

**DETECCIÓN PRECOZ DE CÁNCER VESICAL EN
POBLACION LABORAL DE ALTO RIESGO**

**Marta Sánchez-Carbayo Martín
Laboratorio de Oncología Traslacional
Lucio Lascaray Ikergunea
Universidad del Pais Vasco**

Octubre 2015-Septiembre 2016

**Palabras claves: cáncer vesical, epigenética,
detección precoz, orina**

MEMORIA JUSTIFICATIVA DE PROYECTO

1. SINOPSIS INTRODUCCIÓN

El cáncer vesical es un tumor asociado con la exposición laboral a agentes carcinógenos relacionados con sectores industriales. El cáncer de vejiga es un tumor frecuente asociado a factores epidemiológicos como el tabaco, y ambientales entre los que se encuentra la inhalación de sustancias tóxicas en distintas exposiciones laborales (industria, minería, etc). La exposición laboral a distintos carcinógenos se ha asociado con la presencia de tumores en distintas localizaciones, incluyendo mesoteliomas, senonasales, pulmón, nasofaringe, mama, piel, esofago, estómago, sarcomas de tejidos blandos, y vejiga. La justificación de plantear una estrategia de prevención específicamente en cáncer vesical se justifica por su alta prevalencia, el cuarto en países industrializados, y el hecho de que los pacientes con cáncer vesical tienen una alta tasa de recurrencia, lo cual conlleva la necesidad de seguimiento de manera crónica, con unos gastos económicos y sociales elevados. Es por tanto, una enfermedad prevalente y grave, con importantes implicaciones y consecuencias en la salud, calidad de vida y gasto social. Entre los carcinógenos de exposición laboral más reconocidos se encuentran los asbestos, aceites minerales, radiación, silice, motores de combustión diesel, minería de carbón y metales, dioxinas, y otra exposición ambiental como al tabaco, radon, tetracloroetileno, arsenico, mezclas inorgánicas y otras múltiples circunstancias y exposiciones laborales cuyos agentes carcinógenos siguen sin identificarse ni probarse *in vitro* o *in vivo* la relación directa con la enfermedad neoplásica (Rushton L et al, 2012). La asociación de la exposición de la industria del metal y del arsénico al cáncer vesical se ha descrito en más de 20 estudios (Park D et al, 2009). Se cree que puede estar relacionado con los fluidos metálicos aunque aun no está demostrado si pueden ser: a) directos: aceites minerales, aditivos; b) solubles: aceites minerales, agua, aditivos; c) sintéticos: agua, orgánicos, aditivos; o d) semisintéticos: híbridos de sintéticos y solubles (Colt JS et al, 2014). La exposición a estireno, toluidina, anilina y nitrobenceno en la industria del plástico y gomas (Christensen et al, 2014; Carreon T et al, 2014), a dinitrotolueno en la industria del cobre (Seidler A et al), a tetracloroetileno en la industria de la limpieza en seco (Vlaanderen J et al, 2014), también se han asociado con la presencia de cáncer vesical.

El cáncer vesical es un tumor frecuente y relevante social, laboral y clínicamente. El cáncer vesical representa el cuarto tumor más frecuente en hombres y la octava causa de muerte por cáncer en el hombre (Siegel et al, 2015). Se estima que un 5-25% de los tumores vesicales están relacionados con la exposición a carcinógenos en el ambiente laboral (Siegel et al, 2015). En la práctica clínica habitual, el diagnóstico y el seguimiento del cáncer vesical está basado en la cistoscopia, considerada el método de referencia, en combinación con los hallazgos de la citología urinaria. Debido a las altas tasas de recurrencia y progresión de los tumores no músculo invasivos en invasores de la muscular del urotelio, los pacientes están sometidos a seguimiento mediante cistoscopia cada 3 o 6 meses durante un mínimo de 5 años después del tratamiento quirúrgico de su tumor. La naturaleza invasiva de la cistoscopia, que resulta muy poco confortable para un gran número de pacientes, la naturaleza subjetiva de la citología urinaria, que depende de las habilidades del patólogo y la calidad de la muestra, y tiene limitada

sensibilidad para los tumores mas frecuentes (los no musculo-invasivos), unido a la ausencia de marcadores tumorales en suero fiables en la practica clínica, inducen a la búsqueda de metodos objetivos y no invasivos para la detección del cáncer vesical (Sanchez-Carbayo et al, 2007). Además, es difícil predecir la evolucion clínica de los tumores individuales, y algunos pacientes pueden progresar a enfermedad invasiva a pesar del seguimiento exhaustivo con cistoscopia y terapias agresivas conservadoras de la vejiga. La muestra de orina, en contacto directo con el tumor, representa una muestra fácilmente obtenible para explorar alteraciones moleculares asociadas con progresión tumoral y poder desarrollar biomarcadores para la detección precoz y el seguimiento de la enfermedad asi como para la estratificación del pronóstico clínico. Asi, el cáncer vesical es uno de los tumores con mayores gastos sanitarios por los requerimientos de seguimiento, pudiendo por tanto considerarse de gran importancia social. No hay estudios previos que analicen un cribado en población de alto riesgo, expuestos a posibles carcinógenos industriales por exposición laboral, si un método no invasivo en muestras de orina podría cribar la presencia del tumor, para su detección precoz.

Alteraciones epigenéticas y geneticas estan involucradas en la tumorigenesis y progresión del cáncer vesical. Como cualquier enfermedad molecular ambiental, el cáncer vesical se produce tras la exposición ambiental a distintos agentes carcinogénicos como se reconocen el tabaco y por la exposición laboral asi como la acumulación secuencial de multiples alteraciones geneticas y epigenéticas. Estas alteraciones moleculares resultan en una proliferación celular descontrolada, deregulación del ciclo celular y diferenciación, disminución en la muerte celular o apoptosis, bloqueo de invasión y metastasis (Sánchez-Carbayo 2012). Las alteraciones particulares geneticas, epigenéticas y de expresión proteica ocurren como parte de la interacción de estas rutas de señalización, y determinaran el comportamiento biologico del tumor, incluyendo su capacidad de crecer, recurrir, progresar y metastatizar. En funcion del perfil genético, el comportamiento clínico, los tumores vesicales se pueden asignar dentro de dos subgrupos principales (Sánchez-Carbayo et al, 2007). Las alteraciones mas comunes en tumores no musculo invasivos papilares de bajo grado incluyen la activacion mutacional de FGFR3, perdida de heterozigosidad (LOH) del cromosoma 9, activacion mutacional de los genes PIK3CA y RAS y la inactivacion mutacional de TSC1 (Sánchez-Carbayo 2012). Alteraciones comunes en los tumores musculo-invasivos incluyen la inactivacion de TP53 y RB1, la reduccion de la expresión de PTEN expresión (via mutacion, LOH, deleccion homocigota u otros mecanismos), amplificacion de ERBB2, amplificación de 6p22, delecciones en el cromosoma 8 y otras alteraciones Genómicas cuyas dianas aun no han sido caracterizadas. Asignar a uno de estos subgrupos ya proporciona información no sólo diagnóstica sino pronóstica. Sin embargo predecir la evolución clínica en funcion del conocimiento actual no es totalmente preciso y ninguna de las alteraciones genéticas moleculares descritas hasta ahora tanto individualmente como en combinación han sido aplicadas en la practica clínica habitual como marcadores tumorales para la monitorización de la enfermedad. La hipermetilación y los microRNAs (miRNAs) representan las alteraciones epigenéticas mas estudiadas. La hipermetilación de las islas CpG esta

frecuentemente asociada con el silenciamiento transcripcional de genes críticos en cáncer, incluyendo supresores tumorales (Sánchez-Carbayo M, 2012). La inactivación epigenética por hipermetilación y por miRNAs se ha descrito para genes involucrados en la tumorigenesis y progresión del cáncer vesical (Puerta et al, 2012). Genes inactivados por hipermetilación incluyen CDKN2A, RUNX3, o RASSF1, entre otros (Sanchez-Carbayo 2012). En nuestro grupo hemos identificado la metilación de varios genes en cáncer vesical como SOX9 (Alemán et al, 2008a), PMF1 (Alemán et al, 2008b), myopodin (Cebrián et al, 2008), y KiSS-1 (Cebrián et al, 2011), que añaden valor clínico como biomarcadores diagnóstico y pronóstico en cáncer vesical. Creemos que la estrategia de este proyecto permitiera caracterizar cómo estas alteraciones integradas con otras alteraciones genéticas y epigenéticas ya conocidas, y nuevas alteraciones epigenéticas que se identifiquen en la población de riesgo y se evalúen en cáncer vesical, permitieran mejorar la clasificación clínica de los tumores vesicales y permitir la detección precoz de la enfermedad en población de alto riesgo, en una muestra no invasiva, la orina.

Necesidad de factores diagnósticos, pronósticos y terapias alternativas personalizadas en cáncer vesical. Los tumores vesicales se caracterizan clínicamente por su alta tasa de recurrencia y su mal pronóstico una vez que invaden la capa muscular (Siegel et al, 2015). Los tumores de urotelio T1G3 e *in situ* se consideran de alto riesgo por su alta probabilidad de recurrir y progresar a enfermedad músculo-invasiva y metastásica. La inmunoterapia intravesical con el Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) representa una terapia empírica de gran éxito en estos pacientes beneficiándose por su disminución en las tasas de recurrencia y progresión (Siegel et al, 2015). A pesar de la eficacia superior de BCG sobre la resección transuretral sola o con quimioterapia intravesical, más del 50% de los tumores no-invasivos recurren o persisten. Este es un problema destacado en los pacientes de alto riesgo, con CIS, invasión de la submucosa (estadio T1), y papilares de alto grado ya que aumenta el riesgo de progresión y disminuyendo la probabilidad de curación con cirugía conservadora de la vejiga y evitar la cistectomía. Un gran número de estos pacientes no responde a la inmunoterapia con BCG; y sus tumores no sólo persisten y recurren sino que progresan invadiendo y metastatizando. A pesar de la prometedora sensibilidad y especificidad para predecir respuesta a BCG en estos tres tipos de pacientes de alto riesgo en enfermedad no músculo invasiva, que representa el 80% de los pacientes con cáncer vesical, ninguno de los biomarcadores predictivos descritos hasta ahora ha sido totalmente introducido en práctica clínica habitual (Sánchez-Carbayo 2012). Se necesitan marcadores no sólo diagnósticos para detectar la enfermedad, sino pronósticos y predictivos que puedan permitir diferenciar lesiones leves de aquellos tumores letales para poder proporcionar procedimientos terapéuticos adaptados a la agresividad individual de cada tumor. En este sentido, hemos descrito como candidatos identificados metilados en cáncer vesical, como Myopodin o PMF1, tanto la metilación como la expresión de la proteína por inmunohistoquímica de estos genes u otros identificados mediante técnicas de alto impacto como ezrin, en arrays de tejidos juegan un papel importante como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta a BCG en pacientes de alto riesgo con tumores T1G3 (Alvarez-Múgica M et al, 2010, 2013). Se desconoce el mecanismo de

acción terapéutica de BCG, así como las vías por las que estos genes juegan un papel predictivo. Podría así esperarse que la identificación y caracterización de perfiles epigenéticos en población de alto riesgo podría no sólo revelar nuevos candidatos diagnósticos asociados con etapas iniciales en la tumorigénesis del cáncer vesical sino factores pronósticos y predictivos de respuesta a las terapias actuales en tumores no invasivos de alto riesgo, y así sugerir estrategias que mejoren la eficacia de las opciones actuales no sólo para el diagnóstico precoz sino también terapéuticas o sugerir nuevas dianas terapéuticas de interés para este tipo de pacientes.

