figueroa JD, Kelsey KT, Kiltie AE, Yuan J-M, et al. Polymorphisms in DNA Repair Genes, Smoking, and Bladder Cancer Risk: Findings from the International Consortium of Bladder Cancer. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69(17):6857–64.
31. Aben KKH, Witjes JA, Schoenberg MP, Hulsbergen-van de Kaa C, Verbeek ALM, Kiemeny LALM. Familial aggregation of urothelial cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2002 Mar 10;98(2):274–8.
32. Fosså SD, Ous S, Berner A. Clinical significance of the “palpable mass” in patients with muscle-infiltrating bladder cancer undergoing cystectomy after pre-operative radiotherapy. *Br J Urol.* 1991 Jan;67(1):54–60.
33. Ploeg M, Kiemeny LALM, Smits GA, Vergunst H, Viddeleer AC, Geboers ADH, et al. Discrepancy between clinical staging through bimanual palpation and pathological staging after cystectomy. *Urol Oncol.* 2012 Jun;30(3):247–51.
34. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology.* 2005 Dec;66(6 Suppl 1):35–63.
35. van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol.* 2005 Jun;47(6):736–48.
36. Santoni G, Morelli MB, Amantini C, Battelli N. Urinary Markers in Bladder Cancer: An Update. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Sep 7 [cited 2019 Apr 19];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6137202/>
37. Schips L, Augustin H, Zigeuner RE, Gallé G, Habermann H, Trummer H, et al. Is repeated transurethral resection justified in patients with newly diagnosed superficial bladder cancer? *Urology.* 2002 Feb;59(2):220–3.
38. Jakse G, Algaba F, Malmström P-U, Oosterlinck W. A second-look TUR in T1 transitional cell carcinoma: why? *Eur Urol.* 2004 May;45(5):539–46; discussion 546.
39. Kundra V, Silverman PM. Imaging in oncology from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Imaging in the diagnosis, staging, and follow-up of cancer of the urinary bladder. *AJR Am J Roentgenol.* 2003 Apr;180(4):1045–54.
40. Bostrom PJ, van Rhijn BWG, Fleshner N, Finelli A, Jewett M, Thoms J, et al. Staging and Staging Errors in Bladder Cancer. *Eur Urol Suppl.* 2010 Apr;9(1):2–9.
41. Barentsz JO, Jager GJ, Witjes JA, Ruijs JH. Primary staging of urinary bladder carcinoma: the role of MRI and a comparison with CT. *Eur Radiol.* 1996;6(2):129–33.
42. Kim JK, Park S-Y, Ahn HJ, Kim CS, Cho K-S. Bladder cancer: analysis of multi-detector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging. *Radiology.* 2004 Jun;231(3):725–31.
43. Barentsz JO, Engelbrecht MR, Witjes JA, de la Rosette JJ, van der Graaf M. MR imaging of the male pelvis. *Eur Radiol.* 1999;9(9):1722–36.
44. Swinnen G, Maes A, Pottel H, Vanneste A, Billiet I, Lesage K, et al. FDG-PET/CT for the preoperative lymph node staging of invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2010 Apr;57(4):641–7.
45. Girvin F, Ko JP. Pulmonary nodules: detection, assessment, and CAD. *AJR Am J Roentgenol.* 2008 Oct;191(4):1057–69.
46. Heidenreich A, Albers P, Classen J, Graefen M, Gschwend J, Kotzerke J, et al. Imaging studies in metastatic urogenital cancer patients undergoing systemic therapy: recommendations of a multidisciplinary consensus meeting of the Association of Urological Oncology of the German Cancer Society. *Urol Int.* 2010;85(1):1–10.
47. Lauenstein TC, Goehde SC, Herborn CU, Goyen M, Oberhoff C, Debatin JF, et al. Whole-body

- MR imaging: evaluation of patients for metastases. *Radiology*. 2004 Oct;233(1):139–48.
48. Maurer T, Souvatzoglou M, Kübler H, Opercan K, Schmidt S, Herrmann K, et al. Diagnostic efficacy of [11C]choline positron emission tomography/computed tomography compared with conventional computed tomography in lymph node staging of patients with bladder cancer prior to radical cystectomy. *Eur Urol*. 2012 May;61(5):1031–8.
 49. Jewett HJ. Proceedings: Cancer of the bladder. Diagnosis and staging. *Cancer*. 1973 Nov;32(5):1072–4.
 50. Stenzl A, Nagele U, Kuczyk M, Sievert K-D, Anastasiadis A, Seibold J, et al. Cystectomy – Technical Considerations in Male and Female Patients. *EAU Update Ser*. 2005 Sep 1;3(3):138–46.
 51. Varinot J, Camparo P, Roupret M, Bitker MO, Capron F, Cussenot O, et al. Full analysis of the prostatic urethra at the time of radical cystoprostatectomy for bladder cancer: impact on final disease stage. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2009 Nov;455(5):449–53.
 52. Herr HW. Pathologic evaluation of radical cystectomy specimens. *Cancer*. 2002 Aug 1;95(3):668–9.
 53. Neuzillet Y, Soulie M, Larre S, Roupret M, Defortescu G, Murez T, et al. Positive surgical margins and their locations in specimens are adverse prognosis features after radical cystectomy in non-metastatic carcinoma invading bladder muscle: results from a nationwide case-control study. *BJU Int*. 2013 Jun;111(8):1253–60.
 54. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition [Internet]. Wiley.com. [cited 2019 Mar 6]. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/TNM+Classification+of+Malignant+Tumours%2C+8th+Edition-p-9781119263579>
 55. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, Tiguert R, Sakr W, Wood DP, et al. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol*. 2000 Jul;24(7):980–7.
 56. Leissner J, Koeppen C, Wolf HK. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in urothelial bladder cancer treated with radical cystectomy. *J Urol*. 2003 Mar;169(3):955–60.
 57. Jensen JB, Høyer S, Jensen KM-E. Incidence of occult lymph-node metastasis missed by standard pathological examination in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy. *Scand J Urol Nephrol*. 2011 Dec;45(6):419–24.
 58. Shariat SF, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Lerner SP, Palapattu GS, Cote RJ, et al. Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy. *Cancer*. 2008 Jan 15;112(2):315–25.
 59. Cáncer de vejiga. In: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 21]. Available from: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=C%C3%A1ncer_de_vejiga&oldid=106577501
 60. Linder BJ, Frank I, Cheville JC, Thompson RH, Thapa P, Tarrell RF, et al. Outcomes following radical cystectomy for nested variant of urothelial carcinoma: a matched cohort analysis. *J Urol*. 2013 May;189(5):1670–5.
 61. Kim HS, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Adjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and network meta-analysis of randomized clinical trials. *Oncotarget*. 2017 Oct 6;8(46):81204–14.
 62. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93–105.
 63. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Feb 1;19(3):666–75.
 64. David KA, Milowsky MI, Ritchey J, Carroll PR, Nanus DM. Low incidence of perioperative chemotherapy for stage III bladder cancer 1998 to 2003: a report from the National Cancer Data Base. *J Urol*. 2007 Aug;178(2):451–4.
 65. World Health Organization (WHO) Consensus Conference on Bladder Cancer, Hautmann RE, Abol-Enin H, Hafez K, Haro I, Mansson W, et al. Urinary diversion. *Urology*. 2007 Jan;69(1 Suppl):17–49.
 66. Wallmeroth A, Wagner U, Moch H, Gasser TC, Sauter G, Mihatsch MJ. Patterns of metastasis in muscle-invasive bladder cancer (pT2-4): An autopsy study on 367 patients. *Urol Int*. 1999;62(2):69–75.
 67. Davies JD, Simons CM, Ruhotina N, Barocas DA, Clark PE, Morgan TM. Anatomic basis for lymph node counts as measure of lymph node dissection extent: a cadaveric study. *Urology*. 2013 Feb;81(2):358–63.
 68. Perera M, McGrath S, Sengupta S, Crozier J, Bolton D, Lawrentschuk N. Pelvic lymph node dissection during radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2018 Nov;15(11):686–92.