Tecnologías de alto impacto como medio de identificación de alteraciones epigenéticas en cáncer vesical. Los avances de las tecnologías de alto impacto para el análisis molecular de los tumores permiten explorar los perfiles genéticos, epigenéticos y de proteína característicos de distintos subtipos tumorales y así identificar dianas y rutas moleculares que definan un comportamiento clínico concreto. Distintos grupos, incluido el nuestro, han utilizado perfiles de transcritos, genómicos y proteómicos de tumores y fluidos biológicos para identificar perfiles y candidatos individuales que permitan clasificar distintos subtipos de cáncer vesical, así como rutas moleculares involucrados en la tumorigénesis y progresión del cáncer vesical (Sánchez-Carbayo et al, 2012). Como ejemplos, myopodin y KiSS-1, algunos de los candidatos con los que trabajamos funcionalmente en el laboratorio, fueron identificados como genes diferencialmente expresados a nivel de transcrito mediante el uso de arrays de cDNA y oligonucleótidos en líneas de cáncer vesical y tumores de vejiga. La aplicación de tecnologías de alto rendimiento para identificar alteraciones epigenéticas, genéticas, a nivel de transcrito y proteína han sido descritas por nuestro grupo, incluyendo las técnicas planteadas en este proyecto, desde la primera publicación en arrays de CpG para metilación en tumores vesicales, la optimización y uso de MS-MLPA en cáncer vesical con fines diagnósticos en orina y pronósticos en tejido y orina (Cabello et al, 2011; Agúndez et al, 2011; Sacristán et al, 2014; García-Baquero et al, 2014), o la detección de miRNAs en la orina (Puerta-Gil et al, 2012). Sin embargo, habiendo optimizado metodologías en fluidos biológicos, que sirven como resultados preliminares para apoyar la viabilidad de la propuesta, se necesita más investigación en esta arena para expandir las observaciones iniciales y trasladar la identificación de candidatos moleculares biológicos en biomarcadores diagnósticos de la enfermedad. El reto sigue siendo optimizar la cuantificación multiparamétrica de candidatos seleccionados en muestras no invasivas y mejorar el diagnóstico, la estratificación tumoral y el pronóstico de la evolución clínica, midiéndose de manera que pueda traducirse y aplicarse en la práctica clínica habitual que pueda beneficiar a los pacientes con cáncer vesical. Nuestra estrategia se basa en usar la información característica de tumores vesicales y orinas parejas para seleccionar candidatos concretos y diseñar paneles multiparamétricos específicos de cáncer vesical, y que puedan ser cuantificados por métodos sencillos y aplicables a la práctica clínica de rutina tanto en tumores parafinados como en la orina, muestra no invasiva. Los perfiles epigenéticos tendrán un impacto clínico en el manejo del paciente con cáncer vesical. Los resultados de este proyecto suponen un avance en el estado actual del tema no sólo porque los perfiles multiparamétricos estarán medidos por tecnologías de última

generación sino porque permitieran permitir un diagnóstico no invasivo hacia la detección precoz de la enfermedad en población de alto riesgo expuesta laboralmente a carcinógenos relacionados con la tumorigénesis uroepitelial.

1. 2.- OBJETIVOS

Los objetivos centrales y específicos que se plantearon inicialmente en este proyecto fueron los siguientes:

El **objetivo científico central** es evaluar si la caracterización de rúbricas moleculares epigenéticas clínicamente relevantes en cáncer vesical permiten identificar individuos con cáncer vesical o propensos a la enfermedad en una población de alto riesgo. La caracterización de las alteraciones epigenéticas en esta población de alto riesgo permitiría seleccionar aquellas más específicas según el tipo de carcinógenos en estudio en diversos sectores industriales. Aquellas alteraciones más discriminadoras y específicas podrían desarrollarse y convertirse en marcadores tumorales en orina multiparamétricos, y que mejorar la detección precoz del cáncer vesical no invasivo en orina en población de alto riesgo laboral, lo que conllevaría a la prevención de riesgo laboral en población expuesta.

Los **objetivos concretos** necesarios para realizar este objetivo preventivo central de identificar pacientes con cáncer vesical o alto riesgo de padecer la enfermedad son:

- 1.- Identificar aquellos individuos que presentan microhematuria y cáncer vesical en una población de alto riesgo laboral. Se seleccionarían los individuos con microhematuria en los que se confirme la presencia de cáncer vesical clínicamente mediante citología urinaria y/o cistoscopia
- 2.- Identificar rúbricas moleculares epigenéticas* que permitan distinguir pacientes con cáncer de vejiga de individuos sin la enfermedad, mediante el análisis comparativo de los perfiles epigenéticos mediante arrays de islas CpG de metilación y de miRNAs obtenidos de muestras urinarias de individuos con cáncer vesical de la población de riesgo.
- 3.- Evaluar la significación biológica y clínica de la evaluación de la rúbrica molecular en tejidos vesicales mediante el análisis de las alteraciones epigenéticas en los tumores por MS-PCR, q-RT-PCR y el análisis de los perfiles proteicos mediante inmunohistoquímica en arrays de tejidos para evaluar su utilidad en la estratificación tumoral (estadio y grado) y el pronóstico clínico de la evolución de la enfermedad (recurrencia, progresión, supervivencias específica y global).
- 4.- Diseñar, optimizar y evaluar la utilidad diagnóstica de un ensayo epigenético de metilación y de miRNAs que será patentado, desarrollado industrialmente, y validado en tres series independientes de muestras urinarias de individuos de poblaciones de alto riesgo laboral para el diagnóstico del cáncer vesical (detección precoz de la enfermedad).
- 5.- Evaluar la asociación de las alteraciones epigenéticas encontradas con la exposición a determinados carcinógenos de los diversos sectores industriales en estudio

*Las rúbricas moleculares epigenéticas se definen como la combinación de varios candidatos (20-30) hipermetilados y de miRNAs en orina. Es esperable que genes candidatos de manera individual proporcionen también una alta rentabilidad diagnóstica para la detección precoz de la enfermedad.

2.- METODOLOGÍA: tareas, logros y limitaciones

Tarea 1: Recogida de orina: Las muestras de orina se intentaron recoger en tres empresas que se habían seleccionado arbitrariamente, representando tres sectores diversos del sector industrial de Euskadi (Sidenor, Petronor, Michelin), pero por el miedo empresarial a poderse detectar alguna alteración asociada a la exposición laboral no se pudo realizar en el lugar de trabajo de los empleados. Se ha intentado contactar a las empresas por todas las vías posibles, por contacto directo a los directores y gestores, y mediante contacto a los médicos de empresa, que se sentían amenazados en perder su puesto laboral si facilitaban el estudio. Por lo que tras 5 meses de intento fallido se decidió aplicar un abordaje más difícil porque requería el análisis de un mayor número de muestras para seleccionar posteriormente aquellas asociadas a la exposición laboral. Se han recogido en alrededor de 4 meses 220 muestras de orina que se han seleccionado entre muestras de pacientes en los servicios de Urología cuando los trabajadores presentaban signos o síntomas relacionados con el cáncer vesical y voluntariamente acudieron en el período del estudio a visitar a su médico de cabecera y/o urólogo. Se han recogido muestras de 30 a 50 ml de orina en 220 individuos. Las muestras se congelaron *in situ* en los hospitales a -80C, donde el IP llevó nieve carbónica en cajas de poliespan para recoger las muestras mensualmente y se transportaron al centro de investigación Lucio Lascaray Ikergunea donde se realizó su mantenimiento en el congelador de -80C solicitado hasta la realización de las investigaciones propuestas.

El objetivo específico que pretendemos es seleccionar 40-50 candidatos de los genes y miRNAs coincidentes diferencialmente expresados en las orinas con microhematuria y cáncer vesical confirmado para ser empleadas en las técnicas de arrays epigenéticos de alto impacto. Los arrays de CpG y miRNA utilizados incluyen un número de candidatos lo suficientemente alto como para identificar al menos 40-50 candidatos diferencialmente expresados entre los grupos con valores p de significación inferiores a 0.001. Así, el número de 50 muestras analizadas por grupo es aceptable y consistente con una fórmula conocida para el cálculo de tamaño muestral. Asumiendo un error de tipo I error de 0.001 y una desviación estándar de 0.45, el tamaño muestral de 50 podría detectar diferencias de expresión de al menos un rango de >2 de variación entre los grupos con un poder estadístico del 95%.

Hemos conseguido 220 orinas en este período de las que se han podido seleccionar 98 orinas de individuos asociados con exposición laboral de riesgo, y el resto se han podido utilizar como controles sin riesgo por exposición laboral. La presencia o ausencia de cáncer vesical para asignar a una orina como perteneciente al grupo de los casos con cáncer vesical o de los controles sin cáncer vesical se confirma por cistoscopia, el método diagnóstico de referencia, ya que se ha contado con la información tanto de la cistoscopia como de la citología urinaria cuando era procedente y se disponía de ella.

Siguiendo la estrategia resumida previamente, una vez hayamos identificado y caracterizado los perfiles de 40-50 candidatos, se espera que estos se puedan convertir en ensayos nuevos específicos de MS-MLPA y miRNA para el cáncer vesical, por lo que el tamaño muestral de las series de entrenamiento y validación propuestos en este proyecto (200 de cada serie)

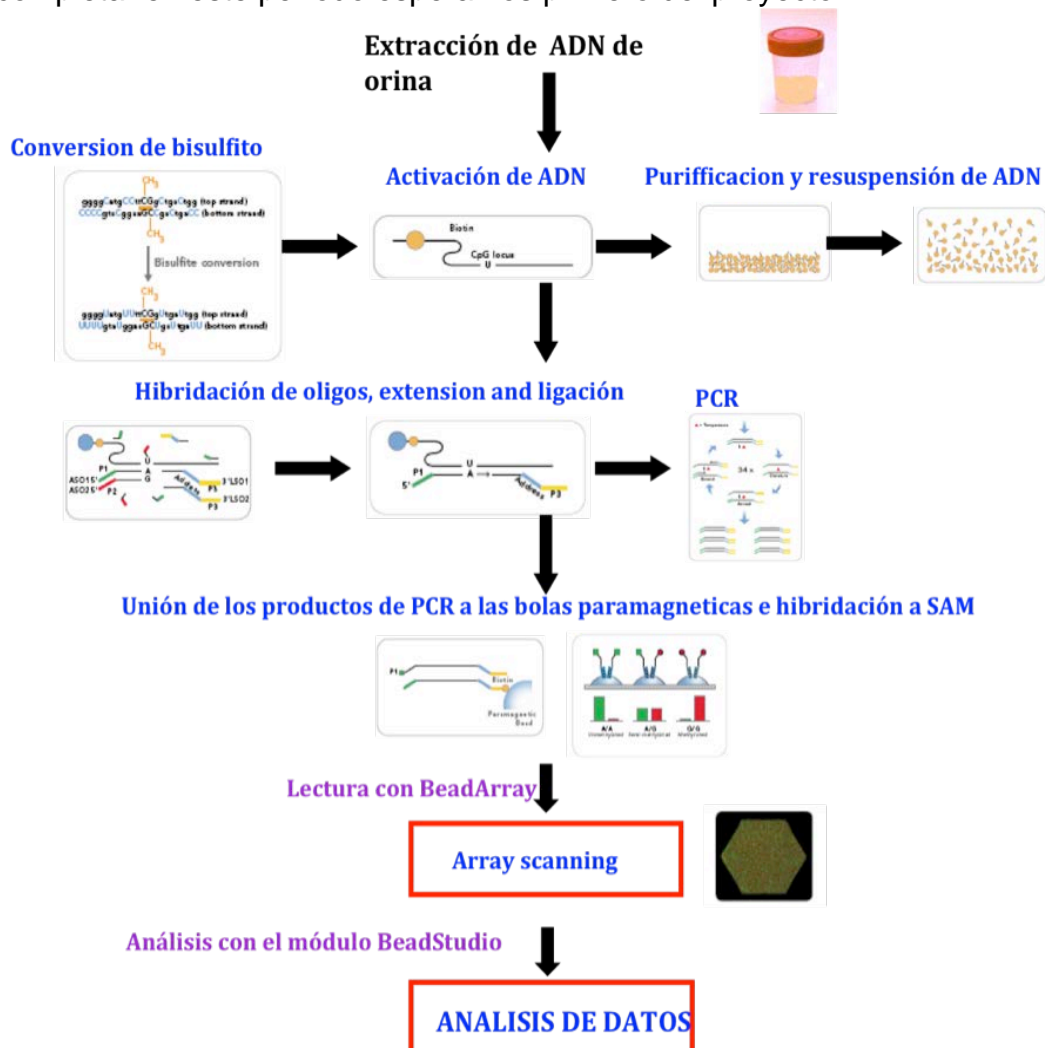
tendrían una exactitud diagnóstica superior al 80% con un valor p significativo de 0.05, y una ratio probabilística de 2.0. Esta estimación es aceptable y consistente si se espera que al menos un 70% de los tumores tendrán islas CpG diferencialmente metiladas o miRNAs diferencialmente expresados comparativamente con los controles, una proporción esperable según lo descrito en distintas tecnologías de alto impacto (Aleman et al, 2008; Sanchez-Carbayo et al, 2006, Lopez et al, 2014). Con relación a la sensibilidad, nos gustaría encontrar una sensibilidad diagnóstica con un poder predictivo superior al 80%. Con el tamaño muestral planeado de 200 individuos, tendremos un poder del 87% para rechazar la hipótesis nula de exactitud diagnóstica del 80% si la exactitud diagnóstica real fuera del 90%, y un poder predictivo del 99% si la exactitud diagnóstica real fuera del 95%. Ambos cálculos asumen un error estándar del tipo I de 0.05, y están basados en cálculos binomiales exactos. Con relación a la evaluación de la especificidad en el grupo control, pretendemos obtener un mínimo de una especificidad del 80% en individuos sin cáncer vesical con una probabilidad del 90% (considerando una desviación del 10%). La inclusión de 200 individuos es aceptable y consistente con estas estimaciones. Esperamos poder completar esta recogida de 400 individuos en la continuación de este proyecto.