69. Simone G, Enein HA, Ferriero M, Papalia R, Mosbah A, Abdel-latif M, et al. 1755 EXTENDED VERSUS SUPER-EXTENDED PLND DURING RADICAL CYSTECTOMY: COMPARISON OF TWO PROSPECTIVE SERIES. *J Urol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2019 Mar 4]; Available from: <https://www.auajournals.org/doi/abs/10.1016/j.juro.2012.02.1771>
70. Zehnder P, Studer UE, Skinner EC, Dorin RP, Cai J, Roth B, et al. Super extended versus extended pelvic lymph node dissection in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: a comparative study. *J Urol*. 2011 Oct;186(4):1261–8.
71. Svatek R, Zehnder P. Role and extent of lymphadenectomy during radical cystectomy for invasive bladder cancer. *Curr Urol Rep*. 2012 Apr;13(2):115–21.
72. Koppie TM, Vickers AJ, Vora K, Dalbagni G, Bochner BH. Standardization of pelvic lymphadenectomy performed at radical cystectomy: can we establish a minimum number of lymph nodes that should be removed? *Cancer*. 2006 Nov 15;107(10):2368–74.
73. Wright JL, Lin DW, Porter MP. The association between extent of lymphadenectomy and survival among patients with lymph node metastases undergoing radical cystectomy. *Cancer*. 2008 Jun;112(11):2401–8.
74. Ng CK, Kauffman EC, Lee M-M, Otto BJ, Portnoff A, Ehrlich JR, et al. A comparison of postoperative complications in open versus robotic cystectomy. *Eur Urol*. 2010 Feb;57(2):274–81.
75. Parekh DJ, Reis IM, Castle EP, Gonzalgo ML, Woods ME, Svatek RS, et al. Robot-assisted radical cystectomy versus open radical cystectomy in patients with bladder cancer (RAZOR): an open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2018 23;391(10139):2525–36.
76. Cha EK, Wiklund NP, Scherr DS. Recent advances in robot-assisted radical cystectomy. *Curr Opin Urol*. 2011 Jan;21(1):65–70.
77. Stein JP, Skinner DG. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure. *World J Urol*. 2006 Aug;24(3):296–304.
78. Hautmann RE, de Petriconi RC, Volkmer BG. Lessons learned from 1,000 neobladders: the 90-day complication rate. *J Urol*. 2010 Sep;184(3):990–4; quiz 1235.
79. Jentzmik F, Schrader AJ, de Petriconi R, Hefty R, Mueller J, Doetterl J, et al. The ileal neobladder in female patients with bladder cancer: long-term clinical, functional, and oncological outcome. *World J Urol*. 2012 Dec;30(6):733–9.
80. Cookson MS, Chang SS, Wells N, Parekh DJ, Smith JA. Complications of radical cystectomy for nonmuscle invasive disease: comparison with muscle invasive disease. *J Urol*. 2003 Jan;169(1):101–4.
81. Sabir EF, Holmäng S, Liedberg F, Ljungberg B, Malmström P-U, Månsson W, et al. Impact of hospital volume on local recurrence and distant metastasis in bladder cancer patients treated with radical cystectomy in Sweden. *Scand J Urol*. 2013 Dec;47(6):483–90.
82. Shariat SF, Karakiewicz PI, Palapattu GS, Lotan Y, Rogers CG, Amiel GE, et al. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. *J Urol*. 2006 Dec;176(6 Pt 1):2414–22; discussion 2422.
83. Nuhn P, May M, Sun M, Fritsche H-M, Brookman-May S, Buchner A, et al. External validation of postoperative nomograms for prediction of all-cause mortality, cancer-specific mortality, and recurrence in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2012 Jan;61(1):58–64.
84. Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, Thalmann GN, Danuser H, Markwalder R, et al. Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 Feb 15;21(4):690–6.
85. International Collaboration of Trialists, Medical Research Council Advanced Bladder Cancer Working Party (now the National Cancer Research Institute Bladder Cancer Clinical Studies Group), European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group, Australian Bladder Cancer Study Group, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, Finnbladder, et al. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jun 1;29(16):2171–7.
86. Sherif A, Holmberg L, Rintala E, Mestad O, Nilsson J, Nilsson S, et al. Neoadjuvant cisplatin based combination chemotherapy in patients with invasive bladder cancer: a combined analysis of two Nordic studies. *Eur Urol*. 2004 Mar;45(3):297–303.
87. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, et al. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med*. 2003 Aug 28;349(9):859–66.
88. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol*. 2005 Aug;48(2):202–5; discussion 205-206.

89. Winquist E, Kirchner TS, Segal R, Chin J, Lukka H, Genitourinary Cancer Disease Site Group, Cancer Care Ontario Program in Evidence-based Care Practice Guidelines Initiative. Neoadjuvant chemotherapy for transitional cell carcinoma of the bladder: a systematic review and meta-analysis. *J Urol*. 2004 Feb;171(2 Pt 1):561–9.
90. Yin M, Joshi M, Meijer RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA, et al. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *The Oncologist*. 2016;21(6):708–15.
91. Nguyen DP, Thalmann GN. Contemporary update on neoadjuvant therapy for bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2017 Mar 14;14(6):348–58.
92. Sánchez-Ortiz RF, Huang WC, Mick R, Van Arsdalen KN, Wein AJ, Malkowicz SB. An interval longer than 12 weeks between the diagnosis of muscle invasion and cystectomy is associated with worse outcome in bladder carcinoma. *J Urol*. 2003 Jan;169(1):110–5; discussion 115.
93. Lee CT, Madii R, Daignault S, Dunn RL, Zhang Y, Montie JE, et al. Cystectomy delay more than 3 months from initial bladder cancer diagnosis results in decreased disease specific and overall survival. *J Urol*. 2006 Apr;175(4):1262–7; discussion 1267.
94. Sternberg CN, Pansadoro V, Calabrò F, Schnetzer S, Giannarelli D, Emiliozzi P, et al. Can patient selection for bladder preservation be based on response to chemotherapy? *Cancer*. 2003 Apr 1;97(7):1644–52.
95. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000 Sep;18(17):3068–77.
96. Milowsky MI, Rumble RB, Booth CM, Gilligan T, Eapen LJ, Hauke RJ, et al. Guideline on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer (European Association of Urology Guideline): American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 01;34(16):1945–52.
97. Font A, Luque R, Villa JC, Domenech M, Vázquez S, Gallardo E, et al. The Challenge of Managing Bladder Cancer and Upper Tract Urothelial Carcinoma: A Review with Treatment Recommendations from the Spanish Oncology Genitourinary Group (SOGUG). *Target Oncol*. 2019 Feb;14(1):15–32.
98. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Jul 20;23(21):4602–8.
99. Yuh BE, Ruel N, Wilson TG, Vogelzang N, Pal SK. Pooled analysis of clinical outcomes with neoadjuvant cisplatin and gemcitabine chemotherapy for muscle invasive bladder cancer. *J Urol*. 2013 May;189(5):1682–6.
100. Reardon ZD, Patel SG, Zaid HB, Stimson CJ, Resnick MJ, Keegan KA, et al. Trends in the use of perioperative chemotherapy for localized and locally advanced muscle-invasive bladder cancer: a sign of changing tides. *Eur Urol*. 2015 Jan;67(1):165–70.
101. Hermans TJN, Fransen van de Putte EE, Horenblas S, Lemmens V, Aben K, van der Heijden MS, et al. Perioperative treatment and radical cystectomy for bladder cancer--a population based trend analysis of 10,338 patients in the Netherlands. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2016 Feb;54:18–26.
102. Bassi P, Ferrante GD, Piazza N, Spinadin R, Carando R, Pappagallo G, et al. Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort. *J Urol*. 1999 May;161(5):1494–7.
103. Gakis G, Schwentner C, Todenhöfer T, Stenzl A. Current status of molecular markers for prognostication and outcome in invasive bladder cancer. *BJU Int*. 2012;110(2):233–7.
104. McConkey DJ, Choi W, Shen Y, Lee I-L, Porten S, Matin SF, et al. A Prognostic Gene Expression Signature in the Molecular Classification of Chemotherapy-naïve Urothelial Cancer is Predictive of Clinical Outcomes from Neoadjuvant Chemotherapy: A Phase 2 Trial of Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin with Bevacizumab in Urothelial Cancer. *Eur Urol*. 2016 May;69(5):855–62.
105. Balar AV, Iyer G, Apolo AB, Regazzi AM, Garcia-Grossman IR, Pendse D, et al. Phase II trial of neoadjuvant gemcitabine (G) and cisplatin (C) with sunitinib in patients (pts) with muscle-invasive bladder cancer (MIBC). *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15_suppl):4581–4581.
106. Pruthi RS, Nielsen M, Heathcote S, Wallen EM, Rathmell WK, Godley P, et al. A phase II trial of neoadjuvant erlotinib in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy: clinical and pathological results: ERLLOTINIB IN BLADDER CANCER. *BJU Int*. 2010 Aug;106(3):349–54.

107. Hahn NM, Knudsen BS, Daneshmand S, Koch MO, Bihrlé R, Foster RS, et al. Neoadjuvant dasatinib for muscle-invasive bladder cancer with tissue analysis of biologic activity. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2016 Jan 1;34(1):4.e11-4.e17.
108. Kurtoglu M, Davarpanah NN, Qin R, Powles T, Rosenberg JE, Apolo AB. Elevating the Horizon: Emerging Molecular and Genomic Targets in the Treatment of Advanced Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2015 Oct;13(5):410–20.
109. Meeting Library | Preliminary product parameter and safety results from NeuACT, a phase 2 randomized, open-label trial of DN24-02 in patients with surgically resected HER2+ urothelial cancer at high risk for recurrence. [Internet]. [cited 2019 Mar 4]. Available from: <https://meetinglibrary.asco.org/record/97952/abstract>
110. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):558–62.
111. Petrylak DP, Powles T, Bellmunt J, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz Zambrano C, et al. A phase Ia study of MPDL3280A (anti-PDL1): Updated response and survival data in urothelial bladder cancer (UBC). *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33(15_suppl):4501–4501.
112. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. 2016 May 7;387(10031):1909–20.
113. Plimack ER, Bellmunt J, Gupta S, Berger R, Chow LQM, Juco J, et al. Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-012): a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2017 Feb 1;18(2):212–20.
114. Necchi A, Anichini A, Raggi D, Briganti A, Massa S, Lucianò R, et al. Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2018 Oct 20;36(34):3353–60.
115. Powles T, Rodriguez-Vida A, Duran I, Crabb SJ, Van Der Heijden MS, Font Pous A, et al. A phase II study investigating the safety and efficacy of neoadjuvant atezolizumab in muscle invasive bladder cancer (ABACUS). *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15_suppl):4506–4506.
116. Prieto PA, Reuben A, Cooper ZA, Wargo JA. Targeted Therapies Combined With Immune Checkpoint Therapy. *Cancer J Sudbury Mass*. 2016 Apr;22(2):138–46.
117. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. *Eur Urol*. 2005 Aug;48(2):189–99; discussion 199-201.
118. Cognetti F, Ruggeri EM, Felici A, Gallucci M, Muto G, Pollera CF, et al. Adjuvant chemotherapy with cisplatin and gemcitabine versus chemotherapy at relapse in patients with muscle-invasive bladder cancer submitted to radical cystectomy: an Italian, multicenter, randomized phase III trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012 Mar;23(3):695–700.
119. Paz-Ares LG, Solsona E, Esteban E, Saez A, Gonzalez-Larriba J, Anton A, et al. Randomized phase III trial comparing adjuvant paclitaxel/gemcitabine/cisplatin (PGC) to observation in patients with resected invasive bladder cancer: Results of the Spanish Oncology Genitourinary Group (SOGUG) 99/01 study. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 20;28(18_suppl):LBA4518–LBA4518.
120. Sternberg CN, Skoneczna I, Kerst JM, Albers P, Fossa SD, Agerbaek M, et al. Immediate versus deferred chemotherapy after radical cystectomy in patients with pT3-pT4 or N+ M0 urothelial carcinoma of the bladder (EORTC 30994): an intergroup, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015 Jan;16(1):76–86.
121. Leow JJ, Martin-Doyle W, Rajagopal PS, Patel CG, Anderson EM, Rothman AT, et al. Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur Urol*. 2014 Jul;66(1):42–54.
122. Hernández-Fernández C, Herranz-Amo F, Moralejo-Gárate M, Subirá-Ríos D, Caño-Velasco J, Barbas-Bernardos G. Infiltrating bladder cancer: prognostic factors, follow-up and treatment of relapses. *Actas Urol Esp*. 2017 Aug;41(6):352–8.
123. Culp SH, Dickstein RJ, Grossman HB, Pretzsch SM, Porten S, Daneshmand S, et al. Refining patient selection for neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy. *J Urol*. 2014 Jan;191(1):40–7.
124. Mitra AP, Skinner EC, Miranda G, Daneshmand S. A precystectomy decision model to predict pathological upstaging and oncological outcomes in clinical stage T2 bladder cancer. *BJU Int*. 2013 Feb;111(2):240–8.
125. Rochon PA, Katz JN, Morrow LA, McGlinchey-Berroth R, Ahlquist MM, Sarkarati M, et al. Comorbid illness is associated with survival and length of hospital stay in patients with chronic disability. A prospective comparison of three comorbidity indices. *Med Care*. 1996 Nov;34(11):1093–101.

126. Canter D, Guzzo TJ, Resnick MJ, Brucker B, Vira M, Chen Z, et al. Hydronephrosis is an independent predictor of poor clinical outcome in patients treated for muscle-invasive transitional cell carcinoma with radical cystectomy. *Urology*. 2008 Aug;72(2):379–83.
127. Kluth LA, Black PC, Bochner BH, Catto J, Lerner SP, Stenzl A, et al. Prognostic and Prediction Tools in Bladder Cancer: A Comprehensive Review of the Literature. *Eur Urol*. 2015 Aug;68(2):238–53.
128. Kunju LP, You L, Zhang Y, Daignault S, Montie JE, Lee CT. Lymphovascular invasion of urothelial cancer in matched transurethral bladder tumor resection and radical cystectomy specimens. *J Urol*. 2008 Nov;180(5):1928–32; discussion 1932.
129. Youssef RF, Shariat SF, Kapur P, Kabbani W, Ghoneim T, King E, et al. Expression of cell cycle-related molecular markers in patients treated with radical cystectomy for squamous cell carcinoma of the bladder. *Hum Pathol*. 2011 Mar;42(3):347–55.
130. Kim H, Kim M, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Prognostic significance of lymphovascular invasion in radical cystectomy on patients with bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2014;9(2):e89259.
131. Pokuri VK, Syed JR, Yang Z, Field EP, Cyriac S, Pili R, et al. Predictors of Complete Pathologic Response (pT0) to Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Feb 1;14(1):e59–65.
132. Zargar-Shoshtari K, Sverrisson EF, Sharma P, Gupta S, Poch MA, Pow-Sang JM, et al. Clinical Outcomes After Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Cystectomy in the Presence of Urothelial Carcinoma of the Bladder With Squamous or Glandular Differentiation. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Feb;14(1):82–8.
133. Schubert T, Todenhöfer T, Mischinger J, Schwentner C, Renninger M, Stenzl A, et al. The prognostic role of pre-cystectomy hemoglobin levels in patients with invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2016 Jun;34(6):829–34.
134. Wang Y-L, Jiang B, Yin F-F, Shi H-Q, Xu X-D, Zheng S-S, et al. Perioperative Blood Transfusion Promotes Worse Outcomes of Bladder Cancer after Radical Cystectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*. 2015;10(6):e0130122.
135. Buisan O, Orsola A, Areal J, Font A, Oliveira M, Martinez R, et al. Low Pretreatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts for Good Outcomes in Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy Before Radical Cystectomy for Muscle Invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(1):145-151.e2.
136. Buisan O, Orsola A, Oliveira M, Martinez R, Etxaniz O, Areal J, et al. Role of Inflammation in the Perioperative Management of Urothelial Bladder Cancer With Squamous-Cell Features: Impact of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio on Outcomes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(4):e697–706.
137. Huguet J. Follow-up after radical cystectomy based on patterns of tumour recurrence and its risk factors. *Actas Urol Esp*. 2013 Jun;37(6):376–82.
138. Roth B, Wissmeyer MP, Zehnder P, Birkhäuser FD, Thalmann GN, Krause TM, et al. A new multimodality technique accurately maps the primary lymphatic landing sites of the bladder. *Eur Urol*. 2010 Feb;57(2):205–11.
139. International Bladder Cancer Nomogram Consortium, Bochner BH, Kattan MW, Vora KC. Postoperative nomogram predicting risk of recurrence after radical cystectomy for bladder cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Aug 20;24(24):3967–72.
140. Ramírez-Backhaus M, Fernández-Serra A, Rubio-Briones J, Cruz Garcia P, Calatrava A, Garcia Casado Z, et al. External validation of FXVD3 and KRT20 as predictive biomarkers for the presence of micrometastasis in muscle invasive bladder cancer lymph nodes. *Actas Urol Esp*. 2015 Oct;39(8):473–81.
141. Moschini M, Karnes RJ, Sharma V, Gandaglia G, Fossati N, Dell'Oglio P, et al. Patterns and prognostic significance of clinical recurrences after radical cystectomy for bladder cancer: A 20-year single center experience. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2016 May;42(5):735–43.
142. Soave A, John L-M, Dahlem R, Minner S, Engel O, Schmidt S, et al. The Impact of Tumor Diameter and Tumor Necrosis on Oncologic Outcomes in Patients With Urothelial Carcinoma of the Bladder Treated With Radical Cystectomy. *Urology*. 2015 Jul;86(1):92–8.
143. Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol Oncol*. 2010 Aug;28(4):409–28.
144. Sanchez-Carbayo M, Succi ND, Kirchoff T, Erill N, Offit K, Bochner BH, et al. A polymorphism in HDM2 (SNP309) associates with early onset in superficial tumors, TP53 mutations, and poor outcome in invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Jun 1;13(11):3215–20.
145. Stadler WM, Lerner SP, Groshen S, Stein JP, Shi S-R, Raghavan D, et al. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Sep 1;29(25):3443–9.