No se ha aplicado ninguna restricción con relación a la edad o al sexo del paciente. Sin embargo, todos los individuos seleccionados han sido mayores a 40 años, siguiendo la prevalencia e incidencia del cáncer vesical, ya que el cáncer de vejiga es poco frecuente en individuos menores de 40 años. Con relación al sexo, el cáncer vesical es una enfermedad asociada al sexo, y en la población seleccionada se han recogido muestras de 6 hombres por cada muestra de mujer, en línea con lo esperado. Los individuos controles se seleccionaron con sexo y edades parejos al grupo de los casos. Hay que destacar que en el proceso de recogida de muestra se ha realizado un cuestionario una recogida de datos epidemiológicos de factores de riesgo de la enfermedad, no sólo el tipo de trabajo y la duración de la realización a lo largo de la vida laboral sino también incluyendo el hábito tabáquico, tipo de tabaco, cantidad y duración.

Tarea 2: Evaluación de microhematuria: Se ha determinado la presencia oculta de sangre en todas las orinas recogidas la orina, ya que es un signo inicial de sospecha de la presencia de cáncer vesical. La evaluación de la presencia de hemoglobina en orina, se ha realizado mediante *dipsticks* de Roche, que son tiras reactivas de orina que por método colorimétrico permite cuantificar el grado de microhematuria basado en la presencia de hemoglobinuria. Estas tiras reactivas también permiten detectar la presencia de leucocituria y de nitritos como signos de una potencial infección urinaria. Estas determinaciones se han realizado por la investigadora principal en el momento de la descongelación en el laboratorio del Lucio Lascaray Ikergeña, ya que ella es especialista vía FIR en Análisis Clínicos. Se ha realizado adicionalmente en todas las orinas positivas para la presencia de microhematuria, un análisis microscópico del sedimento y citología urinaria para descartar y confirmar la presencia o ausencia de infección urinaria, o disfunción renal en función de la morfología celular. Este primer análisis ha permitido un primer asesoramiento clínico para descartar la presencia de cáncer vesical, sino que en el proyecto ha permitido seleccionar a los

individuos que presenten un mayor grado de hematuria en los que tras recibir la información de la presencia o ausencia de cáncer vesical mediante la cistoscopia realizada por el servicio de Urología y la información de la citología urinaria independiente realizada por el servicio de Anatomía Patológica ha permitido seleccionar a los individuos más adecuados para las investigaciones con arrays epigenéticos.

Tarea 3: Perfiles de metilación de ADN en muestras de orina: Para establecer los perfiles globales de metilación de ADN de 93 orinas, usamos una combinación de tratamiento de bisulfito del ADN extraído de las muestras de orina, con un marcaje competitivo e hibridación en un array de oligonucleotidos que mide 6,900 islas CpG (Illumina). La relación entre lo que se hibrida a Cy-3 (verde) y a Cy-5 (rojo) establecerá el estado de metilación de cada isla CpG para diferenciar a casos y controles. El análisis bioinformático se ha realizado con los programas Beadstudio (Illumina) y con microarrays POMELO, y modelos multiparamétricos de inteligencia artificial. Esta tarea se ha realizado en el Laboratorio de Oncología Traslacional dirigido por la IP en colaboración con la plataforma de Genómica en CNIO y en la Universidad del País Vasco para la hibridación de los arrays. Se resume a continuación las fases que se han desarrollado en los arrays de CpG ya realizados en este período, que es la parte que más ha dado tiempo a completar en este período esperamos primero del proyecto:



Tarea 4: Perfiles de expresión de miRNAs en muestras de orina: Usando las mismas muestras analizadas por metilación en el apartado anterior se pretende analizar los perfiles de 850 miRNA usando un array comercial de oligonucleotidos de miRNAs (Agilent). En este caso se utilizará RNA total en el cual se encuentran los miRNAs. Los análisis se realizarán individualmente para cada orina, en duplicado y con inversión de marcaje. Se creará una mezcla de muestras control (con 8 muestras diferentes) que contengan al menos 2 muestras de urotelios normales, y 2 tumores de bajo grado no invasivo, 2 de alto grado no invasivo y 2 de musculo-invasivo para comparar las muestras individuales. Esta tarea realizará en el Laboratorio de Oncología Traslacional dirigido por la IP en colaboración con la plataforma de Genómica en Universidad del Pais Vasco para la hibridación de los arrays.

Tarea 5: Análisis bioinformático: Los análisis de comparación de los arrays realizados con las orinas se han realizado por diversos metodos. El primero usa técnicas estadísticas tradicionales con el metodo BRB (R Simon, NIH, Bethesda), y Statistical Analysis of Microarrays (SAM, Stanford) para identificar perfiles asociados con distintos estadios de la enfermedad (usando por una parte el valor de significación p y por otra el indice de detección falsa o FDR). El análisis jerarquizado no supervisado se ha realizado usando los programas Cluster 3.0 y Treeview (de Eisen). El análisis supervisado jerarquizado se ha realizado usando el programa POMELO (CNIO). En paralelo, se está empleando otro metodo analitico usando inteligencia artificial (NeuroFuzzy Modelling) que permite construir algoritmos iterativos para medir el efecto mediante modelaje en la clasificacion e identificación de candidatos relevantes tras alterar, incluir or retirar cada locus (isla CpG o miRNA) de manera individual o combinada. Este metodo ordena cada alteración diferencialmente expresada entre los grupos en estudio determinando su relevancia sin tener en cuenta asumpciones estadísticas a priori. De estos metodos, se determina el panel de alteraciones epigenéticas (incluyendo containing islas CpG y/o miRNAs) que sean diagnosticos para el cáncer vesical. Los análisis de secuenciación masiva usando el sistema Solid de Applied Biosystems se realizaran para seleccionar de nuestro perfil epigenético aquellos miRNAs mas prevalentes, para identificar los candidatos que puedan ser mas prometedores. Esta tarea se realizará en el Laboratorio de Oncología Traslacional dirigido por la IP en colaboración con la plataforma de Genómica en Universidad del Pais Vasco para la hibridación de los arrays. Por limitación de tiempo y presupuestaria no se ha podido abordar el análisis de miRNAs que se relaiará en futuras convocatorias.

Tarea 6: Análisis funcionales para asociar la hipermetilación de genes candidatos con su silenciamiento: La asociación de la metilación de candidatos identificados en el perfil epigenético al combinar la fase de descubrimiento usando arrays de CpG en orinas y tumores con el silenciamiento de esos genes se ha comenzado a evaluar en líneas tumorales de cáncer vesical. Se desearía poder evaluar y optimizar 40-50 genes candidatos pero por limitación tanto de tiempo como de presupuesto se ha podido comenzar a caracterizar al menos para un gen. El estado de metilación se ha establecido mediante la optimización de dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) de metilación en ADN tratado con bisulfito. Se han diseñado primers para realizar dos procedimientos. Por una parte el estado de metilación se ha analizado por secuenciación de las islas CpG en

ADN bisulfitado, y por otra se han diseñado PCRs de metilación con primers específicos para el ADN metilado o no metilado. Como análisis complementario, se ha realizado el perfil molecular de dos líneas de cáncer vesical tras ser tratadas con azacitidina, un agente demetilante, mediante arrays de expresión de 44,000 sondas (G44K de Agilent de 75 KB de resolución). La recuperación de la expresión de los candidatos silenciados por hipermetilación se ha confirmado mediante RT-PCR, Western blot (WB) e inmunofluorescencia. Estamos familiarizados con estas técnicas como puede observarse en nuestras publicaciones (Aleman et al, 2008; Sanchez-Carbayo et al, 2006, Lopez et al, 2014). Esta tarea se está realizando íntegramente en el Laboratorio de Oncología Traslacional dirigido por la IP.

Tarea 7: Identificación de dianas de los miRNAs del perfil epigenético, y análisis funcional para asociar el silenciamiento de dianas con miRNAs reguladores:

La asociación de los 40-50 miRNA candidatos del perfil epigenético identificados tras combinar la fase de identificación usando arrays de miRNA en orinas con el silenciamiento de dianas candidatas se quisiera evaluar en varias líneas de cáncer vesical. Se desea utilizar secuenciación masiva (de Applied Biosystems usando el sistema Solid) de estas líneas celulares para determinar la abundancia absoluta y el perfil de esos miRNAs en comparación con los análisis obtenidos de las mezclas de muestras analizadas en la tarea 4, pero no ha habido suficiente financiación para la realización de esta tarea. Las secuencias de miRNA se podrán analizar mediante la base de datos miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) y de la Universidad de California (<http://genome.cse.ucsc.edu>). El programa buscador de islas CpG se usará para miRNAs que se colocan en islas CpG, ya que se ha predicho que un 90% de los promotores de los miRNA humanos se localizan 1,000 bp upstream de los miRNA maduros. Finalmente, para investigar la relación entre miRNA, metilación y expresión, se realizará qRT-PCR mediante ensayos TaqMan para miRNAs. Para evaluar si el silenciamiento epigenético de miRNAs tienen relevancia funcional en cáncer para desarrollar una función tumorigénica, se evaluará el efecto en la expresión del gen presumiblemente regulado por un miRNA concreto. Puede predecirse las potenciales dianas moleculares mediante análisis computacional, utilizando la información disponible en Targetscan (www.targetscan.org/). Se confirmarán si estas dianas son reguladas por los miRNAs mediante análisis funcionales. Se transfectarán líneas celulares con precursores de miRNAs (Ambion), diseñadas para mimetizar miRNAs endógenos. La regulación de la expresión de los candidatos silenciados por miRNAs se confirmará mediante RT-PCR, Western blot e inmunofluorescencia. No se ha podido realizar esta tarea por limitación presupuestaria y de tiempo. Se desea solicitar financiación complementaria para poder completar los análisis correspondientes a los miRNAs.

Tarea 8: Evaluar la asociación del perfil epigenético con la estratificación clínica:

Los 40-50 candidatos más diferencialmente expresados del perfil epigenético identificados al combinar los análisis en orinas se pretenden validar mediante técnicas epigenéticas independientes en los bloques de parafina de una serie independiente de 150 tumores vesicales recogidos previamente para los estudios de validación en los ensayos de MS-MLPA y miRNA. Hasta este momento en este período solo ha dado tiempo a caracterizar sólo un gen de los 40-50 que se deseaba

evaluar por limitación presupuestaria y de tiempo. El aislamiento de ADN se ha realizado mediante macrodissección (FFPE miRNA kit, Qiagen). El panel epigenético detectado por los arrays de identificación se pretende validar adicionalmente en una serie de 200 tumores (estratificados por estadios clínicos, histomorfología, progresión a estadios más avanzados). Para caracterizar la metilación de islas CpG se ha extraído ADN de tejido parafinado que se ha tratado con bisulfito (Chemicon) para inducir cambios en la secuencia de metilación y así investigar regiones promotoras de interés. Para los miRNAs se utilizará en un futuro q-RT-PCR (Taqman platform, Applied Biosystems) así como *in situ* hybridisation (using LNA probes, Exiqon). Estas técnicas pueden aplicarse a tumores parafinados (FFPE). Además de los tumores utilizados en la serie independiente recogida retrospectivamente, realizaremos un mapeo histológico epigenético de cistectomías para detectar alteraciones epigenéticas tempranas en la vejiga. Estos análisis servirán para evaluar en que momento se podrían producir las alteraciones epigenéticas considerando el cáncer vesical como una enfermedad multifactorial y secuencial. Para este objetivo, analizaremos el perfil epigenético mediante técnicas de MS-PCR y q-RT-PCR en la serie definida de pacientes cistectomizados (n=100) en los que la línea de urotelio global puede ser caracterizada. Acceso a las variables histopatológicas y al seguimiento de los tumores vesicales permitirán un análisis de la estratificación tumoral y la evolución clínica para los candidatos epigenéticos en evaluación. Las asociaciones entre candidatos y variables clínicas se evaluarán mediante análisis estadísticos no paramétricos (Mann-Whitney y Kruskal-Wallis). En la evaluación diagnóstica, los candidatos se analizarán de manera continua o definiendo puntos de corte mediante curvas ROC. Las asociaciones con las variables de evolución clínica se analizarán de manera continua (Wald) o con distintos puntos de corte (log-rank), y con métodos multivariantes (Cox), y se representarán mediante curvas de Kaplan-Meier. Las asociaciones entre candidatos se analizarán mediante pruebas no paramétricas (Kendall). Estamos familiarizados con estas técnicas como puede observarse en nuestras publicaciones (Sanchez-Carbayo et al, 2006, Aleman et al, 2008; Lopez et al, 2014). Esta tarea se está realizando íntegramente en el Laboratorio de Oncología Traslacional dirigido por la IP. Como se indica, sólo ha podido comenzar a caracterizarse para un gen identificado hipermetilado, por limitaciones de tiempo y presupuestarias. Se desea solicitar financiación complementaria para poder completar los análisis correspondientes a los miRNAs.