146. Atlas Urotelial_PIERRE FABRE 03-09.pdf.
147. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, et al. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 Mar 15;22(6):1007–13.
148. Tiguert R, Lessard A, So A, Fradet Y. Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2002 Aug;20(3):190–5.
149. Lindgren D, Sjö Dahl G, Lauss M, Staaf J, Chebil G, Lövgren K, et al. Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma. *PloS One*. 2012;7(6):e38863.
150. Chaux A, Compérat E, Varinot J, Hicks J, Lecksell K, Solus J, et al. High levels of phosphatase and tensin homolog expression are associated with tumor progression, tumor recurrence, and systemic metastases in pT1 urothelial carcinoma of the bladder: a tissue microarray study of 156 patients treated by transurethral resection. *Urology*. 2013 Jan;81(1):116–22.
151. Fedorov O, Lingard H, Wells C, Monteiro OP, Picaud S, Keates T, et al. [1,2,4]triazolo[4,3-a]phthalazines: inhibitors of diverse bromodomains. *J Med Chem*. 2014 Jan 23;57(2):462–76.
152. Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet*. 2011 Aug 7;43(9):875–8.
153. Kim PH, Cha EK, Sfakianos JP, Iyer G, Zabor EC, Scott SN, et al. Genomic predictors of survival in patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2015 Feb;67(2):198–201.
154. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
155. Sjö Dahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Jun 15;18(12):3377–86.
156. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 25;111(8):3110–5.
157. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014 Feb 10;25(2):152–65.
158. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*. 2016 Oct;12:105–17.
159. Sjö Dahl G, Eriksson P, Liedberg F, Höglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J Pathol*. 2017;242(1):113–25.
160. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017 Oct 19;171(3):540-556.e25.
161. Kamoun A, de Reynies A, Allory Y, Sjö Dahl G, Robertson AG, Seiler R, et al. The consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer: bioRxiv [Internet]. 2018 Dec 10 [cited 2019 Mar 17]; Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/488460>
162. Sjö Dahl G, Jackson CL, Bartlett JM, Siemens DR, Berman DM. Molecular profiling in muscle-invasive bladder cancer: more than the sum of its parts. *J Pathol*. 2019 Jan 2;
163. Brown JS, O’Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov*. 2017 Jan;7(1):20–37.
164. Heeke AL, Pishvaian MJ, Lynce F, Xiu J, Brody JR, Chen W-J, et al. Prevalence of Homologous Recombination-Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. *JCO Precis Oncol*. 2018 Jul 23;(2):1–13.
165. Buttigliero C, Tucci M, Vignani F, Scagliotti GV, Di Maio M. Molecular biomarkers to predict response to neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer. *Cancer Treat Rev*. 2017 Mar;54:1–9.
166. Plimack ER, Hoffman-Censits JH, Viterbo R, Trabulsi EJ, Ross EA, Greenberg RE, et al. Accelerated methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin is safe, effective, and efficient neoadjuvant treatment for muscle-invasive bladder cancer: results of a multicenter phase II study with molecular correlates of response and toxicity. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Jun 20;32(18):1895–901.
167. Qureshi KN, Griffiths TRL, Robinson MC, Marsh C, Roberts JT, Hall RR, et al. TP53 Accumulation Predicts Improved Survival in Patients Resistant to Systemic Cisplatin-based Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer. :9.
168. Watanabe J, Nishiyama H, Okubo K, Takahashi T, Toda Y, Habuchi T, et al. Clinical evaluation of p53 mutations in urothelial carcinoma by IHC and FASAY. *Urology*. 2004 May;63(5):989–93.
169. Kakehi Y, Ozdemir E, Habuchi T, Yamabe H, Hashimura T, Katsura Y, et al. Absence of p53 overexpression and favorable response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in urothelial

- carcinomas. *Jpn J Cancer Res Gann.* 1998 Feb;89(2):214–20.
170. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang ZF, et al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1995 Jun;13(6):1384–90.
171. Duggan B, Kelly J, Keane PF, Williamson K, Johnston SR. Bcl-2 expression identifies patients with advanced bladder cancer treated by radiotherapy who benefit from neoadjuvant chemotherapy. *BJU Int.* 2000 Oct;86(6):757.
172. Font A, Taron M, Gago JL, Costa C, Sánchez JJ, Carrato C, et al. BRCA1 mRNA expression and outcome to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2011 Jan;22(1):139–44.
173. Choueiri TK, Jacobus S, Bellmunt J, Qu A, Appleman LJ, Tretter C, et al. Neoadjuvant dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin with pegfilgrastim support in muscle-invasive urothelial cancer: pathologic, radiologic, and biomarker correlates. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014 Jun 20;32(18):1889–94.
174. Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, Iyer G, Wagle N, Al-Ahmadie H, et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov.* 2014 Oct;4(10):1140–53.
175. Liu D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Garraway LA, Bellmunt J, Van Allen E, et al. Clinical Validation of Chemotherapy Response Biomarker ERCC2 in Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2016 Aug 1;2(8):1094–6.
176. Groenendijk FH, de Jong J, Franssen van de Putte EE, Michaut M, Schlicker A, Peters D, et al. ERBB2 Mutations Characterize a Subgroup of Muscle-invasive Bladder Cancers with Excellent Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol.* 2016 Mar;69(3):384–8.
177. Plimack ER, Dunbrack RL, Brennan TA, Andrade MD, Zhou Y, Serebriiskii IG, et al. Defects in DNA Repair Genes Predict Response to Neoadjuvant Cisplatin-based Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2015 Dec;68(6):959–67.
178. Afonso J, Santos LL, Miranda-Gonçalves V, Morais A, Amaro T, Longatto-Filho A, et al. CD147 and MCT1-potential partners in bladder cancer aggressiveness and cisplatin resistance. *Mol Carcinog.* 2015 Nov;54(11):1451–66.
179. Kilari D, Iczkowski KA, Pandya C, Robin AJ, Messing EM, Guancial E, et al. Copper Transporter-CTR1 Expression and Pathological Outcomes in Platinum-treated Muscle-invasive Bladder Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2016 Feb;36(2):495–501.
180. Takata R, Katagiri T, Kanehira M, Tsunoda T, Shuin T, Miki T, et al. Predicting response to methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for bladder cancers through genome-wide gene expression profiling. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Apr 1;11(7):2625–36.
181. Kato Y, Zembutsu H, Takata R, Miya F, Tsunoda T, Obara W, et al. Predicting response of bladder cancers to gemcitabine and carboplatin neoadjuvant chemotherapy through genome-wide gene expression profiling. *Exp Ther Med.* 2011 Jan;2(1):47–56.
182. Iyer G, Balar AV, Milowsky MI, Huang WC, Woods M, Donat SM, et al. Correlation of DNA damage response (DDR) gene alterations with response to neoadjuvant (neo) dose-dense gemcitabine and cisplatin (ddGC) in urothelial carcinoma (UC). *J Clin Oncol.* 2016 May 20;34(15_suppl):5011–5011.
183. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere FL, Albiol S, Guillem V, et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2007 Mar;18(3):522–8.
184. Pitroda SP, Pashtan IM, Logan HL, Budke B, Darga TE, Weichselbaum RR, et al. DNA Repair Pathway Gene Expression Score Correlates with Repair Proficiency and Tumor Sensitivity to Chemotherapy. *Sci Transl Med.* 2014 Mar 26;6(229):229ra42–229ra42.
185. Teo MY, Bambury RM, Zabor EC, Jordan E, Al-Ahmadie H, Boyd ME, et al. DNA Damage Response and Repair Gene Alterations Are Associated with Improved Survival in Patients with Platinum-Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2017 Jul 15;23(14):3610–8.
186. Dinney CPN, Hansel D, McConkey D, Shipley W, Hagan M, Dreicer R, et al. Novel neoadjuvant therapy paradigms for bladder cancer: results from the National Cancer Center Institute Forum. *Urol Oncol.* 2014 Nov;32(8):1108–15.
187. Pietzak EJ, Zabor EC, Bagrodia A, Armenia J, Hu W, Zehir A, et al. Genomic Differences Between “Primary” and “Secondary” Muscle-invasive Bladder Cancer as a Basis for Disparate Outcomes to Cisplatin-based Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol.* 2019;75(2):231–9.
188. Castroviejo-Bermejo M, Cruz C, Llop-Guevara A, Gutiérrez-Enríquez S, Ducy M, Ibrahim YH, et al. A RAD51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation. *EMBO Mol Med.* 2018;10(12).