Tarea 9: Evaluar el silenciamiento de genes críticos en tumorigénesis del perfil epigenético mediante inmunohistoquímica en arrays de tejidos (TMAs)

Los tejidos recogidos retrospectivamente previamente a este proyecto se han revisado por uropatólogos y la investigadora principal (ver publicaciones del grupo). Estamos familiarizados con estas técnicas como puede observarse en nuestras publicaciones (Sanchez-Carbayo et al, 2006, Aleman et al, 2008; Lopez et al, 2014). Para construir los TMAs se han seleccionado zonas representativas de estos tumores y de los urotelios normales y se han incluido al menos triplicados, y siempre que había disponible se ha incluido urotelio normal y displásico parejo. Si en el futuro es posible obtener los tejidos de los tumores parejos a las orinas estudiadas en este proyecto, se construirán arrays de tejidos también con estas

muestras. Los efectos de silenciamiento de uno de los genes validados *in vitro*, se está analizando por inmunohistoquímica en los TMA's, y se va a relacionar con los resultados obtenidos por MS-PCR de metilación. Los miRNAs se analizarán por Q-RT-PCR específicas. La inmunohistoquímica se está realizando íntegramente en el laboratorio de Oncología Traslacional supervisado por la IP.

Tarea 10: Evaluar la relevancia biológica de los genes identificados en el perfil epigenético en las líneas celulares de cáncer vesical: Se

quisiera haber podido abordar este objetivo en el cual se desea clasificar las líneas celulares en función de los perfiles epigenéticos para elucidar las consecuencias fenotípicas y transcripcionales de la modulación de genes en el perfil epigenético. Estos análisis podrían desarrollarse en el futuro, ya que por ausencia de tiempo y financiación no son viables en el transcurso de un año. Se estudiará a nivel molecular un panel de 10 líneas de cáncer vesical mediante arrays de islas CpG y miRNAs. Se realizarán ensayos funcionales para caracterizar la función biológica de los candidatos más relevantes y profundizar en el efecto de la modulación de la expresión de genes seleccionados candidatos *in vitro*. Esta experimentación requiere un período temporal superior al planteado en este proyecto. Ya disponemos de una serie de líneas celulares bien caracterizadas que nos permitan examinar las consecuencias funcionales de la manipulación de la expresión de genes candidatos del perfil epigenético identificado en el contexto de determinadas alteraciones genéticas y proteicas de estas líneas. Utilizaremos siRNAs y cDNAs en vectores para conseguir el silenciamiento o la sobreexpresión de genes seleccionados. Se evaluarán una serie de vectores con distintos marcadores de selección para caracterizar las alteraciones de manera individual o combinada. Se seleccionarían las líneas tumorales que mejor recapitulen el perfil epigenético observado en los tumores y orinas en estudio. El fenotipo de estas líneas tras modular la expresión de genes candidatos *in vitro* se asesorará mediante variaciones en proliferación, ciclo celular, invasión, migración y tumorigenicidad. Si se encuentran fenotipos muy novedosos, se examinarán mediante arrays de expresión.

Tarea 11: Optimizar & evaluar los ensayos del perfil epigenético en las tres series de orinas de las tres empresas: Estos análisis no han podido

llevarse a cabo aún y podrían desarrollarse en el futuro tras solicitar financiación en convocatorias próximas, ya que por ausencia de tiempo y financiación no son viables en el transcurso de un sólo año. Se pretende diseñar un ensayo de MS-MLPA seleccionando entre los 50 candidatos metilados en los individuos con microhematuria en los que se confirme la presencia de cáncer vesical y los controles sin la enfermedad confirmados por cistoscopia. Los candidatos seleccionados tendrán que estar metilados en la orina, teniendo en consideración los estudios *in vitro* funcionales y la validación clínica en serie independientes de tumores. Para los miRNAs se seleccionarían entre los 50 candidatos más diferencialmente expresados con los mismos criterios para diseñar un ensayo multiparamétrico basado en q-RT-PCR. Estos ensayos se evaluarían en las series de orinas a recoger, con un mínimo de 200 muestras de individuos trabajadores en industrias con riesgo incluyendo aquellas en las que se realizaron los arrays de CpG y miRNA arrays en las Tareas 3 y 4. Las sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y la exactitud diagnóstica de candidatos

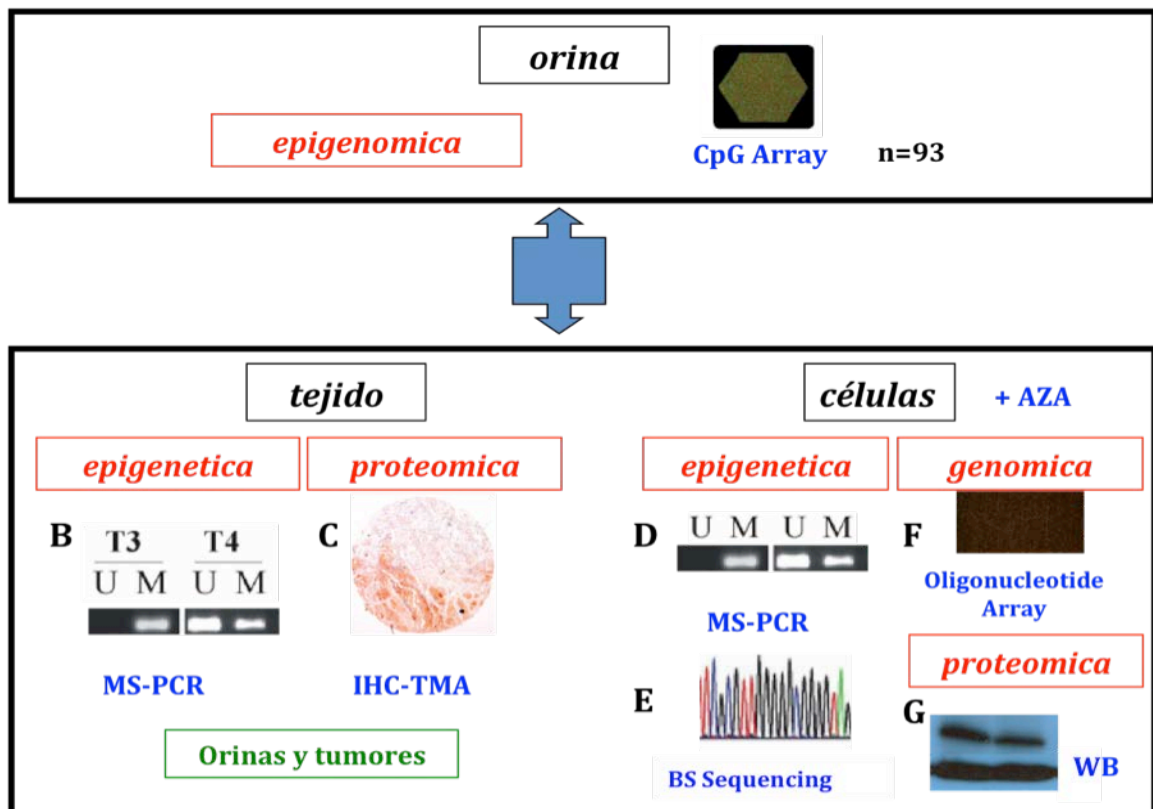
individuales y de los perfiles multiparamétricos se evaluarán los casos y controles (con y sin enfermedad) y con sin riesgo juntos. Se usarían modelos de inteligencia artificial para evaluar la utilidad diagnóstica de la serie.

4.- RESULTADOS

Diseño experimental

Se presenta a continuación un resumen de la estrategia y los resultados que ha dado tiempo a llevar a cabo en este año del proyecto presentado. Tras organizar la recogida de muestras de orina y caracterizar su microhematuria, en un primer lugar se ha analizado los perfiles de metilación de epigenómica mediante un array de metilación con 6900 islas CpG en 93 de las orinas recogidas. El análisis de estos perfiles ha servido para identificar genes candidatos asociados con la presencia de cáncer vesical en las muestras de orina seleccionadas. A continuación, se ha optimizado la metodología de epigenética para caracterizar la metilación mediante MS-PCR y poder determinar si genes seleccionados están metilados por técnicas alternativas tanto en tumores, líneas celulares y en el futuro en series de orinas independientes a las ya recogidas. Para evaluar si la hipermetilación de genes seleccionados se asocia con la pérdida de la expresión de los genes seleccionados, se ha tratado líneas celulares de cáncer vesical con azacitidina, un agente demetilante que permite recuperar la expresión de los genes si están metilados. Se confirma para BDNF, el gen seleccionado, la presencia de metilación no sólo por el array de CpG, sino por PCRs de metilación, secuenciación de bisulfito, y confirmando la recuperación de la expresión del gen mediante RT-PCR, western blot (WB) e inmunofluorescencia.

A



Recogida prospectiva de muestras: caracterización de orinas

Hemos conseguido recoger 220 orinas en este período de tiempo. La recogida real se ha llevado a cabo de marzo a junio de 2016 en el contexto hospitalario a diferencia del contexto industrial donde se planteó inicialmente dada las dificultades mostradas para organizar la recogida *in situ* al contactar a las empresas propuestas. En este muestreo de individuos con signos y síntomas relacionados con el cáncer vesical que acuden a visita al servicio de Urología, se han podido seleccionar 98 orinas de individuos asociados con exposición laboral de riesgo, y el resto se han podido considerar como controles sin riesgo por exposición laboral. La presencia o ausencia de cáncer vesical para asignar a una orina como perteneciente al grupo de los casos o de los controles se ha confirmado por cistoscopia, el método diagnóstico de referencia, ya que se ha contado con la información tanto de la cistoscopia como de la citología urinaria cuando era procedente y se disponía de ella.

De las 220 orinas que se han recogido, se ha constatado la presencia de cáncer vesical mediante cistoscopia en 44 orinas, de las cuales se han encontrado 35 pacientes con tumores vesicales no músculo invasivos, y 9 pacientes con tumores infiltrantes de la muscularis propia (pT2+). De estos pacientes con cáncer vesical, 32 pacientes han sido fumadores y 8 individuos con cáncer vesical se han vinculado con un trabajo que podría ser considerado de riesgo de exposición laboral al estarse en contacto con la industria del automóvil (n=3), caucho (n=3), y pinturas (n=2) durante al menos 15 años. Estos individuos han presentado tumores con estadios iniciales no-musculo invasivos pTA y PT1 de bajo grado. Se espera poder seguir recogiendo orinas de individuos con exposición laboral de riesgo a padecer cáncer vesical y poder ejecutar análisis estadísticos de los genes candidatos que se están identificando con un número suficiente de muestras.

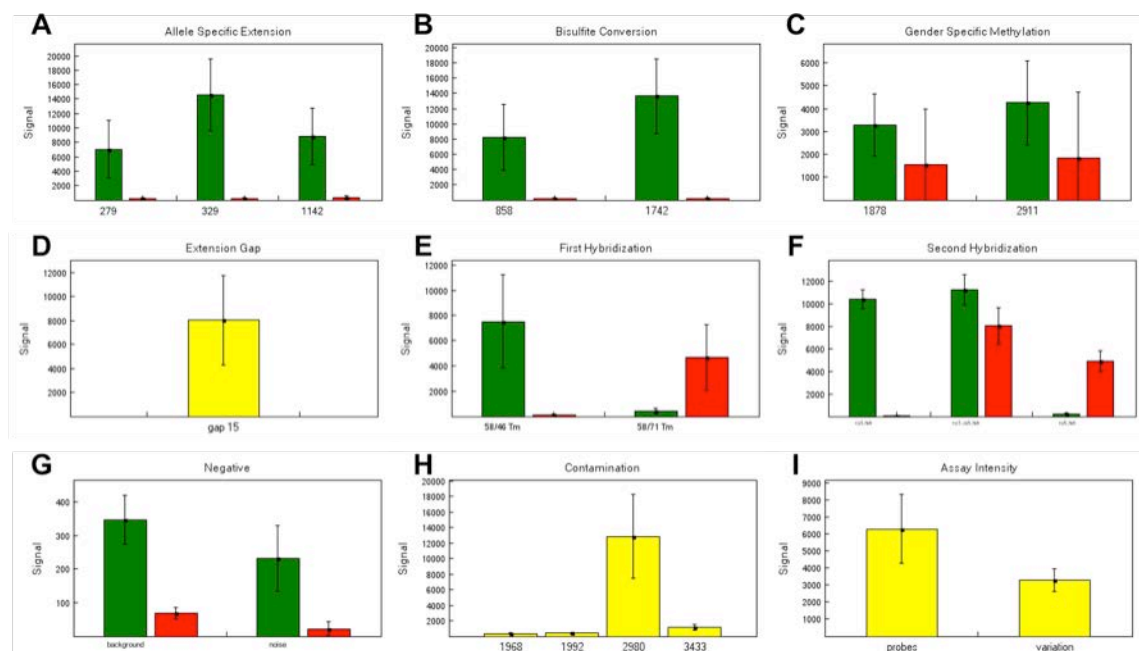
Con relación a la edad, todos los individuos con cáncer vesical evaluados han sido mayores a 40 años, siguiendo la prevalencia e incidencia del cáncer vesical, con una media de 59.2 +/- 6.8 años (rango: 44-82), ya que el cáncer de vejiga es poco frecuente en individuos menores de 40 años. Con relación al sexo, se han recogido muestras de 6 hombres por cada muestra de mujer, en línea con lo esperado. Los individuos controles sin enfermedad para los análisis siguientes, se han seleccionado con sexo y edades parejos al grupo de los casos con cáncer vesical.