189. Miyata Y, Sagara Y, Kanda S, Hayashi T, Kanetake H. Phosphorylated hepatocyte growth factor receptor/c-Met is associated with tumor growth and prognosis in patients with bladder cancer: correlation with matrix metalloproteinase-2 and -7 and E-cadherin. *Hum Pathol*. 2009 Apr;40(4):496–504.
190. Yeh C-Y, Shin S-M, Yeh H-H, Wu T-J, Shin J-W, Chang T-Y, et al. Transcriptional activation of the Axl and PDGFR- α by c-Met through a ras- and Src-independent mechanism in human bladder cancer. *BMC Cancer*. 2011 Apr 16;11(1):139.
191. Kim Y-W, Yun SJ, Jeong P, Kim S-K, Kim S-Y, Yan C, et al. The c-MET Network as Novel Prognostic Marker for Predicting Bladder Cancer Patients with an Increased Risk of Developing Aggressive Disease. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Jul 30 [cited 2019 Mar 21];10(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4520492/>
192. Hass R, Jennek S, Yang Y, Friedrich K. c-Met expression and activity in urogenital cancers – novel aspects of signal transduction and medical implications. *Cell Commun Signal CCS* [Internet]. 2017 Feb 17 [cited 2019 Mar 21];15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316205/>
193. Chen J-F, Yu B-X, Ma L, Lv X-Y, Jiang J-H, Ma Q. RON is overexpressed in bladder cancer and contributes to tumorigenic phenotypes in 5637 cells. *Oncol Lett*. 2018 May;15(5):6547–54.
194. Zhang X, Zhang Y. Bladder Cancer and Genetic Mutations. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Sep;73(1):65–9.
195. Rosenberg JE, Petrylak DP, Van Der Heijden MS, Necchi A, O'Donnell PH, Loriot Y, et al. PD-L1 expression, Cancer Genome Atlas (TCGA) subtype, and mutational load as independent predictors of response to atezolizumab (atezo) in metastatic urothelial carcinoma (mUC; IMvigor210). *J Clin Oncol*. 2016 May 20;34(15_suppl):104–104.
196. Teo MY, Seier K, Ostrovnaya I, Regazzi AM, Kania BE, Moran MM, et al. Alterations in DNA Damage Response and Repair Genes as Potential Marker of Clinical Benefit From PD-1/PD-L1 Blockade in Advanced Urothelial Cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2018 Jun 10;36(17):1685–94.
197. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017 Aug 1;127(8):2930–40.
198. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere FL, Albiol S, Guillem V, et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2007 Mar;18(3):522–8.
199. Mullane SA, Werner L, Guancial EA, Lis RT, Stack EC, Loda M, et al. Expression Levels of DNA Damage Repair Proteins Are Associated With Overall Survival in Platinum-Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2016;14(4):352–9.
200. Sakano S, Ogawa S, Yamamoto Y, Nishijima J, Miyachika Y, Matsumoto H, et al. ERCC1 and XRCC1 expression predicts survival in bladder cancer patients receiving combined trimodality therapy. *Mol Clin Oncol*. 2013 May;1(3):403–10.
201. Weaver DA, Crawford EL, Warner KA, Elkhairi F, Khuder SA, Willey JC. ABCC5, ERCC2, XPA and XRCC1 transcript abundance levels correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer*. 2005 May 9;4(1):18.
202. He C, Duan Z, Li P, Xu Q, Yuan Y. Role of ERCC5 promoter polymorphisms in response to platinum-based chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs*. 2013 Mar;24(3):300–5.
203. Somers J, Wilson LA, Kilday J-P, Horvilleur E, Cannell IG, Pöyry TAA, et al. A common polymorphism in the 5' UTR of ERCC5 creates an upstream ORF that confers resistance to platinum-based chemotherapy. *Genes Dev*. 2015 Sep 15;29(18):1891–6.
204. Wheeler HE, Gamazon ER, Stark AL, O'Donnell PH, Gorsic LK, Huang RS, et al. Genome-wide meta-analysis identifies variants associated with platinating agent susceptibility across populations. *Pharmacogenomics J*. 2013 Feb;13(1):35–43.
205. Yin J-Y, Shen J, Dong Z-Z, Huang Q, Zhong M-Z, Feng D-Y, et al. Effect of eIF3a on response of lung cancer patients to platinum-based chemotherapy by regulating DNA repair. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4600–9.
206. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov*. 2015 Nov;5(11):1137–54.
207. Li C-C, Yang J-C, Lu M-C, Lee C-L, Peng C-Y, Hsu W-Y, et al. ATR-Chk1 signaling inhibition as a therapeutic strategy to enhance cisplatin chemosensitivity in urothelial bladder cancer. *Oncotarget*. 2016 Jan 12;7(2):1947–59.
208. Xu G, Chapman JR, Brandsma I, Yuan J, Mistrik M, Bouwman P, et al. REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature*. 2015 May 28;521(7553):541–4.
209. Flores-Pérez A, Rafaelli LE, Ramírez-Torres N, Aréchaga-Ocampo E, Frías S, Sánchez S, et al. RAD50 targeting impairs DNA damage response and sensitizes human breast cancer cells to cisplatin

- therapy. *Cancer Biol Ther*. 2014 Jun 1;15(6):777–88.
210. Abuzeid WM, Jiang X, Shi G, Wang H, Paulson D, Araki K, et al. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Invest*. 2009 Jul;119(7):1974–85.
211. Ceccaldi R, Liu JC, Amunugama R, Hajdu I, Primack B, Petalcorin MIR, et al. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Polθ-mediated repair. *Nature*. 2015 Feb 12;518(7538):258–62.
212. Ray Chaudhuri A, Callen E, Ding X, Gogola E, Duarte AA, Lee J-E, et al. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature*. 2016 21;535(7612):382–7.
213. Nakada S, Yonamine RM, Matsuo K. RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1. *Cancer Res*. 2012 Oct 1;72(19):4974–83.
214. Wu W, Sato K, Koike A, Nishikawa H, Koizumi H, Venkitaraman AR, et al. HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation. *Cancer Res*. 2010 Aug 1;70(15):6384–92.
215. Jaspers JE, Kersbergen A, Boon U, Sol W, van Deemter L, Zander SA, et al. Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in Brca1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discov*. 2013 Jan;3(1):68–81.
216. Jr JHW. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *J Am Stat Assoc*. 1963 Mar 1;58(301):236–44.
217. Kolde R. Pheatmap: pretty heatmaps. R Package Version. 2012;61:617.
218. Hennig C. Cluster-wise assessment of cluster stability. *Comput Stat Data Anal*. 2007;52:258–71.
219. nCounter® Technology | NanoString Technologies [Internet]. SITE. [cited 2019 Apr 22]. Available from: <https://www.nanostring.com/scientific-content/technology-overview/ncounter-technology>
220. Dash A, Pettus JA, Herr HW, Bochner BH, Dalbagni G, Donat SM, et al. A role for neoadjuvant gemcitabine plus cisplatin in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a retrospective experience. *Cancer*. 2008 Nov 1;113(9):2471–7.
221. Del Bene G, Calabrò F, Giannarelli D, Plimack ER, Harshman LC, Yu EY, et al. Neoadjuvant vs. Adjuvant Chemotherapy in Muscle Invasive Bladder Cancer (MIBC): Analysis From the RISC Database. *Front Oncol*. 2018;8:463.
222. Galsky MD, Stensland K, Sfakianos JP, Mehrazin R, Diefenbach M, Mohamed N, et al. Comparative Effectiveness of Treatment Strategies for Bladder Cancer With Clinical Evidence of Regional Lymph Node Involvement. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 01;34(22):2627–35.
223. López de Maturana E, Alonso L, Alarcón P, Martín-Antoniano IA, Pineda S, Piorno L, et al. Challenges in the Integration of Omics and Non-Omics Data. *Genes*. 2019 Mar 20;10(3).
224. Shariat SF, Palapattu GS, Karakiewicz PI, Rogers CG, Vazina A, Bastian PJ, et al. Discrepancy between clinical and pathologic stage: impact on prognosis after radical cystectomy. *Eur Urol*. 2007 Jan;51(1):137–49; discussion 149–151.
225. Tse J, Ghandour R, Singla N, Lotan Y. Molecular Predictors of Complete Response Following Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma of the Bladder and Upper Tracts. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 13;20(4).
226. Streeper NM, Simons CM, Konety BR, Muirhead DM, Williams RD, O'Donnell MA, et al. The significance of lymphovascular invasion in transurethral resection of bladder tumour and cystectomy specimens on the survival of patients with urothelial bladder cancer. *BJU Int*. 2009 Feb;103(4):475–9.
227. Millikan R, Dinney C, Swanson D, Sweeney P, Ro JY, Smith TL, et al. Integrated therapy for locally advanced bladder cancer: final report of a randomized trial of cystectomy plus adjuvant M-VAC versus cystectomy with both preoperative and postoperative M-VAC. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Oct 15;19(20):4005–13.
228. Minato A, Fujimoto N, Kubo T. Squamous Differentiation Predicts Poor Response to Cisplatin-Based Chemotherapy and Unfavorable Prognosis in Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(6):e1063–7.
229. Oh JJ, Byun S-S, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Association Between Preoperative Hydronephrosis and Prognosis After Radical Cystectomy Among Patients With Bladder Cancer: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol* [Internet]. 2019 Mar 19 [cited 2019 Apr 28];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6433994/>
230. Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA, Chan KS, Kim WY, Radvanyi F, et al. Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting. *Bladder Cancer Amst Neth*. 2016 Jan 7;2(1):37–47.
231. Seiler R, Ashab HAD, Erho N, van Rhijn BWG, Winters B, Douglas J, et al. Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol*. 2017;72(4):544–54.
232. Combining DNA-repair gene mutations and molecular subtyping for more accurate prediction of outcome after neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer [Internet]. UROONCO Bladder Cancer. [cited

2019 May 4]. Available from: <https://bladder.uroonco.uroweb.org/publication/combining-dna-repair-gene-mutations-and-molecular-subtyping-for-more-accurate-prediction-of-outcome-after-neoadjuvant-chemotherapy-for-bladder-cancer/>

233. Paré L, Pascual T, Seguí E, Teixidó C, Gonzalez-Cao M, Galván P, et al. Association between PD1 mRNA and response to anti-PD1 monotherapy across multiple cancer types. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018 Oct 1;29(10):2121–8.

234. Pfannstiel C, Strissel PL, Chiappinelli KB, Sikic D, Wach S, Wirtz R, et al. The tumor immune microenvironment drives a prognostic relevance that correlates with bladder cancer subtypes. *Cancer Immunol Res*. 2019 Apr 15;

235. Zhang R, Tian L, Chen L-J, Xiao F, Hou J-M, Zhao X, et al. Combination of MIG (CXCL9) chemokine gene therapy with low-dose cisplatin improves therapeutic efficacy against murine carcinoma. *Gene Ther*. 2006 Sep;13(17):1263–71.

236. Malanga M, Althaus FR. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 2005 Jun;83(3):354–64.

237. Matsuda K, Kawasaki T, Akazawa Y, Hasegawa Y, Kondo H, Suzuki K, et al. Expression pattern of p53-binding protein 1 as a new molecular indicator of genomic instability in bladder urothelial carcinoma. *Sci Rep*. 2018 Oct 19;8(1):15477.

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de vejiga en hombres en Europa (3).....	21
Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en España (3).....	22
Figura 3. Evolución temporal de la incidencia y mortalidad por cáncer de vejiga de hombres y mujeres en Cataluña entre los años 1994 y 2016 (5)	22
Figura 4. Incidencia y mortalidad del cáncer de vejiga en Cataluña con respecto a Europa. Evolución de la tendencia temporal de la incidencia y mortalidad por cáncer de vejiga en Cataluña y regiones de Europa durante los años 1994 y 2012/13 (5).....	23
Figura 5. Tumor vesical papilar exofítico y su base. Las muestras de la base deben ser recogidas evitando una coagulación abundante y así prevenir el artefacto que supone el cauterio sobre la muestra.....	31
Figura 6. Estadaje del cáncer de vejiga (59).....	33
Figura 7. Plantillas limitada (A), estándar (B), extendida (C) y súper extendida (D) (68).....	36
Figura 8. Supervivencia según el grupo de tratamiento y si los pacientes presentaron respuesta patológica completa (pT0) o tenían enfermedad residual (RD) en el momento de la cistectomía (87) 40	
Figura 9. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra la SG de pacientes con CVMI tras cistectomía radical sin QNA basada en alto riesgo clínico vs bajo según factores pronósticos(123)	49
Figura 10. Modelo explicativo de la génesis del tumor vesical y su progresión (143).....	51
Figura 11. El CVMI es heterogéneo y se pueden definir diferentes subtipos según los perfiles de expresión del ARN. Correspondencias de los diferentes subtipos descritos por los grupos de Lund, TCGA, MDA y UNC (91)	54
Figura 12. Análisis IHQ básico de los fenotipos basal y luminal según la tinción de GATA3 y KRT 5/6 entre otros. Las barras de escala indican 100 μ m (158).....	56
Figura 13. Esquema del enfoque terapéutico estratificado propuesto según el subtipo basado en la expresión para realizar ensayos clínicos prospectivos (160).....	58
Figura 14. Principales vías de reparación del ADN. Las vías de reparación de DSB están en el área sombreada en azul. Las vías de reparación de rSSB se encuentran en el área sombreada en rojo. Los principales objetivos del desarrollo de fármacos están en rojo (163).....	60
Figura 15. Frecuencia de mutaciones de genes HD-DDR en diferentes tumores sólidos (164).....	61
Figura 16. A. SG en presencia o ausencia de mutaciones de ERCC2 en la cohorte de validación (FCCC) B. SG en presencia o ausencia de mutaciones de ERCC2 en la cohorte de descubrimiento (DFCI/MSKCC) (175)	64
Figura 17. SLP y SG para ATM/RB1/FANCC según mutación para la serie descubrimiento del AMVAC (A y C) y validación del DDGC (B y D). La alteración en cualquiera de los 3 genes predijo mejor SLP y SG. wt = tipo salvaje; mut = mutación; PTs = pacientes (177)	65
Figura 18. Vías y genes implicados en la reparación de ADN y tolerancia al estrés replicativo. Los cuatro genes en rojo fueron los que finalmente se escogieron (184).....	66
Figura 19. Asociación de las alteraciones en vías DDR de forma individual tanto a SLP (A) como a SG (B) (185)	67
Figura 20. Análisis genómicos de los CVMI. (A) Frecuencia de alteraciones de genes asociados con respuesta a quimioterapia en tumores primarios vs secundarios (B) Comparación de la SG en pacientes con CVMI primario respecto a secundario tratados con QNA y cistectomía radical (187).....	69
Figura 21. La firma relacionada con la expresión de genes relacionados con la inflamación por células T denota una biología compleja en el microambiente inmune del huésped (197).....	72
Figura 22. Clasificación según pHeatmap respecto a los 4 marcadores utilizados para la clasificación y asociación según su respuesta patológica a los 3 subfenotipos.	89
Figura 23. Proceso de obtención y purificación de ARN, hibridación con las sondas y adquisición digital de los datos de expresión mediante el sistema nCounter® de Nanostring Technologies®	89
Figura 24. Hibridación del ARN de cada gen con las sondas de captura y de codificación (219).....	91
Figura 25. Eliminación del exceso de sondas, unión al cartucho, inmovilización y alineación (219).	92
Figura 26. Contaje específico de ARN de cada gen mediante la lectura del código correspondiente (219).	92
Figura 27. Correlación de los 4 marcadores según su expresión de ARNm y la expresión por IHQ.....	100
Figura 28. Clasificación taxonómica de los pacientes en 3 grupos según los 4 marcadores utilizados y su puntuación. Mixto (mixed), luminal (luminal) y basal (BASQ).....	101
Figura 29. Boxplot de la expresión normalizada de los genes de normalización para la muestra 16C (7 réplicas) y la muestra 25C (6 réplicas). La dispersión para estas muestras prácticamente fue nula..	105

<i>Figura 30. Boxplot de la expresión de los genes de normalización para cada una de las réplicas. Se observan perfiles de expresión similares en todas las réplicas de la muestra 16C y 25C.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 31. Gráficas penalización (A) y de Lasso (B) para calcular el parámetro de penalización lambda, así como el número de variables óptimo (Lambda min = 0.0403, 9 variables).....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 32. Boxplot del logaritmo de la expresión genética de los genes seleccionados por Lasso. En claro están aquellos pacientes con RPc y en oscuro, los pacientes con respuesta parcial o sin respuesta. Entre paréntesis se muestra el número de muestras que contiene cada grupo para cada gen (n). Debajo de cada gráfico se especifica el p-valor obtenido en el análisis univariante</i>	<i>109</i>
<i>Figura 33. Incremento de la capacidad predictiva de RPc. El primero modelo (clínical) pertenece al modelo clínico y patológico. El segundo modelo (+cluster) añade la variable de taxonomía. Posteriormente se añaden la información de los genes uno a uno</i>	<i>110</i>
<i>Figura 34. La RPc se asoció a mayor SLP de forma estadísticamente significativa (p=0.001). En azul se muestran los pacientes con RPc y en verde los que no presentaron respuesta o fue parcial</i>	<i>112</i>
<i>Figura 35. La RPc se asoció a mayor SG de forma estadísticamente significativa (p=0.001). En azul se muestran los pacientes con RPc y en verde los que no presentaron respuesta o fue parcial</i>	<i>112</i>
<i>Figura 36. La RPc se asoció a mayor SCE de forma estadísticamente significativa (p=0.001). En azul se muestran los pacientes con RPc y en verde los que no presentaron respuesta o fue parcial</i>	<i>113</i>
<i>Figura 37. Curvas Kaplan-Meier para Supervivencia Libre de Progresión (SLP) de pacientes de cáncer de vejiga para cada modelo. El color amarillo representa pacientes con una firma favorable, mientras que el color azul representa pacientes con firma desfavorable</i>	<i>115</i>
<i>Figura 38. Curvas Kaplan-Meier para Supervivencia Absoluta (SG) de pacientes de cáncer de vejiga según cada firma. El color amarillo representa pacientes con una firma favorable, mientras que el color azul representa pacientes con firma desfavorable.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 39. Curvas Kaplan-Meier para Supervivencia Específica de Enfermedad (SCE) de pacientes de cáncer de vejiga, estratificado por cada firma. El color amarillo representa pacientes con una firma favorable, mientras que el color azul representa pacientes con una firma desfavorable</i>	<i>117</i>
<i>Figura 40. Clasificación de las estrategias a seguir para la integración de datos moleculares (omics) y clínicos o patológicos (non-omics) (223)</i>	<i>124</i>
<i>Figura 41. Ejemplo de cross-validation. Se subdividen los datos en 5 partes y se construye el modelo predictivo utilizando 4 partes de los datos. Se realiza una validación posterior sobre la parte restante. Este procedimiento se repite en varias ocasiones, realizando 5 experimentos diferentes</i>	<i>131</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Clasificación patológica por TNM del cáncer de vejiga (54)</i>	32
<i>Tabla 2. Biomarcadores y modelos genéticos predictivos de respuesta a quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de vejiga con invasión muscular (165)</i>	62
<i>Tabla 3. Genes implicados en diferentes vías de respuesta y reparación de daño del ADN y porcentaje de afectación de cada vía en los pacientes con alteraciones (185)</i>	66
<i>Tabla 4. Inclusión de genes para el análisis de expresión de ARN según las vías de reparación a las que pertenecen</i>	87
<i>Tabla 5. Genes de dianas terapéuticas y remodelación de la cromatina</i>	87
<i>Tabla 6. Genes de clasificación taxonómica</i>	87
<i>Tabla 7. Genes relacionados con respuesta inmunológica</i>	88
<i>Tabla 8. Características clínicas descriptivas de los pacientes según la disponibilidad de material y datos completos para realizar el estudio de expresión genética (ANÁLISIS RNA) y los que no (NO ANÁLISIS RNA)</i>	99
<i>Tabla 9. Análisis univariante para variables clínicas, patológicas y taxonómicas. Se muestra el odds ratio, intervalo de confianza y el p-value para cada una de ellas</i>	103
<i>Tabla 10. Genes con mayor porcentaje de valores por Nanostring® inferiores al control negativo y número de pacientes con valores superiores según su respuesta al tratamiento</i>	104
<i>Tabla 11. Coeficiente de variación de los genes de normalización para las réplicas 16C y 25C</i>	105
<i>Tabla 12. Modelos analizados y sus capacidades predictivas. Se destaca en negrita el modelo con mayor capacidad predictiva de respuesta</i>	107
<i>Tabla 13. Modelo clínico-patológico + cluster (stepwise)</i>	108
<i>Tabla 14. Coeficientes de los genes seleccionados tras el análisis mediante Lasso. La tabla describe el porcentaje de selección en Lasso, el coeficiente e incluye la media y la mediana de la expresión de cada gen para cada grupo de respuesta al tratamiento: Mean: media; Median: media; Median: mediana; %Sel: porcentaje de selección; Coef: coeficiente; Compl, respuesta completa; partial/noResp: respuesta parcial o no respuesta al tratamiento</i>	108
<i>Tabla 15. Incremento de la capacidad predictiva (AUC) de RPc al añadir cada variable. Se obtiene la máxima capacidad predictiva con 2 genes (RAD51 y CXCL9) y también con 4 genes (RAD51, CXCL9, PARP y 53BP1)</i>	110
<i>Tabla 16. Modelo univariante de cada uno de los 38 genes con la variable RPc</i>	111
<i>Tabla 17. Modelos según inclusión de información clínica, patológica y de taxonomía (CPT) así como la adición de genes por orden de selección mediante Lasso</i>	114
<i>Tabla 18. Modelo clínico y patológico seleccionado por stepwise, con el coeficiente de estimación, error estándar, valor z y p-valor</i>	125
<i>Tabla 19. Modelo stepwise incluyendo la variable de taxonomía junto a las clínicas y patológicas</i>	126