Evaluación de microhematuria: Con relación a la presencia de hematuria macroscópica o microscópica, se han evaluado tiras reactivas en todas las orinas en estudio. En los pacientes con cáncer vesical (n=44), se ha encontrado hematuria macroscópica en 8 pacientes, hematuria microscópica en 17 pacientes, y sin hallazgos patológicos en 6 pacientes. En los individuos sin cáncer vesical (n=176), se ha encontrado hematuria macroscópica en 10 pacientes, y hematuria microscópica en 15 pacientes que se asociaron a procesos de hiperplasia benigna de próstata e infecciones del tracto urinario, respectivamente. Al seleccionar los 98 individuos que por su trabajo se les ha considerado individuos asociados con exposición laboral de riesgo, ninguno ha presentado hematuria macroscópica, 10 presentaron hematuria microscópica, de los cuales se detectó cáncer vesical en 6 pacientes, mientras que los 4 restantes fueron diagnosticados de una infección urinaria.

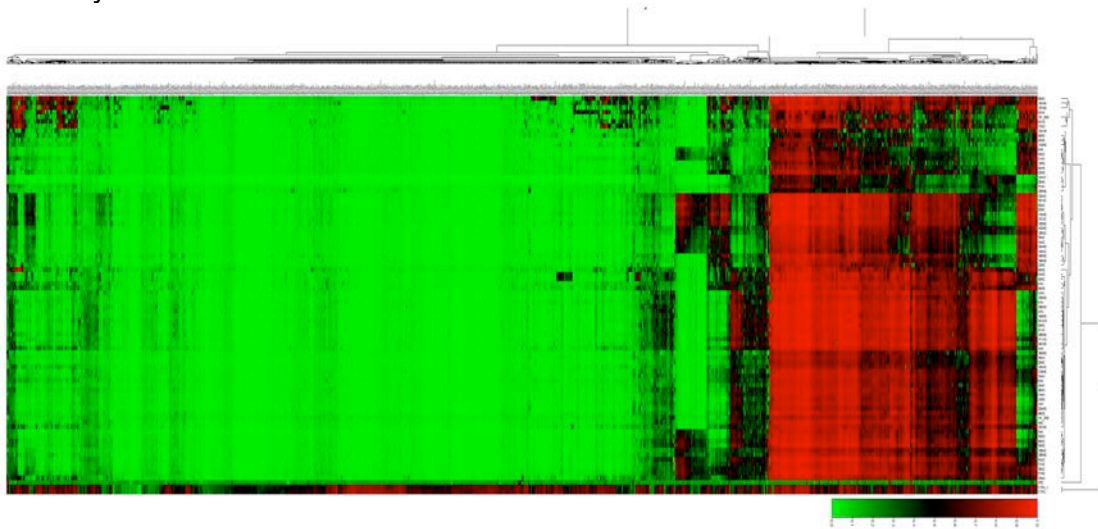
En esta población de 98 individuos con exposición laboral de riesgo se han encontrado 8 pacientes con cáncer vesical, de los cuales 6 presentaron hematuria microscópica y 2 no presentaron alteraciones en la tira reactiva de orina con relación a la hemoglobinuria.

Perfiles de metilación de ADN en muestras de orina: Para establecer los perfiles globales de metilación de ADN, se usó un array de oligonucleótidos que mide 6,900 islas CpG (Illumina), donde se han procesado 93 muestras de orina de las cuales se incluyeron 44 pacientes con cáncer vesical y 49 individuos sin cáncer vesical. Los pacientes con cáncer vesical tenían bajo grado en 25 casos, y alto grado en 19 casos y sus estadios fueron pTa (n=19), pT1 (n=17) y pT2+ (n=8). Tras una optimización del protocolo para ser empleado en muestras urinarias, se procedió a marcar e hibridar los 500 ng de ADN de las orinas recogidas y seleccionadas.

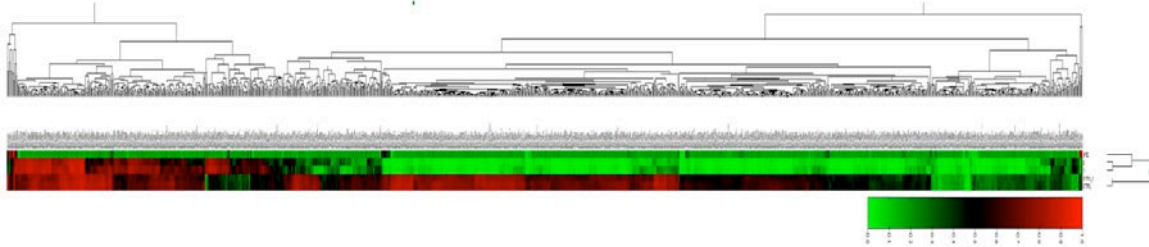
Una vez extraído el ADN de todas las orinas y tras haber evaluado su calidad en un Nanodrop, se procedió al marcaje de los ADNs de las orinas y su hibridación en los arrays. En primer lugar se realizó un análisis de control de calidad de los distintos procesos llevados a cabo en el tratamiento, marcaje e hibridación de los arrays así como unos primeros análisis iniciales que se muestran a continuación en los siguientes paneles: A) verificación de la extensión alelo específica; B) verificación de la conversión de bisulfito; C) verificación de la metilación de genes específicos de sexo (asociados a cromosomas X e Y); D) Control de la extensión; E) control de la primera hibridación; F) control de la segunda hibridación; G) control negativo; H) control de contaminación I) control de la intensidad del array. Todos los controles resultaron ser favorables indicando un proceso correcto en todos los procedimientos de la utilización de los arrays de CpG utilizados. Este primer análisis bioinformático se ha realizado con los programas Beadstudio de Illumina.



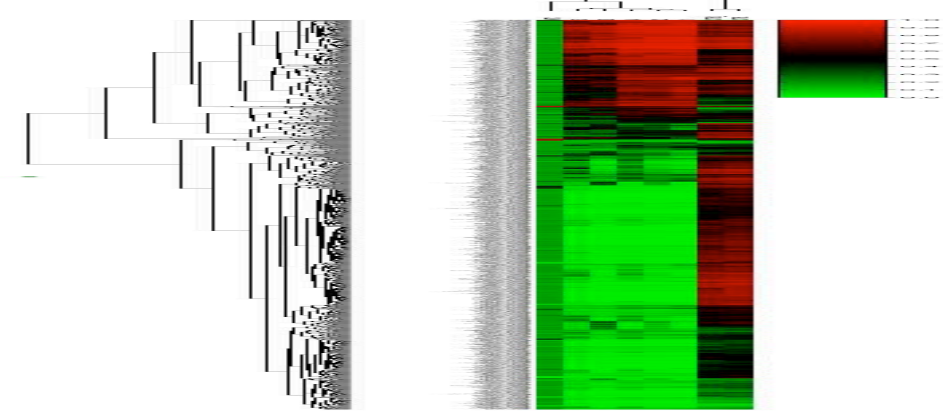
A continuación se muestra un análisis de agrupamiento no supervisado de los perfiles de metilación de todas las islas CpG analizadas en los arrays en todas las muestras analizadas. Estos análisis se han realizado con programas de Eisen desarrollado en Stanford, y para el análisis de microarrays POMELO, desarrollado en CNIO. Cada uno de los genes se muestran en vertical a lo largo de cada una de las muestras que se muestran en horizontal. La relación entre lo que se hibrida a Cy-3 (verde) y a Cy-5 (rojo) establecerá el estado de metilación de cada isla CpG para diferenciar a casos y controles.



Se han realizado también análisis de agrupamientos jerarquizados supervisados en los que se han agrupado las muestras según distintas categorías para revelar genes interesantes según el tipo muestral, el grado anatomopatológico o el estadio histológico que se muestra a continuación

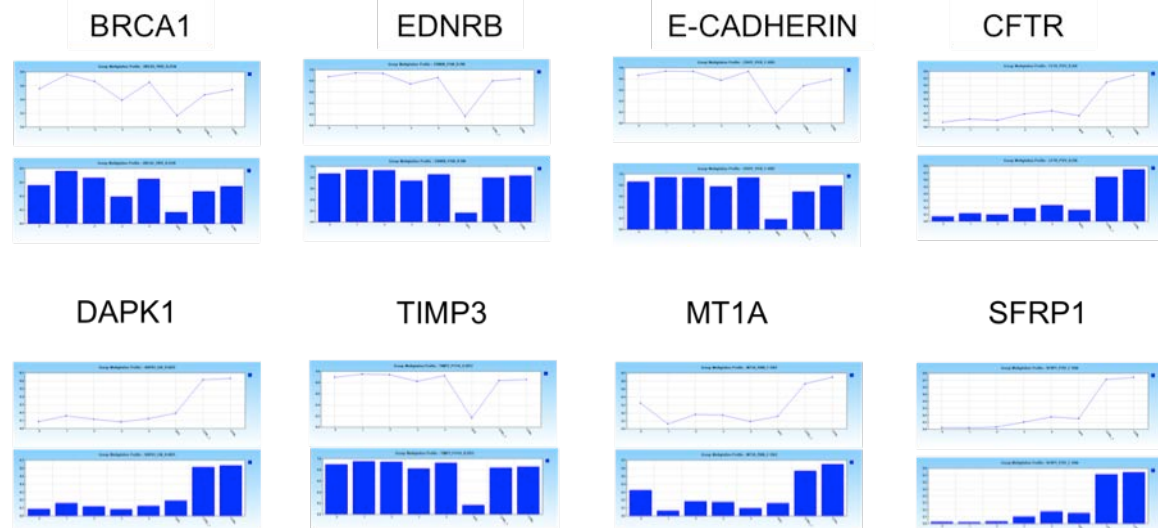


Este tipo de análisis también se ha realizado por el origen de las muestras



Se han identificado genes metilados en distintas muestras de cáncer vesical a lo largo de la iniciación y progresión de la enfermedad. Se muestran las variaciones en intensidad de distintos genes seleccionados por estar diferencialmente metilados a lo largo de las 8 muestras seleccionadas.

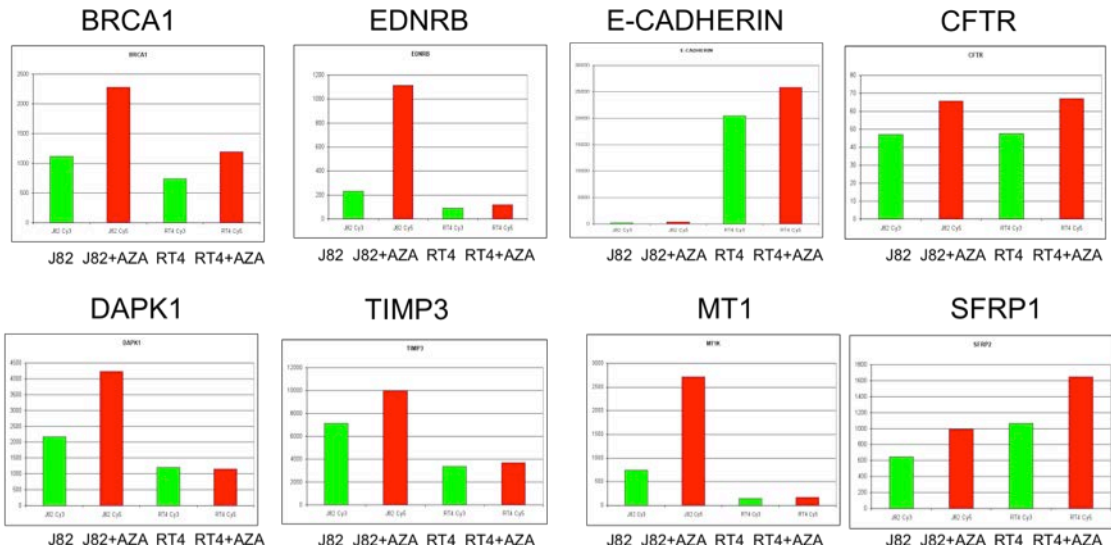
Los genes seleccionados tienen función supresora tumoral (BRCA1, SFRP1), o están implicados en el proceso de la transición epitelio mesenquimal (EDNRB, E-CADHERIN), y en procesos de apoptosis (CFTR, DAPK1) y de adhesión celular (TIMP3, MT1A).



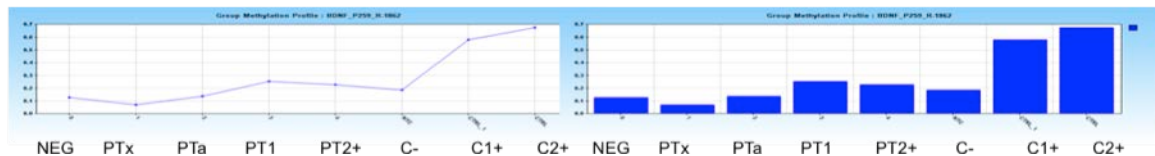
Estas graficas indican la variación en la intensidad y en los grados de metilación encontrados en las muestras analizadas. También refleja la gran utilidad del abordaje empleado para poder caracterizar muchos genes simultáneamente cuya caracterización individual requiere estudios muy focalizados destinados a ello. La caracterización de los genes identificados es clave para poder seleccionar aquellos genes candidatos que puedan aportar las mejores exactitudes diagnósticas tras ser validados en series independientes de casos y controles.