Apéndice



Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació

Crta. De Canyet, s/n - 08916 Badalona
Tel. 93 497.89.56 Fax 93 497.89.74
E-mail: ceic.germanstrias@gencat.cat



A/A.: Dr. A. Font Pous
Servei d'Oncologia Mèdica
Hospital U. Germans Trias i Pujol
08916 - Badalona

Fax:

CÓDIGO	AECC-NEOADY-01	PROMOTOR	CNIO / SOGUG / ICO – HUGTIP	REF. CEI	PI-15-072
TÍTULO: Valor predictivo y pronóstico de los genes implicados en las vías reparadoras del ADN en la respuesta patológica y supervivencia de los pacientes con cáncer de vejiga invasivo que hayan recibido quimioterapia neoadyuvante. Estudio observacional retrospectivo. Versión no consta					
INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. A. Font Pous					

La Dra. Pilar Giner Boya, Presidenta del Comitè de Ètica de la Investigació del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

CERTIFICA

Que en la reunió de fecha 29 de mayo de 2015 se aprobó el estudio arriba mencionado cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación vigente para que la decisión del citado CEI sea válida.

Que en el supuesto que algún miembro del CEI sea investigador principal o colaborador del estudio evaluado, éste se ausentará de la reunión durante la deliberación y toma de decisión.

Que el CEI, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y que su composición actual es la siguiente:

Presidenta

Giner Boya, Pilar. Farmacia

Vicepresidenta

Balañá Quintero, Carme. Oncología Mèdica (ICO)

Secretaria

López Andrés, Anna. Farmacología Clínica (IGTP)

Secretaria Tècnica

Fortes Villegas, Àngels. (IGTP)

Vocales

Altimir Losada, Salvador. Geriatria

Avecilla Palau, M^a Àngels. Ginecologia y Obstetricia (BSA)

Bayés Genís, Beatriu. Direcció Mèdica

Dachary Jiménez, Natàlia. Jurista

Devesa Pradells, Anna. Enfermeria

Jiménez López, Irene. Unitat d'Atenció a l'Usuari

Montané Esteve, Eva. Farmacologia Clínica

Oriol Rocafiguera, Albert. Hematologia y Hemoterapia (ICO)

Palomo Nicolau, Antonio. Psiquiatria. (CEM)

Peláez de Loño, Jordi. Farmacia (CATSALUT)

Puyalto Depablo, Paloma. Radiologia

Ramo Tello, Cristina. Neurologia

Romero González, Ramón. Nefrologia

Romeu Fontanillas, Joan. Medicina Interna

Sánchez Fernández, M^a del Carmen. Genètica (IJC)

Solà Suárez, Montserrat. Medicina Nuclear

Vega Santamaría, Ana. Enfermeria

Atentamente,

Dra. Pilar Giner Boya
Presidenta CEI
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

Badalona, 15 de junio de 2015
PGB/afv

c.c. Dr. A. Font Pous



Comitè d'Ètica de la Investigació

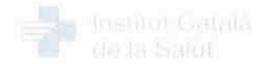
Apéndice 1. Acta del CEIC correspondiente al estudio.



Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació

Crta. De Canyet, s/n - 08916 Badalona
Tel. 93 497.89.56 Fax 93 497.89.74
E-mail: ceic.germanstrias@gencat.cat



INFORME DEL COMITÈ DE ÈTICA DE LA INVESTIGACIÓ

La Dra. Pilar Giner Boya, Presidente del Comitè de Ètica de la Investigació del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol,

CERTIFICA

Que este Comitè ha evaluado la propuesta del Centro Nacional De Investigaciones Oncológicas (CNIO) / Grupo Español de Oncología Genitourinaria (SOGUG) / Institut Català d'Oncologia – Hospital U. Germans Trias i Pujol (ICO – HUGTiP) para que se realice el proyecto de investigación, código de protocolo AECC-NEOADY-01 titulado:

“Valor predictivo y pronóstico de los genes implicados en las vías reparadoras del ADN en la respuesta patológica y supervivencia de los pacientes con cáncer de vejiga invasivo que hayan recibido quimioterapia neoadyuvante. Estudio observacional retrospectivo.” Versión no consta

Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado versión: no consta

y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y que el estudio cumple con los aspectos que se recogen en la Ley de Investigación Biomédica 14/2007.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados.

La capacidad del investigador y sus colaboradores, así como los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Y que este Comitè acepta que dicho estudio sea realizado en el Institut Català d'Oncologia - Hospital Universitario Germans Trias i Pujol por el Dr. A. Font Pous del Servicio de Oncología Médica como investigador principal.

Lo que firmo en Badalona a 29 de mayo de 2015

Firmado:

Dra. Pilar Giner Boya


Comitè d'Ètica de la Investigació

Ref. CEI: PI-15-072

Apèndice 2. Informe del CEIC.