Análisis funcionales para asociar la hipermetilación de genes candidatos con su silenciamiento:

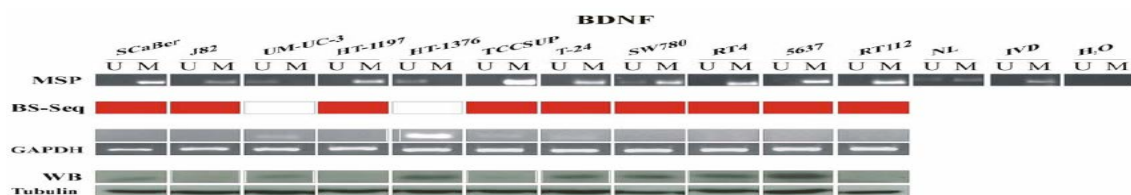
La asociación de la metilación de candidatos identificados en el perfil epigenético al combinar la fase de descubrimiento usando arrays de CpG en orinas con el silenciamiento de esos genes se ha comenzado a evaluar en líneas tumorales de cáncer vesical. Como análisis complementario, se ha realizado el perfil molecular de dos líneas de cáncer vesical tras ser tratadas con azacitidina, el agente demetilante, mediante arrays de expresión (Agilent). Puede observarse a continuación como en dos líneas celulares de cáncer vesical, RT4 y J82, la expresión de los genes mencionados previamente se incrementa al ser expuestas las líneas celulares a azacitidina, un agente demetilante, que recupera la expresión de los genes siempre que el gen este metilado y que no modifica la expresión del gen si no esta metilado. Puede observarse distintos perfiles y respues a azatidina en las dos líneas celulares en estudio.



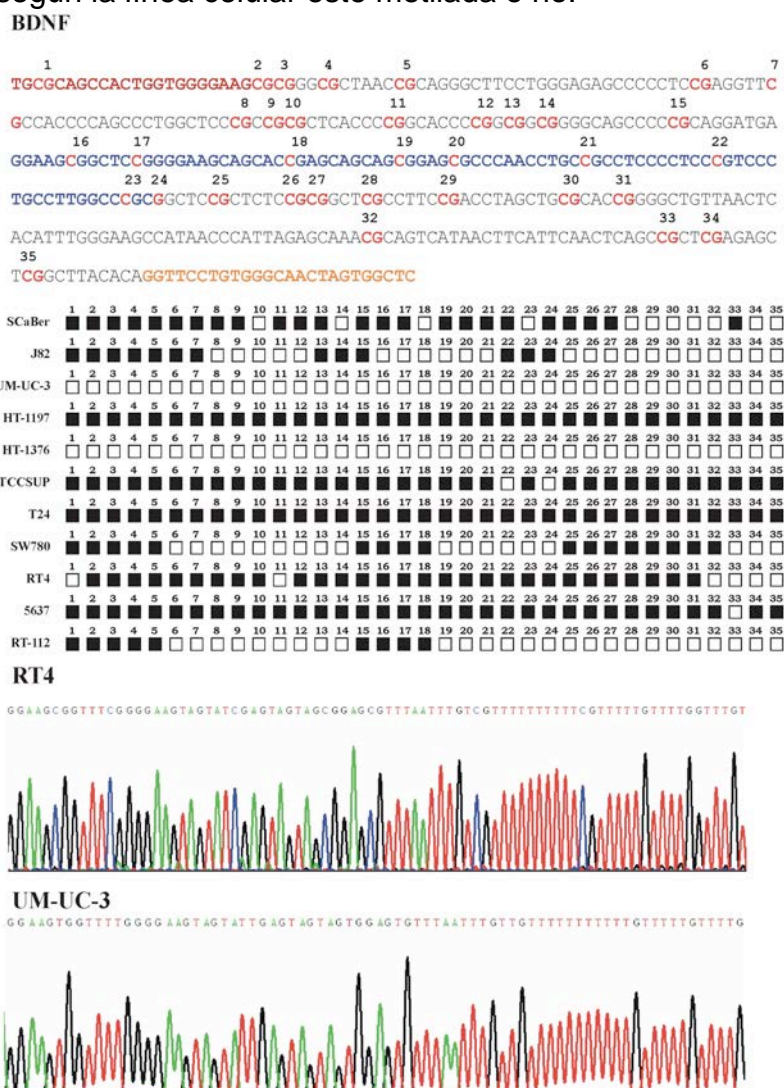
Caracterización de la relevancia biológica y clínica de la metilación de BDNF. La asociación de la metilación de candidatos identificados en el perfil epigenético al combinar la fase de descubrimiento usando arrays de CpG en orinas con el silenciamiento de esos genes se ha comenzado a evaluar integrando la información de líneas tumorales de cáncer vesical con la de tumores y con muestras de orina por métodos independientes, como es la reacción en cadena de polimerasa de metilación (MS-PCR). Se desearía poder optimizar 40-50 genes candidatos pero por limitación tanto de tiempo como de presupuesto se ha podido comenzar a caracterizar al menos para un gen seleccionado, BDNF, cuya caracterización se muestra a continuación. Puede observarse como el gen BDNF se encuentra diferencialmente metilado en orinas seleccionadas analizadas en el array de islas de metilación CpG.



El estado de metilación se ha establecido mediante la optimización de dos PCR de metilación en ADN tratado con bisulfito. Se han diseñado primers para realizar dos procedimientos para caracterizar la metilación de BDNF tanto *in vitro* con líneas celulares como con muestras humanas tanto de tejido como de orina por metodologías más asequibles, económicas y rápidas. Por una parte el estado de metilación se ha analizado por secuenciación de las islas CpG en ADN bisulfitado (BS-Seq), y por otra se han diseñado PCRs de metilación (MSP) con primers específicos para el ADN metilado o no metilado. Puede observarse que las líneas metiladas por secuenciación también están metiladas por MSP y pierden su expresión por WB.

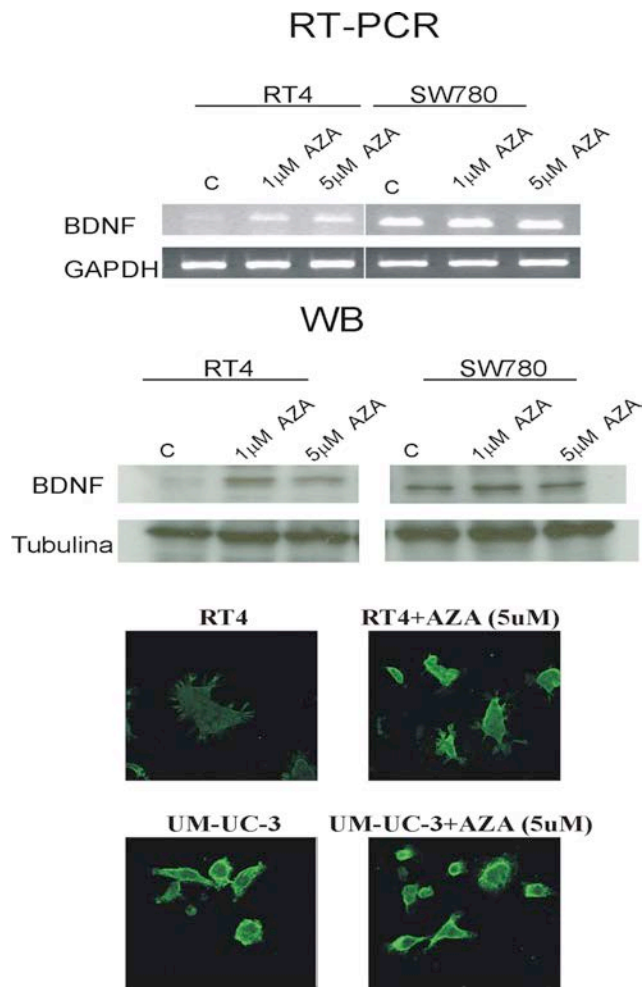


El siguiente panel muestra la caracterización mediante secuenciación de bisulfito del promotor de BDNF en distintas líneas celulares de vejiga. En la parte superior se indica la secuencia del promotor de BDNF que se ha estudiado y caracterizado para diseñar primers de secuenciación que se indican en rojo y naranja y la zona que se analiza en las PCRs de metilación que se indican en azul. Cada una de las islas CpG están numeradas del 1 al 35, que se han secuenciado en ADN de las 11 líneas celulares vesicales que disponemos en el laboratorio. Puede observarse que si una isla CpG está metilada se indica en los cuadrados en negro y si no está metilada se refleja con cuadrados en blanco. Hay líneas no metiladas (UM-UC-3 y HT1376) y otras metiladas en mayor o menor grado. En la parte inferior se muestra un cromatograma representativo de una línea celular metilada (RT4) y de otra línea celular no metilada (UM-UC-3) pudiéndose observar como el tratamiento con bisulfito cambia las islas CpG en los uracilos y en las timinas según la línea celular este metilada o no.

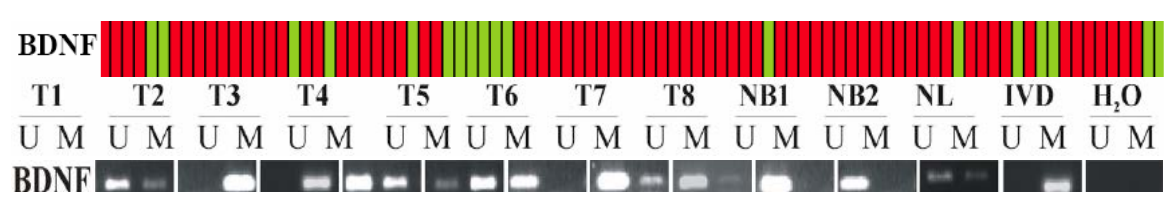


Para caracterizar que la metilación de BDNF es la responsable de su pérdida de expresión, se ha confirmado que tras un tratamiento con azacitidina, agente demetilante del ADN, se consigue recuperar la expresión de BDNF. La recuperación de la expresión de BDNF candidatos silenciados por hipermetilación se ha confirmado mediante RT-PCR, Western blot e inmunofluorescencia. Puede observarse como en la línea celular vesical RT4

que está metilada, la expresión de BDNF aumenta tras tratamiento con azacitidina tanto por RT-PCR a nivel de ARN, como a nivel proteina mediante WB y mediante inmunofluorescencia, donde el marcaje verde indica su aumento de expresión celular. En contraste, en la línea vesical SW780, que no está metilada, al tratar con azacitidina, no se observan cambios de expresión ni a nivel RNA ni a nivel de proteína.



Por último, se ha caracterizado la metilación de BDNF en una serie de 101 tumores vesicales, en los cuales se ha encontrado metilado en un 81.2% de los casos. La distribución del estadio histológico en estos tumores es de pTa (n=24), pT1 (n=32), pT2 (n=16), pT3 (n=25), y pT4 (n=4), siendo la distribución del grado histológico de bajo grado (n=24) y alto grado (n=77). Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la metilación de BDNF y el estadio histológico (p=0.027) y con el grado tumoral (p=0,005) mediante los métodos estadísticos de Kruskall-Wallis y Mann-Whitney, respectivamente



Para finalizar, se está intentando optimizar la medición de algunos candidatos identificados en el array mediante ELISAs, pero aún no ha dado tiempo a completar las determinaciones y los análisis correspondientes.

4.- UTILIDAD PRACTICA DE LOS RESULTADOS EN RELACION CON LA PREVENCION DE RIESGOS LABORALES

Los estudios previos del grupo de la investigadora principal realizando estudios de identificación de genes epigenéticamente alterados en muestras parejas de orina y tumor ya han demostrado que la muestra de orina permite mimetizar los tumores vesicales parejos, lo cual se reproduce y confirma en la experimentación llevada a cabo en este proyecto. Esto es clave ya que se espera que un porcentaje de células en la orina originadas de la descamación del tumor nos permitan reflejar las características biológicas del tumor, tanto para la utilidad de la detección precoz como para definir la agresividad del mismo.

En este proyecto hemos dado un paso adelante, el siguiente paso a nuestra línea de investigación, al aplicar el conocimiento biológico y tecnológico adquirido para la detección precoz del cáncer vesical focalizando en población de alto riesgo por su exposición laboral. Este abordaje es muy novedoso, por una parte no existen publicaciones previas que esten trasladando el conocimiento biológico y tecnológico para ser aplicado a una población expuesta a carcinogénicos industriales y por otra la tecnología aplicada permite valorar muchas alteraciones simultáneamente, lo que requiere una mayor caracterización posterior que deseamos poder continuar y completar en el futuro inmediato, ya que un año es un período muy limitado para completar un proyecto tan amplio.

Los resultados que se han realizado en este año son aun iniciales y piloto, ya que la estrategia planteada es muy ambiciosa y requiere una continuidad en los análisis propuestos. Por una parte para poder completar todos los análisis que se plantearon inicialmente, y por otra, para poder analizar un mayor número de muestras en población seleccionada, que además se debería poder seguir longitudinalmente en el tiempo para ver si en un futuro a medio plazo se desarrollan tumores vesicales nuevos.

El *leit motif* del proyecto es el poder identificar aquellos individuos más propensos dentro de un entorno laboral de riesgo a presentar un cáncer vesical que podrían ser tratados y/o monitorizados precozmente, evitando y previniendo una enfermedad agresiva. Esta estrategia es sobre todo innovadora al poderse realizar en la orina, una muestra facilmente obtenible y no invasiva. Nos gustaria poder continuar nuestros análisis porque creemos que la continuidad de los resultados iniciales podría ser expandible a distintas exposiciones ambientales, con una mejora social en la prevención de la enfermedad en población de alto riesgo para la sociedad vasca.

Las mayores limitaciones que hemos encontrado se relacionan con la dificultad de haber podido recoger las orinas directamente en las empresas. Al tener que cambiar la estrategia de recogida se ha perdido tiempo y velocidad en recoger muestras de individuos expuestos a ambientes laborales de alto riesgo. La siguiente limitacion ha sido relacionada en plantear un proyecto muy ambicioso a poder ser desarrollado en el tiempo planteado y con los recursos obtenidos. Se ha podido completar la parte de metilación aunque hubieramos deseado poder testar mas candidatos

individuales para luego poder combinarlos en un ensayo multiparamétrico. Por otra parte en la parte de miRNAs se ha conseguido extraer buen RNA de las orinas recogidas para realizar los arrays de miRNAs pero no se ha podido completar la validación de candidatos ni el desarrollo del ensayo multiparamétrico para la determinación de miRNAs por RT-PCR. Por ello, se solicitará financiación para enriquecer y completar este estudio en convocatorias similares próximas.

Creemos que hay valorar que ha sido posible solventar el parón inicial ante el bloqueo en la recogida de muestras inicialmente planteada en las empresas por la experiencia del grupo en cada uno de las áreas (y estrategias similares) de este proyecto. Se desea destacar el apoyo de disponer de los recursos tecnológicos y servicios de las plataformas de UPV, sobre todo por la plataforma de Genómica para arrays de CpG y oligonucleótidos, así como colaboraciones previas con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), donde la IP dirigió el grupo de Marcadores Tumorales, y por el acceso del grupo de Oncología Traslacional y la experiencia previa en herramientas bioinformáticas para el análisis de datos. Las colaboraciones clínicas ya establecidas por la investigadora principal en el contexto de Osakidetza han permitido acceso a las muestras clínicas, y su información clínico-patológica, y la revisión e interpretación clínico- histopatológica de los resultados.

Hay que destacar la utilidad práctica de los resultados de este proyecto, ya que los perfiles de metilación y la metilación de BDNF han permitido identificar los individuos con cáncer que se han analizado en este estudio. La generalización en el estudio con una población de mayor tamaño podría identificar qué individuos son más propensos a padecer cáncer vesical. Serán aquellos que presenten alguna alteración epigenética similar a las que presentan los pacientes con cáncer vesical ya evaluados. Se podría así detectar precozmente cáncer vesical porque aquellos con un gran número de alteraciones serán remitidos al centro de salud y al urólogo y podrá así ser descartado por cistoscopia mediante los métodos invasivos diagnósticos de referencia actuales la presencia de la enfermedad. No hay que olvidar que un cáncer detectado y curado precozmente es en una alta proporción de los casos un cáncer curado.

La estrategia que se ha planteado en este proyecto no se ha podido completar de manera global por el número limitado de muestras recogidas para poder responder a todos los objetivos ambiciosos planteados, así como la falta de tiempo y recursos limitados para la complejidad del proyecto. Estas limitaciones sugieren que en estudios posteriores podrían incluso identificarse aquellos eventos/alteraciones moleculares más específicos y/o asociados a cada exposición laboral ya que se evalúan un gran número de alteraciones moleculares a la vez. Esto sería muy interesante tanto biológica como epidemiológicamente para identificar las rutas de señalización involucradas en la tumorigénesis en cada una de las exposiciones ambientales por el entorno laboral.

El estudio está diseñado basándose en la estrategia de nuestro grupo de investigación de mejorar fases críticas en el manejo de un paciente oncológico como son el diagnóstico, la progresión del cáncer vesical y el pronóstico clínico mediante pruebas orientadas a responder cada una de estas fases, en este caso en la detección precoz y la prevención de la

enfermedad. Creemos que la continuación de este proyecto de investigación translacional con un mayor tiempo para la recogida de muestras permitirá confirmar la utilidad de la rúbrica molecular epigenética ya identificada en la orina para la detección precoz de la enfermedad en poblaciones laborales de alto riesgo. Además de las pruebas diagnósticas multiparamétricas como perfiles, marcadores individuales que de tiempo a ser caracterizados y desarrollados podrían desempeñar un papel importante diagnóstico o predictivo, y esta utilidad clínica podría también patentarse y ser introducida no sólo en el entorno industrial sino en los laboratorios clínicos de manera automatizada.

Las contribuciones científico, técnicas y clínicas de este proyecto presentan una gran utilidad y aplicabilidad clínica por el carácter innovador de la estrategia planteada. Este estudio es pionero describiendo la selección de perfiles epigenéticos para el diseño de pruebas de metilación basados en los resultados de arrays de CpG para la detección precoz de la enfermedad en población de alto riesgo. Así, por ejemplo hemos podido identificar como BDNF como marcador diagnóstico es novedoso al ser identificado de una rúbrica molecular epigenética de metilación diferencialmente expresada en muestras urinarias, y líneas celulares, y validada clínicamente en tejidos vesicales independientes. Esta selección multiparamétrica es una variable crítica que aumenta la capacidad de las pruebas diagnósticas empleadas para detectar patrones epigenéticos específicos de cáncer de vejiga para esta población de alto riesgo incluso en estadios iniciales de la enfermedad. Este campo representa un análisis no explorado para la detección precoz de la enfermedad en muestras no invasivas, la orina, y más aun en el contexto de prevención de riesgos laborales.

La caracterización de BDNF como una de las alteraciones epigenéticas características de los casos con lesiones preneoplásicas y tumores vesicales ha permitido contribuir a la caracterización biológica de los eventos moleculares implicados en la tumorigénesis de los tumores vesicales. La medición de la metilación de BDNF en una serie de muestras de mayor número permitirá asociar el grado de metilación a la distinta exposición a diferentes carcinogénicos según el entorno laboral en estudios posteriores.

El abordaje innovador de este proyecto esta representando no sólo un ejercicio tecnológica y clínicamente relevante, sino también un cambio potencial en el manejo clínico de los individuos expuestos laboralmente a agentes carcinogénicos relacionados con cáncer vesical. La identificación de los patrones epigenéticos asociados con la presencia tumoral permitiría seleccionar aquellos individuos con sospecha que podrían ser monitorizados de manera más cercana y prevenirse la aparición de la enfermedad. Podría caracterizarse la prevención del riesgo de adquirir la enfermedad desde la detección precoz en orina a la estratificación de la agresividad del tumor.

A nivel de prevención laboral, la identificación de incidencias elevadas de BDNF y de alteraciones epigenéticas que aun no han podido caracterizarse en población de alto riesgo permitirá identificar y sugerir posible focos carcinogénicos y revisar los mecanismos de funcionamiento industrial para prevenir la enfermedad en población activa laboralmente.

Estas observaciones indican que este proyecto ha permitido abrir una línea de investigación que podría tener una relevancia biológica, tecnológica

y clínica no sólo a corto y medio plazo, sino que podría utilizarse como base para futuros diseños experimentales, que deseamos completar en próximas convocatorias. Podría generalizarse así la implantación de los resultados del proyecto a la práctica clínica mediante técnicas más económicas y asequibles para la sanidad pública como ELISAs que estamos empezando a optimizar en orina de las que se beneficiarían no sólo los pacientes afectados de cáncer vesical sino los individuos expuestos a potenciales agentes carcinogénicos, no sólo para su diagnóstico no-invasivo permitiendo la detección y la monitorización del cáncer vesical, sino también para la prevención de su enfermedad.

A nivel prevención de riesgos laborales, la utilidad clínica es muy relevante no sólo para el individuo, sino para los sectores industriales, Osalan y el sistema de salud. **Para el individuo** porque por presentar o no alguna alteración epigenética en una muestra no invasiva, la orina podrán obtenerse información, sobre si tienen o no cáncer vesical, así como su propensión al mismo. **Para Osalan y el sistema de salud** ya que de los resultados y conclusiones validadas y expandidas a series de un mayor número de muestras y caracterizando más de las alteraciones identificadas, podría ofrecerse esta estrategia preventiva en una muestra de orina en distintos sectores industriales y laborales. Es posible o esperable que se pudiera además **identificarse algún sector industrial** con un mayor riesgo una mayor incidencia o propensión al cáncer vesical, donde se pudiera revisar todo el circuito de producción para la identificación de nuevos carcinógenos, o para sugerir un control exhaustivo de algunos de los procedimientos y/o protocolos industriales que podrían mejorarse para la prevención de la enfermedad,

5.- CONCLUSIONES FINALES Y POSIBLES RECOMENDACIONES

1.- Ha sido posible organizar la recogida de muestras de orina de pacientes con cáncer vesical y de individuos de riesgo por exposición laboral. Este proceso ha llevado casi la mitad de tiempo del desarrollo del proyecto anual y una vez optimizado, se solicitará financiación para poder completar todo el proyecto planteado inicialmente. En la serie de muestras recogidas hasta el momento se ha conseguido optimizar en el nuevo laboratorio de Oncología Traslacional, los protocolos de extracción de ADN y ARN, de manera que la cantidad y calidad de ácidos nucleicos en la orina está siendo lo suficientemente elevada para los análisis propuestos. Además de las técnicas de MS-PCR descritas (Aleman et al BJC, 2008; J Pathol, 2008; Clin Can Res, 2008),

2.- Hemos conseguido realizar perfiles de metilación que pueden aplicarse para el diagnóstico del cáncer vesical en muestras de orina. Hemos conseguido aplicar los arrays de CpG en muestras urinarias y en tumores parejos en un array de 1500 islas CpG usando 500 ng de DNA genómico inicial. Estos estudios confirman que es factible realizar estos análisis de alto impacto en muestras urinarias para proponer las estrategias innovadoras descritas para este proyecto. Hemos conseguido obtener cantidades variables entre 250 y 2000 ng de RNA total de muestras de orina de un volumen de 40-50 ml que podremos utilizar en un futuro proyecto para el análisis de miRNAs. Aunque la celularidad de las orinas es variable, trabajando con la fracción celular de las orinas, no hemos encontrado que la cantidad de RNA pueda ser limitante, ya que hemos conseguido la

optimización de la medida multiparamétrica de miRNAs partiendo de una cantidad total de RNA total inferior a 100 ng. Estos estudios confirman que es factible proponer estos análisis de alto impacto con arrays de miRNAs con un gran número de candidatos en el futuro proyecto a solicitar. Consideramos a pesar de haber sido capaces de optimizar las técnicas, que nuestros resultados son preliminares ya que deseamos poder continuar con una mayor caracterización de los miRNAs.

3.- Hemos identificado a BDNF como un gen metilado y alterado en la tumorigénesis y progresión del cáncer vesical con utilidad para el diagnóstico no invasivo en orina y estratificador en muestras tisulares.

Tras identificar que BDNF es uno de los genes metilados en el array de islas CpG de metilación, un análisis posterior de validación clínica usando series independientes de tumores y de técnicas independientes como PCRs específicas de metilación permitieron asociar la metilación del identificado BDNF con variables clínicopatológicas. La realización por inmunohistoquímica en arrays tisulares construidos con los bloques de parafinas de los tumores analizados por MS-PCR permitirá correlacionar la hipermetilación de BDNF con su silenciamiento genético y variables clínicopatológicas. Estos resultados apoyan el uso de estas metodologías de alto impacto para la identificación de genes metilados críticos en la tumorigénesis del cáncer de vejiga. Más aún, justifican la necesidad de validaciones de otros candidatos que también se han identificado en este proyecto. Por estos motivos se solicitará financiación adicional en convocatorias siguientes para poder analizar más genes identificados en esta serie, así como para aumentar la recogida de muestra y poder seleccionar un mayor número de individuos con riesgo laboral para completar y definir su utilidad diagnóstica. El análisis de estos candidatos en series independientes en tumores permitiría también evaluar la especificidad de los genes candidatos metilados en el cáncer vesical, identificadas en la orina de individuos expuestos laboralmente a carcinógenos relacionados con cáncer vesical.

4.- Las alteraciones epigenéticas de metilación identificadas en tumores de vejiga pueden detectarse en muestras de orina.