CODESET DETAILS			
Customer Identifier	Accession	Position	Target Sequence
1 ACTB	NM_001101.2	1011-1110	TGCAGAGGAGACTCACTGCCCTGGCACCACGACAAATGAAGATCAATGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGGATCGGGCGCTCCATCT
2 ATM	NM_138292.3	1324-1423	TGAAGATAAAGAACTCAGTGGACCTTCATTAATGCTGACCTACCTGAATAACACACTGGTAGAAGATTGGTCAAAGTTGATCAGCAGCTGTCACTGG
3 ATR	NM_001184.2	566-665	AAGACTTGGTTTACCTCCATAGAAGAAATGTGATGGTTCATGCTGGAAATGGCCAGTGGTCAAGCCGATTTTAAAGTCAATAGATGAACACATGGG
4 Axl	NM_021913.2	2191-2290	AGCTGGAGGATTCCTGAGTGAAGCGTCTGCATGAAGAAATTTGACCAATCCAAAGTATGAGGCTCATCGGTGTCTGTTCCAGGGTTCGAACGAGA
5 BRCA1	NM_007294.3	788-887	TCCTTCAAGATACCCTTAATAAGGCAACTTTGACAGTGGGGAGATCAAGAAATTTGCAAAATCCCTCCAAAGAAACAGGATGAATCACTTTGG
6 BRCA2	NM_000059.3	116-215	GGGGACAGATTGTGACCGCGCGGTTTTGTGACCTACTCCGGCCAAAGAAAGACTGCACCTCTGGAGCCGACTTTATCCAAAGCATTGGAGAAATA
7 PDL1	NM_014143.3	50-149	AGCTTCCCGAGGCTCCGACCCAGCCGCTCTGTCGGCTGCGAGGCAATCCAGAAAGATGAGGATATTGCTGTCTTATATTCATGACCTATGGCA
8 CHEK1	NM_00114121.1	2226-2325	AGGGTGTGATGGAGTTCAAGAGACACTCCTGAAGATTAAAGGGAAGCTGATTGATATTGAGAGCCGCAAGAAATTTGGCTCTCCGACATGATC
9 CHEK2	NM_001005735.1	895-994	GGAGAGGTAAGAGTGGCTTTCGAGAGAAACATGTAAGAAAGTAGCCATAAAGATCATCAGCAAAAGGAAATTTGCTATTGGTTCAGCAAGAGGAGGAG
10 CXCL9	NM_002416.1	1976-2075	CACCATCTCCATGAAGAAAGGGAAGGTAAGTAAAGCTAAGGCTAGAGGAAGCAAGCAAGTCGGTTAGTGGAAAGATGATTGGTCCCAAGTTCGCTCTG
11 eIF3a	NM_003750.2	2551-2650	GCAGGATAACACTATAGAGAAAAGAAAGAGGAGGAGCAGAGAAAGGGCAGAAAGCAAAATGCTAAAAGAGGGGAGAGAGAGAGCGCCGCAAGCAGG
12 ERCC1	NM_001983.3	459-558	CCTGGCAGAGGGCAATCCGCTACTGAAGTTGGTGGCAATGTCCCTGGGAAATTTGGGACGTAATTTCCGACTATGTGCTGGCCAGACACACTGTG
13 ERCC2	NM_000400.2	241-340	CATCTACTCTCAAGAACTGTGCCAGATTGAGAGGGTATTTGAGAGCTTCSAAAGTTGCTCAACTTATGABAACGAGGAGGCGAGAGCTCCG
14 ERCC5	NM_000123.3	331-430	AGGGCTTCTCCCGGGTCTTACGGCGGGTGCATCCGCTCGTAGAAGATTAGAGTAGAAGTTGCTGGGTCCTCTTATGAGCAGCCGCTCTCATGG
15 ERCC6	NM_001277058.1	201-300	TCAAAGTCAAAGTCCAGGAGCAAGACTGTTTACAGAGTCAACCTCTCAGTAATAATGAGAAATGGCAATCAAGCAAGAAAGTGGTGGTATGGGAGTGG
16 FANCA	NM_000135.2	799-898	CTGAGAAAGACTGTGGAGCCGCAAAAATGCCCGAGTCCAGGTTGATGACTGCAGAGAAAGTCTGATTTTGGCTTCAAGCTTGGCTGCTGGAGTAC
17 FANCC	NM_001243743.1	1037-1136	ATTATCGCTGCTCAAGCGCTGCCACCTGCCATAATCCGGGTTGTTGATGAGATGTTCCAGGTGTGCACCTCGTGAACCGATGGGGCCCTGGAAAT
18 FANCD2	NM_033084.3	261-360	GGGAGAGATCAGAACTCAAGTACTGTGGATCAAAATAGCTTCCAAAAGAAAGCTTTTCAAGCCTGAGGAGACACCCCTTCTATCCAAAATAATAGAA
19 FOXA1	NM_004496.2	2466-2565	TGATACATTTCAAGAGTTGCTTACCAGAAATTTCAAGGACCCCAACCCCTTTGCTCTCTACCCACAGATGGCCCTGGGAATCAATTCCTCAGGAAT
20 GAPDH	NM_002046.3	973-1072	CACCTCCTCACCCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAATTCCTGATGACACAAATTTGGCTCAGCAGCAGGG
21 GATA3	NM_001002295.1	1692-1791	GTGCTAGCTCACTGGAGACTTCCCAAGAACGCTGTTTAAACCCGCGCCCTCCAGCAGCAATGCTCCCTGAGCCACATCTGGCCCTTCAAGC
22 HERC2	NM_004667.4	13431-13530	CTGTCTTTGGGAGATGTGCTTAAGATGAGCTCTTTTGGTCCCGACAGCCTCTCTCTCACCTGTCTGGAAAGTCAAGTTTGGTGGTAACTGT
23 HPR1	NM_000194.1	241-340	TGTGATGAAGGAGATGGGAGCCATCACCATTGCTCCCTCTGTGTGCTCAAGGGGGCTATAAATCTTTCTGCTGACTGCTGATACAAAGCACTG
24 IFNG	NM_000619.2	971-1070	ATACTTCCAGTTACTGCCGTTTGAATAATGCTGCAACTGAGCCAGTCTTAAATGGCATGACAGCAAGTGAATTTGCTGAGTCAAGCTGAT
25 KRT14	NM_000526.4	524-623	CGGCCTGTGAGATCAAAGACTACAGCTCCTCACTCAAGCATTGAGGACCTGAGGAAACAAGATTTCAAGCCACAGTGGCAATGCCAATGCCAATGCTC
26 KRT5/6	NM_000424.2	131-230	CTGGTTCTCTGCTCCAGGAAACCAAGCCCAATGCTGCCAGTCAAGTGTGCTCCGGAGCGGGGAGCTGTGACTTCAAGCCCGCCCTCCGCA
27 LAG3	NM_002286.5	1736-1835	CTTTTGGTGTGAGGAGCTTTGGCTTTCACCTTTGGAGAAAGACAGTGGCGACCAAGACGATTTTCTGCTTAGAGCAAGGGATCACCTCCGACGGCTC
28 LDHA	NM_001165414.1	1691-1790	AACTTCTGGCTCTTCACTGAACATGCCTAGTCCAAATTTTTCCAGTGAAGTCACTCCTGGATCCAAGTATAAATCCAAATATCATGCTCTGTGC
29 REV7 (MAD2L2)	NM_001127325.1	291-390	GAGGTGGCTGTGACTCTACTCTAGCTTGGCGGAGGCTTACCCCTGGGGATCTCCAGAAACGCAAGAAAGTACAAGGTGCGGGTCCAGATGCTCTGCC
30 c-Met	NM_001127500.1	1926-2025	GCCTGACCATATGTGGCTGGGACTTGGATTTGGGAGGAAATAAATAATTTGATTAAGAAACTAGAGTTCTCTGGAAATGAGAGCTCACTTGGC
31 RON	NM_002447.1	3301-3400	CCACTTTGAGTTGTCTACCCAGGAAATAGATAGACCAAGCCCAAGTCCAAATCCAAATGGCCATCAAGTCAAGTCAAGTCAAGGAGATGGCAGCA
32 NBN	NM_002485.4	1061-1160	GACTACAAAGAAATTAAGTGTACTCCTCAGGGCCATCCAGTACAGGATTAAGAGCAACAACCTCCAGCAGCAGCTTCAAGAGGCTGTCAAGTGTGAA
33 PALB2	NM_024675.3	3551-3650	GTTCCTGGAAGTGAAGTGAAGTCACTGTGCAAGCAACTTGAATCTGGAACAATTTGCCATTTGGGACTACTCTCTGCTGATGCTGATCCCTC
34 PARP	NM_001618.3	3017-3116	AAGGTTTGGGCAAACTACCCCTGATCCTCAGTAACTATGACTGGATGGTGTAGAGCTTCTCTGGGACCGGGATTTCACTGGTGTGAATGACAC
35 PTIP	NM_007349.3	1026-1125	TAGCTACCTGGAGTCCAGCTGACGGACACTGAGGAATATTAATAATGCTGACATTCAGCAGATGAACCGCCCAAAATGAGCACAATCTTTACA
36 PD1	NM_005018.2	311-410	CTTCCCGAGGACCGCAGCCAGCCGCGCAGGACTCCCGCTCCGCTGCACAACTGCCCAAGCGGGGACTCCACATGAGCGGTGTCAGGCGCCGG
37 POL theta	NM_199420.3	2781-2880	AATGATTTGCAAGGAGACTTGAATGAAATGGGAGTGCATGGAATCCATGTGCCCTGTACCTTCAATAGTACATGCTCAATGACTCATGATGATGCGGAA
38 RAD50	NM_005732.2	5398-5497	GCAGGACCAATCCGGCTTGTATTCAGTACACATGGCATGGTTTGTGCCATCTGTAGCTATAATGAGCATGTTTTCCTAGCAGCTTTTCTCACTGGG
39 RAD51	NM_133487.2	367-466	AGACCCAGAGCCGAGCTCTTATCAAGCAAGCCATGATGGTGAATGAGTATGCACTGCTTATGAGCAGATGCAAGCCGCTTACAGAGCA
40 Rf1	NM_001177663.1	4361-4460	TGAGGATAGTCAAGTTCAGATACTCAAATCAAGAAACCTTAGACCGTCTTCAAGCCAGCTGAGAAATGAGTGAAGTCTACCACTGAAGCCAAAGAT
41 RNF168	NM_152617.2	712-811	ATGCTGTGGACTCGGTACCAACCCGAAAGAAATCTCTGCTCAAGCTGGAAGTGTGGAGCATAAATCAAAAACACTTCCAGGGAGTGAAGCTTAGA
42 RNF8	NM_003958.3	45-144	AGCGAGGCTGCTTTCGACGACTCCGAGCGTGTGGCGATGCTTCTGCTGTTATTAGATGGAAGCTGAGGGGATGACAGAGGAGCCAGCAAC
43 TERT	NM_198253.1	2571-2670	GGCTCAAGGCTGGGAGGAACATGGCTCGCAACTCTTTGGGCTCTGGGCTGAGGCTGAGGCTGTTTGGATTTGAGGATGACAGCTCCAGCA
44 53BP1	NM_001141980.1	1961-2060	AGCAGAAAGTGTGTTGATGATCCTCACTGTGATTCGGGGAGTCAAGCAATTCGCTCACCAGCTACTGATCGAGGCATTTCTAGTGTGTTAGATCAG
45 Ku80	NM_021141.3	833-932	GAGAAAAGTGTGCTCTCAAGAAATGAGAGGCAATCCACTGCTGCTGCGACTGACCATGGCTCCAAATTTGCTATAAGGATTCAGCCTAT

Apéndice 3. Detalle de las secuencias de las sondas validadas para cada gen.