Hemos identificado un perfil de metilación característico de cáncer vesical en la serie de muestras analizadas. Por otra parte hemos identificado cómo la metilación de BDNF puede detectarse en muestras de orina usando ADN tratado con bisulfito extraído de muestras de orina. Estos análisis muestran que es posible detectar en la orina metilación con fines diagnósticos. Más aún, estas observaciones indican que las células cáncerosas de vejiga se detectan en la orina, muestras que permiten compararse y mimetizar los tumores vesicales, una hipótesis de trabajo importante en este estudio. Nos gustaría poder optimizar y caracterizar más candidatos de los que hemos identificado y para ello solicitaremos financiación en próximas convocatorias. La presencia de células no cáncerosas en la orina apoyan la necesidad de una serie de análisis complementarios que también hemos abordado: por una parte nos gustaría continuar comparando los perfiles de la orina de los individuos expuestos laboralmente a carcinógenos relacionados con cáncer vesical con tumores vesicales independientes en el proceso de identificación de los candidatos de metilación mediante arrays de CpG para aumentar la especificidad de los candidatos identificados por cáncer vesical; por otra parte

nos gustaría diseñar y evaluar la utilidad diagnóstica al combinar distintos genes identificados para ser medidos simultáneamente en métodos diagnósticos que se diseñen de “methylation specific multiple ligation probe amplification” (MS-MLPA) con los que hemos trabajado previamente y que no hemos podido desarrollar por falta de tiempo y financiación. Nos gustaría poder seguir la recogida de muestras incluyendo un número elevado de orinas de individuos pertenecientes a diversos sectores industriales.

Como conclusiones globales finales se destaca:

1.- Los arrays de islas CpG de metilación han permitido identificar perfiles y candidatos individuales nuevos epigenéticos que son relevantes clínica y biológicamente en la tumorigénesis y progresión del cáncer vesical, con utilidad para la detección precoz de la enfermedad.

2.- La caracterización de BDNF en muestras tisulares, orina y líneas celulares de manera integrada ha permitido identificar un nuevo gen que está silenciado epigenéticamente por metilación y que tiene utilidad clínica para el diagnóstico y la estratificación tumoral de los pacientes con cáncer vesical.

3.- Es necesario aumentar la recogida de muestra para identificar un mayor número de individuos de riesgo y consolidar los resultados ya obtenidos.

4.- Es necesario caracterizar otros candidatos identificados tanto a nivel de metilación como de miRNAs y realizar validaciones complementarias e independientes para definir marcadores que también permitan una detección precoz no invasiva, incluso mejorando los resultados presentados hasta el día de hoy. Se solicitará financiación en convocatorias próximas para poder enriquecer los resultados de este proyecto.

RECOMENDACIONES: Agradecimiento y continuidad del estudio

Deseamos agradecer a OSALAN el haber podido comenzar a desarrollar este proyecto, que supone un reto de trasladar el conocimiento biológico y técnico a la utilidad social en un sector concreto de alto riesgo para la prevención de la enfermedad. El proyecto ha permitido hallazgos innovadores en la caracterización biológica, funcional y clínicamente de nuevas alteraciones tumorigénicas en el contexto de la iniciación de la enfermedad que podrán ser útiles para la detección precoz generalizada al aumentar el tamaño muestral de población laboral en riesgo. Deseamos poder completar el abordaje planteado y para ello solicitaremos financiación en la próxima convocatoria ya que permitirá ejecutar los objetivos que no pudieron ser abordados para caracterizar la utilidad clínica de otros candidatos del perfil identificado en la detección precoz, identificar potenciales asociaciones de alteraciones con agentes carcinogénicos, desarrollar nuevos marcadores no invasivos útiles para la población de riesgo vasca, y para la prevención de la enfermedad en la sociedad en un ámbito más global.

6.- DIFUSION Y EXPLOTACION DE LOS RESULTADOS

Deseamos aumentar el tamaño muestral y completar con nueva financiación algunos objetivos que no han podido abordarse por las limitaciones del número de muestras, tiempo y de financiación. Los resultados una vez completados y consolidados serán visibles en la comunidad científica mediante la asistencia a congresos y a publicaciones en revistas reconocidas que permitan integrar conocimientos de la biología del tumor con investigación translacional como Eur Urol, JCO, J Urol, etc. Tras completar y abordar estos aspectos se espera enviar una comunicación al congreso

europeo de Urología (EAU), así como al congreso americano de Urología (AUA). Se espera escribir dos artículos, uno con los perfiles de los arrays y otro con la caracterización de BDNF. El desarrollo y confección del manuscrito final de estas características suele llevar desde inicio hasta el final un mínimo de 18-24 meses. Esperamos poder completar estos análisis y validaciones entre 2017-2018 para que sean visibles entonces a la comunidad científica con un aumento de casuística y validación.

Este proyecto ha estado centrado en la caracterización de una rúbrica molecular epigenética de cáncer vesical en poblaciones de alto riesgo expuestas a carcinógenos relacionados con cáncer vesical que pueda convertirse en una prueba para la detección precoz en este contexto laboral, que podría ser patentada y desarrollada industrialmente.

Tanto los perfiles, marcadores individuales podrían desempeñar un papel importante diagnóstico o predictivo, y esta utilidad clínica podría también patentarse y ser introducida no sólo en el entorno industrial sino en los laboratorios clínicos de manera automatizada. Tanto los ensayos multiparamétricos como los marcadores diagnósticos individualmente identificados y desarrollados en este proyecto serán patentados y desarrollados tecnológica e industrialmente. La explotación de estos resultados será llevada a cabo siguiendo las directrices y el apoyo institucional de Osalan y la UPV.

7.- BIBLIOGRAFIA

- Agundez M, Grau L, Palou J, Algaba F, Villavicencio H, **Sanchez-Carbayo M.** Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *Eur Urol* 2011;60:131-40.
- Aleman, A., Adrien L, Lopez-Serra L, Cordon-Cardo C, Esteller M, Belbin TJ, **Sanchez-Carbayo M.** Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays. *Br J Cáncer*, 2008, 98: 466-73.
- Aleman A, Cebrian V, Alvarez M, Lopez V, Orenes E, Lopez-Serra L, Algaba F, Bellmunt J, López-Beltrán A, Gonzalez-Peramato P, Cordon-Cardo C, García J, del Muro JG, Esteller M, **Sánchez-Carbayo M.** Identification of PMF1 methylation in association with bladder cancer progression. *CCR* 2008, 814:8236-43.
- Alvarez-Múgica M, Fernández-Gómez JM, Cebrian V, Fresno F, Escaf S, **Sánchez-Carbayo M.** PMF-1 methylation predicts BCG response in patients with high grade non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur Urol* 63:364-70, 2013.
- Alvarez-Múgica M, Cebrian V, Fernández-Gómez JM, Fresno F, Escaf S, **Sánchez-Carbayo M.** Myopodin methylation is associated with clinical outcome in patients with T1G3 bladder cancer. *J Urol*. 2010;184:1507-13.
- Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A, Heredero O, Palacios A, Urrutia M, Fernández JM, López-Beltrán A, **Sánchez-Carbayo M.** Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagn*. 2011;13:29-40.
- Canesin G, Gonzalez-Peramato P, Palou J, Urrutia M, Cordon-Cardo C, **Sánchez-Carbayo M.** Galectin-3 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Tumour Biol*, 31:277-85, 2010.

- Carreon T, Hein MJ, Hanley KW, Viet SM, Ruder AM. Bladder cancer incidence among workers exposed to o-toluidine, aniline and nitrobenzene at a rubber chemical manufacturing plant. *Occup Environ Med* 71, 175-82, 2014.
- Cebrian V, Alvarez M, Aleman A, Palou J, Bellmunt J, Gonzalez-Peramato P, Cordón-Cardo C, García J, Piulats JM, **Sánchez-Carbayo M**. Discovery of myopodin methylation in bladder cancer. *J Pathol* 2008, 216:111-9.
- Cebrian V, Fierro M, Orenes-Piñero E, Grau L, Moya P, Ecke T, Alvarez M, Gil M, Algaba F, Bellmunt J, Cordon-Cardo C, Catto J, López-Beltrán A, **Sánchez-Carbayo M**. KISS1 methylation and expression as tumor stratification biomarkers and clinical outcome prognosticators for bladder cancer patients. *Am J Pathol* 2011, 179:540-546.
- Christensen M, Hansen J, Ramlau-Hansen Ch, Toft G, d' Amore F, Kolstad H. 0177 Exposure to styrene and the risk of cancer: a long term follow-up study of workers in the Danish reinforced plastics industry. *Occup Environ Med* 71, A82-3, 2014.
- Colt JS, Friesen MC, Stewart PA, Donguk P, Johnson A, Schwenn M, Karagas MR, Armenti K, Waddell R, Verrill C, Ward MH, Freeman LE, Moore LE, Koutros S, Baris D, Silverman DT. A case-control study to occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med* 71: 667-74, 2014.
- Fernandez, A.F. et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* (2011).
- Fernandez-Gomez J, Solsona E, Unda M, et al. Prognostic Factors in Patients with Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated with Bacillus Calmette-Guérin: Multivariate Analysis of Data from Four Randomized CUETO Trials. *Eur Urol* 53: 992, 2008.
- García-Baquero R, Puerta P, Beltran M, Alvarez M, Sacristan R, Alvarez-Ossorio JL, **Sánchez-Carbayo M**. A novel panel of tumor suppressor genes in urine brings forward non-invasive diagnosis and prognosis of bladder cancer: a two center prospective study. *J Urol*, 190:723-30, 2013.
- López V, González-Peramato P, Suela J, Serrano A, Algaba F, Cigudosa JC, Vidal A, Bellmunt J, Heredero O, **Sánchez-Carbayo M**. Identification of Prefoldin amplification in bladder cancer using comparative genomic hybridization (CGH) arrays of urinary DNA and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in tissue arrays. *J Transl Med*, 11:182, 2013.
- Orenes-Piñero E, Cortón M, González-Peramato P, Algaba F, Casal I, Serrano A, **Sánchez-Carbayo M**. Searching urinary tumor markers for bladder cancer using a two dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) approach. *J Prot Res*, 6:4440-8, 2007.
- Orenes-Piñero E, Barderas R, Rico D, Casal JI, Gonzalez-Pisano D, Navajo J, Algaba F, Piulats JM, **Sánchez-Carbayo M**. Serum and tissue profiling in bladder cancer combining protein and tissue arrays. *J Proteome Res.* 2010 Jan;9(1):164-73.
- Palou J, Rodriguez O, Segarra J, et al. Restaging transurethral resection of high risk superficial bladder cancer improves the initial response to bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Urol* 176:407, 2006.
- Palou J, Algaba F, Vera I, Rodriguez O, Villavicencio H, **Sánchez-Carbayo M**. Protein Expression Patterns of Ezrin Are Predictors of Progression in T1G3 Bladder Tumours Treated with Nonmaintenance Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol*, 56:829-36, 2009

- Park D, Stewart PA, Coble JB. A comprehensive review of the literature on exposure to metalworking fluids. *J Occup Environ Hyg* 6: 530-41, 2009.
- Puerta-Gil P, García-Baquero R, Yuanyuan A, Ocaña S, Alvarez-Múgica M, Alvarez-Ossorio JL, Cordon-Cardo C, Cava F, **Sánchez-Carbayo M**. miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and non-invasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Am J Pathol* 180 1808-15, 2012.
- Ruppen I, Grau L, Orenes-Piñero E, Ashman K, Gil M, Algaba F, Bellmunt J, **Sánchez-Carbayo M**. Differential protein expression profiling by iTRAQ-two-dimensional LC-MS/MS of human bladder cancer EJ138 cells transfected with the metastasis suppressor KiSS-1 gene. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9:2276-91.
- Rushton L, Hutchings SJ, Fortunato L, Young C, Evans GS, Brown T, Bevan R, Slack R, Holmes P, Bagga S, Cherrie JW, Van Tongeren M. Occupational cancer burden in Great Britain. *Br J Cancer*, 107: S3-7, 2012.
- **Sanchez-Carbayo M**, Schwarz K, Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Mundel P. Tumor suppressor role for myopodin in bladder cancer: loss of nuclear expression of myopodin is cell-cycle dependent and predicts clinical outcome. *Oncogene* 2003; 22:5298-305.
- **Sanchez-Carbayo M**, Socci N, Saint F, Lozano JJ , Cordon-Cardo C. Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays. *JCO* 2006, 24:778-89.
- **Sanchez-Carbayo M**, Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer progression. *Semin Oncol* 34:75, 2007.
- **Sánchez-Carbayo M**. Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications. *Tumour Biol* 33:347-61, 2012.
- **Sánchez-Carbayo M**. Urine epigenomics: a promising path for bladder cancer diagnostics. *Exp Rev Mol Diagn*, 12:429-32, 2012.
- Seidler A, Brunning T, Taeger D, Mohnwe M, Gawrych K, Bergmann A, Haerting J, Bolt HM, Straif K, Harth V. Cancer incidence among workers occupationally exposed to dinitrotoluene in the copper mining industry. *Int Arch Occp Environ Health* 87: 117-24, 2014.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65;5-29.
- Vlaanderen J, Straif K, Ruder A, Blair A, Hansen J, Lynge E, Charbotel B, Loomis D, Kauppinen T, Kyronen P, Pukkala, Weidepass e, Guha N. Tetrachloroethylene exposure and bladder cancer risk: a meta-analysis of dry-cleaning worker studies. *Environ Health Perspect* 122:661-6, 2014.